

prof. dr hab. inż. Grażyna Lewandowicz
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

Poznań 11.12.2017

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Dobosz

pt.: „**Wpływ wybranych nieskrobiowych hydrokoloidów polisacharydowych na retrogradację skrobi ziemniaczanej**”

wykonanej pod kierunkiem promotora **prof. dr hab. inż. Marka Sikory**

oraz **dr inż. Magdaleny Krystyjan** promotora pomocniczego

Retrogradacja skrobi, choć znana już od połowy XIX wieku, jest zjawiskiem stanowiącym również aktualnie problem technologiczny i poznawczy. W sensie aplikacyjnym proces ten jest związany z szeregiem niekorzystnych zjawisk (głównie czerstwienia pieczywa). Z drugiej jednak strony retrogradacja jest kluczowym elementem tworzenia frakcji skrobi typu RSIII odpornej na amylolizę, która jest uważana za jeden z typów błonnika dietetycznego. W sensie poznawczym – precyzyjny opis tego procesu jest bardzo trudny ze względu na różnorodność strukturalną materiału, który mu ulega oraz mnogość warunków, jakie mogą być zastosowane, dlatego też nie ma jednego standardu analitycznego, jaki jest rekomendowany do badania stopnia zaawansowania i przebiegu tego procesu. W badaniach przebiegu retrogradacji skrobi zespół Pana prof. Marka Sikory ma od lat istotne osiągnięcia. Na podkreślenie zasługuje tutaj opublikowanie w roku 2014, w czasopiśmie „*Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*”, pracy przeglądowej dotyczącej metod pomiaru retrogradacji skrobi. W pracy tej Doktorantka jest pierwszym autorem. Praca doktorska Pani mgr inż. Anny Dobosz pt.: „Wpływ wybranych nieskrobiowych hydrokoloidów polisacharydowych na retrogradację skrobi ziemniaczanej” stanowi element szerszego nurtu badań realizowanego od lat w zespole Pana prof. Marka Sikory dotyczącego interakcji skrobi z hydrokoloidami nieskrobiowymi, w aspekcie zdolności zagęszczającej takich układów, ich właściwości reologicznych oraz funkcjonalności w produktach spożywczych.

Cel pracy, mimo iż stanowi odrębny rozdział, został sformułowany w sposób dość lapidarny i raczej nietypowy. Został on przedstawiony w postaci trzech punktów, które można traktować jako przedstawienie trzech etapów pracy. Tak naprawdę o celu pracy jako problemie naukowym, który Doktorantka stara się rozwiązać, można lepiej się zorientować z samego tytułu pracy niż z rozdziału „Cel pracy”. Zaczyna się on od słów: „*Celem prac było 1) otrzymanie żeli skrobi...*”. Tego typu sformułowanie można traktować raczej jako zadanie laboratoryjne a nie badawcze, a tym bardziej jako cel pracy. Nieumiejętność trafnego sformułowania celu badań jest tym bardziej zaskakująca, że Pani mgr inż. Anny Dobosz jest współautorką (oprócz wzmiankowanej już wcześniej pracy) 10 publikacji (w tym sześciu z listy JCR). Niemniej, w aspekcie merytorycznym, uważam tematykę podjętych przez Doktorantkę badań jako bardzo trafną i wpisującą się w aktualny stan badań nad skrobią.

Do zbadania przedstawionego w tytule problemu naukowego Doktorantka zastosowała szereg właściwie dobranych metod obejmujących, oprócz standardowych analiz stosowanych w ocenie skrobi, szereg zaawansowanych metod eksperymentalnych, wśród których na szczególną uwagę zasługują: chromatografia żelowa (GPC), reometria oscylacyjna, rentgenografia strukturalna oraz spektroskopia niskopolewego magnetycznego rezonansu jądrowego (LF NMR). Oznaczano też zawartość skrobi odpornej na amylolizę. Przyjęta w pracy metodyka jest zgodna z aktualnymi standardami obowiązującymi w badaniach skrobi, przy czym kompleksowość zastosowanych metod dowodzi wysokiego poziomu prowadzonych badań.

Praca pod względem formalnym stanowi niezwykle obszerne opracowanie liczące 212 stron maszynopisu. Wynik przedstawiono w postaci 31 tabel, 34 rysunków oraz zacytowano 315 pozycji literatury. Należy podkreślić, iż znaczna część rysunków przedstawiających wyniki pracy składa się z trzech części odpowiadających trzem badanym odmianom skrobi ziemniaczanej. Być może ta niezwykle obszerna praca mogłaby być nieco krótsza gdyby mniej szczegółowo opisano eksperyment. Doktorantka opisując przebieg poszczególnych doświadczeń nie tylko powoływała się na źródło, w którym metodyka pierwotnie była przedstawiona (co jest standardem publikacji naukowych), ale również bardzo szczegółowo opisywała poszczególne czynności, co jest raczej zgodne ze standardami prac magisterskich lub nawet inżynierskich. Przykładowo rozdział 4.2.2. (str. 42) zatytułowany: „Mielenie i przesiewanie skrobi” dotyczy dość banalnej czynności laboratoryjnej i mógłby być

pominięty bez szkody dla jakości pracy, a z korzyścią dla jej przejrzystości tym bardziej, że ma on tylko 4 linijki. Tak szczegółowych opisów czynności laboratoryjnych i tak krótkich rozdziałów powinno się unikać w rozprawach doktorskich. Z drugiej strony, szczegółowy opis doświadczenia może rozwiać wszelkie wątpliwości czytelnika zwłaszcza, gdy niektóre użyte w pracy sformułowania są niejednoznaczne.

Praca na pewno byłaby mniej obszerna, gdyby Doktorantka zastosowała się do obowiązującego standardu prac naukowych i nie przedstawiała tych samych wyników dwukrotnie (zarówno w postaci tabel jak i rysunków). Dotyczy to opisu eksperymentów reologicznych obejmujących zarówno badania przebiegu kleikowania, jak i badania reometryczne. W odniesieniu do badania struktury krystalicznej otrzymywanych preparatów uważam za niepotrzebne pokazywanie dyfraktogramów (tym bardziej, że są one niezbyt wysokiej jakości). Zupełnie wystarczające byłyby dane dotyczące stopnia krystaliczności i krystaliczności względnej (tabele 10 i 28). W odniesieniu do badań stopnia krystaliczności nasuwa się również pytanie merytoryczne: czy Doktorantka uwzględniła wpływ zawartości wody w analizowanych próbkach? W pracy nie podano bowiem informacji czy próbki standaryzowano ze względu na wilgotność. Tymczasem zawartość wody w skrobi ma kluczowy wpływ na jej stopień krystaliczności [Nara Sh., Mori A., Komiya T. 1978. *Study on Relative Crystallinity of Moist Potato Starch. Starch/Stärke* 30 (4), 111-114].

Lektura pracy jest niezwykle trudna nie tylko ze względu na obszerność i liczne powtórzenia, ale przede wszystkim na szereg niezbyt trafnych sformułowań używanych przez Doktorantkę. Są one zauważalne już podczas lektury spisu treści. Pani mgr inż. Anna Dobosz, opierając się na pracy Karima i współpracowników opublikowanej w „*Food Chemistry*” w roku 2000, przyjęła klasyfikację metod pomiaru retrogradacji skrobi na makroskopowe i mikroskopowe, co opisała w rozdziale 2.2.2. *Makroskopowe techniki pomiaru zjawiska retrogradacji*. Kontynuując myśl, zawartą rzekomo w pracy Karima i wsp., w rozdziale 5. *Wyniki i dyskusja*, przedstawiła podrozdział 5.2. *Badania makrostruktury żeli*, obejmujący: 5.2.1. *Masy cząsteczkowe i dyspersyjność skrobi* oraz 5.2.2. *Stopień skleikowania skrobi – mikroskopia optyczna*. Zaliczenie mikroskopii optycznej do badań makrostruktury jest samo w sobie oksymoronem. Przede wszystkim jednak badanie rozkładu mas cząsteczkowych metodą GPC dotyczy struktury molekularnej skrobi i w żaden sposób nie może być zakwalifikowane do badań makroskopowych. Ta sama błędna klasyfikacja jest przyjęta

w opisie metod pomiarowych. Mamy tam rozdział 4.2.4. *Badania makrostruktury żeli* z podrozdziałami 4.2.4.1. *Wyznaczenie mas cząsteczkowych i dyspersyjności skrobi* oraz 4.2.4.2. *Oznaczanie stopnia skleikowania skrobi*. Tymczasem w pracy Karima i wsp. nie ma w ogóle wzmianki na temat chromatografii żelowej oraz mikroskopii. Ponadto w mojej opinii również użycie sformułowania „*Wyznaczenie mas cząsteczkowych i dyspersyjności skrobi*” jest niezręczne, ponieważ w fizykochemii polimerów przyjęte jest określenie **polidispersyjność** polimerów. Można też mówić o rozkładzie mas cząsteczkowych.

W całej pracy doktorskiej pani mgr inż. Anna Dobosz błędnie używa słowa żel. Przykładowo, w punkcie 4.2.4.1. czytamy: „*Masy cząsteczkowe badanych skrobi ziarnistych oraz żeli wyznaczano metodą...*”. Masę cząsteczkową wyznacza się dla indywidualnego chemicznego bądź dla polimeru (mówiąc wtedy o średniej masie cząsteczkowej ze względu na polidispersyjność polimerów). Nie można wyznaczyć masy cząsteczkowej dla żelu, ponieważ żel jest układem dwuskładnikowym składającym się najczęściej z polimeru i rozpuszczalnika. Żel jest w istocie specyficznym typem roztworu koloidalnego. W odniesieniu do hydrokoloidów skrobiowych precyzyjną definicję żelu zawarto w pracy: *Almdal K., Dyre J., Hvidt S., Kramer O. 1993. Towards a Phenomenological Definition of the Term „Gel”. Polymer Gels and Networks 1, 5-17*. Podobnie niewłaściwie jest używane słowo żel w odniesieniu do preparatów poddawanych badaniom rentgenograficznym. Możliwe jest co prawda badanie struktury krystalicznej roztworów polimerów (jak ma to miejsce w przypadku badania struktury krystalicznej białek), jednak Doktorantka badała preparaty skrobiowe metodą proszkową po ich wysuszeniu w drodze liofilizacji, a nie roztwory koloidalne.

Pomimo szeregu niedociągnięć redakcyjnych należy podkreślić, że w pracy doktorskiej przedstawiono szereg bardzo wartościowych rezultatów, które, przy właściwym opisanu, mogłyby być opublikowane w czasopiśmie o znacznym współczynniku wpływu. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała, że największy wpływ na przebieg retrogradacji ma zawartość amylozy w surowcu skrobiowym, niemniej obecność polisacharydów nieskrobiowych w układzie również ma znaczenie. Jest on zależny zarówno od rodzaju dodanego polisacharydu, jak i czasu trwania procesu retrogradacji. Oprócz ww. fundamentalnych (z punktu widzenia tematu pracy) wniosków, Doktorantka poczyniła szereg ciekawych obserwacji, z których część zasługuje na głębszą refleksję. Przykładem problemu,

którego nie można pominąć, są przytoczone w tabeli 3 wartości średnich mas cząsteczkowych. Doktorantka słusznie dyskutuje uzyskane różnice pomiędzy masami cząsteczkowymi skrobi natywnych i retrogradowanych w kategoriach dwóch procesów – hydrolizy oraz retrogradacji. Tym niemniej zaobserwowane wyższe masy cząsteczkowe retrogradowanej skrobi woskowej w porównaniu do wyjściowej skrobi natywnej (tabela 3 str. 64) może być odbierane jako zaskakujące. Retrogradacja jest bowiem procesem fizycznym i teoretycznie nie powinna wpływać na wielkość masy cząsteczkowej. Zaobserwowany wzrost masy cząsteczkowej rodzi pytanie czy w podczas przygotowania próbek do analizy GPC uzyskano molekularne rozproszenie skrobi. Zagadnienie to nie jest problemem łatwym ani małym, ponieważ jak dotąd nie ma jednoznacznych rekomendacji dotyczących zarówno procedur rozpuszczania próbek skrobiowych do analiz GPC w celu molekularnego rozproszenia skrobi, jak i zastosowania różnych eluentów.

Najmocniejszym elementem pracy są właściwie przeprowadzone i zinterpretowane eksperymenty reologiczne. Uzyskane tymi metodami wyniki mogą stanowić podstawę i punkt odniesienia do analizy wyników uzyskanych innymi metodami. Niemniej jednak również w tych fragmentach pracy wkrały się niezrozumiałe sformułowania. Przykładowo, na str. 73 znajduje się trudno zrozumiałe stwierdzenie, cytuję; „...*większa retrogradacja amylozy i amylopektyny SZW w porównaniu z SZN1 i SZN2, może wynikać z dłuższego czasu przygotowywania próbek przed analizą mas cząsteczkowych.*”

Wyniki reometryczne zostały potwierdzone poprzez badanie tekstury. Występuje tu pełna korelacja wyników uzyskanych tymi metodami. Podobnie dotyczy to zawartości skrobi odpornej i wyników uzyskanych metodą rentgenografii strukturalnej. Natomiast pewnym zaskoczeniem były dla mnie rezultaty uzyskane metodą niskopolewego rezonansu jądrowego, w szczególności brak różnic w zawartości wody wolnej i związanej. Spektroskopia niskopolewego magnetycznego rezonansu jądrowego, jako metoda ilustrująca dynamikę wody w układzie, wydaje się być metodą z wyboru do badania procesu retrogradacji. Być może przyczyna tkwi w zjawisku synerzy, która towarzyszyła długotrwałej retrogradacji prowadzonej przez Doktorantkę. W przypadku badań reologicznych i teksturometrycznych bada się *de facto* sam żel, tak jak gdyby wydzielonej wody nie było w układzie. Natomiast w przypadku badań NMR wydzielona woda w układzie pozostawała, co mogło decydować

o uzyskanych rezultatach. Być może warto byłoby w przyszłości przebadać również układy, z których usunięto wydzieloną w wyniku synerезy wodę.

W badaniach reologicznych i teksturometrycznych dotyczących wpływu polisacharydów nieskrobiowych na przebieg retrogradacji skrobi zwraca uwagę znacząco mniejszy ich wpływ na skrobię woskową niż na obie skrobie zwykłe. Co ciekawe, nie koreluje to z wynikami badań synerезy, która w końcowym etapie eksperymentu była równie duża dla wszystkich skrobi. Zakres badań reologicznych dotyczących wpływu polisacharydów nieskrobiowych na przebieg retrogradacji skrobi jest doprawdy imponujący i stanowi w znacznym stopniu o wartości pracy. Natomiast badania metodą rentgenografii strukturalnej, w przypadku opisanych w pracy doktorskiej układów mieszanych, wskazały na bardzo skomplikowany charakter oddziaływań skrobia – polisacharydy nieskrobiowe i nie pozwoliły na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. W tym przypadku bardzo przydatna okazała się metoda niskopolowego magnetycznego rezonansu jądrowego, która w znacznym stopniu pozwoliła naświetlić mechanizmy tych oddziaływań. Niestety, w toku dyskusji wyników rentgenograficznych Doktorantka nie ustrzegła się uchybień interpretacyjnych. Przykładowo, na str. 168 przytoczyła dość zaskakujące twierdzenie: „...próbki bez dodatku tej gumy miały charakter amorficzny (wykazywały widma typu V)...”. Tymczasem dyfraktogram typu V nie odpowiada strukturze amorficznej. Tego typu dyfrakcję wywołuje niewystępujący naturalnie typ krystalitów skrobiowych tworzących się wskutek formowania monohelikalnych kompleksów skrobiowo-lipidowych. Struktura ta może być tworzona również w innych warunkach np. w obecności etanolu [*Dries D.M., Gomand S.V., Delcour J.A., Goderis B. 2016. V-type crystal formation in starch by aqueous ethanol treatment: The effect of amylose degree of polymerization. Food Hydrocolloids. 61, 649-661*]. Nieściśle twierdzenie odnoszące się do typów struktur krystalicznych skrobi Doktorantka zamieściła również na stronie 33, twierdząc jakoby struktura krystaliczna typu C była pośrednią pomiędzy strukturami A i B, podczas gdy struktura typu C stanowi mieszaninę struktur A i B, których wzajemny udział można ustalić metodami analitycznymi.

W podsumowaniu recenzji pracy doktorskiej Pani mgr inż. Anna Dobosz chciałabym podkreślić, że wnioski, jakie wyciągnęła Doktorantka z przeprowadzonych badań są w pełni udokumentowane przeprowadzonymi badaniami i uzyskanymi rezultatami a przedstawione wyżej uwagi krytyczne nie przesłaniają wartości naukowej rozprawy. Reasumując, wysoka

wartość naukowa pracy obejmująca - trafny wybór tematyki, umiejętne dobranie odpowiednich badań i metod eksperymentalnych, a także jej znaczenie dla praktyki przemysłowej pozwala mi na stwierdzenie, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Dobosz pt.: „Wpływ wybranych nieskrobiowych hydrokoloidów polisacharydowych na retrogradację skrobi ziemniaczanej” spełnia wymagania zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Proszę zatem Wysoką Radę Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Dobosz do jej publicznej obrony.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Lewandowski". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping underline that extends to the left.