

Dr hab. Rafał Ziobro, prof. URK  
Katedra Technologii Węglowodanów i Przetwórstwa Zbóż  
Wydział Technologii Żywności  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
aleja Mickiewicza 21,  
31-120 Kraków

## **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr. inż. Bartłomieja Makowskiego**

***„Arabinoksylany skrobi pszennych i ich wpływ na kształtowanie właściwości hydrolizatów”***

**wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Justyny Rosickiej-Kaczmarek, prof. PŁ**

### **Ocena formalna pracy doktorskiej**

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 318 stron, na których zostało zawarte 38 tabel, 150 rycin oraz 246 odnośników bibliograficznych na które powoływał się autor. Wśród nich zdecydowaną większość stanowią pozycje pochodzące z uznanych czasopism o zasięgu światowym, zaś prace w języku polskim to głównie monografie i artykuły dotyczące zagadnień specyficznych dla uprawy pszenicy w naszym kraju. W tekście pracy znalazły się streszczenia w języku polskim i angielskim pozwalające na zapoznanie się z podstawowymi tezami pracy. Układ pracy jest typowy dla rozprawy doktorskiej i zawiera wszystkie elementy niezbędne do zapoznania się z aktualnym stanem wiedzy na temat omawianych zagadnień, zrozumienia celu pracy, zapoznania się z zadaniami badawczymi i metodyką przeprowadzonych analiz, a także ocenę poprawności przedstawionych wyników, ich dyskusji i umiejętności formułowania wniosków. W rozprawie umieszczono także spisy treści, tabel i rycin oraz krótkie podsumowanie dorobku naukowego doktoranta.

### **Ocena merytoryczna pracy doktorskiej**

Po krótkim wprowadzeniu, podkreślającym praktyczne znaczenie przedstawionych badań, Autor przedstawia obszerny **przeгляд literatury** mający za zadanie zapoznanie czytelnika z aktualnym stanem wiedzy na temat pszenicy i składników chemicznych jej ziarna w



kontekście możliwości wykorzystania tego surowca do produkcji skrobi i jej pochodnych, a w szczególności hydrolizatów skrobiowych.

Całość części teoretycznej liczy ponad trzydzieści stron i jak się wydaje mogłaby zostać znacząco skrócona, gdyż zarówno potencjał wykorzystania pszenicy, jak i prozdrowotne właściwości arabinoksylianów nie mają bezpośredniego związku z podjętymi badaniami. Pewnej reorganizacji mógłby także ulec sam układ treści, gdyż biorąc pod uwagę temat pracy, omówione w podrozdziałach 2.4-2.6 składniki chemiczne mają znaczenie jedynie w kontekście ich występowania jako substancji wyizolowanych ziarenek skrobiowych. Należałoby je zatem omówić już w podrozdziale 2.2. Co więcej, pojedynczy podpunkt 2.6.1 powinien zostać zastąpiony zwykłym wyróżnieniem. Ponadto schematyczne rysunki 3 i 4 nie wnoszą żadnej ważnej informacji i niepotrzebnie zwiększają objętość pracy. W pewnej mierze dotyczy to także innych schematów, z których przynajmniej kilka można by z sobą połączyć ilustrując budowę i rozmieszczenie składników w ziarenkach skrobiowych.

W tym miejscu warto również zwrócić na kwestie nomenklaturowe. Autor w różnych miejscach określa ziarenka skrobiowe różnymi terminami: granule, granulki, ziarna, ziarenka, gałeczki. Choć wszystkie te terminy bywają stosowane, lepiej byłoby się zdecydować na konsekwentne stosowanie tylko jednego z nich. Tym bardziej, że termin „ziarna” pojawia się w pracy także w odniesieniu do ziaren zbóż. Innym używanym w pracy określeniem jest łuska, w odniesieniu do okrywy owocowo-nasiennej. Choć takie nazewnictwo funkcjonuje powszechnie w przetwórstwie zbóż, warto byłoby zwrócić uwagę na możliwość pomyłki, wynikającą ze stosowania tego samego terminu w odniesieniu do plewki, co zresztą zostało zobrazowane na zaprezentowanym rysunku 1. Kolejną kwestią jest określanie przewódek jako „odmian fakultatywnych”, choć wcześniej zaproponowano termin „odmiany alternatywne”. Podobnym mankamentem jest stosowanie skrótów i oznaczeń bez ich wcześniejszego wyjaśnienia (AX, WEAX, sub/unsub, itp.) i niepotrzebne dodawanie do jednego z nich końcówek fleksyjnych.

**Cel pracy** nie budzi większych wątpliwości, choć po omówieniu na stronie 27 hydrolizatów białkowych z pszenicy można się zastanawiać, o które hydrolizaty chodzi w tytule pracy, w związku z czym warto byłoby użyć terminu „hydrolizaty skrobiowe”. Pewnej korekty można byłoby dokonać w kolejności punktów przedstawiających zakres pracy - próby wyjaśnienia obserwowanych efektów powinny znaleźć się na końcu, po rzeczach dających się jednoznacznie zweryfikować, zanalizować i ocenić.

**Część metodyczną** podzielono na dwa podrozdziały „Materiał do badań” i „Metody analityczne” dość szczegółowo omawiając wybór

odmian, natomiast nieco mniej dokładnie przedstawiając sposób izolacji skrobi. Zabrakło tu np. danych na temat producenta młynka laboratoryjnego (Instytut Sadkiewicza, Bydgoszcz a może SPOMASZ, Żnin), orientacyjnej wydajności mąki i jej ilości używanej do separacji skrobi, wydajności uzyskiwanego mlecza skrobiowego, sposobu prowadzenia pierwszej sedymentacji. Podobnie, bez szczegółów opisano proces hydrolizy enzymatycznej, nie podając informacji na temat odczynników używanych do ustalania pH, metody ogrzewania i mieszania, oraz określania stężenia uzyskiwanych hydrolizatów. Nie wyjaśniono również w jaki sposób pozyskiwana była okrywa owocowo-nasienna (nazywana w pracy „łuską”), zaznaczono jedynie, że „otręby stanowiły produkt uboczny i były odrzucane”, co dziwi w kontekście prowadzenia szeregu badań dotyczących składu chemicznego i struktury arabinoksylianów w zewnętrznych częściach ziarna. Można się jedynie domyślać, że informacja na temat odrzucania otręb dotyczy wyłącznie przygotowania hydrolizatów skrobiowych a nie prowadzenia analiz i że to właśnie one opisywane są jako „łuska” przy okazji omawiania analiz arabinoksylianów i kwasu ferulowego. Brak bardziej szczegółowego opisu tego właśnie materiału badawczego stanowi największy mankament przedstawionej pracy i bardzo utrudnia wyciąganie jednoznacznych wniosków odnośnie wpływu arabinoksylianów pochodzących z okrywy owocowo-nasiennej na charakterystykę uzyskiwanej skrobi i jej podatność na proces hydrolizy enzymatycznej. Przykładowo - wzrost zawartości procentowej arabinoksylianów w otrębach może wynikać zarówno z ich większej zawartości w całym ziarnie, jak i z lepszego rozdzielenia bielma i okrywy owocowo-nasiennej. Brak ilościowego opisu procesu przemiału uniemożliwia stwierdzenie, z którą sytuacją mamy do czynienia. Rodzi się tu pytanie, *jakie konsekwencje praktyczne ma sposób rozdrabniania ziarna pszenicy na omawiane w pracy parametry hydrolizatów skrobiowych.*

Parametry zastosowanej w pracy metody SKCS zostały niewłaściwie przedstawione, gdyż poprawnymi terminami byłyby tu współczynnik twardości (bezwymiarowy) oraz masa (g), natomiast wilgotność i średnica powinny być podawane z uwzględnieniem jednostek.

Wątpliwości budzi pisownia i interpretacja terminu „konjugaty kwasu ferulowego”, wprowadzonego niejako w opozycji do „kwasu ferulowego w formie związanej”, a przecież *można było ten termin ściśle zdefiniować w rozdziale 2.4.*

W opisie zastosowanych metod statystycznych nie uwzględniono testu korelacji i nie wyjaśniono, *dlaczego stosowano go oddzielnie do każdej z*



*grup badanych pszenic.* Nie wyszczególniono również, że zastosowana analiza wariancji była analizą jednoczynnikową.

Warto podkreślić szeroki zakres zastosowanych metod badawczych, niejednokrotnie bardzo złożonych, obejmujących zarówno metody analityczne, jak i preparatykę z uwzględnieniem metod fizycznych, chemicznych i enzymatycznych. W szczególności godne uwagi jest zaproponowanie przez Autora nowych metod oznaczeń i optymalizacji dotychczasowych metod badawczych związanych z frakcjonowaniem skrobi, modyfikacją jej powierzchni, hydrolizą i oceną zdolności filtracji hydrolizatów. Wątpliwości budzi jednak zaproponowana terminologia - „zdolność do filtracji” powinna odzwierciedlać łatwość uzyskiwania filtratu, podczas gdy wprowadzony jako jej wyróżnik czas potrzebny na przefiltrowanie przedstawia trudności w tym procesie. Podobnie - „ściśliwość osadu” powinna oddawać łatwość jego deformacji, czyli maleć wraz ze wzrostem siły potrzebnej do jego ściśnięcia do żądanej grubości, lub o zadaną wielkość (niestety i w tym przypadku metodyka jest nieprecyzyjna). Otwartymi pozostają pytania, *do jakiego stopnia proces liofilizacji i ponownego uwodnienia zmienia charakterystykę osadu, oraz jakiego rodzaju związek pozostaje między mierzonym w pracy parametrem a współczynnikiem ściśliwości powszechnie stosowanym do opisu procesu filtracji w warunkach przemysłowych.*

Kolejność prezentowania poszczególnych analiz w rozdziale **„Omówienie i dyskusja wyników”** jest zasadniczo poprawna. Po przedyskutowaniu cech fizycznych i składu chemicznego ziarna, omawiana jest charakterystyka preparatów skrobi w zakresie ich ziarnistości i składu chemicznego, a następnie poszczególne frakcje arabinoksylianów oraz wpływ ich usuwania na skład chemiczny ziarenek skrobiowych. Następnie przechodzimy do opisu przemian fazowych różnych preparatów skrobiowych, rejestrowanych z użyciem różnicowej kalorymetrii skaningowej i ich zmian wywołanych reakcją enzymatyczną. W dalszej części omawiana jest struktura krystaliczna ziarenek skrobiowych i preparatów poddanych częściowej hydrolizie po czym przechodzimy do wyników odnoszących się do parametrów jakościowych uzyskanych hydrolizatów skrobiowych. Jako pierwszy z nich brany jest pod uwagę stopień scukrzenia, następnie analizuje się czas filtracji i cechy fizyczne uzyskanych osadów, a na końcu ich barwę. Dalsze analizy dotyczą zawartości i struktury chemicznej arabinoksylianów znajdujących się w hydrolizatach i osadach filtracyjnych. Końcowa, wyraźnie wyodrębniona część pracy poświęcona jest zagadnieniu obecności kwasu ferulowego w analizowanych materiałach badawczych.

Omówienie i dyskusję wyników rozpoczęto od przedstawienia podstawowych parametrów ziarna analizowanych odmian pszenicy ozimej. Pewną wątpliwość budzi tu niska wilgotność badanego ziarna – czy w takich warunkach nie powinno się go poddać kondycjonowaniu przed przemiałem (nie ma jednak o tym mowy w metodyce)? Efektem nieoptymalnych warunków przemiału może być nadmierny stopień uszkodzenia skrobi, a co za tym idzie zmiana podatności na działanie enzymów. Innym skutkiem braku odpowiedniego przygotowania ziarna do przemiału może być nieoptymalne rozdzielanie otrąb i bielma, co może skutkować zanieczyszczeniem próbek mąki, a w dalszej kolejności skrobi, pewną ilością składników okrywy owocowo-nasiennej, jak również usunięciem znaczącej części mąki wraz z otrębami. Niemniej jednak wilgotność ziarna poszczególnych odmian pszenic była zbliżona (wyniki nie różniły się istotnie), można więc oczekiwać, że jeśli przemiał następowałby po wstępnym dowilżeniu obserwowane różnice (np. co do wielkości ziarenek skrobiowych, składu chemicznego mąk) mogłyby się co najwyżej nieco mniej uwypuklić.

Kwestią dyskusyjną jest sposób przedstawiania poszczególnych analiz z wyraźnym podziałem na odmiany ozime i przewódkowe. O ile uwzględnienie tych ostatnich jest samo w sobie ważnym elementem nowości, to ich opis pozostaje w oderwaniu od wcześniej omawianych odmian ozimych. Wydaje się, że obserwacje poczynione w oparciu o odmiany ozime powinny każdorazowo stanowić punkt odniesienia dla dalszej dyskusji odnośnie odmian alternatywnych. Istotne byłoby tu utrzymanie konsekwentnego układu naprzemiennych rozdziałów omawiających poszczególne zagadnienia poruszane w pracy, czego niestety brakuje (np. po omówieniu składu chemicznego skrobi odmian ozimych przechodzimy do omawiania arabinoksylianów tychże odmian, a dopiero potem powracamy do cech skrobi odmian przewódkowych). Alternatywą do powyższego rozwiązania byłoby podzielenie całości rozprawy na dwie odrębne części (albo po prostu prace), jedną poświęconą odmianom ozimym, a drugą przewódkowym.

Inne zaburzenie układu treści zachodzi w przypadku omawiania wpływu usuwania arabinoksylianów z powierzchni skrobi na właściwości i zdolność do filtracji hydrolizatów. Najpierw omawiane są wyniki uzyskane w przypadku skrobi pozbawionych arabinoksylianów (rozd. 5.11), a dopiero potem analizuje się skrobie naturalne (rozd. 5.12), co prowadzi do powoływania się na nieprzedstawione jeszcze wyniki z następnego rozdziału. Sama tylko liczba zaprezentowanych podrozdziałów (15) jest dowodem na nadmierne rozbudowanie części doświadczalnej i pewien brak konsekwencji, gdyż w omawianym przednio zakresie pracy znalazło się jedynie 7 punktów.



Podobnie niekonsekwentny jest sposób ułożenia wyników w poszczególnych tabelach. O ile odmiany różniące się twardością są zasadniczo przedstawiane zgodnie ze wzrostem tego parametru, to w przypadku odmian alternatywnych panuje pełna dowolność - raz jako pierwsze pojawiają się odmiany wysiewane na wiosnę, raz w jesieni, a w niektórych przypadkach kolejność jest zgodna ze wzrostem twardości ziarna. Wszystko to niepotrzebnie utrudnia zestawienia i porównania i może prowadzić do pomyłek.

Wyniki analiz statystycznych przedstawione w tabelach odbiegają od standardu. O ile samo stosowanie różnych liter znacząco ułatwia rozróżnienie wyników różniących się od siebie, to dobrym zwyczajem jest uszeregowanie tychże liter zgodnie z trendem wzrastającym lub malejącym, czego zabrakło w większości przypadków. Z drugiej strony stosowanie różnych oznaczeń w poszczególnych kolumnach można byłoby wyeliminować przez odpowiednią adnotację w stopce. Przedstawione współczynniki korelacji dotyczą niemal wyłącznie współzależności pomiędzy twardością ziarna i najróżniejszymi parametrami mierzonymi w czasie pracy. Zdaniem recenzenta jest to niewłaściwe podejście, utrudniające znalezienie znacznie ciekawszych i nieoczywistych zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami. W obliczeniach statystycznych zdarzają się niestety błędy - np. współczynnik korelacji wyliczony dla danych dotyczących współczynnika twardości (tabela 3) i zawartości lipidów (tabela 5) nie wynosi bynajmniej 0,93, jak to podano na stronie 85, a około 0,5. Także strona graficzna tabel przedstawiających współczynniki korelacji pozostawia sporo do życzenia (niepotrzebne jest zwłaszcza powtarzanie wcześniej przedstawionych wyników - por. tabele 26, 29 i ryc. 72, 81, po ich usunięciu można byłoby uwzględnić większą liczbę współczynników korelacji).

Przeprowadzone badania stopnia powiązania arabinoksylianów z niewęglowodanowymi komponentami ziarenek skrobiowych istotnie poszerzają zakres dostępnych informacji na temat skrobi z odmian przewodkowych, a przede wszystkim roli terminu siewu w kształtowaniu się struktury powierzchni ich ziarenek. Natomiast wnioski wyciągane na temat siły oddziaływania białek i lipidów z arabinoksylianami w zależności od twardości ziarna wydają się zbyt daleko idące. W szczególności trudno doszukać się istotnej statystycznie zależności na rysunku 37, na którym zresztą doszło do pomyłki w zapisanych wartościach usuniętego białka. Trudno się też spodziewać istotnych tendencji w sytuacji, gdy zawartość lipidów w 3 spośród 5 odmian nie ulega zmianie po procesie izolacji arabinoksylianów, tak jak to przedstawia rysunek 38.

Poprawnie przeprowadzono analizę termiczną skrobi, choć trochę szkoda, że nie zdecydowano się na statystyczne opracowanie bardzo licznych wyników uzyskanych tą metodą (zwłaszcza entalpii poszczególnych przemian fazowych).

*Wyjaśnienia wymagają przedstawione w pracy dyfraktogramy. Po raz pierwszy pojawiają się one w rozdziale 5.10 i obejmują rysunki 61 - 70, po raz drugi omawiane są w rozdziale 5.12.3 i obejmują ryciny 85 - 90. Jakkolwiek sposób prezentacji graficznej różni się nieco pomiędzy poszczególnymi rozdziałami (różny zakres kątów, inne kolory, czcionki), wydaje się, że rysunki odpowiednio: 61 i 85, 62 i 86, 65 i 87, 68 i 88, 69 i 89 oraz 90 i 120 obrazują dyfraktogramy tych samych próbek. Na marginesie należy zauważyć, że rozłączne przedstawianie próbek ozimych i jarych przewódkowych odmian pszenicy nie ułatwia zauważenia większej powierzchni pików kompleksu amylozowo-lipidowego przy kątach  $2\Theta$  (a nie jak pisze Autor - długościach) około  $20^\circ$ , o czym mowa na stronie 200.*

W tabelach 29-31 znalazły się rzadko obecne w innych częściach pracy współczynniki korelacji niezwiązane bezpośrednio z twardością ziarna. Wysokie wartości niektórych z nich dowodzą, że niesłuszne jest ograniczanie się do z góry przewidywanych parametrów, a analizę statystyczną powinno się traktować nie jako dowód występowania zależności, ale jako narzędzie umożliwiające identyfikację potencjalnie ciekawych i mogących umknąć uwadze zjawisk. Z tego punktu widzenia znacząca część pracy, w której szczegółowo omawia się współczynniki korelacji na poziomie zupełnie nieistotnym wprowadza więcej chaosu niż pożytku. Z drugiej strony jedną z pierwszych rzeczy, które należałoby przedstawić czytelnikom jest *poziom istotności wspomnianych współczynników przy zadanej liczebności prób.*

Opis różnic we właściwościach uzyskiwanych hydrolizatów skrobiowych, mimo wspomnianych wcześniej zastrzeżeń co do terminologii, został prawidłowo omówiony i zinterpretowany. W tym miejscu muszę jednak zauważyć, że zastosowana metoda pomiaru siły ściskania osadów powinna zostać zmodyfikowana, bo w kilku przypadkach osiągnięto wartości maksymalne skali użytego teksturometru (zaznaczone zresztą przez Autora pogrubieniem). Interesujące byłoby także omówienie ilości zliofilizowanego osadu, bo taki parametr mógłby być z powodzeniem badany w praktyce przemysłowej (być może po zastąpieniu liofilizacji zwykłym suszeniem). Wydaje się to tym bardziej uzasadnione, że w pracy dyskutuje się zawartość arabinoksylianów w tejże frakcji.



Niewątpliwą nowością przedstawioną w pracy jest wykazanie braku obecności kwasu ferulowego we frakcjach arabinoksylianów obecnych na powierzchni ziarenek skrobiowych. Szkoda jednak, że nie zadbano o właściwą kolejność przedstawiania widm masowych, poczynając od wzorca (zgodnie z tym, jak przeprowadzono dyskusję na stronie 277). Skrótowe omówienie zestawionych na rysunkach 140 - 150 widm nie wyjaśnia, czy za podstawę identyfikacji kwasu ferulowego uznawano równoczesne występowanie jonów o wartościach  $m/z$  193, 149, 178, czy też tylko pierwszego z nich oraz jakie inne związki występujące w ziarnie pszenicy mogą dawać sygnał o podobnych wartościach.

Wobec ogromu przedstawionych i w większości przypadków prawidłowo przedyskutowanych wyników, wskazane błędy i wątpliwości nie wpływają zasadniczo na wartość przedstawionej pracy, gdyż dotyczą głównie kwestii czysto technicznych i mogą być stosunkowo łatwo wyeliminowane.

Przedstawione w pracy **wnioski** (strona 279) są liczne (20) i stanowią pewne uogólnienie wcześniejszych podsumowań, formułowanych po większości rozdziałów. W takiej sytuacji można byłoby oczekiwać nieco zwięźlejszej formy i większej dbałości o styl (razi zwłaszcza sformułowanie „bardziej silny”, oraz „uzasadnienie” w znaczeniu „wyjaśnienie, wytłumaczenie”). Tym niemniej wnioski znajdują swe odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach badań i dowodzą umiejętności syntetycznego spojrzenia na całość zagadnienia.

Podsumowując, praca stanowi istotny wkład do zrozumienia sposobu powiązania arabinoksylianów z ziarenkami skrobi pszennej i przedstawia szereg praktycznych wniosków pozwalających na ograniczenie ich negatywnego wpływu na hydrolizę skrobi za pomocą preparatów amylolytycznych. Zaproponowane metody wstępnej selekcji odmian pszenicy i modyfikacji procesów technologicznych związanych z wyosabnianiem skrobi i jej hydrolizą mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle. Biorąc to pod uwagę stwierdzam, że praca Pana mgr inż. Bartłomieja Makowskiego pod tytułem „Arabinoksyliany skrobi pszennych i ich wpływ na kształtowanie właściwości hydrolizatów” spełnia wymogi zawarte w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595 z późn. zm.) oraz wymogi określone w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, co zgodnie z Ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 poz. 261) oraz



przepisami wprowadzającymi ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.) daje podstawę do dopuszczenia Pana mgra inż. Bartłomieja Makowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego, o co niniejszym wnoszę.

Kraków, 6 listopada 2024

  
*dr hab. Rafał Ziobro, prof. URK*