

AUTOREFERAT OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH



Dr inż. Małgorzata Renata Cyran

**Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin,
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Państwowy Instytut Badawczy,
Radzików, 05-870 Błonie**

RADZIKÓW 2014

SPIS TREŚCI	Strona
1. Życiorys naukowy	3
2. Opis osiągnięcia naukowego będącego podstawą do złożenia wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego – tytuł, lista publikacji	4
3. Wstęp	5
4. Cele osiągnięcia naukowego	6
5. Opis wyników badań	7
6. Najważniejsze osiągnięcia naukowe	16
7. Podsumowanie wyników i osiągnięć oraz ich znaczenie aplikacyjne	17
8. Opis pozostałych zainteresowań i osiągnięć naukowo-badawczych	22

Życiorys naukowy

1. Imię i nazwisko: Małgorzata Renata Cyran

2. Posiadane dyplomy:

30.06.1986 – uzyskanie tytułu magistra inżyniera rolnictwa o specjalności technologia żywności na Wydziale Technologii Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Tytuł pracy magisterskiej: *”Charakterystyka substancji azotowych w nowych odmianach fasoli”*,

Promotor: prof. dr hab. Mirosława Klepacka.

17.01.1997 – uzyskanie stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia na Wydziale Technologii Żywności SGGW w Warszawie.

Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Badania nad składem polisacharydów nieskrobiowych ziarna pszenżyta i żyta, ich degradacją w organizmie jednożołądkowców oraz zawiązkiem z wartością wypiekową mąki”*,

Promotor: prof. dr hab. Maria Rakowska.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1986 – stażysta, Zakład Biologicznej Oceny Produktów Roślinnych, IHAR, Radzików

1988 – asystent, Zakład Biologicznej Oceny Produktów Roślinnych, IHAR, Radzików

1997 – do chwili obecnej, adiunkt, Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, IHAR-PIB, Radzików

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 65 z 2003 r. poz.595; Dz. U. 164 z 2005 r. poz.1365; Dz. U. 84 z 2011 r. poz. 455):

a) Tytuł osiągnięcia:

„Struktura makromolekularna arabinoksylanów ściany komórkowej żyta (*Secale cereale* L.) ekstrahowalnych wodą jako czynnik warunkujący lepki potencjał pieczywa”

b) Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl następujących publikacji:

1. **Cyran, M.**, Courtin, C. M., Delcour, J. A. **2003**. Structural features of arabinoxylans extracted with water at different temperatures from two rye flours of diverse breadmaking quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4404 – 4416.

IF = 2,102, 11 pkt wg listy z 2003 roku, udział 80%.

2. **Cyran, M.R.**, Saulnier, L. **2005**. Cell wall fractions isolated from outer layers of rye grain by sequential treatment with α -amylase and proteinase: Structural investigation of polymers in two ryes with contrasting breadmaking quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9213 – 9224.

IF = 2.507, 24 pkt MNiSW wg listy z 2005 roku, udział 85%.

3. **Cyran, M.R.**, Ceglińska, A. **2011**. Genetic variation in the extract viscosity of rye (*Secale cereale* L.) bread made from endosperm and wholemeal flour: impact of high-molecular-weight arabinoxylans, starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 469 – 479.

IF = 1.436, 32 pkt MNiSW wg listy z 2011, udział 75%.

4. **Cyran, M.R.**, Saulnier, L. **2012**. Macromolecular structure of water-extractable arabinoxylans in endosperm and wholemeal rye breads as factor controlling their extract viscosities. *Food Chemistry*, 131, 667 – 676.

IF = 3.334, 45 pkt MNiSW wg listy z 2012 roku, udział 85%.

5. **Cyran, M.R.**, Ceglińska, A., Kolasińska, I. **2012**. Depolymerization degree of water-extractable arabinoxylans in rye bread: characteristics of inbred lines used for breeding of bread cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8720 – 8730.

IF = 2.906, 45 pkt MNiSW wg listy z 2012 roku, udział 75%.

6. **Cyran, M.R.**, Dynkowska, W.M. **2014**. Mode of endosperm and wholemeal arabinoxylans solubilisation during rye breadmaking: Genotypic diversity in the level, substitution degree and macromolecular characteristics. *Food Chemistry*, 145, 356 – 364.

IF = 3.334, 40 pkt MNiSW wg listy z 2013 roku, udział 90%.

Jestem autorem koncepcji naukowej powyższych publikacji, głównym wykonawcą, pierwszym autorem, który napisał wszystkie manuskrypty oraz autorem korespondencyjnym,

odpowiedzialnym za wartość merytoryczną i proces publikowania manuskryptów w wiodących czasopismach międzynarodowych.

- Sumaryczny Impact Factor powyższych publikacji według listy Journal Citation Reports wynosi **15,619**
- **54** cytowania w/w publikacji według Web of Science,
- suma punktów za 6 publikacji z listy MNiSW wynosi **197**.

Oświadczenia współautorów w/w publikacji wraz z określeniem ich wkładu w powstanie pracy stanowi **Załącznik 5**.

- c) Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Arabinoksylany stanowią główny składnik ścian komórkowych ziarna żyta, pszenicy i pszenżyta. Należą one do grupy polisacharydów ściany, które razem z celulozą określane są terminem „nieskrobiowych”, w odróżnieniu od skrobi, dominującego polisacharydu zapasowego ziarna zbóż. Razem z innymi polisacharydami ściany komórkowej, takimi jak β -glukany, arabinogalaktyki oraz, w niewielkim stopniu, glukomannany i ksyloglukany, wypełniają szkielet celulozowy ściany, a ich koncentracja oraz cechy strukturalne warunkują właściwości fizyko-chemiczne i mechaniczne ściany komórkowej oraz jej potencjał antyoksydacyjny.

Polisacharydy ściany komórkowej tworzą zasadniczą frakcję błonnika pokarmowego żywności pochodzenia roślinnego o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych. Produkty zbożowe są głównym źródłem błonnika pokarmowego w diecie człowieka, wśród nich produkty żytnie wyróżniają się wysoką koncentracją tej frakcji. Jedną z najważniejszych właściwości produktów żytnich jest zdolność do znacznego podnoszenia lepkości treści pokarmowej w jelicie cienkim po ich spożyciu. Wysoka lepkość treści pokarmowej ogranicza wchłanianie glukozy oraz trójglicerydów a w rezultacie powoduje spadek poziomu glukozy i cholesterolu w surowicy krwi (Jenkins i wsp. 2004). Powyższe zależności odzwierciedlają jeden z zasadniczych mechanizmów działania błonnika pokarmowego w profilaktyce i leczeniu cukrzycy, otyłości oraz chorób układu sercowo-naczyniowego. Lepkość treści pokarmowej po spożyciu pieczywa żytniego jest ściśle skorelowana z lepkością jego ekstraktu (Mäkki, 2001), kontrolowaną głównie przez polisacharydy ściany komórkowej, które nie są trawione przez enzymy przewodu pokarmowego człowieka, w odróżnieniu od pozostałych wysokocząsteczkowych składników ekstraktu, przede wszystkim skrobi i białek.

Wykazano, że lepkość ekstraktów żyta i pszenicy jest skorelowana z koncentracją arabinoksylanów ekstrahowalnych (Pettersson i Åman, 1987; Scoles i wsp. 1993; Saulnier i wsp., 1995; Martinant i wsp., 1999). Nieliczne doniesienia podnosiły znaczenie cech strukturalnych arabinoksylanów żytnich w odniesieniu do poziomu lepkości ekstraktu (Bengtsson i wsp. 1992; Nilsson i wsp., 2000; Ragaei i wsp. 2001). Pojawiły się również

doniesienia, które wskazywały na znacznie wyższą lepkość ekstraktu jasnej mąki żytniej w porównaniu do lepkości mąki całościarnowej o wyższej koncentracji tej frakcji (Fengler i Marquardt, 1988; Ragaee i wsp. 2001), co sugerowało różnice w strukturze arabinoksylianów obecnych w centralnych warstwach bielma, które podczas przemiału są kumulowane w mące jasnej, i tych występujących w zewnętrznych warstwach ziarna, gromadzonych głównie w otrębach. Jakkolwiek ekstrakt żytni zawiera także inne składniki wielkocząsteczkowe, które mogą wpływać na wartość tego parametru.

W związku z tym pojawiły się pytania (1) czy lepkość ekstraktu jasnego pieczywa żytniego może być wyższa niż pieczywa całościarnowego? co mogłoby wskazywać na jego silniejsze działanie w profilaktyce i leczeniu pewnych chorób cywilizacyjnych, jeśli jest ona kontrolowana przez polisacharydy błonnika pokarmowego, (2) jakie czynniki warunkują wysoką lepkość ekstraktu? oraz (3) jakie są zależności pomiędzy lepkością ekstraktów mąki i pieczywa żytniego? Monotematyczny cykl publikacji prezentowany poniżej w znacznym stopniu wyjaśnia te zagadnienia, rozpoczynając od nowej wiedzy na temat cech strukturalnych arabinoksylianów, niezbędnej do lepszego zrozumienia mechanizmów kontrolujących ich stopień modyfikacji podczas produkcji pieczywa żytniego.

Cele osiągnięcia naukowego [material]:

1. Dystrybucja i analiza cech strukturalnych sub-populacji arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą w różnej temperaturze z centralnych warstw ziarna żyta o zróżnicowanej lepkości ekstraktu. [mąka jasna – 2 odmiany żyta]
2. Charakterystyka makromolekularna arabinoksylianów sekwencyjnie ekstrahowalnych wodą w obecności α -amylazy i proteiny pochodzących z zewnętrznych warstw ziarna żyta o zróżnicowanej lepkości ekstraktu. [otręby żytnie – 2 odmiany żyta]
3. Badanie zróżnicowania lepkości ekstraktów pieczywa jasnego i całościarnowego oraz wpływu wysokocząsteczkowych arabinoksylianów, β -glukanów, skrobi i białek na poziom lepkości ekstraktu ogólnego. [pieczywo jasne i całościarnowe – 11 odmian żyta]
4. Identyfikacja elementów struktury arabinoksylianów kontrolujących poziom lepkości ekstraktów pieczywa otrzymanego z odmian populacyjnych i mieszańcowych żyta. [pieczywo jasne i całościarnowe – 10 odmian żyta]
5. Analiza struktury makromolekularnej arabinoksylianów w ekstraktach mąki wyjściowej i pieczywa otrzymanego z linii wsobnych żyta o zróżnicowanej zawartości arabinoksylianów i aktywności enzymów degradujących te polisacharydy oraz wskazanie prostych testów przesiewowych do selekcji populacji hodowlanych żyta w kierunku odmian „chlebowych” o wysokim potencjale lepkim. [mąka wyjściowa, pieczywo jasne i całościarnowe – 6 linii wsobnych żyta]
6. Badanie mechanizmów upłynniania frakcji arabinoksylianów nie-ekstrahowalnych wodą podczas produkcji pieczywa jasnego i całościarnowego otrzymanego z odmian populacyjnych i mieszańcowych żyta. [mąka wyjściowa, pieczywo jasne i całościarnowe – 11 odmian żyta]

Prace naukowe wykonane przeze mnie dotyczą pieczywa otrzymanego w jednakowych warunkach z ciasta żytniego, które zostało bezpośrednio zakwaszone poprzez dodatek kwasu mlekowego.

Opis wyników badań

Struktura arabinoksylianów ściany komórkowej zbóż jest bardzo złożona. Wynika to ze znacznego zróżnicowania pod względem stopnia podstawienia głównego łańcucha tych polisacharydów szeregiem różnych podstawników bocznych, ich wzajemną proporcją i sekwencją w łańcuchu głównym, a także istotnego zróżnicowania pod względem dystrybucji mas cząsteczkowych.

Obecnie w literaturze światowej coraz częściej podkreśla się fakt, że niewielkie zmiany w strukturze biopolimerów powodują istotne zmiany ich właściwości fizyko-chemicznych, które bezpośrednio wpływają na właściwości surowca roślinnego lub jego produktu końcowego. Te niewielkie zmiany są praktycznie niewidoczne w ogólnej populacji biopolimerów, dlatego zastosowanie odpowiedniej metody sekwencyjnego frakcjonowania populacji ogólnej jest konieczne do obserwacji takich zmian.

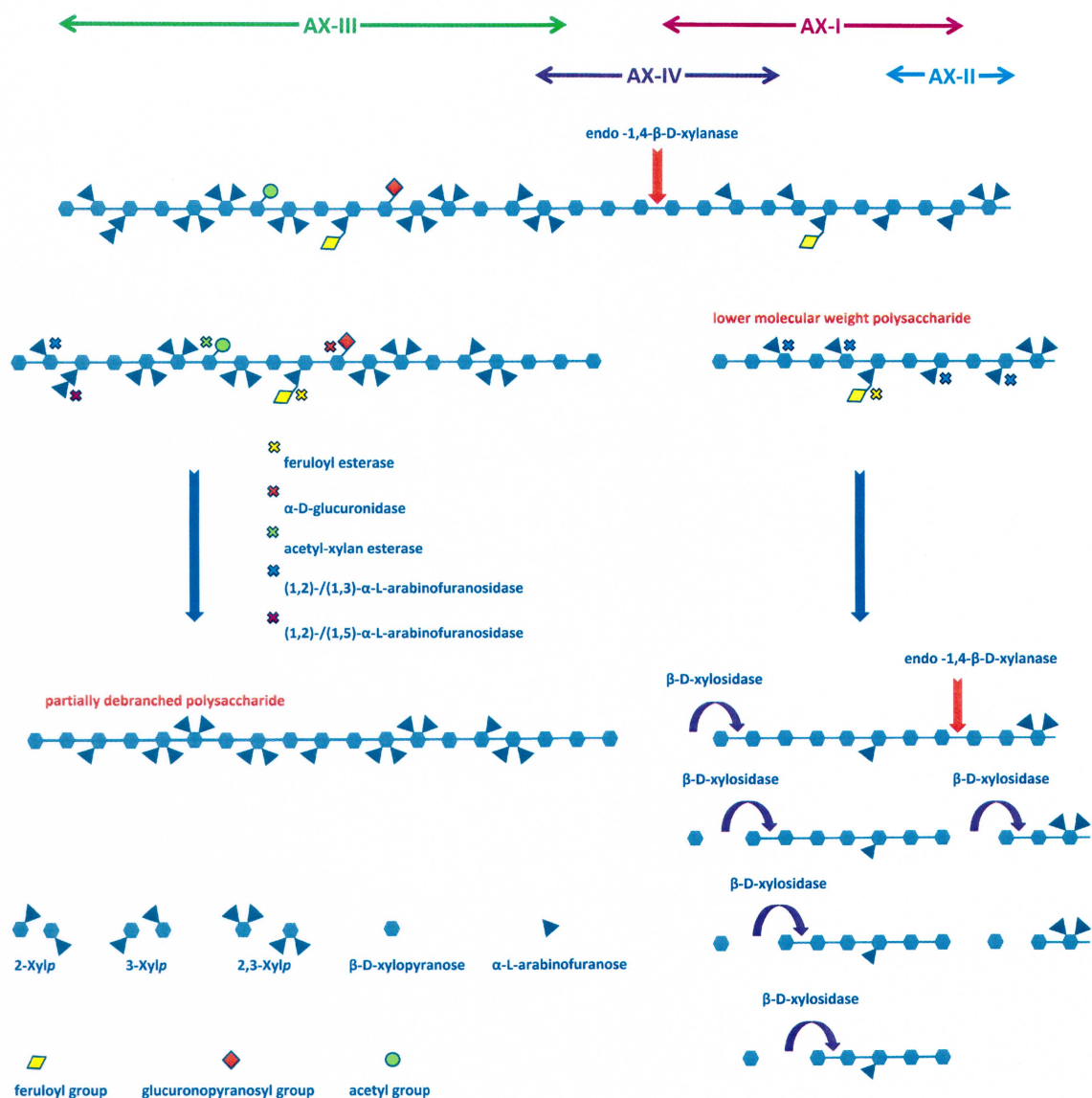
W badaniach naukowych zastosowano technikę sekwencyjnego frakcjonowania siarczanem amonu. Pozwala ona na izolację sub-populacji wchodzących w **skład frakcji ogólnej polisacharydów (WE)**, przez ich kolejne wytrącanie z oczyszczonego ekstraktu przy wzrastającym stopniu nasycenia tej soli. Przy nasyceniu 0 – 40% otrzymujemy sub-frakcję **WE.40**, a następnie przy kolejnych stopniach nasycenia 40 – 60%, 60 – 80% oraz 80 – 100% otrzymujemy odpowiednio sub-frakcje **WE.60**, **WE.80** oraz **WE.100**. W badaniach zawartych w publikacji **H6** zastosowano również sekwencyjne frakcjonowanie etanolem i porównano profile elucyjne HPSEC i masy cząsteczkowe polisacharydów ściany do tych otrzymanych za pomocą frakcjonowania siarczanem amonu.

(H1) Struktura arabinoksylianów bielma żyta ekstrahowalnych wodą o różnej temperaturze

Główny łańcuch arabinoksylianów zbudowany jest z reszt β -D-ksylopiranozy (**Ksylv**) połączonych wiązaniem 1 $\rightarrow$ 4 glikozydowym, które występują w postaci reszt niepodstawionych (**u-Ksylv**) i podstawionych; z jednym podstawnikiem arabinofuranozy (**Araf**) w pozycji O-3 (**3-Ksylv**), bardzo rzadko w pozycji O-2 (**2-Ksylv**) oraz z dwoma podstawnikami w pozycji O-2 i O-3 (**2,3-Ksylv**) (**Rys. 1**). Ponadto, terminalne reszty **Araf** mogą być, w pewnym stopniu, podstawione kolejną resztą **Araf** i tworzyć krótkie oligomeryczne boczne łańcuchy arabinoksylianów poprzez wiązania 1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 3 i 1 $\rightarrow$ 5 glikozydowe (Ebringerowa i wsp. 1994) a także mogą występować w postaci zestryfikowanej kwasami fenolowymi, głównie kwasem ferulowym. Natomiast łańcuch główny arabinoksylianów może zawierać reszty kwasów uronowych: glukuronowego i galakturonowego, a także reszty kwasu octowego, związanych glikozydowo do **Ksylv**.

Wyizolowano trzy frakcje polisacharydów ściany komórkowej kolejno ekstrahowane wodą o temperaturze 4, 40 i 100 °C, odpowiednio **WE.I**, **WE.II** i **WE.III**, z mąki jasnej odmiany populacyjnej i mieszańcowej żyta (Amilo i Nawid). Na podstawie bilansu tych frakcji i ich

składu wykazano, że 62 – 66% ogólnej populacji arabinoksylianów jest ekstrahowalna wodą w niskiej temperaturze, czyli nie jest silnie zasocjowana ze ścianą. Natomiast 10 – 15% i 23 – 24% wymaga wyższej i wysokiej temperatury ekstrakcji.



Rys. 1. Podstawowe elementy struktury łańcucha sub-frakcji arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą (AX-IV, AX-I, AX-II and AX-III, wyizolowanych w wyniku sekwencyjnego wytrącania siarczanem amonu stosując stopień nasycenia odpowiednio 40, 60, 80 i 100%). Schemat działania enzymów biorących udział w hydrolizie tych polisacharydów (Cyran, 2014).

Z każdej populacji ogólnej ściany komórkowej ekstrahowalnej wodą wyizolowano trzy bardziej jednorodne sub-frakcje arabinoksylianów: dominującą **WE.60** o niskim stopniu podstawienia, określonym przez proporcję arabinozy do ksylozy (Ara/Ksyl), wynoszącą 0.47 – 0.51, oraz sub-frakcje **WE.80** i **WE.100** o średnim i wysokim stopniu podstawienia odpowiednio 0.74 – 0.91 i 0.98 – 1.28. Na podstawie widm magnetycznego rezonansu protonów (^1H NMR) uzyskanych dla sub-frakcji oraz ich analizy składu obliczono proporcje reszt **Ksylp** bez podstawników, z jednym oraz dwoma podstawnikami w łańcuchu. Frakcje

główne ściany komórkowej ekstrahowalne zimną wodą (**WE.I**) zawierały większe udziały dominującej sub-frakcji arabinoksylianów **WE.60**, która była zbudowana prawie wyłącznie z **u-Ksyp** i **3-Ksyp**. Frakcje ogólne tych polisacharydów **WE.II** i **WE.III**, które wymagały wyższej i wysokiej temperatury, zawierały większe udziały sub-frakcji **WE.80** i **WE.100**, o wzrastającym stopniu usieciowania poprzez reszty **2,3-Ksyp** z dwoma podstawnikami i niższym udziale **u-Ksyp** i **3-Ksyp**. Ponadto w sub-frakcjach **WE.80** i **WE.100** zidentyfikowano unikalny podstawnik łańcucha arabinoksylianów żytnich, **2-Xyp**, którego rola w interakcjach pomiędzy składnikami ściany komórkowej nie została dotychczas wyjaśniona. Jego udział w łańcuchu wzrastał proporcjonalnie do udziału reszt z dwoma podstawnikami (**2,3-Kyp**).

Stwierdzono wyraźne różnice w dystrybucji mas cząsteczkowych i udziałach czterech badanych typów **Ksyp** w łańcuchach arabinoksylianów wyizolowanych z odmiany populacyjnej o wysokiej lepkości ekstraktu oraz odmiany mieszańcowej o niskiej wartości tego parametru. Arabinoksyliany obecne w centralnej części bielma odmiany populacyjnej charakteryzowały się wyższą koncentracją dominującej sub-frakcji **WE.60**, dwukrotnie wyższym udziałem **2-Ksyp** a także były w znacznie mniejszym stopniu zasocjowane z białkami i substancjami fenolowymi ściany komórkowej. Wysokosprawna chromatografia wykluczania (HPSEC) wykazała, że dominująca sub-frakcja arabinoksylianów odmiany populacyjnej była bardzo symetryczna, natomiast analogi odmiany mieszańcowej zbudowane były z dwóch, częściowo rozdzielonych populacji o niższej i wyższej masie cząsteczkowej.

(H2) Struktura arabinoksylianów zewnętrznych warstw ziarna żyta ekstrahowalnych wodą

Wyizolowano frakcje ogólne arabinoksylianów z otrąb odmiany populacyjnej i mieszańcowej żyta Amilo i Nawid stosując sekwencyjną ekstrakcję wodą w obecności α -amylazy i proteinazy. Oczyszczone ekstrakty zostały poddane frakcjonowaniu siarczanem amonu o wzrastającym stopniu nasycenia 40, 60, 80 i 100% a otrzymane sub-populacje **WE.40**, **WE.60**, **WE.80** i **WE.100** zostały poddane szczegółowej analizie cech strukturalnych stosując ^1H NMR, HPSEC oraz FTIR (analiza w podczerwieni z transformacją Fouriera).

Frakcje wyizolowane z otrąb generalnie zawierały analogi strukturalne arabinoksylianów obecnych w centralnych warstwach ziarna, które zostały opisane w poprzedniej pracy **H1**. Jakkolwiek, zidentyfikowano sub-frakcję arabinoksylianów specyficzną wyłącznie dla ściany komórkowej zewnętrznych warstw żyta, o bardzo niskim stopniu podstawienia wynoszącym 0.30, posiadającą reszty sieciujące mono- i dwu- podstawione, **3-Ksyp** i **2,3-Ksyp** oraz regiony w których występuje kilka niepodstawionych reszt ksylozy w sekwencji. Natomiast analogi strukturalne arabinoksylianów zewnętrznych warstw żyta o wysokim stopniu podstawienia, **WE.80** i **WE.100**, praktycznie nie zawierały **2-Ksyp**.

Frakcja ekstrahowalna wodą w obecności proteinazy zawierała polisacharydy silnie zasocjowane z białkiem ściany oraz estrowo związane z kwasami fenolowymi. Arabinoksylian występujący w tej frakcji zawierał znaczny udział reszt dwu-podstawionych **2,3-Ksyp**.

Arabinoksyliany obecne w zewnętrznych warstwach ziarna odmiany mieszańcowej Nawid o niższej lepkości ekstraktu, w odniesieniu do tych pochodzących z odmiany populacyjnej

Amilo, charakteryzowały się wyższym stopniem usieciowania poprzez dimery kwasu ferulowego, niższą masą cząsteczkową oraz niższą proporcją pasma amidowego I do II wykazaną przez FTIR.

Podsumowaniem wyników badań nad zróżnicowaniem cech strukturalnych arabinoksylianów ściany komórkowej żyta zawartych w publikacji **H1** i **H2** jest zaproponowana klasyfikacja i bilans poszczególnych sub-populacji tych polisacharydów ekstrahowalnych wodą obecnych w centralnych warstwach bielma, warstwach zewnętrznych oraz w całym ziarnie żyta, biorąc pod uwagę ich stopień podstawienia, główny typ reszty sieciującej oraz poziom saturacji siarczanem amonu, który pozwalał na ich wytrącenie z ekstraktu populacji ogólnej (**Tabela 1**).

Tabela 1. Zawartość w ziarnie żyta, udział % i parametry charakterystyki strukturalnej czterech klas arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą otrzymanych w wyniku frakcjonowania siarczanem amonu.

klasa	poziom saturacji	Ara/Ksyl ^a	stopień podstawienia Ara ^f	główny element sieciujący	udział (%)			zawartość (% sm ziarna)
					mąka ^b	otręby	ziarno ^c	
AX-IV	40	0.31	bardzo niski	3-Xylp, 2,3-Xylp	nd	13 – 18	8 – 11	0.27 – 0.28
AX-I	60	0.47 – 0.51	niski	3-Xylp	69 – 70	55 – 58	60 – 62	1.60 – 1.94
AX-II	80	0.74 – 0.91	średni	3-Xylp, 2,3-Xylp	23	18 – 24	20 – 24	0.52 – 0.76
AX-III	100	1.00 – 1.28	wysoki	2,3-Xylp	7 – 8	7 – 8	7 – 8	0.18 – 0.24

Cyran i Saulnier, 2005

^aAra/Ksyl, proporcja arabinozy do ksylozy; ^bźródło, Cyran i wsp., 2003; ^cwartości obliczono na podstawie wydajności przemiału mąki i otręb; nd, nie wykryto. Wyniki uzyskane dla dwóch odmian żyta, Amilo i Nawid

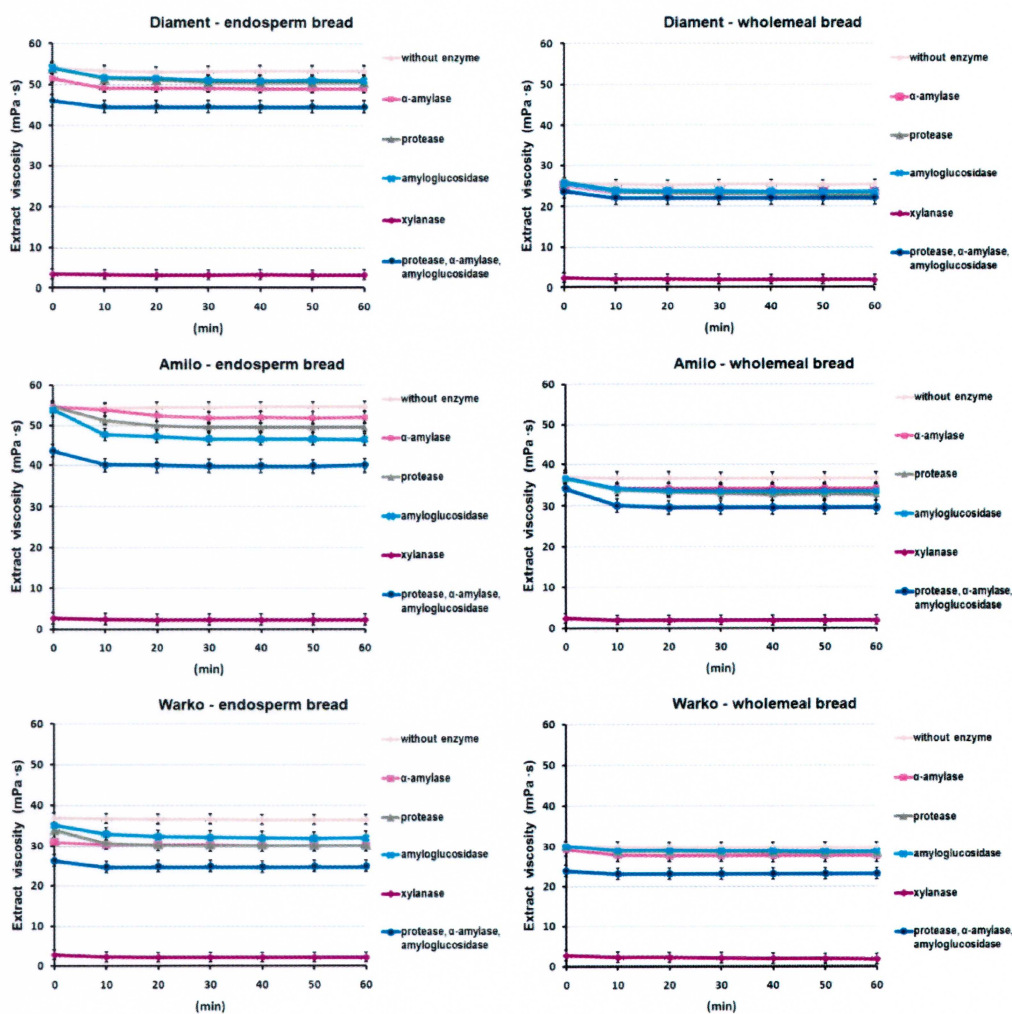
Dominująca klasa arabinoksylianów ziarna żyta ekstrahowalnych wodą, **AX-I**, o niskim stopniu podstawienia, zawierająca prawie wyłącznie **3-Ksylp** jako element sieciujący, stanowi 60 – 62% frakcji ogólnej. Klasa **AX-II** o średnim stopniu podstawienia zawierająca dwa elementy sieciujące **3-Kylp** i **2,3-Ksylp**, stanowi 20 – 24%. Klasa **AX-III** o najwyższym stopniu podstawienia łańcucha, zawierająca głównie reszty dwu-podstawione, stanowi tylko 7 – 8%. Natomiast specyficzna dla zewnętrznych warstw ziarna klasa **AX-IV** o bardzo niskim stopniu podstawienia stanowi 8 – 11% arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą obecnych w ziarnie żyta.

(H3) Wysokocząsteczkowe składniki ekstraktu pieczywa żytniego warunkujące jego lepkość

Oznaczono lepkość ekstraktu ogólnego pieczywa jasnego i całościarnowego otrzymanego z 5 odmian mieszańcowych i 6 odmian populacyjnych żyta oraz lepkość po inkubacji z enzymami katalizującymi rozkład hydrolityczny białek (proteaza), skrobi (α -amylaza i amyloglukozydaza), β -glukanów (lichenaza) oraz arabinoksylianów (endo-ksylanaza), w celu wykazania wpływu poszczególnych składników ekstraktu na poziom lepkości a także działania synergistycznego enzymów trawiących skrobię i białka (**Rys. 2**).

Depolimeryzacja β -glukanów w wyniku działania lichenazy spowodowała średnio 5 i 10% spadek lepkości ekstraktu ogólnego, odpowiednio w przypadku pieczywa jasnego i całościarnowego. Synergistyczne działanie enzymów trawiących skrobię i białka w ekstrakcie powodowało dwukrotnie większą redukcję lepkości (średnio 26 i 17%, w przypadku pieczywa jasnego i całościarnowego), niż działanie każdego enzymu osobno (średnio 12, 11 i 14% w ekstraktach pieczywa jasnego oraz 7, 8 i 9% w ekstraktach pieczywa całościarnowego, odpowiednio dla α -amylazy, amyloglukozydazy i proteazy). Dodatek endoksyłanazy powodował drastyczną 93 – 94% redukcję lepkości ekstraktu pieczywa.

Poziom lepkości ekstraktów pieczywa uzyskany w wyniku synergistycznego działania enzymów trawiących skrobię i białka warunkowany był obecnością polisacharydów ściany komórkowej, głównie arabinoksyłanów, stąd określono go jako lepkość ekstraktu odnoszoną do arabinoksyłanów obecnych w ekstrakcie (AX-EV). Wartość tego parametru może pośrednio odzwierciedlać lepkość treści pokarmowej jelita cienkiego człowieka po spożyciu pieczywa żytniego i strawieniu białka i skrobi w warunkach *in vivo*.

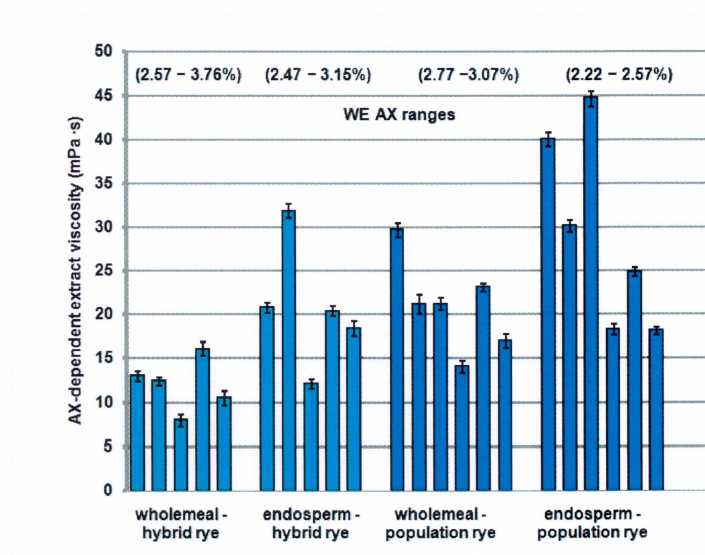


Rys. 2. Wpływ dodatku enzymów na lepkość ekstraktu chleba jasnego i całościarnowego pochodzącego z tej samej odmiany żyta populacyjnego.

Stwierdzono silne korelacje między zawartością arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą w pieczywie a jego lepkością ekstraktu, niezależnie od pH ekstraktu (ekstrakt wodny pH 3.80 – 4.76, ekstrakt w buforze maleinowym o pH 6.0 oraz ekstrakt w kwaśnym buforze HCl/KCl pH 1.5).

Lepkość ekstraktów pieczywa była skorelowana z lepkością ekstraktu mąki wyjściowej. Lepkość ekstraktu wodnego i kwaśnego pieczywa jasnego otrzymanego z odmian mieszańcowych żyta była ujemnie skorelowana ze stopniem wymiału mąki.

Wykazano, że lepkość ekstraktu pieczywa jasnego warunkowana obecnością arabinoksylianów (**AX-EV**), pomimo niższej koncentracji tych polisacharydów, jest wyższa lub równa lepkości ekstraktu pieczywa całościarnowego otrzymanego z tej samej odmiany (**Rys. 2 i 3**).



Rys. 3. Lepkość ekstraktu pieczywa jasnego i całościarnowego otrzymanego z odmian populacyjnych i mieszańcowych żyta po wytrawieniu skrobi i białek.

Ekstrakty pieczywa uzyskanego z odmian populacyjnych o niższej zawartości arabinoksylianów, w odniesieniu do ekstraktów pieczywa z odmian mieszańcowych, charakteryzowały się wyższą lepkością ekstraktu odnoszoną do arabinoksylianów **AX-EV** (**Rys. 3**).

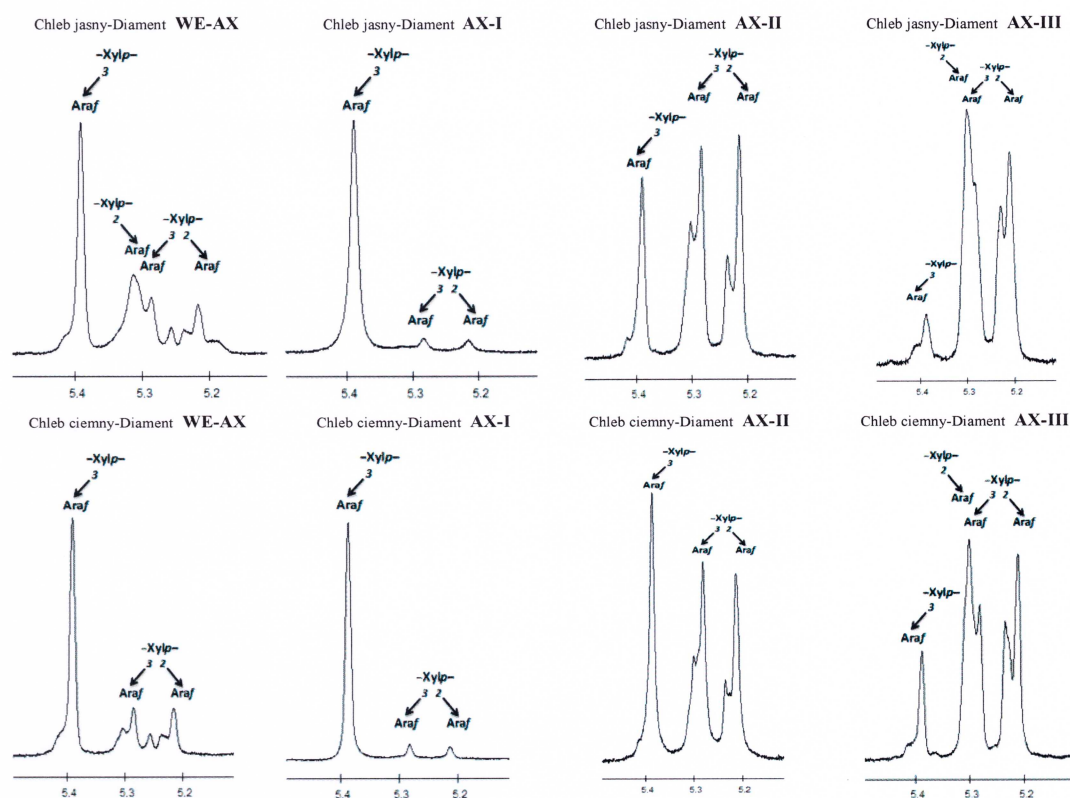
(H4) Struktura makromolekularna arabinoksylianów pochodzących z odmian żyta jako czynnik kontrolujący poziom lepkości ekstraktu pieczywa

Fracje ogólne arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą oraz wchodzące w ich skład subpopulacje zostały wyizolowane z pieczywa otrzymanego z odmian populacyjnych i mieszańcowych żyta o zróżnicowanej lepkości ekstraktu.

Wysokosprawna chromatografia żelowa wykazała, że arabinoksylany we frakcji ogólnej pieczywa całościarnowego o niższej lepkości ekstraktu charakteryzowały się niższą masą cząsteczkową niż ich analogi pochodzące z pieczywa jasnego o wyższej lepkości.

Pieczywo jasne, w odniesieniu do pieczywa całościarnowego, zawierało arabinoksylany wzbogacone w dominującą sub-populację **AX-I**, poza tym sub-frakcja **AX-III** miała wyższy stopień usieciowania resztami **2,3-Ksylp** oraz **2-Ksylp** i znacznie niższą proporcję **2,3-Kylp/2-Ksylp** (Rys. 4), co może odpowiadać za zwiększoną oporność arabinoksylanów na działanie endogennej endoksylationazy podczas fermentacji ciasta żytniego.

Magnetyczny rezonans jądrowy protonów (^1H NMR) wykazał, że część sub-populacji **AX-I**, która uległa degradacji podczas przygotowania ciasta żytniego do wypieku, jest odzyskiwana w kolejnych sub-frakcjach **AX-II** i **AX-III**, powodując wzrost sygnałów anomerycznych protonów **Araf** związanych do **Ksylp** w pozycji *O*-3, **3-Xylp**. Wyższy sygnał tych protonów w widmach ^1H NMR oznaczał wyższy stopień depolimeryzacji **AX-I** (Rys 4).



Rys 4. Widma ^1H NMR frakcji ogólnych i sub-frakcji arabinoksylanów wyizolowanych z pieczywa żytniego (Cyrán i Saulnier, 2012).

Spadek lepkości ekstraktu pieczywa związany był ze wzrostem stopnia degradacji sub-frakcji **AX-I** a jego miarą był spadek proporcji sygnałów **2,3-Ksylp/3-Xylp** oraz **2-Ksylp/3-Kylp** w widmach sub-populacji **AX-II** i **AX-III**.

Poziom aktywności endogennej endoksylationazy w mące jasnej był znacznie niższy niż w mące całościarnowej. Aktywność endoksylationazy w mące całościarnowej była ujemnie skorelowana z lepkością ekstraktu pieczywa.

Wyższa lepkość ekstraktu pieczywa uzyskanego z odmian populacyjnych żyta, w odniesieniu do pieczywa z odmian mieszańcowych, była warunkowana głównie strukturą arabinoksylianów a nie ich poziomem.

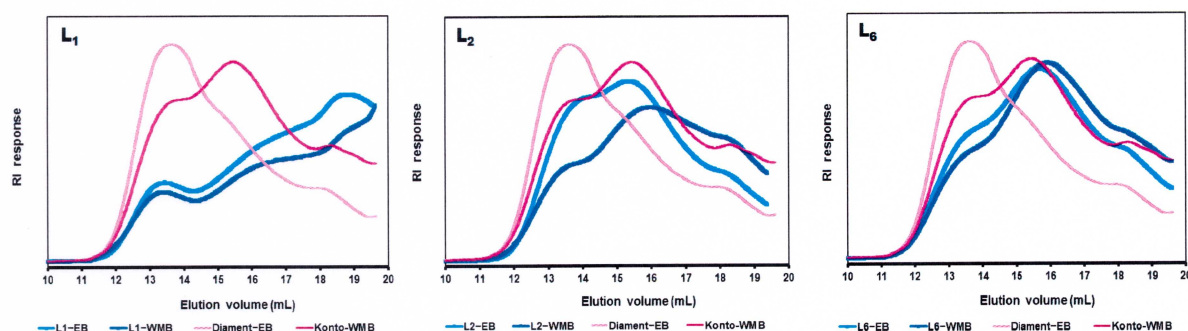
(H5) Struktura makromolekularna arabinoksylianów pochodzących z linii wsobnych żyta jako czynnik kontrolujący poziom lepkości ekstraktu pieczywa – porównanie z analogami występującymi w odmianach żyta

Lepkość ekstraktu pieczywa uzyskanego z odmian żyta mieszańcowego generalnie była większa niż lepkość pieczywa z linii wsobnych użytych do ich hodowli, które charakteryzowały się znacznie większą koncentracją arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą, co sugerowało istotne różnice w strukturze arabinoksylianów obecnych w tych materiałach oraz stanowiło główną przesłankę do podjęcia badań wyjaśniających to zagadnienie.

Oceniono mąki jasne i całościarnowe otrzymane z linii wsobnych żyta oraz pieczywo pod względem lepkości ekstraktu, poziomu aktywności endogennej endoksydanazy, α -L-arabinofuranozydazy i β -D-ksylozydazy a także cech makromolekularnych frakcji i subpopulacji arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą.

Lepkość ekstraktu pieczywa jasnego i całościarnowego pochodzącego z linii wsobnych była porównywalna, w przeciwieństwie do pieczywa otrzymanego z odmian żyta, które charakteryzowało się wyższą lepkością ekstraktu pieczywa jasnego w porównaniu do lepkości ekstraktu pieczywa całościarnowego.

Stwierdzono znacznie wyższy stopień degradacji arabinoksylianów w pieczywie z linii wsobnych niż w pieczywie z odmian żyta, porównując ich profile elucyjne uzyskane za pomocą HPSEC (**Rys. 5**).



Rys. 5. Dystrybucja mas cząsteczkowych arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą obecnych w pieczywie jasnym (EB) i całościarnowym (WMB) otrzymanym z linii wsobnych i odmian żyta (Cyran i wsp. 2012).

Ponadto sub-populacje arabinoksylianów o wysokim stopniu podstawienia **AX-II** i **AX-III** charakteryzowały się bardzo niskim udziałem **2-Ksylp**, w porównaniu do ich analogów z odmian żyta.

Mąki otrzymane z linii żyta wykazywały bardzo wysoki poziom aktywności endoksydanazy.

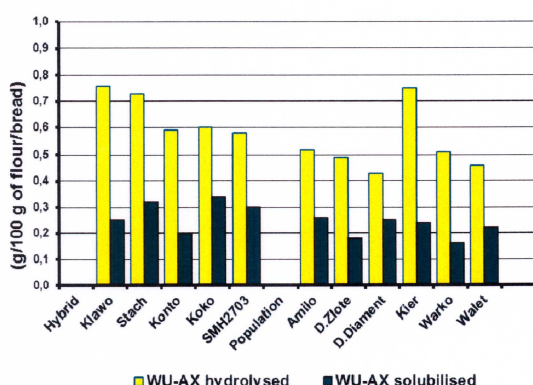
Wstępny etap selekcji linii wsobnych w kierunku odmian chlebowych o wysokim potencjale lepkiem pieczywa może opierać się na ogólnej lepkości ekstraktu **mąk wyjściowych**. Etap wstępny nie jest wystarczający, ponieważ warunki pomiaru lepkości ekstraktu znacznie odbiegają od warunków produkcji pieczywa.

Konieczny jest drugi etap selekcji oparty na pomiarze lepkości ekstraktu **pieczywa** odnoszonej do arabinoksylianów (po wytrawieniu białek i skrobi z ekstraktu), który definitywnie oceni przydatność linii do hodowli odmian żyta przeznaczonych do produkcji pieczywa o wysokiej lepkości ekstraktu.

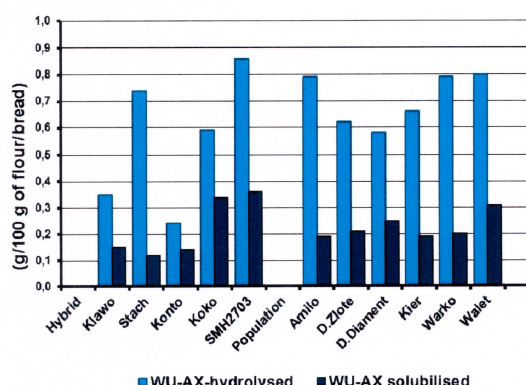
(H6) Mechanizmy modyfikacji struktury i poziomu arabinoksylianów żytnich ekstrahowanych wodą podczas produkcji pieczywa jasnego i całościarnowego

Oszacowano ilości arabinoksylianów, które uległy hydrolizie podczas produkcji pieczywa na podstawie analizy zawartości frakcji ekstrahowalnej i nie-ekstrahowalnej w mąkach wyjściowych oraz otrzymanym pieczywie jasnym i całościarnowym (spadek poziomu frakcji nie-ekstrahowalnej w pieczywie) (**Rys. 6; WU-AX hydrolysed**). Populacja ta składa się z podjednostek o różnej masie cząsteczkowej, ale tylko te o dużej masie cząsteczkowej powodują wzrost frakcji ekstrahowalnej **w pieczywie**, tj., mogą być wytrącone z ekstraktu pieczywa 80% etanolem (**WU-AX solubilised**).

Endosperm flour/bread



Wholemeal flour/bread



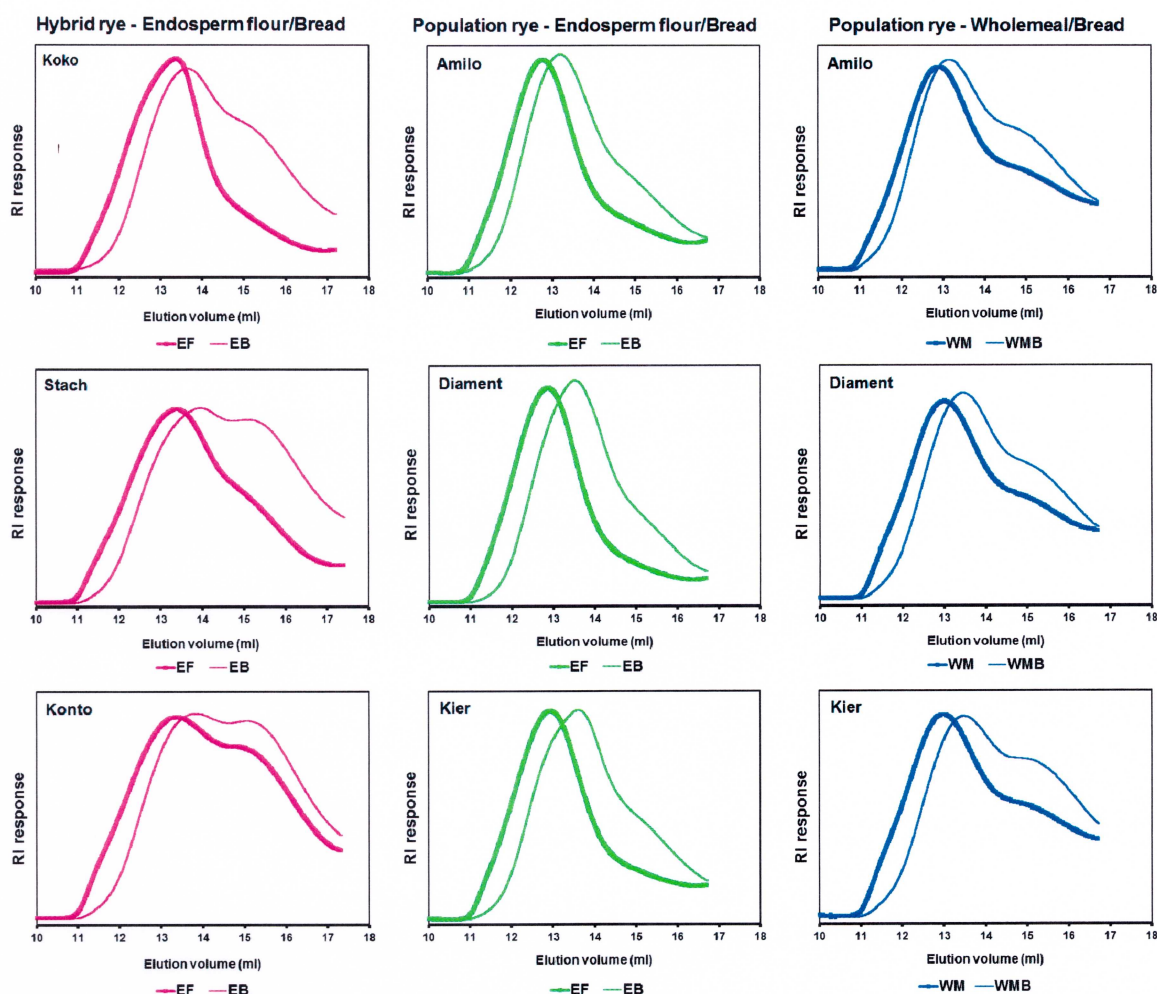
Rys. 6. Ilości arabinoksylianów nie-ekstrahowalnych wodą, które uległy hydrolizie (WU-AX hydrolysed) oraz zostały upłynnione (WU-AX solubilised) do frakcji ekstrahowalnej wodą podczas produkcji pieczywa jasnego i całościarnowego z odmian mieszańcowych i populacyjnych żyta (Cyran i Dynkowska, 2014).

Pomimo faktu, iż mąki jasne charakteryzowały się znacznie niższym poziomem aktywności endoksylianazy oraz wyższym stopniem usieciowania arabinoksylianów nie-ekstrahowanych w odniesieniu do mąk całościarnowych, średnie ilości tych polisacharydów, które uległy hydrolizie podczas produkcji pieczywa jasnego i całościarnowego były zbliżone. Jakkolwiek obserwowano istotne zróżnicowanie między poszczególnymi odmianami zarówno w przypadku odmian populacyjnych jak i mieszańcowych.

Średnio 42 i 36% arabinoksylianów nie-ekstrahowalnych wodą uległo upłynnieniu podczas produkcji pieczywa jasnego i całościarnowego, powodując 11 i 8% wzrost frakcji ekstrahowalnej wodą w pieczywie.

Wysokosprawna chromatografia wykluczenia frakcji ogólnych arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą wykazała, że mąki wyjściowe zawierają populacje o różnych masach cząsteczkowych (**Rys. 7**), różnej lepkości granicznej, różnych współczynnikach polidispersji i różnych promieniach bezwładności.

Najwyższe wartości masy cząsteczkowej, lepkości granicznej, promienia bezwładności oraz najniższe wartości współczynnika polidispersji stwierdzono dla populacji pochodzących z mąki jasnej odmian populacyjnych żyta. Masa cząsteczkowa arabinoksylianów w mące całozłaznowej była niższa a współczynnik polidispersji wyższy w porównaniu do analogów mąki jasnej pochodzącej z tej samej odmiany.



Rys. 7. Dystrybucja mas cząsteczkowych arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą wyizolowanych z mąki wyjściowej i pieczywa jasnego i całozłaznowego odmian populacyjnych i mieszańcowych żyta (Cyrán i Dynkowska, 2014).

Arabinoksyliany obecne w pieczywie charakteryzowały się niższymi masami cząsteczkowymi w porównaniu do form natywnych z mąk wyjściowych. Degradacja ich łańcuchów była sygnalizowana obecnością drugiej populacji o niższych masach cząsteczkowych, a wzrastający stopień degradacji był odzwierciedlany wzrastającym udziałem tej sub-populacji we frakcji ogólnej (**Rys. 7**).

Wskazano zasadnicze mechanizmy hydrolizy enzymatycznej arabinoksylianów w wyniku depolimeryzacji głównego łańcucha oraz hydrolizy bocznych podstawników terminalnych w przypadku produkcji pieczywa jasnego i całościarnowego, z punktu widzenia różnic w stopniu usieciowania tych polisacharydów w mące jasnej i całościarnowej, w poziomach aktywności endoksylianazy, arabinofuranozydazy i ksylozydazy tych mąk oraz niskiej wartości pH ciasta żytniego z bezpośrednim dodatkiem kwasu mlekowego.

Biorąc pod uwagę wzrost zawartości frakcji ekstrahowalnej arabinoksylianów w pieczywie jako jeden z indeksów pozytywnego działania metabolicznego w organizmie człowieka wykazano, że najważniejszym czynnikiem w produkcji pieczywa wykazującego takie działanie jest użycie żyta odpowiedniej odmiany.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe

H1.

- Wobec braku jednoznacznej odpowiedzi w literaturze międzynarodowej na pytanie - czy populacje **AX-I** i **AX-III** są odrębne, czy też stanowią wspólną część jednego polimeru? - wykazano, że dominująca sub-frakcja arabinoksylianów **AX-I**, zawierająca jedynie jeden typ usieciowania (**3-Ksylv**) oraz sub-frakcja **AX-III** o najwyższym stopniu usieciowania resztami z dwoma podstawnikami (**2,3-Ksylv**), stanowią odrębne populacje.
- Po raz pierwszy zbilansowano wszystkie sub-populacje, w procentach wyizolowanego wysokocząsteczkowego materiału oraz w procentach sm mąki lub pieczywa.

Wykazano, że:

- ekstrahowalność arabinoksylianów jest warunkowana wzajemną proporcją sub-frakcji o niskim stopniu podstawienia, **AX-I**, do sub-frakcji o wysokim stopniu usieciowania **AX-III**. Im wyższy udział **AX-III** we frakcji ogólnej tym wyższa temperatura jest wymagana do ich ekstrakcji;
- białka i substancje fenolowe ściany komórkowej biorą udział w niekowalencyjnym wiązaniu arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą.

H2.

- Wyizolowano i scharakteryzowano pod względem cech strukturalnych sub-populację arabinoksylianów obecną wyłącznie w zewnętrznych warstwach ziarna żyta.
- Wykazano, że mono-podstawiona ksylopiranoza w pozycji O-2, **2-Ksylv**, praktycznie nie występuje w łańcuchu arabinoksylianów ściany warstw peryferyjnych.
- Zaproponowano klasyfikację strukturalną arabinoksylianów z punktu widzenia ich stopnia usieciowania, elementów sieciujących łańcuch główny oraz poziomu saturacji siarczanem amonu, przy którym są wytrącane.

H3.

- Zobrazowano, jak ważny jest genotyp żyta użyty do wypieku pieczywa z punktu widzenia koncentracji błonnika pokarmowego i jego głównych komponentów a także potencjału lepkiego pieczywa.

Wykazano, że:

- nie tylko ilość arabinoksylianów ale ich cechy strukturalne kontrolują lepkość ekstraktu pieczywa;
- lepkość ekstraktów pieczywa jasnego, w zależności od odmiany żyta, z którego otrzymano mąkę, może być znacznie wyższa niż lepkość ekstraktu pieczywa całościarnowego otrzymanego z tej samej odmiany, co sugeruje, że **żytnie pieczywo jasne** może być co najmniej tak skuteczne w profilaktyce i leczeniu niektórych chorób cywilizacyjnych jak pieczywo całościarnowe. **Taki właśnie przypadek został potwierdzony w badaniach klinicznych na ludziach przez naukowców z Uniwersytetu w Lund, Szwecja (Rosén i wsp. 2009).**

H4.

Wykazano, że:

- struktura arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą z pieczywa jasnego różni się od tych obecnych w pieczywie całościarnowym, jest ona jednym z najważniejszych czynników warunkujących potencjał lepki pieczywa;
- ilość i masa cząsteczkowa dominującej sub-populacji **AX-I**, stopień usieciowania resztami **2,3-Ksylp** i **2-Ksylp** oraz wzajemna proporcja tych elementów w łańcuchach sub-populacji **AX-II** i **AX-III** kontrolują lepkość ekstraktu pieczywa;
- reszty sieciujące arabinoksylianów **2-Ksylp** mają istotne znaczenie dla oporności arabinoksylianów na hydrolityczne działanie endogennej endoksylianazy;
- proporcje sygnałów **2,3-Ksylp/3-Ksylp** oraz **2-Ksylp/3-Ksylp** w widmie magnetycznego rezonansu protonów sub-populacji **AX-II** i **AX-III** są miarą stopnia degradacji dominującej populacji **AX-I**, skorelowaną z lepkością ekstraktu pieczywa.

H5.

- Stwierdzono, że arabinoksyliany ekstrahowalne wodą obecne w liniach wsobnych żyta charakteryzują się bardzo **niskim poziomem reszty sieciującej 2-Ksylp**, który jest jednym z czynników wpływających na znacznie większy stopień degradacji arabinoksylianów w pieczywie otrzymanym z linii niż w pieczywie z odmian mieszańcowych wyhodowanych z tych linii wsobnych.
- Hodowla żyta w kierunku odmian mieszańcowych warunkujących wysoką lepkość otrzymanego pieczywa wymaga co najmniej dwóch etapów selekcji; wstępna selekcja z punktu widzenia wysokiej zawartości arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą oceniana za pomocą pomiaru lepkości ogólnej mąk wyjściowych, drugi etap selekcji wymaga próbnego wypieku pieczywa i pomiaru jego lepkości ekstraktu odnoszonego wyłącznie do arabinoksylianów.

H6.

- Wykazano częściową hydrolizę arabinoksylianów nie-ekstrahowalnych wodą podczas produkcji pieczywa żytniego, w wyniku czego następował wzrost frakcji ekstrahowalnej w pieczywie.
- Proces produkcji pieczywa negatywnie wpływa na masę cząsteczkową, lepkość graniczną oraz promień bezwładności arabinoksylianów we frakcji ekstrahowalnej oraz pozytywnie na ich wartość współczynnika polidispersji.
- Stopień hydrolizy arabinoksylianów nie-ekstrahowalnych wodą nie był skorelowany ze wzrostem frakcji ekstrahowalnej w pieczywie, która nie zależała również od stopnia wymiału mąki ale od odmiany żyta populacyjnego lub mieszańcowego użytego do produkcji pieczywa.
- Wskazano mechanizmy upłynniania frakcji arabinoksylianów nie-ekstrahowalnych wodą podczas produkcji jasnego i całościarnowego pieczywa żytniego, kontrolowane przez wiele czynników takich jak: aktywności enzymów endogennych hydrolizujących arabinoksyliany obecnych w mące wyjściowej, kwasowość ciasta żytniego, interakcje arabinoksylianów z innymi składnikami mąki oraz ich charakterystyka makromolekularna.

Podsumowanie wyników i osiągnięć oraz ich znaczenie aplikacyjne

Wyizolowano 4 główne klasy arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą o różnej strukturze łańcucha. Zbadano ich dystrybucję w mąkach oraz otrzymanym pieczywie jasnym i całościarnowym pochodzącym z żyta odmian populacyjnych i mieszańcowych.

Pomimo znacznej koncentracji skrobi i białek w ekstraktach chleba żytniego wykazano, że nie mają one zasadniczego wpływu na lepkość ogólną ekstraktów. Arabinoksyliany, główne polisacharydy błonnika pokarmowego żyta, warunkują 70 – 80% lepkości ogólnej ekstraktów chleba żytniego. Natomiast pozostałe polisacharydy błonnika pokarmowego żyta, głównie β -glukany, nie mają istotnego wpływu na wartość tego parametru, ze względu na ich znacznie niższą koncentrację w ekstraktach a także niższe masy cząsteczkowe.

Opracowano test enzymatyczny *in vitro*, który szacuje lepkość ekstraktów wynikającą z obecności arabinoksylianów (AX-EV) lub/oraz innych polisacharydów błonnika dominujących w produktach roślinnych. Polega on na pomiarze lepkości ekstraktów po selektywnym wytrawieniu skrobi i białka w wyniku synergistycznego działania α -amylazy, amyloglukozydazy oraz proteazy, dla których wykazano brak aktywności w kierunku polisacharydów ściany komórkowej, symulując warunki występujące w jelicie cienkim człowieka. Wartość tego parametru odzwierciedla lepkość treści jelita cienkiego po spożyciu chleba żytniego lub innych produktów bogatych w błonnik pokarmowy, ponieważ organizm człowieka nie wytwarza enzymów zdolnych do rozkładu tej frakcji. Jednym z najważniejszych elementów tego pomiaru jest wykazanie, że zastosowane enzymy trawiące skrobię i białko z ekstraktów nie posiadają żadnych bocznych aktywności w kierunku

polisacharydów błonnika pokarmowego, w dodatkowych pomiarach lepkości stosując subfrakcję arabinoksylianów **AX-I**. Pomiar lepkości ekstraktów odnoszonej do polisacharydów błonnika pokarmowego (AX-EV) pozwoli szacować zdolność do podnoszenia lepkości treści pokarmowej jelita cienkiego produktów wchodzących w skład diety człowieka, która charakteryzuje ich właściwości prozdrowotne istotne z punktu widzenia profilaktyki i leczenia miażdżycy oraz cukrzycy.

Chleby żytnie charakteryzujące się wysoką lepkością zachowują wysoką wartość tego parametru niezależnie od pH buforu użytego do ekstrakcji (kwaśny bufor HCl/KCl o pH 1.5, bufor maleinowy o pH 6.0), co wskazuje na fakt, że spożycie chleba żytniego o maksymalnej lepkości ekstraktu zapewni maksymalną wartość tego parametru w górnych odcinkach przewodu pokarmowego człowieka (jama ustna pH 5–7, żołądek pH 1.5–2.0 oraz jelito cienkie pH ok. 6.0–7.0) **niezależnie od ich wartości pH**.

Proces fermentacji ciasta żytniego stwarza korzystne warunki dla enzymów zasocjowanych z ziarnem/mąką żytnią. Wynikiem działania enzymów degradujących arabinoksylany (endoksylianazy, arabinofuranozydazy oraz ksylozydazy) podczas fermentacji ciasta żytniego był generalnie kilkuprocentowy wzrost zawartości frakcji ekstrahowalnej arabinoksylianów w chlebie oraz znacznie bardziej intensywny spadek frakcji nierozpuszczalnej tych polisacharydów. Ponadto stwierdzono spadek stopnia podstawienia arabinozą łańcuchów arabinoksylianów rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie obecnych w chlebach żytnich w odniesieniu do stopnia podstawienia tych polisacharydów w mąkach wyjściowych. Jest to wynik „upłynniania” frakcji nierozpuszczalnej arabinoksylianów, która zwiększa pulę frakcji rozpuszczalnej w wodzie oraz równoczesnego procesu depolimeryzacji obydwu frakcji tych polisacharydów.

Lepkość odnoszona do arabinoksylianów obecnych w ekstraktach jasnego pieczywa żytniego otrzymanego z ciasta z bezpośrednim dodatkiem kwasu mlekowego może być podobna, a nawet dwukrotnie wyższa, niż pieczywa całościarnowego otrzymanego z tej samej odmiany. Jasne pieczywo żytnie otrzymane z takich odmian jak **Diamant** i **Amilo** (populacyjne) oraz **Stach** (odmiana mieszańcowa) może skutecznie obniżać poziom insuliny i glukozy we krwi, dlatego te odmiany powinny być powszechnie rekomendowane do wypieku pieczywa o wysokim potencjale lepkim.

Nasze wyniki są zbieżne z wynikami uzyskanymi w niezależnych badaniach klinicznych przez naukowców z Uniwersytetu Lund w Szwecji, którzy wykazali podobne spadki glukozy i insuliny we krwi ludzi po spożyciu żytniego pieczywa jasnego i całościarnowego a także korzystny profil tych składników (*Rosén i wsp. 2009. Endosperm and whole grain rye breads are characterized by low post-prandial insulin response and a beneficial blood glucose profile. Nutrition Journal, 8, 42*).

Wykazano, że generalnie wysoka zawartość arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą w pieczywie żytnim, a tym samym wysoka zawartość ekstrahowalnej frakcji błonnika pokarmowego, może nie zapewnić wysokiej lepkości ekstraktu pieczywa. W pewnych przypadkach zasadnicze znaczenie ma stopień degradacji arabinoksylianów ekstrahowanych wodą. Dlatego zaproponowany przez nas nowy pomiar lepkości, odnoszonej wyłącznie do obecności polisacharydów błonnika pokarmowego, uwzględnia obydwie powyższe czynniki i powinien być szeroko stosowany do monitorowania lepkości produktów zbożowych oraz innych produktów roślinnych będących źródłem błonnika pokarmowego w diecie człowieka.

Uzyskane wyniki stanowią znaczące uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat błonnika pokarmowego chleba żytniego oraz powinny przyczynić się do zweryfikowania powszechnego poglądu, że potencjał prozdrowotny produktów roślinnych jest bezpośrednio odnoszony wyłącznie do koncentracji frakcji błonnika pokarmowego. W przyszłości powinno się uwzględniać wpływ procesu produkcji na stopień degradacji polisacharydów błonnika pokarmowego obecnych w diecie człowieka, a także wykorzystać potencjał jasnego chleba żytniego do podnoszenia lepkości treści pokarmowej jelita cienkiego człowieka, zwiększając tym samym asortyment produktów zalecanych w profilaktyce i leczeniu chorób serca i cukrzycy.

Literatura

1. Bengtsson, S., Andersson, R., Westerlund, E., Åman, P. (1992) Content, structure and viscosity of soluble arabinoxylans in rye grain from several countries. *J. Sci. Food Agric.*, 58, 331 – 337.
2. Cyran, M.R. (2014). Dietary fiber arabinoxylans in processed rye: Milling- and breadmaking-induced changes. W *“Processing and Impact on Active Components in Food”* pod red. Preedy, V.R., Academic Press, Elsevier Inc. rozdz. 38, 319 – 328.
3. Ebringerová, A., Hromádková, Z., Berth, G. (1994). Structural and molecular properties of a water-soluble arabinoxylan-protein complex isolated from rye bran. *Carbohydr. Res.*, 264, 97 – 109.
4. Fengler, A.I., Marquardt, R.R. (1988) Water-soluble pentosans from rye: I. Isolation, partial purification, and characterization. *Cereal Chem.*, 65, 294 – 297.
5. Jenkins, D.J.A., Marchie, A., Augustin, L.S.A., Ros, E., Kendal, CWC. (2004) Viscous dietary fibre and metabolic effects. *Clin. Nutr. Suppl.* 1, 39 – 49.
6. Mäلكki, Y. (2001) Physical properties of dietary fiber as keys to physiological functions. *Cereal Food World*, 46, 196 – 199.
7. Martinant, J.-P., Billot, A., Bouguennec, A., Charmel, G., Saulnier, L., Branlard, G. (1999) Genetic and environmental variation in water-extractable arabinoxylans content and flour extract viscosity. *J. Cereal Sci.*, 30, 45 – 48.
8. Nilsson, M., Andersson, R., Andersson, R.E., Autio, K., Åman, P. (2000) Heterogeneity in a water-extractable rye arabinoxylan with low degree of disubstitution. *Carbohydr. Polym.* 41, 397 – 405.
9. Pettersson, D., Åman, P. (1987) The variation in chemical composition of triticale grown in Sweden. *Acta Agric Scand.*, 37, 20 – 26.

10. Ragae, S.M., Campbell, G.L., Scoles, G.J., McLeod, J.G., Tyler, R.T. (2001) Studies on rye (*Secale cereale* L.) lines exhibiting a range of extract viscosities. 2. Rheological and baking characteristics of rye and rye/wheat blends and feeding value for chicks of wholemeals and breads. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2446 – 2453.
11. Rosén, L.A.H., Blanco Silva, L.O., Andersson, U.K., Holm, C., Östman, E.M., Björck, I.M.E. (2009) Endosperm and whole grain rye breads are characterized by low post-prandial insulin response and a beneficial blood glucose profile. *Nutr. J.* 8, 42, doi:10.1186/1475-2891-8-42.
12. Saulnier, L., Peneau, N., Thibault, J.-F. (1995) Variability in grain extract viscosity and water-soluble arabinoxylan content in wheat. *J. Cereal Sci.*, 22, 259 – 264.
13. Scoles, G.J., Campbell G.L., McLeod, J.G. (1993) Variability for grain extract viscosity in inbred lines and F2 population of rye (*Secale cereale* L.). *Can. J. Plant Sci.* 73, 1 – 6.

5. Omówienie pozostałych zainteresowań i osiągnięć naukowo-badawczych

Z chwilą podjęcia pracy w Zakładzie Biologicznej Oceny Produktów Roślinnych (ZBOPR) IHAR w roku 1986 moje zainteresowania naukowe zostały ukierunkowane przez **prof. dr hab. M. Rakowską**, kierownika zakładu, na polisacharydy ściany komórkowej zbóż jako głównej frakcji włókna pokarmowego. Po wprowadzeniu metody enzymatyczno-grawimetrycznej oznaczania włókna pokarmowego do rutynowych analiz wykonywanych w ZBOPR, następnym zadaniem było oznaczanie składu cukrów we frakcji polisacharydowej włókna metodą chromatografii gazowej. W tym celu odbyłam szkolenie w Pracowni Chromatografii Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie, gdzie pod kierunkiem **dr. M. Daniewskiego** i **dr. W. Mielniczuka** poznałam zasady analizy chromatograficznej. Następnie pracowałam nad specyficznymi warunkami ilościowej hydrolizy polisacharydów ściany komórkowej i przeprowadzenia produktów tej hydrolizy (monocukrów) w lotne pochodne, które są podstawą detekcji przy użyciu detektora płomieniowo-jonizacyjnego oraz chromatografu gazowego.

Obecnie rutynowo wykonujemy analizę zawartości i składu polisacharydów ściany różnych materiałów roślinnych, mając do dyspozycji jeden z najnowszych typów chromatografu gazowego firmy Agilent zintegrowany z generatorami ultra czystego wodoru i powietrza w linii. W zależności od typu tkanki roślinnej możemy stosować dwa typy hydrolizy - stosując kwas trójfluorooctowy (TFA) lub dwustopniową hydrolizę w kwasie siarkowym; potrafimy również przeprowadzić cukry po hydrolizie w dwa typy lotnych pochodnych – aldonitryle oraz alditole, które umożliwiają identyfikację monocukrów, występujących w formie obojętnej lub kwaśnej. Taki warsztat pracy wykorzystałam do badań, których wyniki przedstawiłam w mojej rozprawie doktorskiej.

Etapy rozwoju kariery naukowej oraz dorobek naukowo-badawczy po uzyskaniu stopnia doktora (nie wchodzący w zakres osiągnięcia naukowego)

1. **Poprawa wartości paszowej śruty rzepakowej poprzez zastosowanie dodatku mieszanek preparatów enzymatycznych** – Post-doc, grant kanadyjski

Podczas mojego pierwszego pobytu jako post-doc w Kanadzie (University of Manitoba, Department of Animal Sciences) prowadziłam doświadczenia na zwierzętach laboratoryjnych pod kierunkiem **dr. B. Słomińskiego** w projekcie badawczym pt. „*Nutritive value of enzyme-treated canola meal*” finansowanym przez The Brewing and Malting Barley Research Institute and Agri-Food Research and Development Initiative, Winnipeg, Kanada). Biodostępność składników odżywczych w śrucie rzepakowej jest ograniczona głównie z powodu wysokiego stopnia lignifikacji oraz wysokiej zawartości silnie zasocjowanych polisacharydów ściany komórkowej. Stosowano komercyjne preparaty celulolityczne wzbogacone aktywnościami galaktozydazy, fitazy i pektynazy - w celu depolimeryzacji składników ściany śruty w warunkach *in vitro* i poprawy biodostępności składników odżywczych. Wykazano częściową degradację polisacharydów ściany, oligosacharydów i fitynianów w śrucie rzepakowej inkubowanej preparatami celulolitycznymi, która powodowała stosunkowo niewielki wzrost przyrostu masy ciała i wykorzystania paszy zwierząt w doświadczeniu wzrostowym, jako wynik braku efektów w początkowym 1 i 2 tygodniu doświadczenia.

Wyniki badań opisano w doniesieniu konferencyjnym (10th International Rapeseed Congress "New Horizons for an Old Crop", Canberra, Australia, 1999) - poz. **B9** w wykazie dorobku (Załącznik 4).

2. **Zależności między składem i strukturą polisacharydów błonnika pokarmowego (ściany komórkowej) a wartością technologiczną ziarna żyta** – temat statutowy, współpraca z **dr. A. Cygankiewiczem**, IHAR Zakład Roślin Zbożowych w Krakowie

Materiały hodowlane żyta zostały ocenione pod względem parametrów wstępnej oceny technologicznej oraz parametrów oceny wartości wypiekowej na podstawie wypieku laboratoryjnego, które zestawiono z podstawową oceną fizyko-chemiczną oraz składem polisacharydów błonnika pokarmowego mąki żytniej. Badania wykazały, że mąki żytnie o wysokiej ocenie wartości wypiekowej charakteryzowały się wysoką proporcją frakcji arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą do frakcji nie-ekstrahowalnych, która była zbieżna z wysoką liczbą opadania oraz maksymalną lepkością kleiku skrobiowego. Zawartość arabinoksylianów nie-ekstrahowalnych wodą w mące żytniej była ujemnie skorelowana z parametrami oceny wypiekowej pieczywa i mąki (sumaryczna ocena wartości wypiekowej, objętość pieczywa, końcowa temperatura kleikowania skrobi, maksymalna lepkość kleiku skrobiowego).

Publikacja z listy JCR poz. **A6** oraz doniesienie konferencyjne poz. **B6** w wykazie dorobku (Załącznik 4).

3. **Zmienności cech jakościowych jęczmienia browarnego w odniesieniu do składu i zawartości polisacharydów ściany komórkowej** – temat finansowany przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Publikacja w języku polskim pozycja **B3**.

Raport z rocznych wyników oceny jakościowej uzyskanych dla materiałów hodowlanych jęczmienia.

Następne etapy mojego rozwoju naukowego uwidocznione są w realizacji tematów nr 4, 5, 6 i 7:

4. **Cechy strukturalne polisacharydów ściany komórkowej słodu jęczmiennego jako czynników powodujących problemy filtracyjne podczas produkcji piwa** – Post-doc, grant kanadyjski

Publikacja z listy JCR poz. **A7**.

5. **Hemicelulozy żytnie – frakcjonowanie i porównanie cech strukturalnych populacji obecnych w mące jasnej i otrębach** – Post-doc, indywidualne stypendium OECD w Belgii oraz współpraca z INRA, Nantes, Francja w ramach pobytu sfinansowanego przez Unię Europejską (5th Framework Programme for Research and Technological Development)

Publikacje z listy JCR pozycje **A4** i **A7**.

6. **Izolacja i charakterystyka strukturalna polimerycznych ksylanów uwolnionych z nie-ekstrahowanej frakcji ściany komórkowej żyta pod wpływem proteinazy i lichenazy jako potencjalnych komponentów folii biodegradowalnych** - Post-doc, indywidualne stypendium OECD w Belgii oraz współpraca z INRA, Nantes, Francja w ramach pobytu sfinansowanego przez Unię Europejską (5th Framework Programme for Research and Technological Development)

Publikacja z listy JCR poz. **A3**.

7. **Wpływ hydrolizy termicznej na wysłodki buraczane jako surowiec do produkcji biogazu** – współpraca z **dr inż. K. Ziemińskim** (Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności)

Publikacja z listy JCR poz. **A2**.

Tematyka powyższych badań dotyczyła metod frakcjonowania chemicznego i enzymatycznego oraz analizy cech makromolekularnych polisacharydów ściany komórkowej. Otrzymane stypendia doktoranckie, dwa kanadyjskie (University of Manitoba oraz

Canadian Grain Commission, Winnipeg, Kanada) i jedno przyznane przez OECD na realizację badań własnych na Uniwersytecie Leuven w Belgii, oraz współpraca z autorytetami naukowymi w tej dziedzinie (**Aleksander W. MacGregor, Marta S. Izidorczyk, Jan A. Delcour oraz Luc Saulnier**), pozwoliły mi na opanowanie zaawansowanych technik stosowanych obecnie na świecie w badaniach struktury polisacharydów ściany komórkowej (β -glukany, glukurono-arabinoksylany, arabinogalaktany).

Techniki te obejmują nie tylko metody izolacji i frakcjonowania materiału roślinnego, ale również umiejętność identyfikacji cech strukturalnych w oparciu o magnetyczny rezonans protonów/węgla $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR, analizę metylacyjną oraz wykorzystanie jednoczesnej potrójnej detekcji w zakresie UV, RI i światła laserowego (MALLS).

Uzyskane wyniki badań wnoszą nową wiedzę w tej dziedzinie, ponadto rewidują dotychczasowe, powszechnie cytowane poglądy na temat struktury polisacharydów oraz ich dystrybucji w ścianie komórkowej zbóż.

Ze względu na fakt, że ściana komórkowa zbóż zawiera znaczne ilości niskocząsteczkowej frakcji białkowej oraz biologicznie czynnych substancji fenolowych o bardzo szerokim profilu, moja aktywność naukowa została dalej ukierunkowana na te substancje. Uruchomiłam nowe stanowiska pracy w **Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin (ZBiFR)**, gdzie obecnie pracuję, do oznaczania kwasów fenolowych (wolnych, skoniugowanych oraz związanych kowalencyjnie ze ścianą komórkową) i dimerów kwasu ferulowego wykorzystując metodę GC lub HPLC/DAD, aktywności enzymów hydrolizujących ścianę komórkową oraz testów *in vitro* szacujących potencjał antyoksydacyjnych różnych materiałów roślinnych oraz ich produktów końcowych.

8. **Badanie mechanizmów modyfikacji struktury arabinoksylanów w układach modelowych chleba żytniego, jej wpływ na zdolność chleba do tworzenia lepkich roztworów oraz potencjał antyoksydacyjny** – projekt własny (NCN OPUS 2) aktualnie realizowany, współpraca z **prof. dr hab. A. Ceglińską** (SGGW, Zakład Technologii Zbóż Wydziału Nauk o Żywności)

Publikacja z listy JCR poz. **A1** oraz doniesienie w formie plakatu poz.1.

Porównano wpływ niektórych czynników technologicznych i genetycznych na poziom kwasów fenolowych i dimerów kwasu ferulowego w chlebie żytnim (5 eksperymentalnych układów chleba żytniego, 5 odmian żyta, 2 rodzaje mąki, jasna i całościarna). Opisano również procesy transformacji kwasów fenolowych (wolnych, skoniugowanych oraz kowalencyjnie związanych ze ścianą komórkową) podczas produkcji pieczywa.

Aktualnie realizowane projekty dotyczą nie tylko ściany komórkowej ziarna zbóż, ale także ściany komórkowej korzeni/liści/siewek pszenicy wyjściowej oraz linii addycyjnych pszenicy z chromosomami żyta w aspekcie zmian indukowanych stresami abiotycznymi.

9. **Zastosowanie parametrów fizykochemicznych i biochemicznych ściany komórkowej w hodowli zbóż o podwyższonej tolerancji na stresy abiotyczne**

– aktualnie realizowany temat statutowy – pszenica oraz linie addycyjne pszenicy)

Moje przyszłe plany naukowe obejmują wdrożenie innych zaawansowanych technik do analiz cech strukturalnych polisacharydów ściany wykonywanych rutynowo w ZBiFR – profil oligomeryczny po trawieniu specyficznymi enzymami depolimeryzującymi oraz identyfikacja strukturalna otrzymanych oligo-, di- i monomerów (MALDI-TOF, ESI-ITMS, ESI-Q-TOF). Wyniki powyższych analiz mogą być pomocne w wyjaśnianiu niektórych mechanizmów regulacji metabolizmu ściany komórkowej a także mogą być podstawą nowych testów z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał lub ligandów (carbohydrate binding molecules) do szybkiej selekcji materiałów hodowlanych z punktu widzenia określonych elementów struktury, warunkujących użyteczność gospodarczą materiałów roślinnych.

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje:

(szczegółowy wykaz publikacji oraz dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego znajduje się w Załączniku 4)

- 21 prac oryginalnych w tym 20 opublikowanych w czasopismach z listy JCR opublikowanych po doktoracie (włączając 6 publikacji składających się na osiągnięcie naukowe), w 18 przypadkach jestem pierwszym autorem a w 19 przypadkach jestem autorem korespondencyjnym;
- 5 publikacji w których opublikowano wyniki badań uzyskane w ramach pracy doktorskiej;
- 1 praca przeglądowa oraz 1 rozdział w książce o zasięgu międzynarodowym;
- 4 wygłoszone referaty, w tym jeden w języku angielskim;
- 10 doniesień konferencyjnych;
- udział w 3 własnych projektach badawczych jako kierownik projektu (OECD, KBN oraz NCN, OPUS 2 – w realizacji);
- udział w 3 międzynarodowych projektach jako post-doc lub wykonawca (2 projekty kanadyjskie, 1 europejski);
- wykonałam 15 recenzji oryginalnych prac naukowych dla wiodących czasopism (*Food Chemistry*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Food Hydrocolloids*, *Carbohydrate Polymers*; *Journal of Cereal Science*, *Phytochemical Analysis*);

- sumaryczny współczynnik wpływu *Impact Factor* prac wg JCR z roku opublikowania wynosi **31,747** w tym **15,619** - sumaryczny *Impact Factor* prac włączonych do osiągnięcia naukowego;
- liczba cytowań na podstawie Web of Science **120**, w tym **94** bez autocytowań;
- Index Hirscha opublikowanych publikacji - **6** wg Web of Science;
- suma punktów przyznanych za publikacje w czasopismach naukowych wg listy MNiSW wynosi **385**, w tym **197** dotyczy publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Szczególnym wyróżnieniem było dla mnie:

- imienne zaproszenie przez prof. Victor'a R. Preedy z King's College w Londynie do udziału w przygotowaniu rozdziału pt. "Dietary fiber arabinoxylans in processed rye: milling- and breadmaking-induced changes" w książce „*Processing and Impact on Active Components in Food*” wydanej przez Academic Press, Elsevier Inc., które odbieram jako dostrzeżenie moich osiągnięć naukowych na forum międzynarodowym;
- oraz rekomendacja publikacji **H6** przez nieznanego naukowca z zagranicy w sieci **PubAdvanced**.

Podpis Wnioskodawcy.....

Małgorzata Cyran