

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Krekory pt. „Wpływ polifenolowych komponentów preparatów błonnikowych na strukturę białek glutenowych i właściwości reologiczne ciasta”**

**1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji**

Podstawą formalną opracowania recenzji jest uchwała Nr 2333/P23/2022 powołująca mnie w dniu 12 grudnia 2022 r. przez Radę Naukową Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego w Lublinie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Krekory.

Przewód został wszczęty w obszarze nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

**2. Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej**

Wytwarzanie ciasta pszennego jest podstawowym procesem w produkcji pieczywa, decydującym o właściwościach wyrobów finalnych. Podczas miesienia następuje połączenie w jednolitą masę składników ciasta i kształtowanie jego właściwości, determinujących przede wszystkim teksturę i objętość chleba. Cechy te w szczególności związane są z ilością i jakością białek glutenowych. Obecnie modne wzbogacane pieczywa dodatkami roślinnymi, będących cennym źródłem błonnika i wielu związków bioaktywnych, w tym szczególności polifenoli, prowadzi z jednej strony do polepszenia potencjału prozdrowotnego wyrobów piekarskich, z drugiej zaś powoduje zmiany w strukturze sieci glutenowej, a tym samym oddziałuje na jakość wyrobów finalnych. Poznanie tych oddziaływań jest nie tylko ważne z poznawczego punktu widzenia, ale może się również przyczynić do optymalizacji produkcji wyrobów piekarskich. Dlatego też podjęcie przez Panią magister Magdalę Krekorę tematu dotyczącego wpływu polifenolowych komponentów preparatów błonnikowych na strukturę białek glutenowych i właściwości reologiczne ciasta bardzo dobrze wpisuje się w tę tematykę.

**3. Ogólna charakterystyka rozprawy**

Na rozprawę składa się cykl czterech publikacji wydanych w czasopismach naukowych o łącznej punktacji MNiSW wynoszącej 490 punktów i sumarycznym wskaźniku Impact Factor 16,246. Dwie z prac wchodzących w skład osiągnięcia zostały opublikowane w Journal of

Cereal Sciences, jedna w Food Hydrocolloids i jedna w Food Biophysics. W dwóch pracach udział Doktorantki wynosi 60% a pozostałych dwóch 70%.

Celem rozprawy było przeanalizowanie wpływu wybranych kwasów fenolowych (ferulowego, kumarowego, kawowego, galusowego, elagowego i taninowego) na strukturę białek glutenowych oraz właściwości fizyczne ciasta modelowego i glutenowego.

Autorka we wstępie rozprawy doktorskiej przedstawiła charakterystykę glutenu oraz opisała proces powstawiania jego struktury podczas tworzenia ciasta pszenne. Dokonała także charakterystyki polifenoli ze szczególnym uwzględnieniem kwasów fenolowych opisując rodzaje ich oddziaływań w układzie białko-polifenol. Opierając się na aktualnej literaturze wskazała, że kwasy fenolowe mogą mieć wpływ na proces tworzenia ciasta pszenne poprzez różne rodzaje interakcji z białkami glutenowymi. Powoduje to zmiany w strukturze sieci glutenowej, a tym samym oddziałuje na właściwości mechaniczne ciasta, decydujące o cechach jakościowych pieczywa. Chcąc poznać zakres tych oddziaływań, jak również wyjaśnić mechanizm ich powstawiania Doktorantka prawidłowo sformułowała cel pracy oraz hipotezy badawcze.

W celu przeprowadzenia badań Doktorantka wytworzyła ciasto modelowe, które uzyskała poprzez połączenie skrobi pszennej i glutenu pszenne w proporcji wagowej 80:15 oraz przyjmując wodochłonność mąki na poziomie 65%. Wytworzenie ciasta modelowego miało na celu wyeliminowanie wpływu na uzyskane wyniki badań takich składników, jak błonnik czy związki fenolowe, które występują w mące handlowej. Do tak przygotowanego układu dodawano wybrane kwasy fenolowe w trzech stężeniach (0,05, 0,1 i 0,2 %). Proces wytwarzania kontrolnego oraz suplementowanego kwasami fenolowymi ciasta analizowano przeprowadzając testy farinograficzne przy znacznie wydłużonym czasie miesienia ciasta.

Drugi etap badań dotyczył badań spektroskopowych i biochemicznych ciasta modelowego i glutenowego, do którego dodawano kwasy fenolowe. Tak przygotowane próby suszono sublimacyjnie oraz rozdrabniano do postaci proszku. W dalszej części, przeprowadzono analizy przy wykorzystaniu spektroskopii FT-Ramana i spektroskopii w podczerwieni. Oznaczono również wolne grupy SH. Wyniki uzyskanych badań poddano analizie statystycznej, wykorzystując jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Tukey`a.

W pierwszej publikacji (P.1) Doktorantka analizowała wpływ kwasów fenolowych (cynamonowego, *p*-kumarowego, kawowego, ferulowego i chlorogenowego) na właściwości farinograficzne modelowego ciasta pszenne oraz zmiany struktury drugo- i trzeciorzędową białek glutenowych. Wykazała, że dodatek fenolokwasów do ciasta istotnie oddziałuje na jego właściwości fizyczne, powodując po pewnym czasie miesienia uzyskanie wyraźnego

ekstremum krzywej farinograficznej, a następnie gwałtowny spadek oporności na oddziaływania mechaniczne. Świadczy to o gwałtownym osłabieniu struktury glutenu i jego rozpadzie. Co istotne, Doktorantka zaobserwowała, że osłabienie to było powiązane z aktywnością przeciwutleniającą kwasów fenolowych. Im wyższa była aktywność danego fenolokwasu, tym rozmiękczenie ciasta następowało szybciej. Natomiast analiza widm wykonana przy użyciu spektroskopii Ramana wykazała, że dodatek kwasów fenolowych do modelowego ciasta pszennego powodował zmiany w strukturze trzeciorzędowej sieci glutenowej, sugerując tym samym wbudowywanie się kwasów fenolowych w sieć glutenową, ale również ich obecność w kieszeniach hydrofobowych utworzonych przez białko. Doktorantka wywnioskowała także, że obecność kwasów fenolowych w cieście pszenным może powodować redukcję wiązań dwusiarczkowych i związane z tym osłabienie struktury ciasta. Ponadto przeprowadziła badania mikrośrodowiska aminokwasów aromatycznych, stwierdzając, że reszty tyrozyny nie uczestniczą w tworzeniu nowych wiązań wodorowych. Wykazała także, że reszty tryptofanu są bardziej wrażliwe na obecność kwasów fenolowych niż reszty tyrozyny, przy czym wrażliwość ta jest ściśle powiązana z aktywnością przeciwutleniającą fenolokwasów.

W kolejnej pracy (P.2) wchodzącej w skład osiągnięcia Doktorantka przeanalizowała wpływ kolejnych kwasów fenolowych (galusowego, elagowego, taninowego) na właściwości farinograficzne ciasta pszennego oraz strukturę sieci glutenowej, wykorzystując do tego celu spektroskopię Ramana z transformacją Furiera (FT-Raman). Podobnie jak w pracy P.1 wytworzyła ciasto modelowe, do którego dodawała wybrane kwasy fenolowe w postaci sproszkowanej w trzech udziałach (0,05, 0,1 i 0,2 %) w stosunku do masy mąki. Doktorantka wykazała, że obecność w cieście pszennych kwasu galusowego i elagowego może przyczyniać się do osłabienia struktury glutenu i w konsekwencji rozpadu ciasta, a czas wystąpienia ekstremum na krzywej obrazującej zmiany konsystencji ciasta wydłuża się wraz ze wzrostem wielkości cząsteczki użytego kwasu. Co ważne, Doktorantka nie stwierdziła negatywnego wpływu kwasu taninowego na strukturę ciasta - związek ten przyczynił się do stabilizacji sieci glutenowej. Ponadto analiza uzyskanych widm wykazała, że kwasy fenolowe mogą oddziaływać z białkami glutenowymi poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych lub wodorowych pomiędzy grupami SH białka a grupami OH kwasu fenolowego. Dodatkowo doktorantka udowodniła, że obecność fenolokwasów w sieci glutenowej nie wpływa na tworzenie wiązań wodorowych z tyroziną. Analizując widma różnicowe wykazała natomiast, że kwas galusowy może częściowo chronić białka glutenowe przed agregacją, a jedyną strukturą, która zmieniała się wraz ze stężeniem kwasu elagowego, były struktury  $\alpha$ -helisy. Na

postawie analizy widm Kandydatka zaobserwowała także, że zmiany strukturalne ciasta dotyczą głównie gliadyn. Ponadto stwierdziła także, że na uzyskanych widmach występują pasma związane ze strukturą  $\beta$ , co wskazuje, że zarówno dodatek polifenoli do ciasta pszennego, jak i jego nadmierne miesienie może prowadzić do osłabienia stabilności sieci glutenowej.

W kolejnej pracy (P.3) Doktorantka wykorzystwała spektroskopię w podczerwieni do analizy zmiany w strukturze drugorzędowej białek glutenowych oraz populacjach wody, spowodowane suplementacją ciasta modelowego wybranymi kwasami fenolowymi, różniącymi się liczbą i rodzajem grup funkcyjnych jak i wielkością cząsteczki. Ponadto przeanalizowała wpływ wydłużonego miesienia ciasta na strukturę białek glutenowych. Doktorantka wykazała, że dłuższe (75 min) wyrabianie ciasta powoduje zniszczenie jego struktury poprzez rozerwanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w sieci glutenowej oraz rozerwanie wiązań wodorowych pomiędzy białkami glutenu (głównie glutenin) a cząsteczkami wody. Przy czym dodatek analizowanych kwasów fenolowych (poza kwasem taninowym) do modelowego ciasta prowadzi do jego rozpadu objawiającego się bardzo szybkim, niemal natychmiastowym zniszczeniem struktury glutenowej. Ponadto Doktorantka udowodniła, że sposób oddziaływania na ciasto zależy od rodzaju dodanych fenolokwasów sugerując, iż pochodne kwasu cyjankowego wbudowują się w sieć glutenową, tworząc wiązania wodorowe. Natomiast pochodne kwasu galusowego zamykają się w kieszeniach hydrofobowych, bądź też w niewielkim stopniu oddziaływały z siecią glutenową. Z kolei badania populacji wody wykazały, że grupy pochodnych kwasu galusowego konkurowały z białkami glutenowymi o wodę, odwrotnie niż w przypadku pochodnych kwasu cyjankowego.

W ostatniej pracy (P.4) wchodzącej w skład osiągnięcia analizowano interakcje kwasów fenolowych z białkami w cieście glutenowym. Uwzględniono zarówno pochodne kwasu cyjankowego (kwas cyjankowy, kawowy, kumarowy, ferulowy i chlorogenowy) oraz benzoowego (kwas galusowy, elagowy i taninowy). Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdziła, że wprowadzenie wymienionych kwasów do ciasta glutenowego powoduje zmiany w strukturze białek glutenowych. Przy czym w przypadku wzbogacenia ciasta kwasem cyjankowym zaobserwowała pasmo dodatnie związane z tworzeniem agregatów. Natomiast w przypadku pozostałych kwasów stwierdziła występowanie pasma ujemnego, jak i dodatniego związanego z antyrównoległymi  $\beta$ -kartkami, wskazujące również na agregację białek. Ponadto badania próbek ciasta z dodatkiem kwasu chlorogenowego

wykazały obecność pasm związanych ze strukturą  $\alpha$ -helisy, co sugeruje iż kwas ten może również oddziaływać z gliadynami.

Podsumowując osiągnięcie Doktorantki, należy stwierdzić, że potwierdziła ona postawione w niniejszej pracy hipotezy badawcze. Autorka wykazała na układach modelowych, że kwasy fenolowe tworzą kompleksy z białkami glutenowymi prowadzące do powstania wiązań kowalencyjnych wodorowych oraz hydrofobowych, a obserwowane zmiany w strukturze drugorzędowej białek mogą dotyczyć zarówno gliadyn jak i glutenin. Ponadto zmiany te prowadzą do przekształcenia wiązań dwusiarczkowych w formę mniej stabilną, prowadząc tym samym do zniszczenia struktury ciasta podczas jego długotrwałego miesienia. Doktorantka wykazała także, że w trakcie tego procesu kwasy fenolowe prowadzą do agregacji białek glutenowych, zarówno w cieście modelowym, jak i glutenowym, spowodowaną rozerwaniem wiązań wodorowych, co objawia się gwałtownym spadkiem konsystencji ciasta podczas miesienia. Wyniki zawarte w przedstawionej rozprawie przyczyniają się do poszerzenia zakresu wiedzy pozwalającej na wyjaśnienie mechanizmów oddziaływania związków polifenolowych ze składnikami chlebowego. Wiedza ta daje podstawy do optymalizacji wywarzania ciasta, a tym samym pieczywa pszennego wzbogaconego dodatkami roślinnymi.

Po przestudiowaniu rozprawy mam do Doktorantki następujące pytania i zalecenia.

1. Czy Doktorantka próbowała wykonać badania na klasycznej mące pszennej wykorzystywanej do produkcji pieczywa? Wytworzenie ciasta modelowego z jednej strony pozwala na wyeliminowanie wpływu polifenoli i błonnika zawartych w mące, z drugiej zaś może prowadzić do niepełnej informacji, jakie zmiany zachodzą podczas wytwarzania ciasta wzbogaconego kwasami fenolowymi w mące wykorzystywanej bezpośrednio do produkcji pieczywa.
2. Czas mechanicznego oddziaływania na ciasto podczas przeprowadzonych badań był znacznie wyższy do czasu wytwarzania ciasta stosowanego w warunkach przemysłowych. Czym Autorka uzasadnia tak długie wytwarzanie ciasta?
3. Ze względu na fakt, że przeprowadzenie analizy statystyczne uzyskanych widm klasycznymi metodami jest niemożliwe proszę o informację, jaka jest powtarzalność pomiarów uzyskanych w badaniach spektrofotometrycznych.
4. W dalszej części rozwoju naukowego sugerowałabym Doktorantce przeprowadzenie badań ciasta po różnym czasie fermentacji oraz wykonanie próbnych wypieków i odniesienie uzyskanych wyników badań do właściwości gotowego wyrobu.

### **Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Krekory pt. „Wpływ polifenolowych komponentów preparatów błonnikowych na strukturę białek glutenowych i właściwości reologiczne ciasta” stanowi oryginalne rozwiązania problemu badawczego, wskazuje na wysoki poziom wiedzy teoretycznej Doktorantki a także potwierdza jej umiejętność planowania i prowadzenia prac naukowych. Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiona rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.), zgodnie z ustawą dnia 20 lipca 2018 roku. Zgodnie z przepisami wprowadzającymi: Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20-go września 2018 roku. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin artystycznych. Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Krekory do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną pracy doktorskiej, jak i nowatorski sposób rozwiązania problemu badawczego wnioskuję do Rady Dyscypliny Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego w Lublinie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Krekory.

*Wioletta Gocik - Dziuki*