Prof. dr hab. inż. Wioletta Błaszczak,
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Olsztyn, dnia 04.01.2021

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Walkowiak pt.: "Charakterystyka molekularnych właściwości skrobi modyfikowanej fizycznie" wykonanej na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Hanny Marii Baranowskiej profesora UPP.

Skrobia, jeden z głównych polimerów występujących w przyrodzie, dzięki swoim właściwościom, znajduje szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, od produkcji żywności począwszy, poprzez przemysł farmaceutyczny aż do biodegradowalnych opakowań. Skrobia łatwo poddaje się procesom modyfikacji chemicznej, fizycznej czy enzymatycznej, które pozwalają na otrzymywanie preparatów modyfikowanych spełniających szeroki wachlarz wymagań stawianych przez użytkowników. Podejmowane są liczne próby dalszych, ukierunkowanych modyfikacji tego biopolimeru z zachowaniem szczegółowych wymagań i obostrzeń prawnych. Jedną z rozwijanych ostatnio metod jest działanie na skrobię mikrofalami. Tego zagadnienia dotyczy właśnie recenzowana dysertacja.

Ocena formalna

Praca napisana została w typowy sposób dla redagowania prac naukowych. Liczy ona 95 stron maszynopisu w tym 9 tabel , 36 rysunków. Zacytowano 94 referencje. Pracę poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim. Obszerny wstęp liczy 20 stron i dotyczy podstawowych wiadomości o badanym polimerze, zastosowanym w modyfikacji ligandzie i metodzie magnetycznego rezonansu jądrowego w niskich polach. Po przedstawieniu wybranych zagadnień bazowych Autorka przedstawia cel pracy wraz z hipotezami badawczymi (2 strony) i przechodzi do prezentacji materiału badawczego i metod analitycznych (8 stron). Rozdział Wyniki i dyskusja przedstawiono na 41 stronach,. w tym 10 stron dotyczy kleików skrobiowo-białkowych. Ostatnia część- badawcza pracy, zatytułowana Wnioski (2 strony), stanowi podsumowanie przeprowadzonych badań, w której Autorka formułuje 13 szczegółowych wniosków.

Ocena merytoryczna pracy

Tytuł pracy**: "Charakterystyka molekularnych właściwości skrobi modyfikowanej fizycznie"** jest co najmniej dyskusyjny. Co prawda, tytuł zawiera słowa kluczowe takie jak charakterystyka molekularna, skrobia czy modyfikacja fizyczna, natomiast nie oddaje on w pełni merytorycznej treści pracy. Po pierwsze, z tytułu dysertacji nie wynika jaka skrobia i

jaki rodzaj modyfikacji fizycznej będzie stosowany. Po drugie, że fizyczna modyfikacja skrobi zostanie przeprowadzona z dodatkiem lizozymu.
Przedstawiona do recenzji praca dotyczy głównie skrobi ziemniaczanej, oddziaływania mikrofal i dodatku lizozymu. Stąd, bardziej informacyjne byłoby ujęcie w tytule, wpływu działania mikrofal i dodatku lizozymu na molekularne właściwości preparatów otrzymanych ze skrobi ziemniaczanej.

W części literaturowej rozprawy (Cz. 1. Wprowadzenie teoretyczne) Autorka bardzo szczegółowo charakteryzuje skrobię, jej właściwości chemiczne, polimorfizm i trójwymiarową strukturę ziarenka. W dalszej części Doktorantka przybliża metody modyfikacji skrobi, dzieląc je na chemiczne, enzymatyczne, z zastosowaniem inżynierii genetycznej i modyfikacje fizyczne. Omówieniu tych metod poświęca połowę wprowadzenia teoretycznego. W końcowej jego części, Autorka przedstawia specyfikę działania magnetycznego rezonansu jądrowego w niskich polach. Żałować należy, że w tej części pracy, marginalnie potraktowano lizozym – jego właściwości i celowość zastosowania w wielu branżach przemysłu spożywczego. Podobnie, mało miejsca poświęcono przykładowemu wykorzystaniu niskopolowego magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach skrobi i preparatów skrobiowych. Można mieć również pewne uwagi co do zastosowanego, nie zawsze trafnie dobranego, słownictwa (właściwości teksturalne, hipotetyczna granulka, bezpostaciowe lamele, reszty glukozylowe, stopień ułożenia podwójnych helis, skrobie sfotografowane skaningowym mikroskopem elektronowym, właściwości funkcjonalne produktu, niska odporność termiczna (skrobi), gładka tekstura (skrobi), modyfikacje podwójne (skrobi), nieodwracalne żele skrobiowe). Ponadto, opisując skrobie, Doktorantka zamiennie używa takich terminów jak granula skrobiowa, granulka skrobiowa, ziarno gałeczki skrobiowej czy ziarno skrobi (str. 12). Zdaniem recenzentki, korzystniej byłoby wybrać i konsekwentnie stosować w całej dysertacji jeden, poświęcony skrobi, termin.

W części drugiej dysertacji, Autorka definiuje cel badań i formułuje następujące hipotezy badawcze: i) „Biopolimer poddany działaniu pola elektromagnetycznego o częstości rzędu GHz, zmienia właściwości molekularne układu skrobia-woda"; ii) „Dodatek lizozymu zmienia oddziaływania molekularne w sieci biopolimerowej". Następnie, przedstawiono zakres podjętych prac w celu weryfikacji wspomnianych wyżej hipotez. Według mnie, pierwszą hipotezę sformułowano zbyt ogólnie, bowiem w pracy zastosowano stałą częstotliwość (2450 MHz) a zmienną moc mikrofal (50-200 W/g), w funkcji czasu (1-5 min).

W części trzeciej pracy, Doktorantka prezentuje materiał badawczy, przedstawia zakres analiz i stosowane metody badawcze. Większość informacji podana jest w sposób wyczerpujący, jednak niektóre z nich wymagają dodatkowego wyjaśnienia. W przypadku lizozymu warto byłoby przytoczyć celowość i wybór metody jego modyfikacji. Autorka tylko lakoniczne wspomina, że „Modyfikację… przeprowadzono metodą termiczno-chemiczną w środowisku utleniającym." Nasuwa się również pytanie, czy 5% roztwór monomeru lizozymu otrzymano od producenta (Belovo, Belgia), czy jednak sporządzono go samodzielnie. Jeśli tak, to jaki był skład środowiska dla rozpuszczonego enzymu? W podrozdziale 3.4. dotyczącym przygotowania żeli skrobiowych, doktorantka niefortunnie stosuje określenie

„roztwór skrobiowy”. Jednozdaniowy opis metod statystycznych ogranicza się jedynie do podania „…liczby powtórzeń wraz z odchyleniami od wartości średniej.”, podczas gdy Autorka prezentuje w omówieniu wyników znacznie szerszy zakres stosowanych testów statystycznych.
Na szczególne wyróżnienie zasługuje warsztat naukowo-badawczy, który Doktorantka wykorzystała w swoich badaniach, zwłaszcza metoda niskopolowego magnetycznego rezonansu jądrowego. Zastosowanie tej metody do analiz molekularnych właściwości wody w testowanych układach istotnie zwiększa wartość naukową pracy.

Część czwartą pracy, tj.: Wyniki i dyskusja, podzielono na trzy podrozdziały. Najistotniejsza w tej części badań, dokumentacja wyników całkowicie wymknęła się Autorce spod kontroli i w całym rozdziale numery tabel i rysunków nie zgadzają się z numerami podawanymi w tekście, mimo że spis tabel i rysunków podany na końcu pracy jest prawidłowy.

W podrozdziale pierwszym (4.1. Fizyczna modyfikacja ziarna skrobiowego), Doktorantka charakteryzuje wpływ mocy i czasu mikrofalowania na fizykochemiczne właściwości skrobi. Stwierdza, że „…na skutek oddziaływania pola elektromagnetycznego, skrobia zmienia swoje właściwości hydroskopowe.” Zasadnym wydaje się doprecyzowanie dość enigmatycznego określenia „właściwości hydroskopowe”. Opisywane przez Autorkę zjawisko hydratacji dotyczy bardziej zdolności sorpcji pary wodnej przez skrobie niż właściwości, o których pisze Autorka.
Badając parametry hydrodynamiczne doktorantka nie stwierdziła istotnego wpływu mocy i czasu napromieniowania na zmiany w rozkładzie mas cząsteczkowych skrobi. Natomiast, wartości parametrów hydrodynamicznych prezentowane w Tabeli 6 wskazują na zmianę parametru opisującego kształt makromolekuły skrobiowej w roztworze (Rg/Rh). Stąd, pewnym zgrzytem jest stwierdzenie Autorki, że „…kształt ziarna skrobiowego w czasie…modyfikacji zmienił się na przypominający pręt lub pałeczkę.” To nie ziarno skrobiowe zmienia kształt lecz zmienia się konformacja makrocząsteczki w roztworze i w zależności od wartości może ona przyjmować ściśle określoną formę (np.: zbity kłębek, kłębek statystyczny lub pałeczka).
Analizując widma w podczerwieni podkreślono znaczenie pasma o liczbie falowej 1638cm^{-1} (odpowiadające wiązaniom glikozydowym alfa-(1,4)) i możliwość transglikozydacji na rzecz wiązań glikozydowych alfa-(1,6), czy jak pisze Autorka „..lub innych.” Warto byłoby doprecyzować o jakie inne wiązania chodzi.

W drugim podrozdziale (4.2. Kleiki skrobiowe) Doktorantka omawia wpływ zastosowanej modyfikacji na parametry kleikowania 5% zawiesin skrobiowych. Mimo że wszystkie wyniki z eksperymentu zestawiono w Tabeli 7., to wyniki powielono w postaci dwóch dodatkowych rysunków tj. Rys. 12 i 13. Na podstawie otrzymanych rezultatów Autorka stwierdza, że najkorzystniejsze (z punktu widzenia właściwości użytkowych badanych preparatów) parametry lepkości końcowej i początkowej temperatury kleikowania otrzymano dla skrobi modyfikowanej falą o mocy 175 W/g i w czasie 2 min. Analizując dynamikę molekularną wody w kleikach skrobiowych metodą niskopolowego magnetycznego rezonansu jądrowego, Doktorantka stwierdza, że niezależnie od parametrów przeprowadzonej

modyfikacji, badany materiał charakteryzuje spadek czasu relaksacji spin-sieć. Twierdzi Ona, że fizyczna modyfikacja powoduje uwięzienie wody w sieci polimerowej, co przekłada się na ograniczenie jej ruchliwości w badanym układzie. Największy spadek odnotowano dla próbek modyfikowanych falą o mocy 100 - 150 W/g i w czasie 2 min. Jednocześnie kalkulując średni czas korelacji ruchu rotacyjnego molekuł wody, zaobserwowano istotny spadek wartości średnich czasów korelacji dla preparatów modyfikowanych w czasie 2 i 3 min. Zjawisko to przypisano procesowi uwalniania wody na skutek, jak pisze Autorka,''krystalizacji łańcuchów polimerowych''. Wydaje się, że powyższe stwierdzenie wymaga znacznie głębszej refleksji. Badając temperaturowe zmiany parametrów relaksacyjnych odnotowano spadek wartości parametru T1 niezależnie od zastosowanych warunków modyfikacji. Zdaniem Autorki, modyfikacja falą elektromagnetyczną skutkuje szybszą reorganizacją cząsteczek wody w badanych układach i wzrostem energii aktywacji dla ruchów rotacyjnych cząsteczek wody w strukturze żelu skrobiowego. Ponadto, Doktorantka stwierdza, że wartości lepkości były silnie i dodatnio skorelowane z szybkością relaksacji spin-sieć. Podobnie, aktywność wody silnie i dodatnio korelowała z szybkością relaksacji spin-spin. Podsumowanie tej części omówienia wyników, kończy stwierdzenie, że modyfikacja skrobi ziemniaczanej przy pomocy mikrofal prowadzi do zmiany właściwości hydrofobowo-hydrofilowych biopolimeru na skutek zmiany lokalizacji cząsteczek wody w badanych układach.

Ostatni podrozdział omówienia wyników (4.3. Kleiki skrobiowo-białkowe), poświęcono właściwościom fizykochemicznym układów otrzymanych ze skrobi modyfikowanej mikrofalami i wprowadzeniu do nich lizozymu.

Jak stwierdza Doktorantka, wzrost mocy użytych mikrofal i dodatek białka (pH=4/ pH=6) istotnie wpływa na wartości szybkości relaksacji (R_2) i na czas relaksacji spin-spin (T_2). Natomiast nie odnotowano istotnego wpływu dodatku lizozymu na szybkość relaksacji spin-sieć. Analizując wpływ zastosowanej modyfikacji na charakterystykę temperaturową badanych układów, Autorka wnioskuje, że obróbka skrobi mikrofalami o mocy 150 W/g, w czasie 3 min., i dodatek białka (pH=6) obniża początkową temperaturę kleikowania układu (z 55°C na 40°C), co według Autorki z punktu widzenia technologicznego, jest pożądanym zjawiskiem. Obserwuje również, że dodatek lizozymu o pH=4 do skrobi mikrofalowanej z użyciem mocy 150 W/ g, w czasie 2 i 3 min., skutkuje wzrostem energii aktywacji ruchów rotacyjnych cząsteczek wody w badanych układach.

W końcowej części pracy, sformułowano 13 szczegółowych wniosków. W ostatnim wniosku Autorka stwierdza, że otrzymane wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania dimeru lizozymu do poprawy właściwości strukturalnych sieci biopolimerowej. Szkoda, że dopiero w tym miejscu Doktorantka precyzuje, że na skutek zastosowanej modyfikacji otrzymała, dimer lizozymu. Jest to o tyle istotne, że taki kierunek modyfikacji może uczynnić lizozym bardziej atrakcyjnym dla wykorzystania w przemyśle spożywczym. Wiadomym jest, że dimer lizozymu wykazuje nową aktywność skierowaną przeciw bakteriom Gram-ujemnym. Jednoczenie nie traci właściwości bakteriobójczych wobec bakterii Gram-dodatnich.

Prace kończy spis tabel i rysunków oraz bibliografia. Część poświęcona bibliografii wymaga korekty i ujednolicenia pisowni nazw czasopism.

Podsumowując, Doktorantka podjęła się szerokiego, a zarazem trudnego tematu modyfikacji skrobi ziemniaczanej przy pomocy mikrofal o zmiennej mocy promieniowania i czasie obróbki. Jednocześnie wprowadziła do układu skrobia mikrofalowana - woda dodatkowy czynnik modyfikujący- dimer lizozymu. Praca stanowi odpowiedź na zainteresowanie przemysłu spożywczego i wskazuje w jakim kierunku powinny być kontynuowane dalsze badania, tak aby zadowolić przyszłych użytkowników otrzymanych preparatów.

Na uwagę zasługuje bardzo duża pracochłonność wykonanych zadań badawczych. Założenia pracy są prawidłowe, a jej konstrukcja jest spójna i prowadzi do założonego celu.

Wymienione w recenzji uwagi krytyczne nie mają wpływu na wartość merytoryczną pracy i mam nadzieję, że będą pomocne w przygotowaniu wartościowych publikacji naukowych. Informacje zawarte w pracy niewątpliwie wzbogacają wiedzę na temat modyfikacji fizycznej skrobi i układów skrobiowo-białkowych. Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U.Nr 65, poz.595, z późn. zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Proszę zatem Wysoką Radę Naukową Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Walkowiak do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.