

# Autoreferat

w języku polskim

dotyczący działalności naukowo-badawczej

**dr Agnieszki Nawrockiej**

*Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego  
Polska Akademia Nauk*

Lublin, 2017

*AN*

1. Imię i nazwisko  
**Agnieszka Nawrocka**
  
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne
  - **magister fizyki:** Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, Instytut Fizyki, czerwiec 2004 r.  
tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ oddziaływań nukleotydów w DNA na ich stany elektronowe”  
pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Krawczyka
  
  - **doktor nauk fizycznych w dyscyplinie fizyka:** Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, Instytut Fizyki, październik 2008 r.  
tytuł rozprawy doktorskiej: „Spektroskopowe badania stanów elektronowych barwników zaadsorbowanych na nanocząstkach tlenku tytanu IV”  
promotor: prof. dr hab. Stanisław Krawczyk  
recenzenci: prof. dr hab. Danuta Wróbel  
dr hab. Jerzy Żuk
  
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

luty 2009 – obecnie	Instytut Agrofizyki, Polska Akademia Nauk
• luty 2009 – styczeń 2010	Pracownik inżynieryjno-techniczny (fizyk)
• luty 2010 – obecnie	Adiunkt
• 2011 – obecnie	Opiekun Laboratorium Oceny Jakości Surowców Zbożowych i Oleistych
• styczeń 2013 – grudzień 2015	Kierownik tematu badawczego nr VI: „Wartość użytkowa materiałów i surowców roślinnych”
• styczeń 2016 – grudzień 2016	Kierownik zadania badawczego nr 4: „Badanie oddziaływań białek glutenowych z błonnikami pokarmowymi”
• styczeń 2017 – obecnie	Kierownik zadania badawczego nr 4: „Określenie wpływu dodatków prozdrowotnych na strukturę białek glutenowych, jakość ciasta chlebowego i pieczywa”

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. nr 65, poz. 595 ze zm.):

A) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Moim osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl sześciu publikacji naukowych powiązanych tematycznie oraz ujętych pod wspólnym tytułem:

**„Wpływ preparatów błonnikowych oraz ich składników polisacharydowych na strukturę białek glutenowych w cieście chlebowym”**

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

**H1. Nawrocka A.,** Szymańska-Chargot M., Miś A., Ptaszyńska A.A., Kowalski R., Waśko P., Gruszecki W.I. Influence of dietary fibre on gluten proteins structure – a study on model flour with application of FT-Raman Spectroscopy. Journal of Raman Spectroscopy 2015, 46, 309-316.

IF<sub>5-letni</sub>= 2.506

IF<sub>2015</sub> = 2.395

MNiSW = 30

**H2. Nawrocka A.,** Miś A., Szymańska-Chargot M. Characteristics of relationships between structure of gluten proteins and dough rheology – Influence of dietary fibres studied by FT-Raman spectroscopy. Food Biophysics 2016, 11, 81-90.

IF<sub>5-letni</sub>= 1.901

IF<sub>2016</sub> = 1.704

MNiSW = 30

**H3. Nawrocka A.,** Szymańska-Chargot M., Miś A., Kowalski R., Gruszecki W.I. Raman studies of gluten proteins aggregation induced by dietary fibres. Food Chemistry 2016, 194, 86-94.

IF<sub>5-letni</sub>= 4.498

IF<sub>2016</sub> = 4.529

MNiSW = 40

**H4. Nawrocka A.,** Szymanska-Chargot M., Miś A., Wilczewska A.Z., Markiewicz K.H. Dietary fibre-induced changes in the structure and thermal properties of gluten proteins studied by Fourier transform-Raman spectroscopy and thermogravimetry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2016, 64, 2094-2104.

IF<sub>5-letni</sub>= 3.504

IF<sub>2016</sub> = 3.154

MNiSW = 40

**H5. Nawrocka A.,** Miś A., Niewiadomski Z. Dehydration of gluten matrix as a result of dietary fibre addition – A study on model flour with application of FT-IR spectroscopy. Journal of Cereal Science 2017, 74, 86-94.

IF<sub>5-letni</sub>= 2.665

IF<sub>2016</sub> = 2.223

MNiSW = 35

**H6. Nawrocka A.,** Szymańska-Chargot M., Miś A., Wilczewska A.Z., Markiewicz, K.H. Effect of dietary fibre polysaccharides on structure and thermal properties of gluten proteins – a study on gluten dough with application of FT-Raman spectroscopy, TGA and DSC. Food Hydrocolloids 2017, 69, 410-421.

IF<sub>5-letni</sub> = 5.459IF<sub>2016</sub> = 4.747MNI<sub>SW</sub> = 45

**H7. Nawrocka A.,** Szymańska-Chargot M., Miś A., Wilczewska A.Z., Markiewicz, K.H. Aggregation of gluten proteins in model dough after fibre polysaccharide addition. Food Chemistry 2017, 231, 51-60.

IF<sub>5-letni</sub> = 4.498IF<sub>2016</sub> = 4.529MNI<sub>SW</sub> = 40

Wkład wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w Załączniku 3, natomiast oświadczenia współautorów w Załączniku 7.

Sumaryczny *impact factor* prac stanowiących najważniejsze osiągnięcie w dorobku naukowym według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: **23.008**, punkty MNI<sub>SW</sub> = **260**.

- C) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

W latach 2013 – 2017 realizowałam prace badawcze i wnikliwe studia literaturowe odnośnie wykorzystania metod spektroskopowych (spektroskopii Ramana, spektroskopii w podczerwieni) oraz metod analizy termicznej (termograwimetrii, skaningowej kalorymetrii różnicowej) w badaniach zmian strukturalnych białek glutenowych oraz ich własności termicznych wywołanych suplementacją ciasta chlebowego, modelowego oraz glutenowego preparatami błonnikowymi różnego pochodzenia oraz polisacharydami będącymi składnikami tychże preparatów. Uzyskane rezultaty opublikowałam w postaci cyklu prac powiązanych tematycznie (**H1 – H7**), które uważam za swoje największe osiągnięcie w dotychczasowej działalności naukowej i przedkładam jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

### Wprowadzenie

Obecnie, w wyniku rosnącej świadomości konsumenci zaczynają doceniać korzyści zdrowotne diety bogatej w błonnik pokarmowy, a równocześnie oczekują aby suplementowanie produktów spożywczych preparatami błonnikowymi nie wpływało na pogarszanie ich walorów sensorycznych. Pieczywo pszenne zajmuje nadal czołowe miejsce w diecie europejskiej, a zatem może być odpowiednim nośnikiem również wartościowych składników prozdrowotnych w tym błonnika pokarmowego. Preparaty błonnikowe są bogate w polisacharydy, antocyjany, flawanole, tokoferole i kwasy fenolowe. Składniki te mają pozytywny wpływ na zdrowie człowieka oddziałując przeciwutleniająco, antyrakowo, przeciwcukrzycowo, neuroprotekcynie etc. Jednakże suplementacja pieczywa preparatami błonnikowymi powoduje obniżenie jego jakości sensorycznej poprzez zmniejszenie objętości bochenka, nieodpowiednią jego teksturę i smak. Stąd istnieje potrzeba określenia podstaw negatywnego wpływu preparatów błonnikowych na jakość chleba pszennego. Pozwoli to w przyszłości na opracowanie technologii produkcji suplementów odpowiednich do zastosowań w piekarnictwie.

Jakość ciasta chlebowego, a co za tym idzie samego chleba, jest ściśle związana ze strukturą białek glutenowych. Białka glutenowe, gliadyny i gluteniny tworzą ciąglą, lepko-sprężystą sieć glutenową w cieście. Gluteniny, białka polimerowe o dużej masie cząsteczkowej (500 kDa - 10 MDa),

składają się z podjednostek o dużej (HMW) i małej masie cząsteczkowej (LMW), które łączą się ze sobą za pośrednictwem mostków disiarczkowych. Natomiast gliadyny, białka globularne o małej masie cząsteczkowej (28-55 kDa), oddziałują z gluteninami poprzez wiązania wodorowe oraz oddziaływania hydrofobowe (Shewry et al., 2002). Gluteniny zapewniają wytrzymałość i elastyczność podczas rozwoju ciasta chlebowego, podczas gdy gliadyny nadają ciastu lepkość (Sivam et al., 2012). Dodawanie do ciasta chlebowego różnych związków chemicznych zaburza sieć glutenową poprzez tworzenie nowych wiązań wodorowych oraz zmiany w konformacji mostków disiarczkowych. Prowadzi to nieprawidłowego zwijania się łańcuchów polipeptydowych lub agregacji kompleksów białkowych w wyniku czego otrzymujemy sieć glutenową o zmienionych właściwościach reologicznych (Miś, 2011; Miś et al., 2013).

Dwa rodzaje wiązań chemicznych są niezwykle ważne dla procesu formowania i rozwoju ciasta. Pierwsze z nich to mostki disiarczkowe utworzone przez reszty cysteinowe zlokalizowane na końcach C i N łańcuchów gluteninowych. Mostki disiarczkowe mogą się tworzyć wewnątrz kompleksu białkowego lub pomiędzy kompleksami białkowymi. Podczas procesu miesienia ciasta mostki disiarczkowe działają jako "przedłużacze łańcucha" - łącząc podgrupy glutenin o dużej i małej masie cząsteczkowej, tworząc sieć glutenową. Ponadto zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowe wiązania S-S przyczyniają się do wzrostu elastyczności sieci glutenowej (Wieser, 2007). Wiązania S-S mogą przyjmować trzy konformacje: gauche-gauche-gauche (g-g-g), trans-gauche-gauche (t-g-g) i trans-gauche-trans (t-g-t), którym można przyporządkować następujące przedziały spektralne w widmie Ramana: 508-512  $\text{cm}^{-1}$  dla g-g-g, 523-528  $\text{cm}^{-1}$  dla t-g-g i 530-545  $\text{cm}^{-1}$  dla t-g-t (Sugeta, 1975). Konformacja g-g-g jest uważana za konformację najbardziej stabilną energetycznie, która dominuje w niemodyfikowanej sieci glutenowej. Drugim rodzajem wiązań chemicznych ważnych dla procesu tworzenia ciasta są wiązania wodorowe, które można badać analizując środowisko dwóch aminokwasów aromatycznych – tyrozyny (TYR) i tryptofanu (TRP). Przyjmuje się, że podjednostki gluteninowe o dużej masie cząsteczkowej (HMW) zawierają od 3 do 5% tyrozyny. Udział reszt TYR w tworzeniu wiązań wodorowych jest opisywany przez dublet tyrozynowy. Dublet tyrozynowy jest to stosunek intensywności pasm z maksimum na 850 i 830  $\text{cm}^{-1}$  w widmie ramanowskim –  $I(850)/I(830)$ . Spadek wartości dubletu tyrozynowego wskazuje na chowanie się reszt TYR wewnątrz kompleksu białkowego i tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Natomiast wzrost wartości  $I(850)/I(830)$  wskazuje na wyeksponowanie reszt TYR i tworzenie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Jeśli wartość tego stosunku mieści się w przedziale (0.9-1.43), to reszty TYR są uważane za "tyrozinę normalną", która może jednocześnie pełnić rolę donora lub akceptora protonu. Jeżeli wartość dubletu przekracza 1.43 to reszty TYR pełnią rolę akceptora protonu, a dla wartości dubletu mniejszej od 0.9 pełnią rolę donora protonu. W przypadku białek glutenowych wartość tego stosunku mieści się w zakresie "normalnej tyrozyny" (Wieser, 2007). Rodzaj wiązań wodorowych, w których biorą udział reszty TRP, określa się na podstawie analizy intensywności pasma TRP na 760  $\text{cm}^{-1}$  w widmie Ramana. Pasma to zostało zaproponowane jako wskaźnik siły wiązania wodorowego oraz hydrofobowości pierścienia indolowego. Zmniejszenie intensywności pasma sugeruje, że reszty TRP są wyeksponowane i biorą udział w tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, podczas gdy wzrost intensywności wskazuje na chowanie się grup hydroksylowych TRP i ich udział w tworzeniu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych (Linlaud et al., 2011).

Błonnik pokarmowy jest to mieszanina substancji polisacharydowych, zazwyczaj pochodzenia roślinnego, które nie ulegają trawieniu przez enzymy przewodu pokarmowego człowieka oraz niektórych zwierząt. Polisacharydy wchodzące w skład błonnika pokarmowego można podzielić na dwa rodzaje: polisacharydy nierozpuszczalne w wodzie (mniej sfermentowane): celuloza, hemiceluloza,

lignina i rozpuszczalne w wodzie (dobrze sfermentowane): pektyny, gumy i śluzy (Dhingra et al., 2012). Błonnik występuje powszechnie w zbożach, warzywach, owocach i orzechach. Jego ilość oraz skład chemiczny zależy od rodzaju rośliny, z której się go otrzymuje. Pomimo tego, że błonnik pokarmowy wpływa pozytywnie na zdrowie człowieka, to wzbogacanie pieczywa błonnikiem pokarmowym znacznie zmniejsza jego jakość. Dodanie błonnika do ciasta zmienia jego właściwości lepko-sprężyste i stabilność podczas procesu miesienia (Peressini et al., 2009; Miś, 2011, Miś et al., 2013). Obserwowane negatywne skutki suplementacji ciasta preparatami błonnikowymi mogą być związane z botanicznym źródłem pochodzenia błonnika, determinującym jego skład chemiczny, technologię produkcji oraz recepturę mieszanek błonnikowych (Collar et al., 2007). Jak już wspomniano wyżej, dodawanie błonnika do ciasta powoduje zmiany w strukturze białek glutenowych. Sivam et al. (2012, 2013) badali wpływ pektyn i polifenoli wyekstrahowanych z jagód na strukturę sieci glutenowej w chlebach modelowych i rzeczywistych z zastosowaniem spektroskopii FTIR i Ramana. Wyniki badań pokazały, że dodatek pektyn oraz ekstraktów polifenolowych spowodował zmiany w strukturze chleba. Wzbogacone pieczywo w porównaniu do zwykłego pieczywa zawierało  $\beta$ -kartki powstałe z zakrętów  $\beta$  oraz większą ilość struktur nieuporządkowanych, zwłaszcza w obecności ekstraktów polifenolowych. Badano również wpływ różnego rodzaju celuloz oraz pektyn na strukturę białek glutenowych (Correa et al., 2014). Dodatek tych związków do mąki pszennej spowodował zwiększenie liczby struktur nieuporządkowanych. Polisacharydy rozpuszczalne w wodzie mogą być również wykorzystywane jako polepszacze pieczywa ze względu na ich wpływ na funkcjonalność, jakość oraz przechowywanie pieczywa. Linlaud et al. (2011) badali oddziaływania między białkami glutenowymi a gumą ksantanową, gumą karobową, gumą guar oraz pektynami przy użyciu spektroskopii FT-Ramana. Każdy z tych związków powodował inne zmiany w paśmie amid I, konformacji mostków disiarczkowych oraz środowisku tyrozyny i tryptofanu. Generalnie, dodatek tych polisacharydów do ciasta powodowało tworzenie bardziej labilnej sieci glutenowej, w której to dominowały struktury nieuporządkowane. Jako polepszacz ciasta mogą być używane również dekstryny, których wpływ na strukturę gliadyn badali Secundo et al. (2005). Analiza pasma amid I gliadyn modyfikowanych przez dekstryny sugerowała utworzenie wiązań wodorowych między gliadynami i dekstrynami. Również dodatek glukomannanu (rozpuszczalnego w wodzie polisacharydu stosowanego jako dodatek błonnika pokarmowego) powodowało powstawanie wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi białek glutenowych i glukomannanu. W wyniku tego powstawała sieć glutenowa charakteryzująca się dużą elastycznością (Zhou et al., 2014). W celu zbadania zmian w strukturze białek glutenowych powstających w wyniku suplementacji ciasta innymi składnikami preparatów błonnikowych poza polisacharydami, dodawano również kwasy fenolowe i antocyjany (Min et al., 2011; Sivam et al., 2013; Taddei et al., 2013).

W celu wyjaśnienia mechanizmu pogarszania się jakości ciasta i pieczywa wywoływanego suplementacją ciasta preparatami błonnikowymi, zostały stworzone trzy hipotezy. Jedna z nich mówi o tym, że obniżenie jakości związane jest ze zjawiskiem konkurencji o wodę pomiędzy białkami glutenowymi i błonnikami pokarmowymi w trakcie procesu miesienia ciasta (Collar et al., 2007). Druga hipoteza zakłada, że dodawanie błonnika pokarmowego fizycznie zaburza powstawanie pęcherzyków w cieście a przez to sieć glutenową (Gan et al., 1989). Bock et al. (2013) połączył obie powyższe hipotezy w jedną. Zakłada ona, że zjawisko konkurencji o wodę pomiędzy białkami glutenowymi i błonnikami pokarmowymi może powodować zmiany w redystrybucji wody w cieście, a co za tym idzie spowodować częściową dehydratację sieci glutenowej. Zjawisko dehydratacji może prowadzić do zmian w strukturze białek glutenowych, w wyniku których powstaje sieć glutenowa charakteryzująca

się niekorzystnymi właściwościami lepko-sprężystymi i następuje częściowe załamanie sieci glutenowej.

### **Cel naukowy**

Wspólnym celem naukowym wymienionych prac stanowiących moje osiągnięcie naukowo-badawcze było określenie zmian w strukturze oraz własnościach termicznych białek glutenowych modyfikowanych preparatami błonnikowymi i ich składnikami polisacharydowymi w czasie rozwoju i miesienia ciasta pszennego, modelowego i glutenowego.

Dodatkowo zostały sformułowane następujące cele szczegółowe:

- określenie zmian w strukturze białek glutenowych pochodzących z ciasta pszennego modyfikowanego czterema preparatami błonnikowymi oraz powiązanie zmian strukturalnych ze skutkami technologicznymi (**publikacja H2**);
- opracowanie metodologii określania zmian strukturalnych białek glutenowych z widm ramanowskich (**publikacja H1**);
- określenie rodzaju zmian w strukturze białek glutenowych w cieście glutenowym (bez obecności skrobi) modyfikowanym poprzez preparaty błonnikowe i polisacharydy (**publikacje H3 i H6**);
- określenie różnic w strukturze białek glutenowych w zależności od zawartości preparatu błonnikowego lub polisacharydu oraz rodzaju ciasta: modelowego i glutenowego (**publikacje H3-H7**);
- określenie zmian w populacjach wody w cieście modelowym suplementowanym preparatami błonnikowymi (**publikacja H5**);
- przyporządkowanie obserwowanych zmian w strukturze białek glutenowych poszczególnym polisacharydom (**publikacje H6 i H7**).

### **Metodologia**

W przedstawianym osiągnięciu naukowym obiektami badań były trzy rodzaje ciast – ciasto pszenne (**publikacja H1**), ciasto modelowe (**publikacja H2, H4, H5 i H7**) oraz ciasto glutenowe (**publikacja H3 i H6**). Jako pierwsze w ramach badań wstępnych badano ciasto pszenne otrzymywane z mąki pszennej. Jednakże mąka pszenna nie jest mieszaniną tylko dwóch składników tj. skrobi pszennej i glutenu pszennego, zawiera również lipidy, różnego rodzaju polisacharydy błonnikowe etc. W celu wyeliminowania wpływu na wyniki badań tych pozostałych składników mąki pszennej, stworzono mąkę modelową zawierającą tylko skrobię pszenną i gluten pszenny w stosunku wagowym 80:15. Z mąki modelowej otrzymywano ciasto modelowe. Natomiast ciasto glutenowe otrzymywano poprzez zmieszanie glutenu pszennego z 2% roztworem NaCl, w celu określenia zmian w strukturze białek glutenowych w nieobecności skrobi.

Jako czynniki modyfikujące strukturę białek glutenowych oraz ich własności termiczne użyto dziewięć komercyjnych preparatów błonnikowych i cztery polisacharydy błonnikowe. Wśród preparatów błonnikowych użyto błonnika aroniowego (CHB), żurawinowego (CRB), jabłkowo-żurawinowego (A-CR), jabłkowego (APL), marchwiowego (CRR), kakaowego (CAC), karobowego (CAR), owsianego (OAT) i Inianego (FLX). Natomiast jako polisacharydy wybrano te, które najczęściej występują w preparatach błonnikowych tj. celulozę mikrokrystaliczną (MCC), inulinę (IN), pektynę jabłkową (AP) i pektynę cytrusową (CP). Charakterystyka preparatów błonnikowych przedstawiona jest w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka preparatów błonnikowych użytych w osiągnięciu naukowo-badawczym: zawartość błonnika pokarmowego (DF), polifenoli (TPC), antocyjanów, celulozy i pektyn.

Parametr (g/100g)	CHB	CRB	CRR	CAC	CAR	OAT	FLX
Całkowity DF	75	58.2	50	72	74.6	44	50
DF nierozpuszczalny w wodzie	70	53	33	61	68.4	23	33
DF rozpuszczalny w wodzie	5	5.2	17	11	6.2	11	17
Celuloza	17.3	27.2	14.3	19.9	12.8	4.5	6.9
Pekyyny	0.28	0.37	0.64	0.64	0.34	nd	nd
TPC	0.694	0.252	0.167	0.344	0.330	0.071	0.048
Antocyjany	0.478	0.236	0.168	0.263	0.053	0.024	0.000

nd – nie dotyczy

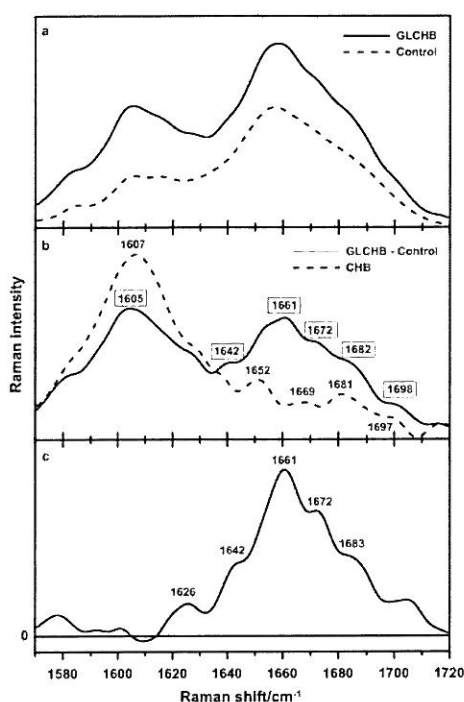
Badania w ramach osiągnięcia można podzielić na badania wstępne i badania właściwe. W ramach badań wstępnych badano wpływ czterech preparatów błonnikowych (A-CR, CAC, CAR i OAT) przy stałej ich zawartości 6% na białka glutenowe w cieście pszennym (**publikacja H2**) oraz siedmiu preparatów błonnikowych (CHB, CRB, CRR, CAC, CAR, OAT i FLX) również przy stałej ich zawartości 6% na białka glutenowe w cieście modelowym (**publikacja H1**). W ramach badań właściwych badano wpływ ośmiu preparatów błonnikowych (CHB, CRB, APL, CRR, CAC, CAR, OAT i FLX) przy następujących ich zawartościach 3%, 6%, 9%, 12% i 18% na strukturę białek glutenowych w cieście modelowym (**publikacja H4 i H5**) i w cieście glutenowym (**publikacja H3**). Badania strukturalne wykonane przy użyciu preparatów błonnikowych wskazywały na to, że suplementacja ciasta preparatami błonnikowymi powoduje podobne zmiany w strukturze białek glutenowych. Na tej podstawie postawiono hipotezę, że za obserwowane zmiany odpowiedzialna jest prawdopodobnie celuloza jako polisacharyd występujący we wszystkich badanych preparatach. W związku z tym przeprowadzono badania wpływu czystych polisacharydów na strukturę białek glutenowych w cieście modelowym (**publikacja H7**) i cieście glutenowym (**publikacja H6**) w celu przyporządkowania obserwowanych zmian strukturalnych odpowiednim polisacharydom.

Podstawową metodą badawczą wykorzystywaną we wszystkich badaniach stanowiących osiągnięcie naukowe była spektroskopia ramanowska z transformatą Fouriera (FT-Raman). Metoda ta, w której używany był laser Nd:YAG o długości fali światła  $\lambda = 1064$  nm, dostarczała informacji o strukturze drugorzędowej białek (analiza pasma amid I –  $1590-1720$   $\text{cm}^{-1}$ ), strukturze trzeciorzędowej białek (analiza konformacji mostków disiarczkowych w przedziale spektralnym  $490-550$   $\text{cm}^{-1}$ ) oraz środowisku dwóch aminokwasów aromatycznych – tyrozyny (dublet tyrozynowy –  $I(850)/I(830)$ ) i tryptofanu (intensywność pasma na  $760$   $\text{cm}^{-1}$  –  $I(760)$ ). Ponadto w badaniach wykorzystano spektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera (FT-IR) do określenia zmian w strukturze drugorzędowej białek (analiza pasm amid I –  $1570-1720$   $\text{cm}^{-1}$  i amid III –  $1200-1630$   $\text{cm}^{-1}$ ) oraz populacji wody (analiza pasma związanego z drganiem rozciągającymi grup OH –  $2500-4000$   $\text{cm}^{-1}$ ) (**publikacja H5**) oraz skaningową mikroskopię elektronową (SEM) do określenia zmian w mikrostrukturze łańcuchów glutenowych w cieście modelowym (**publikacja H1**). Własności termiczne białek glutenowych modyfikowanych preparatami błonnikowymi (**publikacja H4**) i polisacharydami (**publikacja H6 i H7**) badano z wykorzystaniem termogravimetrii (TGA) (**publikacja H4, H6 i H7**) oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) (**publikacja H6 i H7**). Z termogramów TGA określano ubytek



masy przy temperaturze 600 °C oraz temperaturę rozkładu ( $T_d$ ), natomiast z termogramów DSC określano temperaturę denaturacji ( $T_p$ ) białek glutenowych.

W analizie struktury drugorzędowej białek używano widma różnicowe obliczone poprzez odjęcie widma próbki kontrolnej od widma mieszaniny gluten – preparat błonnikowy/polisacharyd (I widmo różnicowe). Oba widma były normalizowane polem powierzchni pod pasmem amid I lub amid III. Jeżeli w I widmie różnicowym zaobserwowano pasmo związane z preparatem błonnikowym/polisacharydem to obliczano II widmo różnicowe poprzez odjęcie od I widma różnicowego widma preparatu błonnikowego/polisacharydu. I widmo różnicowe oraz widmo preparatu błonnikowego/polisacharydu było normalizowane intensywnością pasma charakterystycznego dla preparatu błonnikowego/polisacharydu. Schemat obliczania widm różnicowych przedstawiony jest na przykładzie preparatu aroniowego na rys.1 i pochodzi z publikacji H1.



Rys.1. Schemat obliczania widm różnicowych w paśmie amid I dla preparatu aroniowego. Widmo próbki kontrolnej zostało odjęte od widma mieszaniny gluten – preparat błonnikowy i otrzymano I widmo różnicowe oznaczone linią ciągłą w panelu b. Linią przerywaną w panelu b oznaczone jest widmo preparatu błonnikowego. Oba widma w panelu b zostały znormalizowane na paśmie 1605  $\text{cm}^{-1}$  i odjęte od siebie. W wyniku odejmowania otrzymano II widmo różnicowe przedstawione w panelu c, które odzwierciedla interakcje pomiędzy białkami glutenowymi i preparatem błonnikowym.

## Omówienie wyników badań

### 1. Charakterystyka białek glutenowych (próbki kontrolnej).

W przedkładanym osiągnięciu naukowo- badawczym badano trzy rodzaje ciast, z których wycinano próbki kontrolne. Charakterystyka próbek kontrolnych przedstawiono w tabeli 2. Porównanie próbek glutenowych ze względu na strukturę drugorzędową pokazuje niewielkie zmiany w zawartości procentowej struktur  $\beta$ , natomiast ilość  $\alpha$ -helis ( $\alpha$ H) i agregatów (AGR) nie zmienia się. Zaobserwowano pseudo- $\beta$ -kartki ( $p\beta$ S) w próbkach glutenowych otrzymanych z ciasta modelowego i glutenowego, zmniejszenie liczby  $\beta$ -katek ( $\beta$ S) oraz zwiększenie ilości antyrównoległych- $\beta$ -katek ( $a\beta$ S) i zakrętów  $\beta$  ( $\beta$ T) w porównaniu do ciasta pszenne. W przypadku mostków disiarczkowych zaobserwowano dominację konformacji g-g-g w cieście pszenne, natomiast w cieście modelowym i glutenowym dominują konformacje g-g-g i t-g-g. Wyraźną różnicę pomiędzy ciastem pszenne a ciastami modelowym i glutenowym widać w wartości dubletu tyrozynowego (I(850)/I(830)), który jest

prawie dwa razy większy dla dwóch ostatnich ciast. Dla białek glutenowych wymytych z ciasta pszenne nie określono intensywności pasma TRP i parametrów termicznych. Jeżeli chodzi o parametry termiczne to różnica pomiędzy ciastem modelowym i glutenowym widoczna jest tylko w przypadku testów DSC. Termogram DSC białek glutenowych wymytych z ciasta modelowego pokazuje pięć pików temperaturowych na 79, 187, 266, 283, 296 °C, z których tylko dwa (78, 293 °C) są obserwowane na termogramie DSC białek glutenowych wymytych z ciasta glutenowego.

Tabela 2. Charakterystyka strukturalna i termiczna białek glutenowych (próbek kontrolnych) otrzymanych z ciasta pszenne (**publikacja H2**), modelowego (**publikacja H1 i H7**) i glutenowego (**publikacja H3 i H6**).

Parametr	Ciasto pszenne	Ciasto modelowe	Ciasto glutenowe
AGR (1606) (%)	8	10	6
pβS (1616) (%)	0	7	7
βS (1628) (%)	11	5	7
aβS (1689) (%)	8	16	14
αH (1657) (%)	60	54	58
βT (1677) (%)	13	5	8
SS <sub>ggg</sub> (%)	62	41	43
(max pasma, cm <sup>-1</sup> )	(505)	(504)	(505)
SS <sub>tgg</sub> (%)	27	42	45
(max pasma, cm <sup>-1</sup> )	(516, 522sh)	(514sh, 520)	(514, 522sh)
SS <sub>tgt</sub> (%)	11	17	12
(max pasma, cm <sup>-1</sup> )	(532, 538sh)	(535)	(535, 540sh)
I(850)/I(830)	0.88	1.56	1.48
I(760)	nd	0.167	0.119
Ubytek masy (%)	nd	74.8	76.9
T <sub>d</sub> (°C)	nd	322	319
T <sub>p</sub> (°C)	nd	79, 187, 266, 283, 296	78, 293

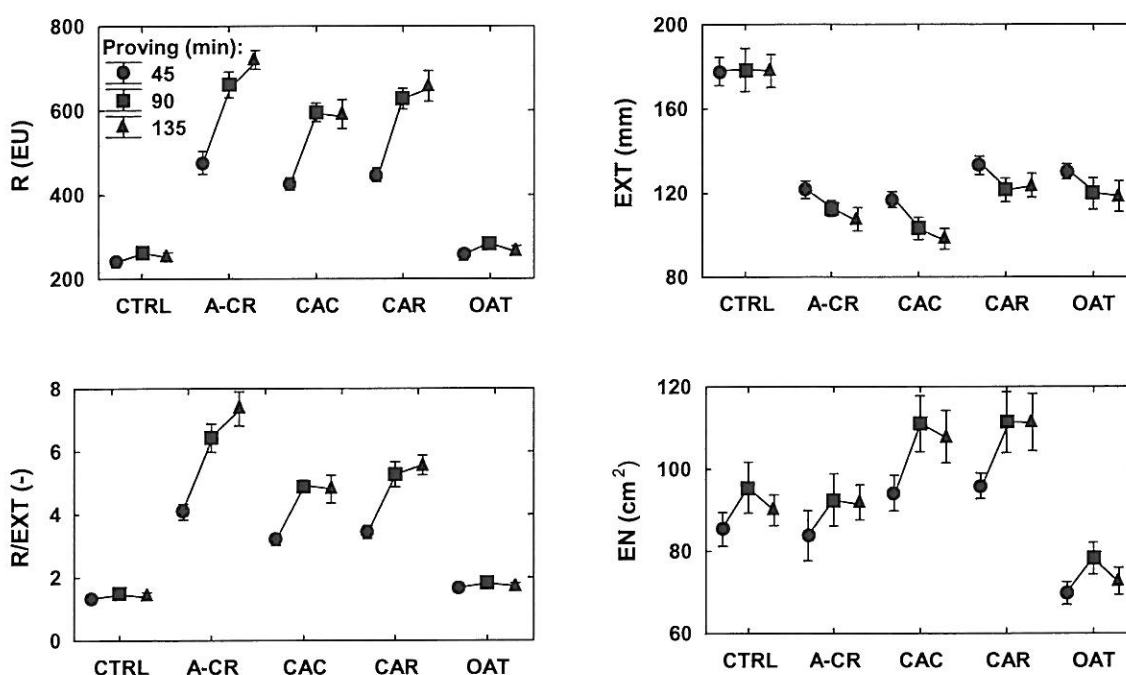
nd – nie dotyczy

## 2. Zmiany w strukturze białek glutenowych w cieście pszennym modyfikowanym preparatami błonnikowymi i określenie zależności pomiędzy właściwościami strukturalnymi i reologicznymi ciasta (**publikacja H2**).

Jak wspomniano wyżej jakość ciasta pszenne i pieczywa jako produktu końcowego jest ściśle związana ze strukturą białek glutenowych. Stąd, celem badań wstępnych przedstawionych w **publikacji H2** było określenie zmian w strukturze białek glutenowych w cieście pszennym modyfikowanym 6% dodatkiem czterech preparatów błonnikowych (A-CR, CAC, CAR i OAT), zmian właściwości reologicznych modyfikowanego ciasta oraz określenie zależności pomiędzy parametrami strukturalnymi białek glutenowych i własnościami reologicznymi ciasta pszenne.

Spośród własności reologicznych ciasta pszenne określano wodochłonność (WA) mieszanki z której wyrabiano ciasto, czas rozwoju ciasta (DT), stabilność ciasta (S), stopień rozmiękczenia ciasta (DS), rozciągliwość ciasta (EXT), opór ciasta na rozciąganie (R), stosunek R/EXT oraz energię ciasta (EN). Ponadto określono również parametry charakteryzujące zawartość i jakość białek glutenowych: indeks glutenu (GI), ilość glutenu mokrego (WG) i suchego (DG), wodochłonność glutenu (WA<sub>G</sub>) i zawartość wody wolnej (FW<sub>G</sub>). Po zastosowaniu preparatów błonnikowych największe zmiany zaobserwowano w wartościach rozciągliwości ciasta (EXT), oporze na rozciąganie (R) i stosunku R/EXT, które są przedstawione na rys.2. Rysunek ten pokazuje, że wszystkie preparaty błonnikowe za wyjątkiem

owsianego powodują znaczące zmiany w wartościach R, EXT i stosunku R/EXT. W wyniku suplementacji ciasta preparatami błonnikowymi opór ciasta na rozciąganie rośnie ponad dwukrotnie w porównaniu do próbki kontrolnej, natomiast rozciągliwość ciasta spada o jedną trzecią wartości kontrolnej. W konsekwencji wartość stosunku R/EXT rośnie z 1.4 do 6.0 dla preparatu A-CR. Pomimo znaczących zmian w wartościach R, EXT i R/EXT, wartość energii ciasta (EN) zmienia się w niewielkim stopniu zwłaszcza w przypadku błonnika owocowego. Preparaty CAC i CAR wywołują nieznaczny wzrost EN, natomiast preparat OAT powoduje znaczne obniżenie wartości tego parametru. Dodatek preparatu błonnikowego również zmienia wartości tych parametrów w zależności od czasu leżakowania ciasta. Jest to związane prawdopodobnie z tym, że obecność preparatów zmienia dynamikę procesów biochemicznych w cieście np. procesów utleniania i proteolizy, które to wywołują przeciwstawne procesy reologiczne, odpowiednio usztywnienie i rozmięczenie ciasta.



Rys.2. Zmiany w parametrach reologicznych (opór ciasta na rozciąganie – R, rozciągliwość ciasta – EXT, energia ciasta – EN dla trzech czasów leżakowania ciasta – 45, 90 i 135 min.) wywołane suplementacją ciasta pszennego czterema preparatami błonnikowymi: jabłkowo-żurawinowy (A-CR), kakaowy (CAC), karobowy (CAR) i owsiany (OAT).

Zmiany strukturalne w białkach glutenowych zaobserwowane po suplementacji ciasta pszennego preparatami błonnikowymi przedstawiono w tabeli 3. W przypadku struktury drugorzędowej zmiany spowodowane dodatkiem wszystkich preparatów błonnikowych zaobserwowano głównie w ilości struktur  $\beta$ , tj. pojawiło się nowe pasmo związane z pseudo- $\beta$ -kartkami ( $p\beta S$ ) na  $1616\text{ cm}^{-1}$  i zmniejszyła się liczba równoległych  $\beta$ -kartek ( $\beta S$ ), natomiast ilość struktur helikalnych ( $\alpha H$ ) nie uległa zmianie. Suplementacja ciasta preparatami CAC i CAR wywołała również agregację zakrętów  $\beta$  ( $\beta T$ ) w antyrównoległe  $\beta$ -kartki ( $a\beta S$ ). W przypadku mostków disiarczkowych zaobserwowano znaczne zwiększenie się ilości mostków disiarczkowych w konformacji t-g-g i t-g-t kosztem mostków w konformacji g-g-g. Wartość dubletu tyrozynowego nieznacznie spadła w przypadku preparatów A-CR, CAC i CAR w porównaniu do próbki kontrolnej wskazując na tworzenie wewnątrz-cząsteczkowych wiązań wodorowych przez grupy hydroksylowe TYR, a co za tym idzie

zwijanie się białka. Natomiast dla preparatu OAT zaobserwowano znaczny wzrost wartości  $I(850)/I(830)$  co wskazuje na tworzenie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy grupami OH tyrozyny i prawdopodobnie polisacharydów obecnych w OAT. Obserwowane zmiany w strukturze białek glutenowych wskazują na agregację lub nieprawidłowe zwijanie się białek. W wyniku tych zmian dostajemy mocniejszą sieć glutenową na co wskazują wyniki badań reologicznych tj. wzrost wartości oporu na rozciąganie (R) i zmniejszenie rozciągliwości ciasta (EXT).

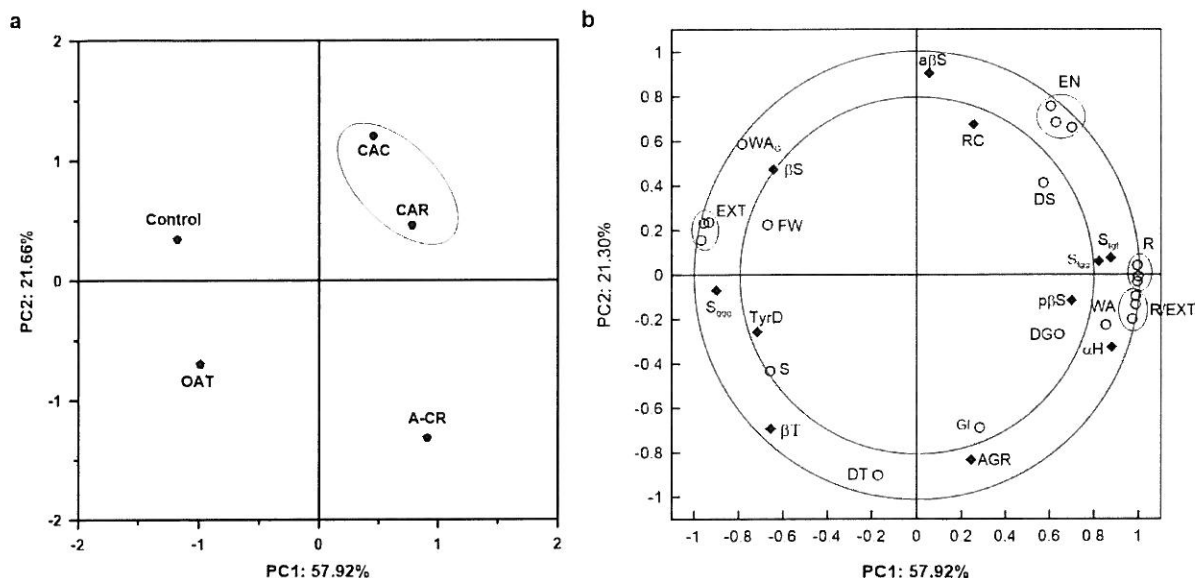
Tabela 3. Parametry strukturalne określone dla białek glutenowych w cieście pszennym modyfikowanym preparatami błonnikowymi (A-CR, CAC, CAR i OAT).

Parametry strukturalne	Kontrola (%) <sup>*</sup>	A-CR (%) <sup>*</sup>	CAC (%) <sup>*</sup>	CAR (%) <sup>*</sup>	OAT (%) <sup>*</sup>
<b>Struktura drugorzędowa</b>					
AGR (1606)	8	12	8	7	9
pβS (1616)	0	4	4	5	4
βS (1628)	11	1	4	7	5
aβS (1689)	8	3	17	10	8
αH (1657)	60	69	63	68	62
βT (1677)	13	11	2	3	12
RC (1636)	0	0	3	0	0
<b>Konformacja mostków disiarczkowych</b>					
SS <sub>g-g</sub>	62	33	32	23	45
(max pasma, cm <sup>-1</sup> )	(505)	(503)	(502)	(497, 507)	(505)
SS <sub>t-g</sub>	27	42	45	43	38
(max pasma, cm <sup>-1</sup> )	(516, 522sh)	(516)	(522)	(521)	(515, 522sh)
SS <sub>t-g-t</sub>	11	25	23	34	17
(max pasma, cm <sup>-1</sup> )	(532, 538sh)	(527, 536sh)	(534)	(537, 544sh)	(536)
<b>Dublet tyrozynowy</b>					
$I(850)/I(830)$	0.88	0.75	0.83	0.76	1.29

<sup>\*</sup>nie odnosi się do wartości  $I(850)/I(830)$

Drugim nie mniej istotnym celem badań przedstawionych w publikacji H2 było również określenie zależności pomiędzy parametrami opisującymi strukturę białek glutenowych a parametrami opisującymi własności mechaniczne sieci glutenowej w cieście pszennym. Do tego celu użyto analizy składowych głównych (PCA, *Principal Component Analysis*), której wyniki przedstawiono na rys.3. Analiza PCA dała cztery składowe główne wyrażające 100% wariacji. Poszczególne składowe PC1, PC2, PC3 i PC4 wyrażały procent wariacji odpowiednio 57.92%, 21.66%, 13.84% i 6.58%. Rys.3a pokazuje, że preparaty CAC i CAR wywołują podobne zmiany w analizowanych parametrach. A-CR również powoduje podobne zmiany, ponieważ wszystkie trzy preparaty leżą po prawej stronie osi PC1. Natomiast próbka kontrolna i OAT w odmienny sposób wpływają na badane parametry i są zlokalizowane po lewej stronie osi PC1. Takiego rodzaju podział badanych próbek jest prawdopodobnie związany ze składem chemicznym poszczególnych preparatów błonnikowych. Zależności pomiędzy parametrami strukturalnymi i mechanicznymi przedstawione są na rys. 3b. Pozytywne korelacje zaobserwowano pomiędzy oporem ciasta na rozciąganie (R) a ilością struktur helikalnych (αH) i pseudo-β-kartek (pβS), podczas gdy ilość β-kartek (βS) i zakrętów β (βT) była negatywnie skorelowana z R. Te zależności mogą wskazywać na to, że pβS tworzone są z βS i βT. Wyniki te są w zgodzie z modelem „loop i train” Beltona (Belton, 1999) opisującym strukturę białek glutenowych w sieci

glutenowej. Według tego modelu opór ciasta na rozciąganie zależy od stosunku „loop/train”. Jeżeli zwiększa się liczba „train”, dla których charakterystyczne są struktury  $\beta$ , to zwiększa się również wartość R, ponieważ potrzebna jest większa energia do tego by zniszczyć „train”. Natomiast struktury  $\alpha$ -helikalne tworzą „loops”. Jeżeli chodzi o mostki disiarczkowe to pozytywnie skorelowano parametr R z mostkami disiarczkowymi w konformacjach t-g-g i t-g-t, natomiast negatywnie z konformacją g-g-g. W przypadku dubletu tyrozynowego stwierdzono ujemną korelację pomiędzy wartością tego stosunku a parametrem R. Zależności pomiędzy rozciągliwością ciasta (EXT) a parametrami strukturalnymi są odwrotne w porównaniu do oporu ciasta na rozciąganie (R).



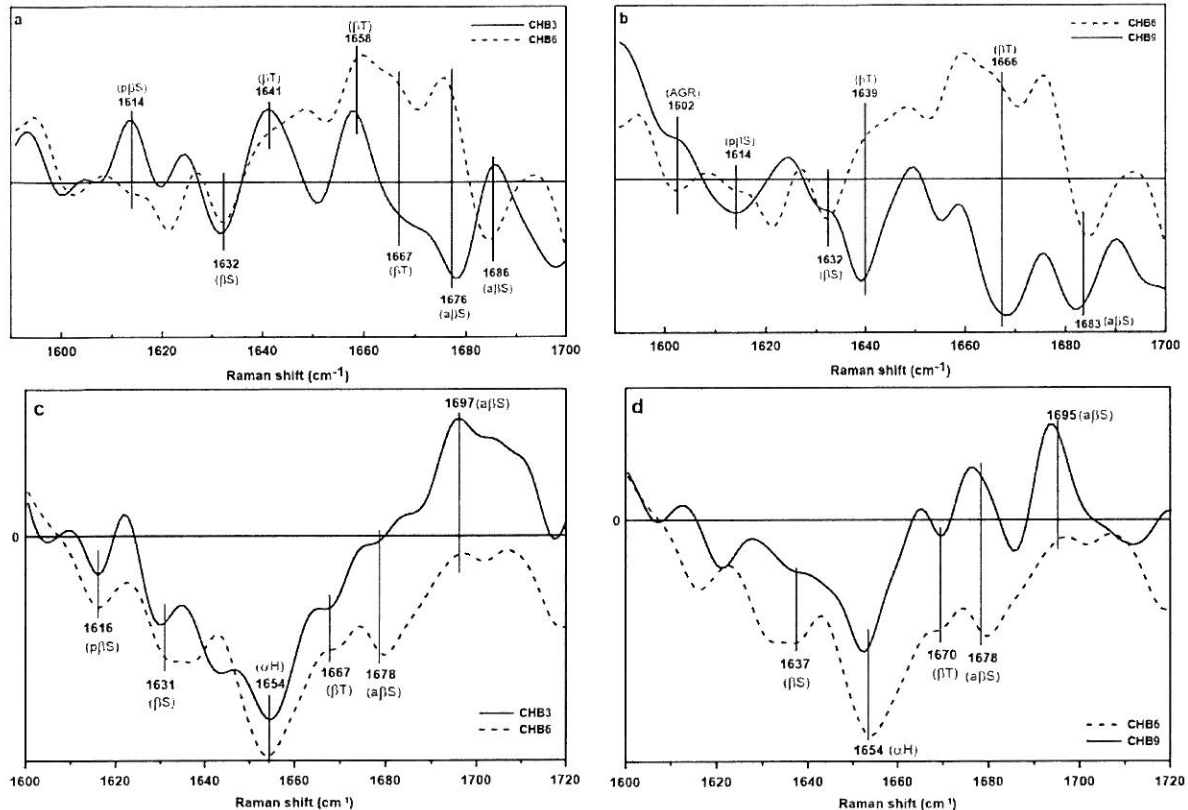
Rys.3. Analiza składowych głównych (PCA) odzwierciedlająca zależności pomiędzy parametrami opisującymi strukturę białek glutenowych (puste kółka) i parametrami opisującymi własności mechaniczne sieci glutenowej (romby). W panelu b wartości R, EXT i R/EXT są przedstawione jako trzy punkty ze względu na trzy czasy leżakowania ciasta.

Podsumowując, badania wstępne dotyczące wpływu preparatów błonnikowych różnego pochodzenia na białka glutenowe w cieście pszenным wskazują na agregację i/lub nieprawidłowe zwijanie się białek glutenowych co znajduje odzwierciedlenie we wzmacnianiu mechanicznym sieci glutenowej w cieście. Zmiany strukturalne dotyczą głównie struktur  $\beta$  w tym pojawienie się nowego pasma związanego z pseudo- $\beta$ -kartkami. Spośród parametrów mechanicznych największe zmiany obserwowano dla oporu ciasta na rozciąganie, rozciągliwości ciasta oraz stosunku R/EXT.

### 3. Zmiany w strukturze i właściwościach termicznych białek glutenowych w cieście modelowym i glutenowym wywołane suplementacją ciasta preparatami błonnikowymi (publikacja H1, H3, H4 i H5).

Celem badań opisanych w publikacjach H1, H4 i H5 było określenie zmian w strukturze, zarówno na poziomie molekularnym jak i mikroskopowym, populacjach wody oraz właściwościach termicznych białek glutenowych w cieście modelowym suplementowanym siedmioma preparatami błonnikowymi różnego pochodzenia (aroniowy – CHB, żurawinowy – CRB, marchwiowy – CRR, kakaowy – CAC, karobowy – CAR, owsiany – OAT i lniany - FLX). Te same błonniki zastosowano w publikacji H3, w której to badano ich wpływ na strukturę białek glutenowych w cieście glutenowym

(bez dodatku skrobi). Ponadto, w trzech publikacjach (H3, H4 i H5) badano zależności pomiędzy ilością dodawanego błonnika (3%, 6%, 9%, 12% i 18%) a obserwowanymi zmianami strukturalnymi.

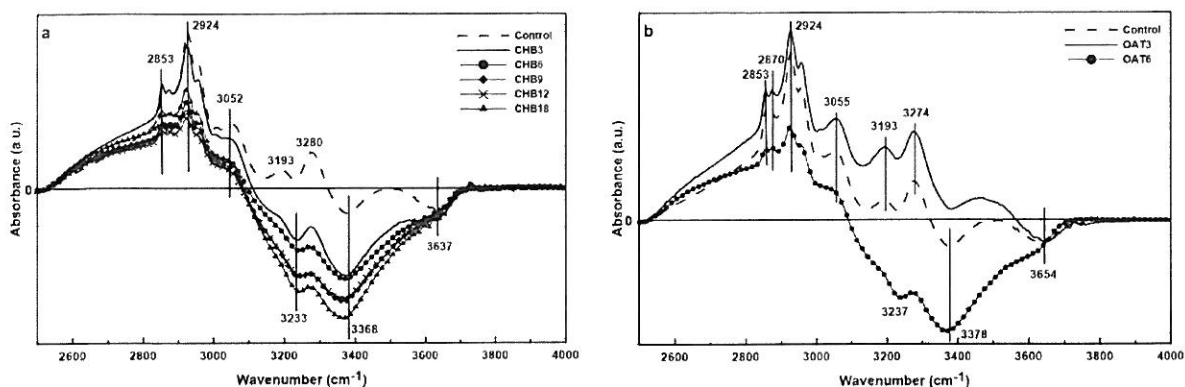


Rys.4. Widma różnicowe przedstawiające zmiany w strukturze drugorzędowej białek glutenowych w cieście modelowym (a, b) i glutenowym (c, d) suplementowanych błonnikiem aroniowym.

Zmiany strukturalne w paśmie amid I dla ciasta modelowego analizowano na widmach różnicowych przedstawionych na rys.4a-b. Wybrano preparat aroniowy jako przykładowy, ponieważ zwierzał najwięcej błonnika pokarmowego i polifenoli (patrz tabela 1). Analiza widm różnicowych dla ciasta modelowego (publikacje H4 i H5) pokazała, że wszystkie preparaty błonnikowe za wyjątkiem owsianego wywołują podobne zmiany w strukturze drugorzędowej białek glutenowych. Największe zmiany obserwowano w przedziałach spektralnych związanych z antyrównoległymi  $\beta$ -kartkami ( $1614$  i  $1684$   $\text{cm}^{-1}$ ) i zakrętami  $\beta$  ( $1640$  i  $1657$   $\text{cm}^{-1}$ ) połączonymi wiązaniami wodorowymi. Otrzymane wyniki wskazują, że zmiany te dotyczą głównie glutenin, ponieważ to one tworzą struktury  $\beta$ , natomiast  $\alpha$ -helisy są charakterystyczne dla gliadyn. W przypadku mostków disiarczkowych stwierdzono, że wzrost zawartości wszystkich preparatów błonnikowych oprócz CAC i OAT powoduje spadek liczby wiązań S-S w konformacji g-g-g, a wzrost liczby wiązań S-S w konformacji t-g-g i/lub t-g-t. Ponadto obserwowano również pasma związane z międzycząsteczkowymi mostkami disiarczkowymi na  $515$  i  $538$   $\text{cm}^{-1}$ . Jeżeli chodzi o dublet tyrozynowy to generalnie stwierdzono spadek wartości  $I(850)/I(830)$  wraz ze wzrostem zawartości błonnika dla wszystkich preparatów oprócz CHB i CAR dla których zanotowano wzrost wartości tego stosunku. Spadek wartości  $I(850)/I(830)$  wskazuje na chowanie się reszt TYR wewnątrz kompleksu białkowego i uczestnictwo w tworzeniu wewnątrz-cząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami peptydowymi. Wyniki wskazują również na to, że reszty TRP chowają się i biorą udział w tworzeniu wewnątrz-cząsteczkowych wiązań wodorowych, ponieważ intensywność pasma TRP na  $760$   $\text{cm}^{-1}$  rośnie wraz ze wzrostem zawartości preparatu błonnikowego.

Zmiany strukturalne w paśmie amid I dla ciasta glutenowego modyfikowanego preparatem błonnikowym przedstawiono na rys.4c-d (**publikacja H3**). W przypadku ciasta glutenowego wszystkie preparaty błonnikowe powodowały podobne zmiany w strukturze drugorzędowej białek glutenowych. Na wszystkich widmach różnicowych zaobserwowano obecność ujemnego pasma na  $1654\text{ cm}^{-1}$  i dodatniego pasma na  $1695\text{ cm}^{-1}$ . Równoczesna obecność tych pasm wskazuje, że struktury helikalne ( $\alpha\text{H}$ ) pochodzące prawdopodobnie z dwóch kompleksów białkowych łączą się przy pomocy wiązań wodorowych w antyrównoległe  $\beta$ -kartki ( $\alpha\beta\text{S}$ ). Pozostałe zmiany w strukturze białek glutenowych dotyczą głównie  $\beta$ -katek ( $\beta\text{S}$ ) i zakrętów  $\beta$  ( $\beta\text{T}$ ), które związane są z ujemnymi pasmami co również wskazuje na ich udział w tworzeniu zagregowanych antyrównoległych  $\beta$ -katek i/lub agregatów. Jeżeli chodzi o konformacje mostków disiarczkowych to 3% dodatek preparatów błonnikowych powoduje spadek liczby wiązań S-S w konformacji g-g-g dla CHB i CAR, wzrost tej liczby dla OAT i FLX, natomiast dla CRB, CRR i CAC pozostaje ona stała. Dalszy wzrost zawartości preparatu w próbce powoduje wzrost liczby wiązań S-S w konformacji g-g-g dla CHB, CRB, CAC i CAR oraz spadek dla CRR i FLX. W przypadku preparatu OAT tendencji w liczbie mostków nie ustalono. Generalnie można powiedzieć, że dodatek preparatów błonnikowych oprócz preparatu OAT i FLX do ciasta glutenowego powoduje wzrost liczby wiązań S-S w konformacji g-g-g. Preparaty, które powodują wzrost wartości tego parametru, charakteryzują się najmniejszą zawartością celulozy (patrz tabela 1). Stąd można wysnuć wniosek, że celuloza blokuje mostki disiarczkowe w konformacji najbardziej stabilnej energetycznie. Wartość dubletu tyrozynowego rośnie wraz ze wzrostem zawartości preparatu błonnikowego w cieście dla wszystkich preparatów za wyjątkiem CRB i CAC. Jednakże wartości  $I(850)/I(830)$  pozostają w przedziale charakterystycznym dla „normalnej tyrozyny”, która może pełnić rolę zarówno donora jak i akceptora protonu w wiązaniu wodorowym. W przypadku tryptofanu znaczny wzrost intensywności pasma na  $760\text{ cm}^{-1}$  zaobserwowano dla pięciu preparatów błonnikowych (CHB, CRR, CAC, CAR i FLX), a wartość intensywności nie zmieniła się w stosunku do próbki kontrolnej dla CRB. W przypadku preparatu OAT wartość intensywności spadła po dodaniu 3% preparatu, natomiast dalszy wzrost zawartości preparatu nie powodował zmiany intensywności tego pasma. Spadek intensywności pasma wskazuje na wyekspozowanie grup OH tryptofanu i ich udział w tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych ze składnikami preparatu błonnikowego.

Występowanie podobnych zmian w strukturze białek glutenowych obecnych w cieście modelowym i glutenowym modyfikowanym preparatami błonnikowymi różnego pochodzenia wskazuje, że badane preparaty błonnikowe zawierają jeden składnik wspólny dla wszystkich preparatów. Tym wspólnym składnikiem jest prawdopodobnie celuloza. Podobnie jak w przypadku ciasta pszennego (patrz **publikacja H2**), obserwowane zmiany strukturalne wskazują na agregację i/lub nieprawidłowe zwijanie się białek glutenowych. Zjawiska te prawdopodobnie związane są z częściową dehydratacją sieci glutenowej występującą podczas procesu mieszenia ciasta. Preparaty błonnikowe znane są z tego, że chłoną duże ilości wody. Stąd podczas mieszenia ciasta z dodatkiem preparatu błonnikowego występuje konkurowanie o wodę pomiędzy składnikami preparatu błonnikowego a białkami glutenowymi. Niestety białka przegrywają tę walkę, ponieważ preparaty błonnikowe bogate w polisacharydy zawierają więcej grup hydroksylowych tworzących wiązania wodorowe z wodą niż białka glutenowe. Z tego też względu grupy hydroksylowe obecne w białkach glutenowych tworzą wiązania wodorowe pomiędzy sobą, dzięki czemu obserwujemy oznaki agregacji lub/i nieprawidłowego zwijania się białek. Ponadto wyniki otrzymane z badań nad ciastem glutenowym wskazują na to, że skrobia może pełnić funkcję ochronną wobec białek glutenowych, ponieważ w przypadku ciasta modelowego nie obserwuje się zmian w strukturach helikalnych, tak jak w cieście glutenowym.



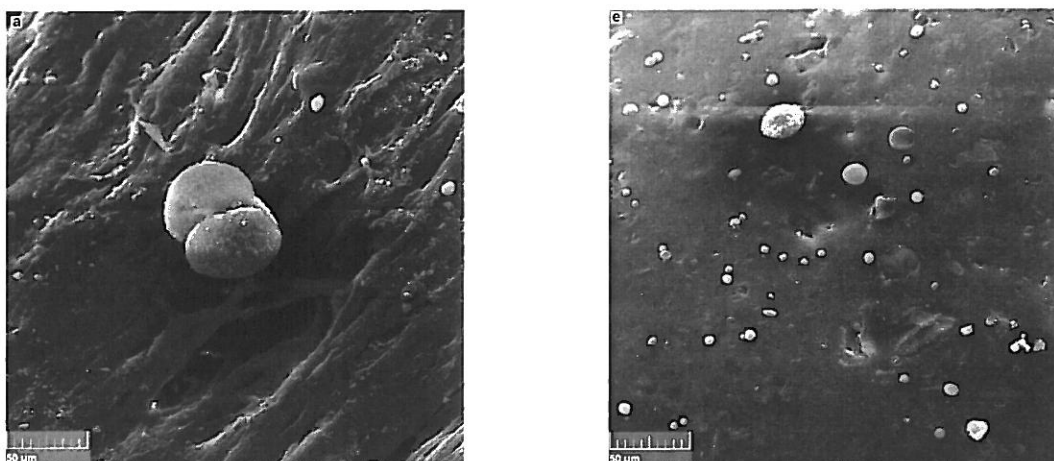
Rys.5. Widma różnicowe pasma związanego z drganiami rozciągającymi grup OH (2500 – 4000 cm<sup>-1</sup>) dla preparatu aroniowego (a) i owsianego (b).

W prezentowanych badaniach postawiono hipotezę, że obserwowane zmiany w strukturze białek glutenowych związane są z częściową dehydratacją sieci glutenowej. Z tego względu badano również jak zmieniały się populacje wody w sieci glutenowej obecnej w cieście modelowym modyfikowanym preparatami błonnikowymi z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni (FT-IR) (**publikacja H5**). Przykładowe widma różnicowe pasma związanego z drganiami rozciągającymi grup OH (2500 – 4000 cm<sup>-1</sup>) dla preparatu aroniowego i owsianego przedstawione są na rys.5. Widmo różnicowe próbki kontrolnej (linia przerywana) wykazuje siedem pasm dodatnich i dwa pasma ujemne. Pasma na 2855, 2876, 2927 i 2958 cm<sup>-1</sup> związane są z symetrycznymi i asymetrycznymi drganiami rozciągającymi grup CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub>, natomiast pozostałe pasma na 3051, 3192, 3277, 3380 i 3638 cm<sup>-1</sup> związane są z drganiami grupy OH w cząsteczce wody. Dwa pozytywne pasma na 3051 i 3192 cm<sup>-1</sup> odpowiadają dwóm populacjom wody w cieście, które są związane z siecią glutenową poprzez odpowiednio silne i słabe wiązania wodorowe (Bock et al., 2013). Pasma na 3277 cm<sup>-1</sup> wynika prawdopodobnie z drgań cząsteczek wody wolnej połączonych wiązaniami wodorowymi w postaci łańcuchów (Jain et al., 1989) lub z sytuacji, w której oba atomy wodoru w cząsteczce wody uczestniczą w tworzeniu wiązań wodorowych (Cotugno et al., 2001). Natomiast ujemne pasma na 3380 i 3638 cm<sup>-1</sup> są prawdopodobnie związane odpowiednio z małymi klasterami wodnym, w których cząsteczki wody są połączone wiązaniami wodorowymi (Bock et al., 2013) oraz niezwiązanymi cząsteczkami wody (tzw. wodą wolną) (Cotugno et al., 2001). Otrzymane wyniki dla próbki kontrolnej wskazują, że cząsteczki wody w cieście modelowym są głównie związane wiązaniami wodorowymi z siecią glutenową i/lub są zamknięte w wolnych przestrzeniach sieci glutenowej. Suplementacja ciasta modelowego preparatami błonnikowymi spowodowała znaczne zmiany w populacjach wody obecnych w cieście. Widmo różnicowe dla 3% dodatku preparatu jest podobne do widma próbki kontrolnej dla wszystkich preparatów z wyjątkiem preparatu aroniowego (rys.5a) i marchwiowego. Dalszy wzrost zawartości preparatu błonnikowego w próbce nie powoduje zmian w położeniu pasm z przedziału spektralnego 2500-3100 cm<sup>-1</sup>. Natomiast w przedziale spektralnym 3100-4000 cm<sup>-1</sup> pojawiło się nowe ujemne pasmo na 3237 cm<sup>-1</sup>, a zniknęło pasmo związane z wodą wolną na 3637 cm<sup>-1</sup>, co może wskazywać na zwiększone wchłanianie wody przez preparaty błonnikowe. Nowe pasmo na 3237 cm<sup>-1</sup> jest to prawdopodobnie przesunięte w stronę wyższych liczb falowych pasmo na 3192 cm<sup>-1</sup> (próbka kontrolna) związane z cząsteczkami wody połączonymi słabymi wiązaniami wodorowymi z siecią glutenową. Przesunięcie tego pasma oraz to, że stało się ujemne wskazuje na to, że część cząsteczek wody tworzących słabe wiązania wodorowe z siecią glutenową, w modyfikowanym cieście tworzy również słabe wiązania wodorowe ale z polisacharydami obecnymi w preparacie błonnikowym.



Obecność ujemnego pasma na  $3237\text{ cm}^{-1}$  oraz wypłaszczenie i znaczne zmniejszenie intensywności pasma na  $3051\text{ cm}^{-1}$  potwierdzają występowanie zjawiska konkurowania o wodę pomiędzy białkami glutenowymi a składnikami preparatów błonnikowych. Ponadto otrzymane wyniki wskazują na to, że silne wiązania wodorowe pomiędzy siecią glutenową a cząsteczkami wody są niezbędne do utworzenia sieci glutenowej w cieście.

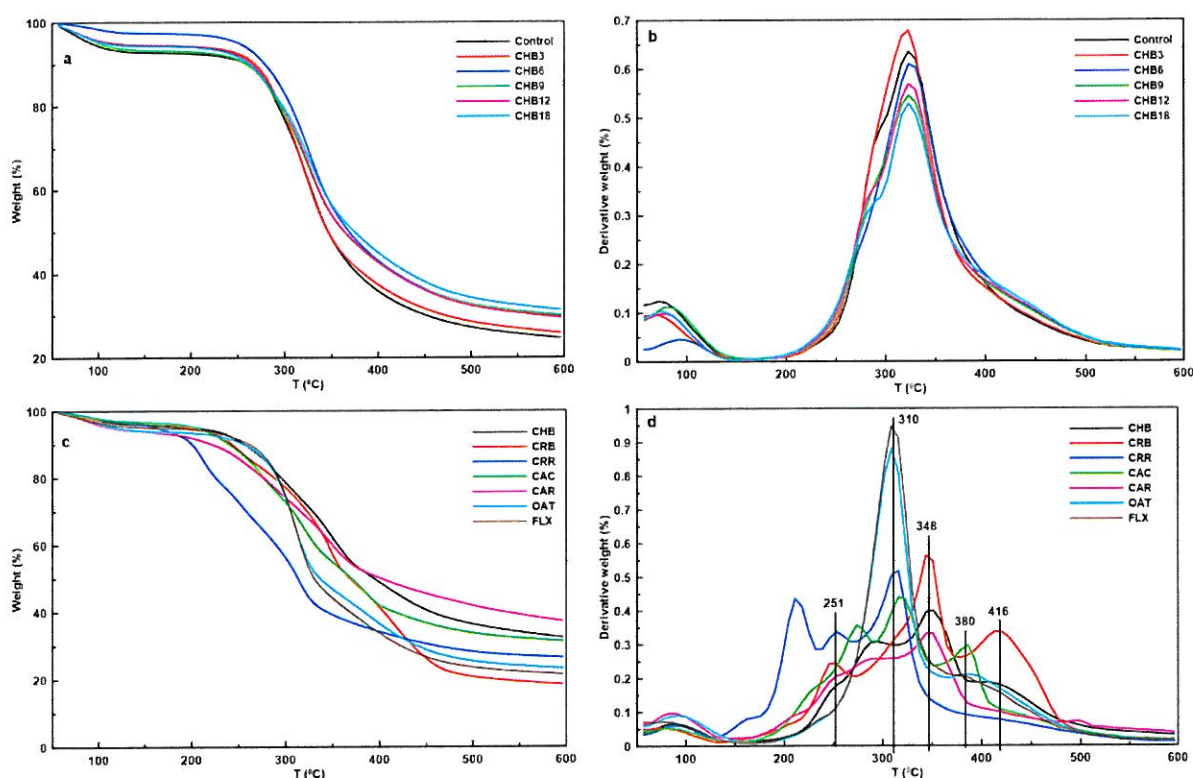
Badano również mikrostrukturę białek glutenowych wymytych z ciasta modelowego modyfikowanego preparatami błonnikowymi z użyciem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) (**publikacja H1**). Przykładowe obrazy SEM dla próbki kontrolnej oraz próbki modyfikowanej błonnikiem aroniowym przedstawiono na rys.6. Na obrazie SEM próbki kontrolnej widoczne są włókna glutenowe, które znikają po zastosowaniu błonnika aroniowego. Oba błonniki owocowe (CHB i CRB) powodowały całkowity zanik włókien glutenowych. Błonnik CAC, CAR, CRR i FLX spowodowały znaczne pogrubienie włókien glutenowych, natomiast obraz glutenu modyfikowanego błonnikiem owsianym był podobny do obrazu próbki kontrolnej. Porównując obrazy SEM ze składem chemicznym preparatów błonnikowych postawiono hipotezę, że całkowity zanik włókien glutenowych obserwowany jest dla preparatów zawierających największą ilość nierozpuszczalnej w wodzie frakcji błonnika (patrz tabela 1).



Rys.6. Obrazy SEM dla próbki kontrolnej (po lewej) oraz próbki modyfikowanej błonnikiem aroniowym (po prawej). Powiększenie wynosiło 1000x. Dwie kulki widoczne na obrazie próbki kontrolnej są to ziarna skrobi.

Celem przeprowadzonych badań było również określenie wpływ preparatów błonnikowych na własności termiczne białek glutenowych w cieście modelowym, które były badane z użyciem termogravimetrii (TGA). Przykładowe termogramy oraz ich pierwsze pochodne dla białek glutenowych modyfikowanych błonnikiem aroniowym oraz preparatów używanych w badaniach przedstawiono na rys.7. Początkowy ubytek masy obserwowany w przedziale temperatur  $60 - 150\text{ °C}$  związany jest z utratą wody wolnej i związanej przez próbkę. Dalszy wzrost temperatury powoduje rozerwanie wiązań peptydowych, mostków disiarczkowych oraz wiązań O-N i O-O w wyniku czego następuje zniszczenie struktury białek. Jak widać w tabeli 2 ubytek masy oraz temperatura degradacji białek glutenowych wynosi odpowiednio 75.4% i  $322\text{ °C}$ . Porównanie wyników dla próbki kontrolnej oraz próbek suplementowanych preparatami pokazuje, że preparaty błonnikowe nie mają wpływu na temperaturę degradacji, natomiast wartość ubytku masy zmniejsza się nieznacznie dla błonników CHB, CAC i CAR. Brak wpływu preparatów błonnikowych na temperaturę degradacji wskazuje, że sieć glutenowa w cieście modelowym modyfikowanym preparatami błonnikowymi pozostaje termicznie stabilna.

Natomiast zmiany w wartości ubytku masy informują o zmianach strukturalnych sieci glutenowej tzn. wzrost wartości tego parametru wskazuje na tworzenie słabszej sieci glutenowej, a spadek wartości wskazuje na tworzenie zwartej i mocniejszej sieci glutenowej (Khatkar et al., 2013). Otrzymane wyniki sugerują tworzenie zwartej i mocniejszej sieci glutenowej w wyniku suplementacji ciasta modelowego błonnikami CHB, CAC i CAR. W przypadku preparatów CAC i CAR wyniki TGA są zgodne z wynikami badań reologicznych przedstawionych w publikacji H2. Rys.7a przedstawia pierwsze pochodne termogramów poszczególnych preparatów błonnikowych z charakterystycznymi dla nich temperaturami degradacji. Odpowiednie wartości można przyporządkować składnikom polisacharydowym preparatów błonnikowych. Temperatura degradacji dla celulozy obserwowano w przedziale 327 – 450 °C (Liu et al., 2011), dla hemiceluloz 200 – 327 °C (Liu et al., 2011), dla lignin 200 – 500 °C (Carrier et al., 2011) i dla pektyn 180 – 270 °C (Einhorn-Stoll et al., 2007).



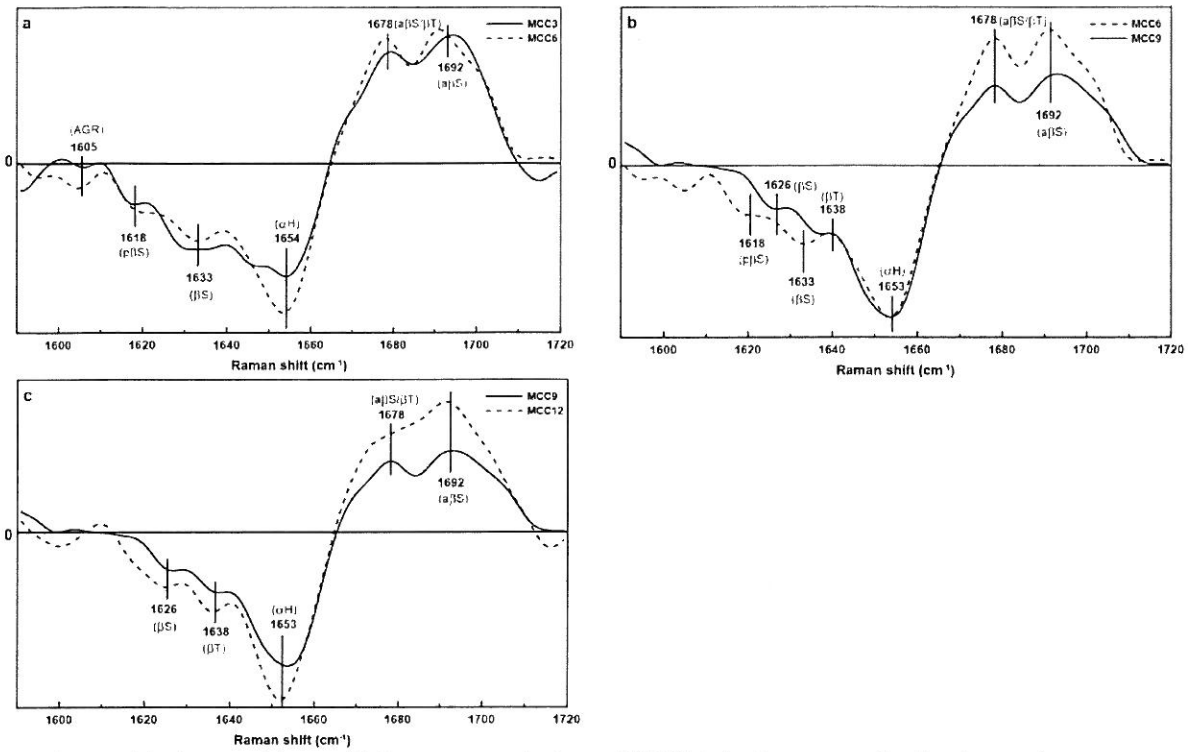
Rys.7. Termogramy TGA oraz ich pierwsze pochodne dla białek glutenowych modyfikowanych błonnikiem aroniowym (a, b) oraz preparatów używanych w badaniach (c, d).

#### 4. Zmiany w strukturze i właściwościach termicznych białek glutenowych w cieście modelowym i glutenowym wywołane suplementacją ciasta polisacharydami (publikacja H6 i H7).

Wyniki poprzednich badań dotyczących wpływu preparatów błonnikowych różnego pochodzenia na strukturę białek glutenowych pokazały, że prawie wszystkie preparaty błonnikowe za wyjątkiem owsianego powodują podobne zmiany strukturalne. Stąd pojawiła się hipoteza, że wszystkie preparaty błonnikowe zawierają jeden składnik, który powoduje te same zmiany i jest nim prawdopodobnie celuloza. W publikacjach H6 i H7 przedstawiono badania dotyczące wpływu czterech polisacharydów, będących składnikami preparatów błonnikowych, na strukturę białek glutenowych odpowiednio w cieście glutenowym i cieście modelowym. Jako polisacharydy użyto celulozę mikrokrystaliczną (MCC), inulinę (IN), pektynę jabłkową (AP) i pektynę cytrusową (CP). W publikacjach



kontrolnej obserwuje się wzrost intensywności pasma TRP na  $760\text{ cm}^{-1}$  dla wszystkich polisacharydów. Natomiast wzrost zawartości polisacharydów powoduje wzrost wartości tego parametru dla AP, spadek dla CP i pozostaje stały dla MCC i IN.



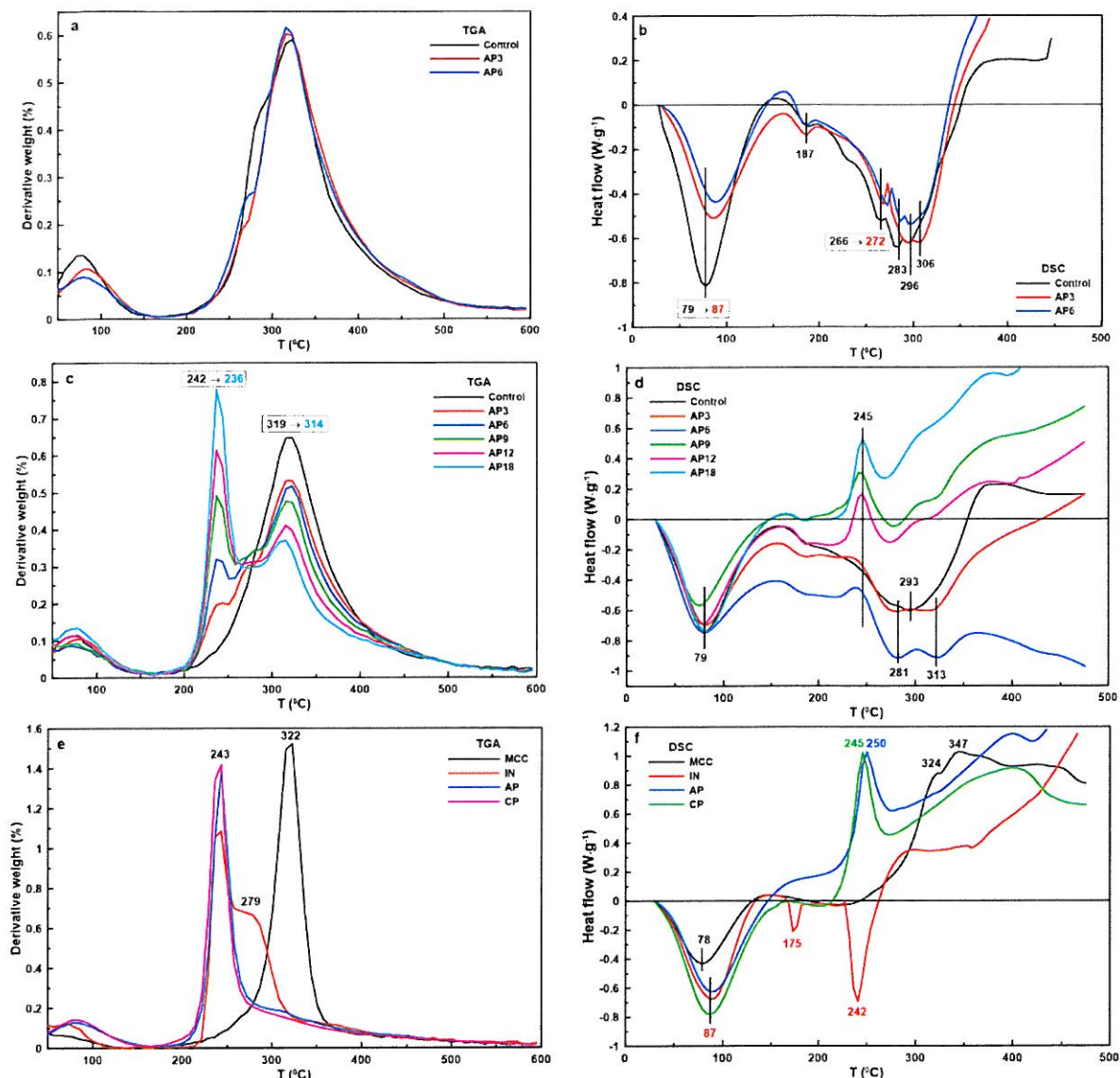
Rys.9. Przykładowe widma różnicowe w paśmie amid I białek glutenowych dla ciasta glutenowego modyfikowanego celulozą mikrokrystaliczną (MCC) (publikacja H6).

W przypadku ciasta glutenowego obserwowane zmiany w strukturze białek glutenowych dotyczą zarówno glutenin jak i gliadyn (publikacja H6). Przykładowe widma różnicowe w paśmie amid I białek glutenowych dla ciasta glutenowego modyfikowanego celulozą mikrokrystaliczną przedstawiono na rys.9. W przypadku ciasta glutenowego podobne zmiany w strukturze drugorzędowej białek glutenowych, tj. tworzenie się antyrównoległych  $\beta$ -katek ( $1692\text{ cm}^{-1}$ ) z  $\alpha$ -helis ( $1654\text{ cm}^{-1}$ ), obserwowano dla MCC, IN oraz 3 i 6-procentowej zawartości obu pektyn. Dla wyższych zawartości obu pektyn pojawiają się pozytywne pasma związane z agregatami ( $1608\text{ cm}^{-1}$ ), pseudo- $\beta$ -katekami ( $1618\text{ cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -katekami ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ) i zakrętami  $\beta$  ( $1665\text{ cm}^{-1}$ ) z międzycząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi. Liczba mostków disiarczkowych w konformacji g-g-g rośnie po dodaniu MCC, AP i CP a spada po dodaniu IN w porównaniu do próbki kontrolnej. Podobnie jak w przypadku ciasta modelowego, jego suplementacja IN powoduje znaczny spadek w liczbie wiązań S-S w konformacji g-g na rzecz konformacji t-g-g, natomiast konformacji t-g-t nie obserwuje się. Dalszy wzrost zawartości polisacharydów powoduje spadek liczby wiązań S-S w konformacji g-g-g dla AP, natomiast dla MCC i CP nie ustalono tendencji zmian. Suplementacja ciasta glutenowego MCC i IN spowodowała spadek wartości dubletu tyrozynowego, jednakże reszty TYR mogą nadal być zaliczane do „normalnej tyrozyny”. Natomiast AP i CP spowodowały wzrost wartości  $I(850)/I(830)$  nawet do 11 dla CP. Niespotykanie wysokie wartości  $I(850)/I(830)$  dla obu pektyn wskazują na tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy białkami glutenowymi a pektynami. Tę hipotezę potwierdzają termogramy TGA, na których widoczne są piki charakterystyczne dla pektyn. Intensywność tych pików rośnie wraz ze wzrostem zawartości pektyn w próbce. W przypadku tryptofanu 3% dodatek polisacharydów

spowodował spadek intensywności pasma na  $760\text{ cm}^{-1}$ . Jednakże wyższe zawartości polisacharydów spowodowały wzrost intensywności tego pasma.

Własności termiczne białek glutenowych były badane z wykorzystaniem dwóch metod – TGA i DSC. Przykładowe termogramy TGA i DSC dla próbek modyfikowanych pektyną jabłkową (AP) oraz czystych polisacharydów są przedstawione na rys. 10 zarówno dla ciasta modelowego jak i glutenowego. Wyniki otrzymane z TGA pokazują, że polisacharydy niezależnie od koncentracji nie wpływają na parametry termograwimetryczne białek glutenowych w cieście modelowym (**publikacja H7**) tj. białka glutenowe pozostają termicznie stabilne i ich struktura się nie zmienia. Jednakże analizy spektroskopowe wykazały duże zmiany w strukturze badanych białek i można by się spodziewać spadku wartości ubytku masy (Khatkar et al., 2013). Analiza termogramów DSC pokazała, że na wszystkich termogramach obecny jest pik z przedziału temperatury  $70\text{--}100\text{ }^{\circ}\text{C}$  związany z odparowaniem wody z próbki. Ponadto, w próbce kontrolnej pik ten występuje przy temperaturze  $79\text{ }^{\circ}\text{C}$  podczas gdy dla próbek modyfikowanych jest on przesunięty na  $87\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Przesunięcie pików w stronę wyższych temperatur sugeruje odparowanie wody związanej z molekułami polisacharydów. Po dodaniu IN obserwuje się również przesunięcie pików z  $283\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $292\text{ }^{\circ}\text{C}$  bez względu na jej ilość. Przesunięcie to może odzwierciedlać zmianę w konformacji mostków disiarczkowych po dodaniu IN, ponieważ IN powoduje wzrost ilości wiązań S–S w konformacji t-g-g do ok. 90%.

W przypadku ciasta glutenowego (**publikacja H6**), podobnie do ciasta modelowego, obserwuje się brak zmian w parametrach TGA po dodaniu MCC i IN co sugeruje, że MCC i IN nie reagują z białkami glutenowymi. Natomiast suplementacja ciasta glutenowego AP i CP nie zmienia wartości ubytku masy, ale na termogramach TGA oprócz pików na  $319\text{ }^{\circ}\text{C}$ , charakterystycznego dla białek glutenowych, obserwuje się drugi pik na  $242\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Drugi pik temperaturowy związany jest z pektynami i jego obecność świadczy o tym, że pektyny nie zostały wymyte z ciasta glutenowego i reagują z białkami. Ponadto w miarę wzrostu zawartości pektyn maksimum tego pików przesuwa się w stronę niższych temperatur. Podobnie zachowuje się pik na  $319\text{ }^{\circ}\text{C}$ , co wskazuje na to, że sieć glutenowa staje się mniej stabilna termicznie po dodaniu pektyn. Przesunięcie to może być również związane z obserwowanymi zmianami strukturalnymi tj. obecnością agregatów i zagregowanych struktur  $\beta$ . Jeżeli chodzi o zmiany w termogramach DSC to, podobnie jak w przypadku ciasta modelowego, po dodaniu MCC, IN oraz AP w ilości 3 i 6% obserwuje się pik na  $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ . W miarę wzrostu zawartości polisacharydów, pik ten przesuwa się w stronę niższych temperatur dla MCC i IN, a w przeciwną stronę dla AP. W cieście glutenowym, identycznie jak w modelowym, również obserwuje się przesunięcie pików związanego z odparowaniem wody z  $78\text{ }^{\circ}\text{C}$  dla próbki kontrolnej do ok.  $87\text{ }^{\circ}\text{C}$  dla próbek modyfikowanych polisacharydami. Przesunięcie to jest związane z odparowywaniem wody związanej z cząsteczkami polisacharydów. Wyniki DSC sugerują, że IN, tak jak pektyny, również reaguje z białkami glutenowymi. Świadczy o tym obecność dwóch pików temperaturowych na  $187\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $267\text{ }^{\circ}\text{C}$  na termogramach DSC modyfikowanych próbek. Mogą być to przesunięte pasma, które dla czystej IN występują odpowiednio na  $175\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $242\text{ }^{\circ}\text{C}$ . W przypadku pektyn na termogramach DSC próbek modyfikowanych obserwuje się pik na  $245\text{ }^{\circ}\text{C}$ , który potwierdza hipotezę wynikającą z analiz TGA, że pektyny reagują z białkami glutenowymi, ponieważ pik ten jest charakterystyczny dla pektyn.



Rys.10. Przykładowe termogramy TGA i DSC dla próbek modyfikowanych pektyną jabłkową (AP) oraz czystych polisacharydów (e, f) dla ciasta modelowego (a, b) jak i glutenowego (c, d).

Suplementacja obu rodzajów ciast wybranymi polisacharydami błonnikowymi wskazuje na występowanie podobnych zmian w strukturze oraz własnościach termicznych białek glutenowych odpowiednio w cieście modelowym i cieście glutenowym. Obserwowane zmiany potwierdzają postawioną w badaniach z błonnikami pokarmowymi hipotezę, że zmiany głównie strukturalne związane są ze zjawiskiem dehydratacji sieci glutenowej przez polisacharydy błonnikowe co prowadzi do nieprawidłowego zwijania się i/lub agregacji białek glutenowych. W wyniku tych zmian otrzymujemy bardziej zwartą i mocniejszą sieć glutenową w cieście i obniżenie jakości ciasta a co za tym idzie również pieczywa jako produktu końcowego.

### Podsumowanie

Podsumowując całość omówionych powyżej badań opublikowanych w cyklu publikacji H1-H7 należy podkreślić, że zostały określone zmiany w strukturze oraz własnościach termicznych białek glutenowych w cieście pszennym, modelowym i glutenowym modyfikowanych preparatami błonnikowymi różnego pochodzenia oraz polisacharydami błonnikowymi. Badania te mają charakter

podstawowy, ale z powodzeniem mogą być zastosowane do badań aplikacyjnych. Badania opublikowane w przedkładanym osiągnięciu naukowym dowiodły, że:

- Błonnik pokarmowy/polisacharydy modyfikują drugorzędową strukturę białek glutenowych zwiększając udział struktur  $\beta$  z międzycząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi oraz agregatów, co powoduje nieprawidłowe zwijanie się białek glutenowych i/lub ich agregację.
- Badane polisacharydy w różny sposób wpływają na konformację mostków disiarczkowych tj. mogą chronić mostki disiarczkowe przed zmianą konformacji na mniej stabilną energetycznie tak jak celuloza, lub powodować przejście prawie wszystkich mostków disiarczkowych w jedną konformację tak jak inulina.
- Zmiany strukturalne wynikające z suplementowania błonnikiem pokarmowym są ściśle powiązane z właściwościami reologicznymi ciasta zwłaszcza z oporem ciasta na rozciąganie i rozciągliwością ciasta.
- Dodatek polisacharydów pozostawia sieć glutenową termicznie stabilną.
- Badania termiczne wskazują, że polisacharydy tworzą wiązania z białkami glutenowymi w cieście.
- Prezentowane wyniki mogą wskazywać na mechanizm częściowej dehydratacji sieci glutenowej jako główną przyczynę obserwowanych zmian strukturalnych białek glutenowych, prowadzących do obniżenia jakości technologicznej i sensorycznej pieczywa.

#### Piśmiennictwo uzupełniające

- Belton P.S. On the elasticity of wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 1999, 29, 103-107.
- Bock J.E., Damodaran S. Bran-induced changes in water structure and gluten conformation in model gluten dough studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids* 2013, 31, 146-155.
- Carrier M., Loppinet-Serani A., Denux D., Lasnier J.-M., Ham-Pichavant F., Cansell F., Aymonier C. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass Bioenergy* 2011, 35, 298-307.
- Collar C., Santos S., Rossell C.M. Assessment of the rheological profile of fibre-enriched bread doughs by response surface methodology. *J. Food Eng.* 2007, 78, 820-826.
- Correa M.J., Ferrer E., Anon M.C., Ferrero C. Interactions of modified celluloses and pectins with gluten proteins. *Food Hydrocolloids* 2014, 35, 91-99.
- Cotugno S., Larobina D., Mensitieri G., Musto P., Ragosta G. A novel spectroscopic approach to investigate transport processes in polymers: the case of water-epoxy system. *Polymer* 2001, 42, 6431-6438.
- Dhingra D., Michael M., Rajput H., Patil R.T. Dietary fibres in foods: a review. *J. Food Sci. Technol.* 2012, 49, 255-266.
- Einhorn-Stoll U., Kunzek H., Dongowski G. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. *Food Hydrocolloids* 2007, 21, 1101-1112.
- Gan Z., Ellis P.R., Vaughan J.G., Galliard T. Some effects of non-endosperm components of wheat and of added gluten on wholemeal bread microstructure. *J. Cereal Sci.* 1989, 10, 81-91.
- Jain T.K., Varshney M., Maitra A. Structural studies of aerosol reverse micellar aggregates by FT-IR spectroscopy. *J. Phys. Chem.* 1989, 93, 7409-7416.
- Khatkar B.S., Barak S., Mudgil D. Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013, 53, 38-41
- Linlaud N., Ferrer E., Puppo M.C., Ferrero C. Hydrocolloid interactions with water, protein and starch in wheat dough. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 713-719.
- Liu Q., Zhong Z., Wang S., Luo Z. Interactions of biomass components during pyrolysis: a TGA-FTIR study. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 2011, 90, 213-218.

- Min H.M., Koh B.-K. Effect of phenolic acids on the rheological properties and proteins of hard wheat flour dough and bread. *J. Sci. Food Agric.* 2011, 91, 2495-2499.
- Miś A. Interpretation of mechanical spectra of carob fibre and oat wholemeal-enriched wheat dough using non-linear regression models. *J. Food Eng.* 2011, 91, 369-379.
- Miś A., Dziki D. Extensograph curve profile model used for characterising the impact of dietary on wheat dough. *J. Cereal Sci.* 2013, 57, 471-479.
- Peressini D., Sensidoni A. Effect of soluble dietary fibre addition on rheological and breadmaking properties of wheat doughs. *J. Cereal Sci.* 2009, 49, 190-201.
- Secundo F., Guerrieri N. ATR-FT/IR study on the interactions between gliadins and dextrin and their effect on protein secondary structure. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1757-1764.
- Shewry P.R., Halford N.G., Belton P.S., Tatham A.S. The structure and properties of gluten: An elastic protein from wheat grain. *Phil. Trans. R. Soc.* 2002, 357, 133-142.
- Sivam A.S., Sun-Waterhouse D., Perera C.O., Waterhouse G.I.N. Exploring the interactions between the blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads: a FTIR and HPLC investigation. *Food Chem.* 2012, 131, 802-810.
- Sivam A.S., Sun-Waterhouse D., Perera C.O., Waterhouse G.I.N. Applications of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. *Food Res. Int.* 2013, 50, 574-858.
- Sugeta H. Normal vibrations and molecular conformations of dialkyl disulphides. *Spectrochim. Acta A* 1975, 31, 1729-1737.
- Taddei P., Zanna N., Tozzi S. Raman characterizations of the interactions between gliadins and anthocyanins. *J. Raman Spectrosc.* 2013, 44, 1435-1439.
- Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007, 24, 115-119.
- Zhou Y., Zhao D., Foster T.J., Liu Y., Wang Y., Nirasawa S., Tatsumi E., Cheng Y. Konjac glucomannan-induced changes in thiol-disulphide exchange and gluten conformation upon dough mixing. *Food Chem.* 2014, 143, 163-169.

D) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

• **przed uzyskaniem stopnia doktora**

Jestem współautorem 1 oryginalnej pracy w czasopiśmie znajdującym się w bazie *Journal Citation Reports* (wykaz prac poz. IIA.1), która ukazała się przed obroną pracy doktorskiej, a której *impact factor* wynosi **3.396**, a liczba punktów MNiSW **24**.

Po studiach magisterskich na kierunku fizyka zostałam słuchaczką Studiów Doktoranckich w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki na Wydziale Matematyki Fizyki i Informatyki, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, gdzie prowadziłam badania pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Krawczyka. Tematem mojej rozprawy doktorskiej było badanie stanów elektronowych barwników zaadsorbowanych na nanocząstkach tlenku tytanu i tlenku cyrkonu z wykorzystaniem spektroskopii efektu Starka, spektroskopii UV-VIS oraz spektroskopii Ramana. Do moich zadań należało przygotowanie nanocząstek tlenku tytanu poprzez hydrolizę izopropanolanu tytanu oraz preparatyka kompleksów nanocząstek TiO<sub>2</sub> i ZrO<sub>2</sub> z różnego rodzaju barwnikami. Jako barwników używałam dihydroksyantrachinonów (alizaryny i kinizaryny), katecholu oraz karboksylowych pochodnych pirenu (1-karboksypirenu i kwas 2-pirenooctowy).

Podczas studiów doktoranckich wzięłam udział w trzech konferencjach naukowych: From Molecular Recognition To Molecular Devices 2007, I Krajowa Konferencja Nanotechnologii 2007 i XIV Warsztaty Biofizyczne, gdzie prezentowałam zarówno referaty, jak i brałam udział w sesjach posterowych.



W latach 2006-2007 pełniłam funkcję przedstawiciela Doktorantów Instytutu Fizyki do Rady Instytutu Fizyki, Rady Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki oraz Samorządu Doktorantów UMCS. Byłam również członkiem oddziału lubelskiego Polskiego Towarzystwa Biofizycznego.

W zakresie działalności dydaktycznej prowadziłam konwersatoria z zakresu Wstęp do fizyki (30 godz./semestr) oraz I Pracownię Fizyczną dla Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki (30 godz./semestr) oraz Wydziału Chemii UMCS.

- **po uzyskaniu stopnia doktora**

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk fizycznych w lutym 2009 r. podjęłam pracę w Instytucie Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Zakładzie Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych w grupie prof. dr hab. Stanisława Grundasa. Od 2011 r. pełnię funkcję Opiekuna Laboratorium Oceny Jakości Surowców Zbożowych i Oleistych, w którym znajduje się aparatura spektroskopowa, chromatograficzna oraz technologiczna do badania jakości ziarna pszenicy i ciasta chlebowego. W styczniu 2013 r. zostałam powołana na stanowisko Kierownika Tematu badawczego nr VI, który był zatytułowany „Wartość użytkowa materiałów i surowców roślinnych”. W ramach Tematu realizowanych było 3-5 zadań badawczych, których tematyka dotyczyła m.in. wpływu nanocząstek srebra w postaci zaprawy nasiennej na strukturę białek glutenowych, określania własności reologicznych ciasta pszennego modyfikowanego preparatami błonnikowymi oraz procesów fizycznych i biologicznych w złożu materiału sypkiego. W ramach Tematu badawczego kierowałam pracami badawczymi 5-6 osób. W roku 2016 byłam Kierownikiem Zadania badawczego nr 4 zatytułowanego „Badanie oddziaływań białek glutenowych z błonnikami pokarmowymi, a od 2017 r. jestem również Kierownikiem Zadania badawczego nr 4 ale zatytułowanego „Określenie wpływu dodatków prozdrowotnych na strukturę białek glutenowych, jakość ciasta chlebowego i pieczywa. W ramach zadania badawczego kieruję zespołem badawczym złożonym z 5 osób. Od 2015 r. jestem członkiem Komisji Dyscyplinarnej w Instytucie Agrofizyki PAN.

Po uzyskaniu stopnia doktora do chwili obecnej jestem współautorem w sumie **20** oryginalnych prac naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*, których sumaryczny *impact factor* z roku opublikowania wynosi **47.569**, a liczba punktów MNiSW **629**. Po wyłączeniu dorobku zaliczonego do osiągnięcia, *impact factor* i liczba punktów MNiSW wynoszą odpowiednio **24.561** i **369**. Liczba cytowań moich prac według bazy Web of Science Core Collection wynosi **100** (bez autocytowań **74**), a indeks Hirscha **6**.

Jestem współautorem hasła „Grain physics” w Encyklopedii Agrofizyki (**II.C4**) pod redakcją J. Glińskiego, J. Horabika i J. Lipca oraz rozdziału zatytułowanego „Determination of food quality by using spectroscopic methods” w książce pt: „Advances in Agrophysical Research” pod redakcją S. Grundasa i A. Stępniewskiego (**II.C5**). Jestem również współautorem 5 zgłoszeń patentowych będących wynikiem prac badawczo-rozwojowych w grupie, którą kieruję:

- P.410455. Miś A., **Nawrocka A.** Sposób określania dynamiki koalescencji pęcherzyków gazowych formujących się w uwodnionych mieszaninach zawierających białka glutenowe, zwłaszcza w cieście pszennym (2014 r.).
- P.415134. Miś A., **Nawrocka A.** Sposób określania właściwości reologicznych błonnikowych suplementów pieczywa (2015 r.).
- P.419564. Miś A., **Nawrocka A.** Sposób określania wodochłonności błonnikowych suplementów pieczywa (2016 r.).

- P.419382. Gancarz M., Rusinek R., **Nawrocka A.**, Tadla M. Sposób określania rodzaju organicznych substancji lotnych i ich koncentracji z zastosowaniem elektronicznego nosa (2016 r.).
- P.419383. Gancarz M., Rusinek R., **Nawrocka A.**, Tadla M. Matryca czujników elektronicznego nosa (2016r.).

Oprócz badań opisanych w publikacjach H1-H7 brałam również udział w badaniach nad cyklem rozwojowym wołka zbożowego z wykorzystaniem rentgenografii (publikacje II.B2 i II.B3). W badaniach tych analizowałam obrazy rentgenowskie ziarna pszenicy porażonego w różnym stopniu wołkiem zbożowym (*Sitophilus granarius* L.). Moim zadaniem było obliczenie wielkości ubytku masy ziarniaka wykorzystując do tego celu skalę szarości obrazu i powiązanie tego ubytku z odpowiednim stadium rozwojowym wołka. Badania te miały na celu stworzenie szybkiego systemu identyfikacji rentgenowskiej ziarna pszenicy porażonego wołkiem zbożowym i zastosowanie go w przemyśle spożywczym do eliminowania ziarna porażonego wołkiem, a więc zanieczyszczonego jego wydaliniami szkodliwymi dla zdrowia ludzi i zwierząt. Podczas mojej pracy naukowej w Instytucie Agrofizyki PAN badałam również wpływ nanocząstek srebra w postaci zaprawy nasiennej na składniki pszenicy – skrobię i białka glutenowe (publikacje II.B5 i II.B6). Nanocząstki srebra znane są ze swoich właściwości antibakteryjnych i antygrzybiczych. Z tego też powodu powstał pomysł zastosowania ich jako zaprawy nasiennej, która chroniłaby ziarno pszenicy przed infekcjami bakteryjnymi i grzybiczymi. Moim zadaniem w tych badaniach było przygotowanie nanocząstek srebra stabilizowanych cytrynianem sodu, następnie zaprawianie ziarna pszenicy odpowiednim stężeniem nanocząstek srebra w ciągu 10, 20 i 30 minut oraz pomiar i analiza widm FT-IR. Analiza widm FT-IR pokazała, że roztwór koloidalny nanocząstek srebra miał wpływ na strukturę drugorzędową białek glutenowych. Obserwowano zwiększenie ilości  $\beta$ -kartek kosztem  $\alpha$ -helis i zakrętów  $\beta$ . Zmiany te mogą wskazywać na wzrost elastyczności sieci glutenowej. Jeżeli chodzi o skrobię, to analiza widm FT-IR nie wykazała wpływu nanocząstek srebra na strukturę skrobi. Jako członek zespołu realizującego badania w ramach Tematu badawczego nr VI i Zadania badawczego nr 4 brałam udział w badaniach dotyczących własności reologicznych mąki pszennej (publikacja II.B10) oraz ciasta chlebowego suplementowanego preparatami błonnikowymi różnego pochodzenia (publikacje II.B11 i II.B12). W ramach realizacji Zadania badawczego nr 4 biorę również udział w badaniach nad organicznymi substancjami lotnymi (VOCs) wytwarzanymi przez produkty rolne z wykorzystaniem elektronicznego nosa (publikacja II.B13). Wraz z zespołem stworzyliśmy matrycę czujników elektronicznego nosa opartą na czujnikach MOS (zgłoszenie patentowe nr P.419383) oraz nową metodę identyfikacji substancji lotnych opartą na trzech parametrach odczytywanych z sensorgramu tj. maksymalna odpowiedź czujnika, czas impregnacji substancją lotną powierzchni czynnej czujnika oraz czas czyszczenia powierzchni czynnej czujnika dla połowy maksymalnej odpowiedzi czujnika (zgłoszenie patentowe nr P.419382).

Obecnie w ramach Zadania badawczego nr 4 kontynuowane są badania związane ze zmianami strukturalnymi obserwowanymi w białkach glutenowych związanych z suplementacją ciasta modelowego i glutenowego pochodnymi celulozy, kwasami fenolowymi oraz antocyjanami. Badania przedstawione w ramach osiągnięcia naukowego wskazują, że obniżenie jakości ciasta pszennego wywołane jest częściową dehydratacją sieci glutenowej w czasie procesów rozwoju i miesienia ciasta. Z tego też powodu rozpoczęto badania nad zjawiskiem dehydratacji wykorzystując do tego celu metody reologiczne oraz spektroskopowe. Wykorzystuje się również dwa rodzaje elektronicznych nosów (w jednym zastosowane są czujniki polimerowe CP, w drugim czujniki półprzewodnikowe MOS) pieczywa oraz analizy substancji lotnych wydzielających się podczas procesu wypieku.

Brałam udział w realizacji projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach Programu Badań Stosowanych II (PBS II): „Urządzenie do monitorowania stanu mikrobiologicznego nasion na podstawie elektronicznej analizy substancji lotnych” (nr projektu PBS2/A8/22/2013). Wynikiem tej współpracy jest 1 publikacja z listy JRC (publikacja **II.B13**) oraz 2 zgłoszenia patentowe (P.419382 i P.419383).

W 2013 r. składałam projekt w ramach programu ERA-Net-SUSFOOD pt.: „Transforming plant side streams for optimal gluten interaction and sustainable, healthy and of high quality bakery products (SUFIBAKE), którego byłam koordynatorem. Projekt, składany w konsorcjum z German Research Centre for Food Chemistry Leibnitz Institute (DFA) (prof. Peter Koehler) i Technical Research Centre of Finland (VTT) (prof. Kaisa Poutanen), został zakwalifikowany do II etapu oceny merytorycznej. Niestety nie uzyskał finansowania.

Na konferencjach naukowych krajowych i międzynarodowych w tym C&E Spring Meeting of AACC International, International Conference Agrophysics for Quality of Life, Food Structure and Functionality Forum – Symposium FROM MOLECULES TO FUNCTIONALITY, 18th International Conference on Sensing Technology, 11th International Conference on Agrophysics: Soil, Plant & Climate, XV i XVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, prezentowałam **20** prezentacji ustnych oraz **16** posterów. Byłam Sekretarzem Komitetu Organizacyjnego **2** konferencji międzynarodowych (International Conference Agrophysics for Quality of Life, 10th International Conference on Agrophysics) oraz członkiem Komitetu Organizacyjnego **1** konferencji międzynarodowej (11th International Conference on Agrophysics: Soil, Plant & Climate) i **5** konferencji krajowych (XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, XXI, XXII, XXIII i XXIV Lubelskie Warsztaty Biofizyczne).

Od 2014 r. pełnię funkcję Sekretarza Zarządu oddziału lubelskiego Polskiego Towarzystwa Biofizycznego.

Pracując w Instytucie Agrofizyki PAN sprawowałam opiekę nad stażystami oraz praktykantami. W 2012 r. pełniłam funkcję opiekuna dwóch studentów studiów doktoranckich ze Słowackiego Uniwersytetu Rolniczego w Nitrze (Słowacja) w ramach Programu Erasmus. Do moich obowiązków jako Opiekuna Laboratorium Oceny Jakości Surowców Zbożowych i Oleistych należała również opieka nad **5** stażystami z innych ośrodków naukowych (UP w Lublinie, UMCS, SGGW, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski), **5** stażystami z Urzędu Pracy oraz **6** studentami w ramach ich praktyk zawodowych.

Jako pracownik naukowy regularnie podnosiłam swoje kompetencje poprzez uczestnictwo w studiach podyplomowych oraz różnego rodzaju szkoleniach. W latach 2009-2011 odbyłam studia podyplomowe w Wyższej Szkole Ekonomii i Innowacji w Lublinie z zakresu „Public relations w badaniach naukowych” oraz „Menadżer projektów badawczych”. W latach 2013-2015 byłam stażystką programu SIMS (Science Infrastructure Management Support) finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. W ramach programu SIMS uczestniczyłam w 5-tygodniowym stażu, który obejmował pobyt w Instytutach Fraunhoffera MOEZ i IZI w Lipsku (Niemcy), na Uniwersytecie Technologicznym w Dreźnie (Niemcy), Centrum Badawczo-Rozwojowym im. T.J. Watsona IBM w Yorktown Heights (Stany Zjednoczone), Centrum Badawczym IBM w Sommers (Stany Zjednoczone) oraz szkoleniach z zakresu kompetencji miękkich (HR, Strategia, Business Development, Core Facility i in.).

W mojej działalności dydaktycznej i popularyzatorskiej w latach 2013-2014 byłam wykonawcą zadania „Preparatyka i spektroskopowe badania nanocząstek metali” w projekcie „Zostań odkrywcą fizyki, chemii i biologii w przyrodzie – warsztaty, eksperymenty, badania”. Projekt realizowany był w ramach Przedsięwzięcia MNiSW „Ścieżki Kopernika”.

Ponadto wykonałam w sumie 22 recenzje artykułów naukowych w 11 różnych czasopismach. Były to głównie czasopisma z listy JRC, takie jak Journal of Cereal Science, Plos One, LWT – Food Science & Technology, Molecules, Infrared Physics and Technology i International Agrophysics.

Zestawienie liczbowe mojego dorobku naukowego znajduje się w tabeli poniżej. Ponadto wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki dołączam do dokumentów jako Załącznik 4.

Dorobek naukowy	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Razem
Oryginalne prace twórcze	1	26	27
Sumaryczny IF	3.396	47.569	50.965
Punkty MNiSW	24	644	668
Wystąpienia ustne na konferencjach:	2	20	22
- krajowych	2	12	14
- międzynarodowych	0	8	8
Wystąpienia posterowe na konferencjach:	1	16	17
- krajowych	1	5	6
- międzynarodowych	0	11	11
Udział w realizacji projektów badawczych	0	1	1
Organizacja konferencji	0	8	8
- krajowych	0	5	5
- międzynarodowych	0	3	3
Recenzje artykułów naukowych	0	22	22

*Agnieszka Nawrocka*