

Warszawa, 23.01.2023

Dr hab. Marcin A. Kurek, prof. SGGW
Kierownik Zakładu Techniki w Żywieniu
Katedra Techniki i Projektowania Żywności
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Krekory
pt. *Wpływ polifenolowych komponentów preparatów błonnikowych
na strukturę białek glutenowych i właściwości reologiczne ciasta*
wykonanej w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem naukowym dr hab. Agnieszki Nawrockiej

**Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

**Instytut Nauk o Żywieniu
Człowieka**

**Katedra Techniki
i Projektowania Żywności**

ul. Nowoursynowska 159c
bud. 32, pok. 0116
02-776 Warszawa
+48 22 593 70 78
Marcin_kurek@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Recenzja została wykonana na podstawie Uchwały Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN z dnia 12.12.2022r, pisma Dyrektora Instytutu prof. dr hab. Cezarego Sławińskiego, czł. koresp. PAN (RN-431-1/20 z dnia 14.12.2022) oraz rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Krekory.

Podstawą prawną niniejszej recenzji są przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669).

2. Ocena formalna recenzowanej rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl czterech publikacji opublikowanych w latach 2020-2022 po uprzedniej ocenie merytorycznej recenzentów w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Tytuł rozprawy jest zgodny z przeprowadzonymi i opublikowanymi badaniami. W skład rozprawy wchodzi, następujące publikacje:

1. Krekora, M., Szymańska-Chargot, M., Niewiadomski, Z., Miś, A., & Nawrocka, A. (2020). Effect of cinnamic acid and its derivatives on structure of gluten proteins – A study on model dough with application of FT-Raman spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 107, 105935.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105935>.

2. Krekora, M., Nawrocka, A (2022). Effect of a polyphenol molecular size on the gluten proteins–polyphenols interactions studied with FT-Raman spectroscopy. Food Biophysics. doi:10.1007/s11483-022-09740-z.
3. Krekora, M., Miś, A., & Nawrocka, A. (2021). Molecular interactions between gluten network and phenolic acids studied during overmixing process with application of FT-IR spectroscopy. Journal of Cereal Science, 99, 103203. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103203>.
4. Krekora, M., Nawrocka, A. (2022). The influence of selected polyphenols on the gluten structure - a study on gluten dough with application of FT-IR and FT-Raman spectroscopy. Journal of Cereal Science, 108, 103570. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103570>

Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR), przyporządkowanych do dyscypliny technologia żywności i żywienia wg listy MEiN z 2021 roku. Na szczególne podkreślenie zasługują ilościowe wskaźniki charakteryzujące publikacje wchodzące w skład ww. monotematycznego cyklu. Łączna liczba punktów obliczona wg daty opublikowania prac wynosi 490 pkt. MEiN, a sumaryczny IF = 16,25, co należy uznać za wskaźniki w pełni wystarczające przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora.

Powyższe prace są wieloautorskie. Dwie z nich to prace Doktorantki i Promotorki, jedna z nich jest z udziałem jeszcze jednego autora, natomiast skład autorski jednej z nich składa się w sumie z pięciu współautorów. We wszystkich pracach mgr Magdalena Krekora jest pierwszym autorem.

Wkład Doktorantki w oryginalne prace twórcze polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodologii, przeprowadzeniu badań i analiz statystycznych oraz przygotowaniu oryginalnego manuskryptu.

Przedstawiona do recenzji dysertacja ma typowy układ rozprawy doktorskiej powstałej na bazie spójnego tematycznie zbioru publikacji naukowych. Przedłożona dysertacja oprócz kopii opublikowanych artykułów zawiera również opracowanie liczące 40 strony maszynopisu, stanowiące syntetyczny opis przeprowadzonych badań.

Obejmuje ono obszernie streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp opisujący główne obszary badawcze podejmowane w pracy doktorskiej, cele i hipotezy badawcze, opis materiału i metodyki, jak i omówienie uzyskanych wyników badań w formie opisu poszczególnych publikacji z krótkim wprowadzeniem pozwalającym lepiej rozumieć zagadnienia stanowiące przedmiot danego badania. Rozprawę wieńczą wnioski z przeprowadzonych badań, jak i bibliografia składająca się z 36 pozycji.

Strona edytorska pracy jest jak najbardziej poprawna i nie budzi większych zastrzeżeń, a prezentacja wyników w publikacjach jest bardzo czytelna. Oczywiście jest fakt, że nie wszystkie dane z publikacji znalazły odzwierciedlenie w opisie rozprawy w języku polskim i nie jest to błędem. Doktorantka swobodnie posługuje się fachowym językiem angielskim w opublikowanych pracach.

Reasumując, uważam, iż przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne ubiegania się o stopień naukowy doktora.

3. Ocena wyboru tematu oraz zakresu pracy

Obecnie rośnie zainteresowanie konsumentów żywnością o charakterze prozdrowotnym i jej pozytywnym wpływem na organizm. Chleb pszenny jako podstawowy element codziennej diety odgrywa ważną rolę w żywieniu człowieka. Z tego powodu fortyfikacja pieczywa psennego w związku z korzystnym wpływem na zdrowie może być dobrym sposobem na urozmaicenie i wzbogacenie diety. Chleb pszenny można

fortyfikować między innymi preparatami błonnika pokarmowego, ekstraktami polifenoli albo surowcami bogatymi w polifenole. Dodanie polifenoli do ciasta pszennego prowadzi do zmian w strukturze sieci glutenu i jego właściwości mechanicznych. Zmiany te mogą być związane głównie z wbudowaniem związków fenolowych w sieć glutenu i/lub zamknięciem ich w kieszeniach hydrofobowych.

Sieć glutenu powstaje w cieście w obecności wody. Białka glutenowe (gliadyny i gluteniny) są połączone ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi (wiązania peptydowe i mostki dwusiarczkowe) i niekowalencyjnymi (wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe i siły van der Waalsa). Lokalizacja i rodzaj wiązań chemicznych występujących w sieci glutenu mogą być modyfikowane przez substancje dodawane do matrycy. Interakcje pomiędzy białkami glutenu a polifenolami mogą obejmować tworzenie wiązań wodorowych i kowalencyjnych C - N i C - S.

Interakcje białka glutenowe - polifenole mogą zależeć od struktury, wielkości, masy cząsteczkowej lub rodzaju grup funkcyjnych obecnych na pierścieniu aromatycznym polifenoli. Wcześniejsze badania Promotorki wykazały, że zmiany obserwowane w strukturze sieci glutenu uzupełnionego polifenolami zależą od rodzaju grup funkcyjnych obecnych na pierścieniu aromatycznym i ich właściwości antyoksydacyjnych.

W związku z tym ważne jest określenie, z jakimi składnikami ciasta oddziałują polifenole oraz jaki jest mechanizm tych oddziaływań, jak i w jaki sposób mogą wpływać na jakość pieczywa. Oceniam, że wybór tematu rozprawy doktorskiej jest ważny z punktu widzenia rozwoju badań podstawowych z obszaru interakcji glutenu z innymi składnikami matrycy żywnościowych, jakim jest pieczywo pszenne.

Zakres pracy obejmował głównie badania na cieście modelowym i glutenowym, a głównymi metodami pomiarowymi wykorzystywanymi w badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie były metody spektroskopowe: spektroskopia ramanowska z transformatą Foruriera (FT-Raman) i spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FT-IR), co odzwierciedla metody używane przez innych badaczy w tego typu badaniach.

4. Charakterystyka i ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu polifenolowych komponentów preparatów błonnikowych (wybranych kwasów fenolowych) na strukturę białek glutenowych w dwóch rodzajach ciasta pszennego (modelowe ciasto pszenne i ciasto glutenowe). Ponadto celem badań przedstawionych w tej pracy było zbadanie właściwości reologicznych ciasta modelowego powstałego w wyniku suplementacji wybranymi kwasami fenolowymi.

Cel ten został zweryfikowany poprzez postawione przez Doktorantkę hipotezy badawcze, że

1. w procesie miesienia pszennego ciasta modelowego/glutenowego kwasy fenolowe tworzą kompleksy z białkami glutenowymi poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych, wodorowych oraz hydrofobowych. Prowadzi to do zmiany struktury drugorzędowej, konformacji mostków disiarczkowych i środowiska dwóch aminokwasów aromatycznych - tyrozyny i tryptofanu;
2. kwasy fenolowe mogą być zamykane w kieszeniach hydrofobowych utworzonych przez łańcuchy polipeptydowe podczas miesienia ciasta;
3. interakcje pomiędzy kwasami fenolowymi a białkami glutenowymi nie powodują rozerwania mostków disiarczkowych. Zakłada się natomiast przekształcenie wiązań S-S z konformacji najbardziej stabilnej energetycznie (gauche-gauche-gauche) do mniej stabilnych (trans-gauche-gauche i trans-gauche-trans) oraz tworzenie wiązań pomiędzy wolnymi grupami SH i kwasami fenolowymi;

4. kwasy fenolowe powodują agregację białek glutenowych.

Rozdział dotyczący metodyki został napisany poprawnie, a wszystkie metodyki są możliwe do odtworzenia przez kolejnych naukowców. Na pozytywną uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka postanowiła posłużyć się ciastem modelowym w celu wyłączenia interakcji z innymi składnikami w matrycy. Analiza statystyczna jest dobrana poprawnie do typu badań.

W publikacji 1 pt. *Effect of cinnamic acid and its derivatives on structure of gluten proteins – A study on model dough with application of FT-Raman spectroscopy* - Spektroskopia Ramana z transformacją Fouriera została zastosowana do zbadania interakcji pomiędzy białkami glutenowymi i pięcioma kwasami fenolowymi podczas mieszania ciasta modelowego. Wybrano kwasy fenolowe: cynamonowy, p-kumarowy, kawowy, ferulowy i chlorogenowy, które dodano w ilości 0,05%, 0,1% i 0,2%. Związki te różnią się rodzajem grup funkcyjnych obecnych przy fenolowym pierścieniu aromatycznym, a tym samym aktywnością antyoksydacyjną. Wyniki badań farinograficznych wskazały na zmianę zachowania ciasta w obecności kwasów fenolowych, którą można uznać za rozpad ciasta. Zjawisko to zachodzi najszybciej w przypadku kwasu kofeinowego, a najwolniej w przypadku kwasu p-kumarowego, które charakteryzują się odpowiednio najwyższą i najniższą aktywnością antyoksydacyjną. Zmiany strukturalne obserwowane w białkach glutenowych zależą również od aktywności antyoksydacyjnej kwasów fenolowych. Największe zmiany zaobserwowano w konformacji mostków dwusiarczkowych, zawartości wolnych grup SH i otoczeniu tryptofanu w wyniku dodania kwasów kofeinowego i chlorogenowego. Uzyskane wyniki wskazują, że badane kwasy fenolowe mogą wchodzić w sieć glutenu lub mogą być zamknięte w kieszeniach hydrofobowych bez tworzenia wiązań chemicznych.

W publikacji 2 pt. *Effect of a polyphenol molecular size on the gluten proteins – polyphenols interactions studied with FT-Raman spectroscopy* zmiany obserwowane w strukturze sieci glutenu w wyniku fortyfikacji ciasta polifenolami mogą zależeć od liczby i rodzaju grup funkcyjnych przy pierścieniu aromatycznym, aktywności antyoksydacyjnej i wielkości cząsteczki polifenolu. Niniejsze badania pokazują wpływ polifenoli różniących się wielkością cząsteczki (kwas galusowy, elagowy i taninowy) na strukturę sieci glutenu badaną za pomocą spektroskopii FT- Raman. Do ciasta modelowego dodawano polifenole w ilości 0,05%, 0,1% i 0,2%. Badania farinograficzne wykazały, że tylko kwasy galusowy i elagowy prowadziły do rozpadu ciasta, natomiast kwas taninowy (największa cząsteczka) stabilizował sieć glutenu. Wyniki badań spektroskopowych wskazują na tworzenie się kowalencyjnych lub wodorowych wiązań pomiędzy grupami SH białka i grupami OH polifenoli. Ponadto we wszystkich widmach zaobserwowano silne ujemne pasmo, które można przypisać α -helisom. Sugeruje to, że zmiany strukturalne mogą dotyczyć głównie gliadyny. Jeśli chodzi o aminokwasy aromatyczne, polifenole nie miały wpływu na wzór wiązania wodorowego tyrozyny, natomiast mikrośrodowisko tryptofanu zmieniło się znacznie na bardziej hydrofobowe. Może to świadczyć o fałdowaniu łańcuchów polipeptydowych i tworzeniu bardziej zwartej i uporządkowanej sieci glutenu. Wyniki wskazują, że mostki dwusiarczkowe mogą zostać przerwane podczas mieszania ciasta i cząsteczki fenoli tworzą wiązania z grupami SH cysteiny. Potwierdza to włączenie polifenoli do sieci glutenu.

Publikacja 3 pt. *Molecular interactions between gluten network and phenolic acids studied during overmixing process with application of FT-IR spectroscopy* opierała się na badaniach za pomocą spektroskopii FT-IR zmian strukturalnych w sieci glutenu spowodowanych uzupełnieniem ciasta modelowego wybranymi kwasami fenolowymi. Dodatkowo określono wpływ nadmiernego mieszania (wydłużenie czasu mieszania do 60 i 75 min) na strukturę glutenu. Ośmiu kwasów fenolowych (pochodne kwasu cynamonowego i galusowego) różniących się grupami funkcyjnymi obecnymi przy pierścieniu aromatycznym i wielkością cząsteczki dodano do ciasta modelowego w ilości 0,05%, 0,1% i 0,2%. Zmiany

strukturalne w wyniku suplementacji badano w próbkach pobranych przed rozpadem ciasta i pod koniec mieszania ciasta. Analiza zmian w strukturze drugorzędowej i populacji wody wykazała, że proces nadmiernego mieszania w połączeniu z suplementacją doprowadził do stopniowego mechanicznego zniszczenia, które dotyczy głównie glutenin. Zaobserwowano tworzenie się agregatów, rozpad wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w sieci glutenu oraz rozpad silnych wiązań H pomiędzy białkami glutenu i cząsteczkami wody. Dodatkowo wyniki próbek "przed rozpadem ciasta" wskazały, że pochodne kwasu cyjanonowego mogą wbudowywać się w sieć glutenu, natomiast pochodne kwasu galusowego mogą być zamknięte w kieszeniach hydrofobowych i konkurować o wodę z białkami glutenu.

Ostatnia publikacja, czyli *The influence of selected polyphenols on the gluten structure - A study on gluten dough with application of FT-IR and FT-Raman spectroscopy* dotyczyła tego, że spektroskopia FT-IR i FT-Raman zostały zastosowane do zbadania interakcji pomiędzy białkami glutenowymi a ośmioma polifenolami w cieście glutenowym (bez skrobi). Polifenole dodawano w ilości 0,05%, 0,1% i 0,2% do ciasta glutenowego. Na podstawie widm FT-IR badane związki podzielono na trzy grupy, w zależności od rodzaju zmian, jakie wywołują w strukturze drugorzędowej białek glutenowych. Zmiany wywołane przez każdą grupę polifenoli były ściśle związane z różną liczbą i rodzajem grup funkcyjnych obecnych w fenolu, a także z ich wielkością cząsteczkową. Kwas galusowy, elagowy i taninowy powodowały wzrost liczby mostków dwusiarczkowych w konformacji g-g-g. Wszystkie badane kwasy fenolowe zwiększyły intensywność pasma tryptofanu i zmieniły środowisko tego aminokwasu na bardziej hydrofobowe. Taki wynik wskazuje na tworzenie się bardziej uporządkowanej struktury i składanie łańcuchów polipeptydowych.

Rozprawę doktorską zamykają wnioski, w których Doktorantka stwierdziła, że hipotezy badawcze zostały potwierdzone przy pomocy przedstawionych wyników badań i opublikowane w czasopismach. Ponadto, umieszczono 12 stwierdzeń dotyczących poszczególnych obserwacji.

Z obowiązku recenzenta chciałbym jednak zwrócić uwagę na pewne drobne błędy natury redakcyjnej oraz nieścisłości dostrzeżone w przedstawionym do recenzji maszynopisie:

1. W Streszczeniu Doktorantka używa określenia „zdrowa żywność”. Z punktu widzenia żywieniowego nie ma ostrej granicy między zdrową a niezdrową żywnością, więc sugerowałbym używanie innego terminu, jak np. żywność o wysokiej wartości odżywczej lub o podwyższonej wartości odżywczej.
2. Następnie wskazano, że *Obecnie pieczywo jak i inne produkty pszenne wytwarzane są z mąki rafinowanej, pozbawionej ważnych składników odżywczych tj. błonnik pokarmowy i związki polifenolowe*. Składniki odżywcze w rozumieniu prawa żywnościowego to białko, węglowodany, tłuszcz, błonnik, sól, witaminy i składniki mineralne oraz substancje, które należą do jednej z tych kategorii lub stanowią jej składniki. Polifenole nie należą do składników odżywczych, ponieważ należą do grupy wtórnych metabolitów roślin, co czyni je substancjami (składnikami) bioaktywnymi.
3. Dość istotnym błędem merytorycznym, który pojawia się w pracy jest stwierdzenie „suplementacji” pieczywa. Rozumiem, że jest to swego rodzaju anglicyzm, natomiast zgodnie z definicją Słownika Języka Polskiego, jak i ogólnie przyjętymi normami w naukach o żywności „suplementacja” to uzupełnianie diety o niezbędne witaminy i składniki mineralne. W przypadku produktów żywnościowych, w których znajdujemy niewystępujące w typowych warunkach składniki możemy mówić o fortyfikacji, wzbogacaniu lub zwiększaniu udziału określonego składnika.
4. W części 3.2 Przygotowanie ciasta modelowego Doktorantka napisała, że *Ciasto modelowe wzbogacano w wybrane kwasy fenolowe w trzech stężeniach: 0.05%, 0.1%, 0.2%. Zawartość kwasów fenolowych ustalono na podstawie ich rzeczywistych zawartości w preparatach*

błonnikowych. Natomiast nie ma wskazania jaką metodą określono tę rzeczywistą zawartość w preparatach błonnikowych.

5. W rozdziale 5, czyli Wnioskach Doktorantka ograniczyła się wyłącznie do stwierdzenia, że hipotezy zostały potwierdzone bez powrotu do ich treści, co nie jest błędem, ale w mojej opinii warto by było wskazać na podstawie czego zostały potwierdzone. Ponadto, zwrot „hipotezy zostały potwierdzone” nie jest do końca precyzyjny. Radziłbym używanie zwrotu, że hipotezę zweryfikowano pozytywnie lub negatywnie.

Błędy te w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, którą ogólnie oceniam bardzo wysoko.

Odnosząc się do przedstawionej rozprawy oraz przeprowadzonych przez Doktorantkę badań prosiłbym o ustosunkowanie się do poniższych kwestii:

1. Z czego wynika dość długi czas miesienia zastosowany w pracy wynoszący od 30 do 120 minut w przypadku badań farinograficznych i w jaki sposób można go skorelować z czasem miesienia występującym w praktyce przemysłowej wynoszącym do kilku lub kilkunastu minut?
2. Czy podczas procesu miesienia zawartość poszczególnych kwasów fenolowych mogła ulegać zmianie np. na skutek utlenienia?
3. W Publikacji 1. Doktorantka wspomina, że *Po czasie t_0 następowało chemiczne uaktywnienie kwasów, co na farinogramie obserwowano jako wzrost konsystencji ciasta w porównaniu z kontrolą*. Co jest rozumiane jako „chemiczne uaktywnienie kwasów”?
4. W jaki sposób powyższe badania mogą mieć zastosowanie w praktyce przemysłowej z zakresu piekarnictwa?

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Praca doktorska Pani mgr Magdaleny Krekory jest kompleksowym studium uzupełniającym lukę w światowej literaturze na temat interakcji białek glutenowych oraz polifenoli pochodzących w preparatów błonnikowych.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi formalne przedstawione w ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1668, z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Krekory do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK ZAKŁADU


/ Dr hab. Marcin Kurek, prof. SGGW /