

Łódź, 14.07.2023

Dr hab. inż. Maria Balcerek, prof. uczelni
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

**Recenzja pracy doktorskiej
mgr inż. Dagmary Poniewskiej
pt. „Enzymatycznie wspomagana ekstrakcja bioaktywnych inozytoli z nasion gryki
i jej możliwe zastosowania”**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Krzysztofa Żyły
w Katedrze Biotechnologii i Ogólnej Technologii Żywności
Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

*Podstawę formalną przygotowania recenzji stanowi uchwała rady dyscypliny
technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
oraz pismo Przewodniczącego rady dyscypliny technologia żywności i żywienia, dr hab. inż.
Marcina Łukasiewicza, prof. URK, z dnia 25.05.2023.*

Ocena celowości podjęcia problemu naukowego

Współcześni konsumenci coraz częściej wykazują zainteresowanie produktami spożywczymi o wysokiej zawartości składników bioaktywnych. Do surowców, których walory prozdrowotne są coraz bardziej doceniane należy gryka. Oprócz tego, że jest surowcem niezawierającym białek glutenowych, co jest istotne dla osób z nietolerancją glutenu, to jest także źródłem związków z grupy inozytoli, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka oraz wykazujących działanie prozdrowotne. Jednakże biodostępność inozytoli jest ograniczona, ponieważ w ziarniakach gryki występują one najczęściej w postaci kompleksów z innymi składnikami. Zatem zasadne jest opracowanie efektywnych metod ekstrakcji tych związków z ukierunkowaniem na wykorzystanie w procesach przetwórczych, m.in. w przemyśle spożywczym, co pozwoli na wytwarzanie produktów o pożądanym walorach sensorycznych i możliwie najwyższej wartości odżywczej. W świetle powyższych informacji, badania przeprowadzone przez mgr inż. Dagmarę Poniewską w ramach pracy doktorskiej, dotyczące enzymatycznie wspomaganą ekstrakcję bioaktywnych inozytoli z nasion gryki i jej możliwych zastosowań, uznaję za aktualne i uzasadnione. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań mogą posłużyć do opracowania technologii produkcji innowacyjnych napojów fermentowanych na bazie gryki. Produkcja takich napojów byłaby odpowiedzią na oczekiwania konsumentów poszukujących wyrobów atrakcyjnych pod względem smakowo-zapachowym oraz o wysokiej wartości prozdrowotnej.

Formalna ocena pracy

Praca doktorska jest opracowaniem obejmującym 278 stron, w którym pracy zamieszczono 111 tabel (w tym 2 w części teoretycznej i 5 w części metodycznej) oraz 68 rysunków (w tym 18 rysunków w części teoretycznej pracy). Opracowanie rozpoczyna się spisem treści obejmującym wykaz rozdziałów i podrozdziałów, których układ jest klasyczny dla prac

eksperymentalnych i zawiera: Wstęp, Przegląd literatury, Hipotezy badawcze, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Wykaz literatury, Spisy rysunków i tabel, Streszczenie oraz Aneks z wynikami analizy statystycznej zamieszczonymi w 212 tabelach. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 335 pozycji, z przewagą publikacji o zasięgu międzynarodowym z ostatnich 10 lat.

Ocena merytoryczna rozprawy

Wprowadzeniem w tematykę badawczą realizowaną w ramach pracy jest rozdział pt. „Przegląd literatury”. W pierwszym podrozdziale przedstawiona została charakterystyka gryki z uwzględnieniem zarówno związków o działaniu prozdrowotnym, jak i antyodżywczych. Kolejny podrozdział poświęcony jest omówieniu budowy, form występowania oraz biologicznych funkcji inozytoli. Ponadto wskazane zostały źródła inozytoli w żywności oraz scharakteryzowano enzymy degradujące estry mio-inozytoli i fagopirytole. W następnym podrozdziale opisane zostały fizyczne i biologiczne procesy wspomagające ekstrakcję enzymatyczną. Spośród procesów fizycznych dokonano charakterystyki sonikacji, obróbki z udziałem podwyższonego ciśnienia, zaś jako godne rozważenia procesy biochemiczne wskazano enzymatyczne upłynnianie skrobi oraz kiełkowanie. Kolejne trzy podrozdziały traktują o produkcji piwa z uwzględnieniem charakterystyki surowców, drożdży oraz etapów wytwarzania i fermentacji brzezki. Treści te zostały przedstawione nieco chaotycznie, ponieważ charakterystyka surowców do produkcji brzezki powinna być zamieszczona przed charakterystyką etapów produkcji brzezki. Ponadto podpunkt 1.4.1. zatytułowany „Etapy wytwarzania brzezki” powinien być zakończony po scharakteryzowaniu etapu przygotowania brzezki nastawnej (chmielonej). Należało zrezygnować z opisywania w tym podpunkcie faz fermentacji, leżakowania i filtracji piwa. Z kolei w podpunkcie 1.4.2 niepotrzebnie wymienione zostały drożdże, które nie są surowcami do wytwarzania brzezki, zwłaszcza, że zostały one scharakteryzowane w kolejnym podpunkcie 1.4.3.

Kolejnym zagadnieniem przedstawionym w ramach przeglądu literatury jest fermentacja mlekowa, mikroorganizmy odpowiedzialne za jej prowadzenie (m.in. *Lactobacillus plantarum*) oraz właściwości prozdrowotne żywności fermentowanej z ich udziałem. Uważam, że bez szkody dla wartości merytorycznej i naukowej pracy przegląd literatury mógł zostać zakończony na tym etapie, gdyż kolejny podrozdział zawiera znane treści dotyczące podstaw teoretycznych wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Podsumowując tę część pracy stwierdzam, że mimo kilku dyskusyjnych wątków, tematyka poszczególnych podrozdziałów w Przeglądzie literatury jest interesująca, dobrze przemyślana, a ich lektura dostarcza czytelnikowi informacji potwierdzających zasadność prowadzenia zaplanowanych prac badawczych.

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa, Doktorantka postawiła cztery hipotezy badawcze, a następnie, aby je zweryfikować sformułowała **cel i zakres pracy**. Celem pracy było opracowanie fizyczno-enzymatycznej metody ekstrakcji bioaktywnych inozytoli z nasion gryki oraz opracowanie technologii nowych produktów gryczanych o wysokiej zawartości inozytoli (piwa oraz napoju fermentowanego). Aby zrealizować postawione cele, Doktorantka badała wpływ kiełkowania nasion gryki na biosyntezę bioaktywnych inozytoli (tj. mio- i D-chiro-inozytoli) oraz czynników fizycznych (ultradźwięki, obróbka ciśnieniowo-termiczna/autoklawowanie) oraz biochemicznych (enzymatyczna hydroliza skrobi) na wspomaganą aktywnością α -galaktozydazy i fitazy ekstrakcję inozytoli z nasion gryki. Ponadto dokonano optymalizacji warunków biosyntezy i ekstrakcji inozytoli z nasion gryki z wykorzystaniem metody planowania i analizy eksperymentów (DoE). Cel pracy, jak i przedstawione w siedmiu punktach cele szczegółowe zostały jasno sprecyzowane i nie budzą zastrzeżeń.

W kolejnym rozdziale, zatytułowanym **Materiały i metody**, Autorka pracy przedstawiła wykaz materiałów badawczych, preparatów enzymatycznych oraz techniki i metody stosowane w trakcie realizacji doktorskiej. Do obróbki i prezentacji wyników Autorka pracy zastosowała szereg metod statystycznych. W opinii recenzenta, realizacja tak szerokiego zakresu badań z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych i statystycznych potwierdza wysokie umiejętności i kompetencje mgr inż. Dagmary Poniewskiej dotyczące planowania i realizacji pracy badawczej.

W rozdziale **Wyniki i dyskusja**, który powinien być zatytułowany „Wyniki” w sposób przejrzysty i zrozumiały przedstawiono i opisano uzyskane wyniki. zilustrowano je czytelnymi wykresami, a kluczowe informacje zestawiono w bardzo dobrze skonstruowanych tabelach. Zastosowany sposób prezentacji wyników ułatwia przedstawienie najważniejszych efektów pracy, mimo obszernego zakresu danych eksperymentalnych będących podstawą tego opracowania. To bardzo ważna umiejętność zasługująca na podkreślenie, która ułatwi wyselekcjonowanie wyników do publikacji naukowych.

Prezentację osiągnięć Doktorantka rozpoczęła od przedstawienia i omówienia wyników oznaczenia zawartości inozytoli w dostępnych produktach gryczanych, takich jak: ziarno gryki, łuska gryki zwyczajnej i tatarskiej, otręby gryki zwyczajnej, herbata gryczana, gryka młoda oraz dwie próbki miodu gryczanego. Jako najbogatsze źródło mio-inozytoli i D-chiro-inozytoli uznano ziarno gryki zwyczajnej, jednak najwięcej wolnego mio-inozytoli oznaczono w otrębach gryczanych, zaś wolny D-chiro-inozytol był obecny w największych ilościach w gryce młodej. Kolejny etap badań miał na celu wyznaczenie optymalnych warunków ekstrakcji mio-inozytoli śruty gryczanej, wspomaganą aktywnością fitazy. Wykazano, że najwyższy stopień ekstrakcji mio-inozytoli zapewnia prowadzenie procesu w temperaturze 50 °C, przy pH 4,5, w czasie 240 minut, z wykorzystaniem 0,05M buforu octanowego. Wskazano także optymalne dawki poszczególnych preparatów fitazy. Jednocześnie stwierdzono, że enzymatyczna ekstrakcja mio-inozytoli z nasion gryki wspomaganą aktywnością fitaz nie zapewnia pełnej konwersji mio-inozytoli całkowitego do wolnego w śrucie gryczanej; stopień konwersji w zależności od użytego preparatu fitazy wynosił od 52 do ok. 82%.

Dalsze badania miały na celu wyznaczenie optymalnych parametrów ekstrakcji D-chiro-inozytoli etanolem oraz wspomaganą enzymatycznie. Za optymalne warunki ekstrakcji na pierwszym etapie uznano stężenie etanolu na poziomie 50% obj., dawka etanolu 35 ml/g śruty gryczanej, czas ekstrakcji 10 min, temperatura 25 °C, zaś na etapie ekstrakcji wspomaganą enzymatycznie – 0,05M bufor octanowy, pH 5,0, temperatura 50°C, czas 6h, dawka preparatu α -galaktozydazy 25 mg/g śruty. Zważywszy na to, że mimo zastosowania optymalnych warunków, wydajność ekstrakcji D-chiro-inozytoli wynosiła ok. 45%, uznano za zasadne przeprowadzenie kolejnych prac eksperymentalnych polegających na zastosowaniu wstępnej obróbki śruty gryczanej z udziałem ultradźwięków. Odnotowano istotne zwiększenie stężenia uwalnianego mio-inozytoli i D-chiro-inozytoli po zastosowaniu ultradźwięków o amplitudzie 75, z czasem ekspozycji w przedziale 30-45 min. Testowano także wpływ upłynniania skrobi na efektywność ekstrakcji inozytoli, jednak zabieg ten nie przyczynił się do zwiększenia efektywności ekstrakcji inozytoli z nasion gryki. Z kolei obróbka ciśnieniowo-termiczna (autoklawowanie) surowca wpłynęła na zwiększenie w ekstraktach stężenia mio-inozytoli oraz D-chiro-inozytoli w formie wolnej. Wykazano również, że 5-dniowe kiełkowanie ziaren gryki poddanych moczeniu w roztworze sorbinianu potasu wpływa korzystnie na biosyntezę inozytoli, zarówno w formie wolnej jak i związanej.

Poddanie skiełkowanego ziarna obróbce enzymatycznej z udziałem fitazy i α -galaktozydazy pozwoliło na osiągnięcie, średnio, 85% wydajności ekstrakcji inozytoli.

Wartościowym elementem pracy jest wykorzystanie wyników wcześniejszych badań do optymalizacji warunków ekstrakcji inozytoli, rutyny oraz fagopiryny z nasion gryki z wykorzystaniem modułu „Planowanie i analiza eksperymentu”.

Kolejnym etapem prac badawczych mgr inż. Dagmary Poniewskiej było zastosowanie opracowanych we wcześniejszym etapie metod maksymalizowania stężenia inozytoli w nasionach gryki do wytwarzania słoðu piwowskiego, a następnie brzezki i piwa. Uznano, że sólð otrzymany w warunkach prowadzonych doświadczeń odznaczał się wyższym stężeniem inozytoli oraz korzystniejszym z technologicznego punktu widzenia składem chemicznym. Proszę o odpowiedź, czy dotyczy to także zawartości białka, która w sólðzie laboratoryjnym była wyższa niż w sólðzie przemysłowym? Czy nie jest to czynnik obniżający wartość słoðu laboratoryjnego? Literatura przedmiotu (Kunze, 1999) podaje, że wysoka zawartość białka w sólðzie zwykle wiąże się z jego niską ekstraktywnością i zbyt dużą ilością związków azotowych w brzezce, co prowadzi w rezultacie do zmniejszenia wydajności warzelnii, pojawiania się osadu, tworzenia zmętnień i tym samym pogorszenia trwałości koloidalnej piwa.

Wyniki badań zamieszczone w recenzowanej rozprawie potwierdziły celowość stosowania na etapie zacierania słoðu obróbki enzymami wspomagającymi (fitazą i β -glukanazą), co skutkowało istotnym wzrostem stężenia inozytoli oraz rutyny w uzyskanym piwie. Przeprowadzono także próby fermentacji mlekowej brzeczki gryczanej z udziałem bakterii *L. plantarum*. Analogicznie jak w przypadku wytwarzania piwa, najwyższą zawartość inozytoli zawierały próby napoju fermentowanego z brzezki zakwaszonej kwasem mlekowym oraz po obróbce enzymatycznej z udziałem na etapie zacierania ww. enzymów wspomagających. Ponadto należy podkreślić, że produkty wytworzone z tak przygotowanej brzezki gryczanej (piwo, napój fermentowany) odznaczały się relatywnie wysoką aktywnością antyoksydacyjną.

Podsumowując ocenę rozdziału **Wyniki**, uważam ten rozdział za **źródło wielu cennych informacji o charakterze naukowym oraz aplikacyjnym**. W literaturze przedmiotu brak tak obszernego i kompleksowego podejścia do zagadnień związanych z metodami ekstrakcji bioaktywnych inozytoli z nasion gryki, z jednoczesnym wskazaniem kierunków aplikacji. Wyniki tych badań stanowią niewątpliwie oryginalny wkład Doktorantki w rozwój wiedzy dotyczącej wpływu czynników fizycznych, biochemicznych, mikrobiologicznych oraz technologicznych na efektywność pozyskiwania substancji bioaktywnych z surowców roślinnych.

Przedstawiona przez Autorkę pracy **Dyskusja** jest elementem rozprawy, który zwraca uwagę w pozytywnym aspekcie. Doktorantka omówiła i przeanalizowała uzyskane wyniki, biorąc pod uwagę różne zmienne, odnosząc je jednocześnie do wyników zamieszczonych w licznie przywoływanych publikacjach naukowych. Sprawnie przeprowadzona dyskusja wyników świadczy o dobrej znajomości literatury w obszarze tematyki rozprawy.

W rozdziale **Wnioski** Doktorantka przedstawiła najważniejsze osiągnięcia z przeprowadzonych badań. Sposób zredagowania wniosków jest generalnie poprawny, a ich strona merytoryczna znajduje uzasadnienie w analizie prezentowanych wyników badań i potwierdza dokonanie weryfikacji postawionych hipotez badawczych. Jednakże wnioski nr 2 i 3 mogły zostać połączone, ponieważ oba dotyczą obróbki enzymatycznej. Z kolei wniosek nr 4 powinien być zredagowany inaczej, ponieważ w postaci zaprezentowanej w pracy jest opisem procedury enzymatycznie wspomaganiej ekstrakcji D-chiro-inozytolu.

Ocena poprawności redakcyjnej

Edytorskie przygotowanie rozprawy doktorskiej świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktorantkę techniki redagowania tekstu naukowego. Praca jest napisana poprawnym, pod względem stylistycznym, językiem. Do drobnych niedociągnięć edytorskich należą dość liczne błędy literowe.

Uwagi o charakterze wyjaśniającym i/lub dyskusyjnym

Materiały i metody

- str. 52, podrozdziały 4.1 oraz 4.1.2 mają ten sam tytuł; ten drugi mógł być zatytułowany jako „Surowce podstawowe”;
- str. 57, w p. 4.2.3.4 podano informacje odnośnie wyznaczania optymalnego stężenia śruty gryczanej przy ekstrakcji mio-inozytolu. Proszę o odpowiedź, na podstawie jakich przesłanek obrano zakres stężeń od 1,43 do 20% oraz czy jest to stężenie w/v, czy w/w? W całej pracy brak pełnego opisu stężeń stosowanych reagentów;
- str. 57, w p. 4.2.4.1 opisano procedurę wyznaczania optymalnych parametrów ekstrakcji fagopirytolu. W tekście czytamy „Badano różne optymalne stężenia etanolu [].” Jest to niewłaściwe sformułowanie, gdyż Autorka miała zamiar ustalić optymalne stężenie etanolu. Ponadto Autorka pracy w części tekstu posługuje się nazwą związku w języku angielskim „fagopyritol”, a w innej części w języku polskim „fagopirytol”;
- str. 70, podpunkt 4.2.21, jeśli podczas oznaczania suchej masy próbek słodu ważono próbki po suszeniu tylko raz, jak podano w opisie, to nie dochowano odpowiedniej staranności. Aby uznać, że próbka została wysuszona do stałej masy, należałoby zważyć ją w odpowiednich odstępach czasowych co najmniej dwukrotnie i dopiero po stwierdzeniu, że jej masa nie uległa zmianie można uznać pomiar za zakończony.
- str. 75, podpunkty 4.2.34 i 4.2.35, przywołane procedury badawcze powinny zostać zamieszczone w wykazie literatury i opatrzone możliwie najdokładniejszym opisem bibliograficznym.

Wyniki

- str. 85, w omówieniu wyników podano, że obróbka preparatem Finase®P w dawce 30 mg/g pozwoliła na uwolnienie 1,3869 mg/g s.m. mio-inozytolu, podczas gdy z danych zamieszczonych na rys. 26 wynika, że jest to blisko 2,5 mg/g s.m.. W kolejnym zdaniu Autorka podaje, że obróbka preparatem Ronzyme w dawce 150 mg/g śruty gryczanej spowodowała wzrost stężenia wolnego mio-inozytolu o 0,8787 mg/g s.m. Należało dodać w tym zdaniu „w odniesieniu do dawki 25 mg/g śruty”.
- str. 102, w ostatnim akapicie podano, że stężenie D-chiro-inozytolu całkowitego i wolnego było tym wyższe, im dłużej trwało kiełkowanie ziaren moczonych w roztworze sorbinianu potasu jest nieprecyzyjne. Z danych zamieszczonych w tabeli 27 wynika, że dotyczy to D-chiro-inozytolu wolnego, natomiast stężenie D-chiro-inozytolu całkowitego wzrastało do 2 dnia kiełkowania, a w kolejnych nie obserwowano statystycznie istotnych zmian jego zawartości;
- str. 151, p. 5.3.5, w tekście jest skrót NFF- powinno być NGF;
- str. 153, p. 5.3.6, w całym podrozdziale błędnie zapisano nazwę bakterii;
- str. 155, niekompletny opis osi Y na rys. 58;
- str. 169, w ostatnim zdaniu na stronie podano, że najwyższym początkowym oraz końcowym stężeniem związków fenolowych odznaczała się próbka BK1, podczas gdy z rys. 68 wynika, że próbka BK1 zawierała najmniej tych związków. Ponadto jest błąd w oznakowaniu próbki w tekście na str. 168 oraz w legendzie na rys. 68, wg mnie powinno być BNGF a nie BNGP. Z kolei informacje zawarte pod tytułami rysunków 67 i 68 zawierają błędny opis próby BNGF.

Wymienione uwagi nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej i mają charakter dyskusyjno-wyjaśniający.

Ocena końcowa

Podsumowując swoją recenzję stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Dagmary Poniewskiej spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom na stopień doktora. Praca cechuje się oryginalnością naukową i w sposób istotny rozszerza wiedzę w obszarze dyscypliny technologia żywności i żywienia odnośnie wpływu czynników fizycznych i biochemicznych na wspomaganą enzymatycznie ekstrakcję związków bioaktywnych z surowców roślinnych. Doktorantka sprawnie sformułowała temat i cel pracy, poprawnie zaplanowała i przeprowadziła prace eksperymentalne służące jego realizacji, umiejętnie wykorzystwała narzędzia badawcze, analityczne i statystyczne, co podnosi znacząco wiarygodność ustaleń naukowych prezentowanych w rozprawie. Przedstawione w rozprawie wyniki, oprócz aspektu poznawczego, wykazują również wartość aplikacyjną.

Konkluzja

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Dagmary Poniewskiej pt. „Enzymatycznie wspomaganą ekstrakcją bioaktywnych inozytoli z nasion gryki i jej możliwe zastosowania” spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Na tej podstawie wnioskuję do rady dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Dagmary Poniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Balcerzyk