



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 18 stycznia 2023 r.

Dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

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

Wyzwania, jakie współcześnie stawiane są przed agronomami, a w szczególności agrofizykami dla projektowanych przez nich procesów technologicznych, wymagają formułowania pytań oraz poszukiwania odpowiedzi na poziomie molekularnym, z zastosowaniem odpowiednich technik pomiarowych, wśród nich, bardzo często, z obszaru spektroskopii molekularnej. Ta właśnie grupa zagadnień stała się podstawą rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Krekory. W pracy podjęto próbę określenia wpływu wybranych kwasów fenolowych (cytrynowego, kawowego, ferulowego, chlorogenowego, kumarowego, galusowego, elagowego oraz taninowego) na strukturę białek glutenowych. Wobec faktu, iż tak suplementowane pieczywo nabywa ważnych składników prozdrowotnych i odżywczych, przedłożona rozprawa jest opracowaniem nie tylko interesującym, ale również ważnym. Wyniki przeprowadzonych badań kierowane są głównie do środowisk związanych z piekarnictwem, a to z powodu powszechnego stosowania w procesie produkcji mąki rafinowanej, pozbawionej błonnika pokarmowego oraz związków polifenolowych. Wzrastająca świadomość w tej kwestii

wydaje się być również alternatywą dla gospodarowania odpadami po produkcji zbożowej i owocowo-warzywnej.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych oraz Laboratorium Oceny Jakości Surowców Zbożowych i Oleistych Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem znakomitego specjalisty w obszarze badań spektroskopowych – dr hab. Agnieszki Nawrockiej. Ośrodek, w którym przygotowana została rozprawa, należy do czołowych krajowych centrów, w których prowadzone są badania naukowe materiałów pochodzenia roślinnego. Ocenianą rozprawę doktorską stanowi zestawienie czterech oryginalnych artykułów badawczych, opublikowanych w czasopismach specjalistycznych. Udział Doktorantki w tych pracach jest istotny. Wniosek ten opieram nie tylko na stosownym oświadczeniu zamieszczonym na początku rozprawy, ale również na pierwszym w kolejności autorstwie Doktorantki we wszystkich opublikowanych pracach.

Pani mgr Krekora kształtowała swój warsztat badawczy głównie w oparciu o techniki absorpcji i rozproszenia światła w podczerwieni, a rezultaty tych badań ukazały się w latach 2020-2022. Prace charakteryzują się znacznymi wartościami oddziaływania tzw. impact factor. *Food Hydrocolloids* (IF 5.893), *Food Biophysics* (IF 3.34), oraz dwie prace w *Journal of Cereal Science* (IF 2.938 i 4.075) indeksowanych odpowiednio dla różnych lat przyjęcia prac do druku. Tak duża liczba publikacji świadczy o zaangażowaniu i bardzo dojrzałym traktowaniu własnej przyszłości naukowej przez Doktorantkę.

Przeprowadzone badania opierają się na skomplikowanej, w moim odczuciu, analizie ewolucji aktywności pasm oscylacyjnych wyselekcjonowanych do monitorowania interakcji pomiędzy białkami glutenowymi i kwasami fenolowymi. Związane jest to na przykład z przekrywaniem się wartości energii, dla których przypadają maksima absorpcji grup chemicznych określanych potocznie zakresem amid I. Jest to zazwyczaj pojedyncze, szerokie pasmo, stąd specyficzne wymagania, co do metody analizy polegającej na konturowaniu i dopasowaniu krzywych odzwierciedlających kształt amidu I, prowadzące w rezultacie do dokładniejszego wglądu w nakładające się oscylacje. Zauważono, że suplementacja

modelowego ciasta pszennego wspomnianymi kwasami podczas jego miesienia indukuje zmiany w strukturze sieci białek glutenowych zależne od struktury kwasu fenolowego i jego aktywności antyoksydacyjnej (największe zmiany dotyczyły dodatków kwasu kawowego i chlorogenowego). Pani magister analizowała próbki pobierane przed i po tzw. rozpadzie ciasta w wyniku miesienia. Na podstawie zebranych widm różnicowych wspomnianych próbek wnioskowała o chemicznej naturze zmian powodowanych nadmiernym miesieniem. Analiza białkowego pasma amid I wskazywała na powstawanie agregatów, β -krotek i struktur nieuporządkowanych. Kwasy fenolowe w niewielkim stopniu wpływały na zmiany intensywności drgań oscylacyjnych charakterystycznych dla aminokwasów aromatycznych, ale miały też duży wpływ na tzw. parametr konsystencji ciasta. Wzrost zawartości kwasów przyspieszał dynamikę wzrostu konsystencji ciasta.

Zmiany strukturalne w cieście modelowym, które Pani Krekora obserwowała zależnie od liczby i rodzaju grup funkcyjnych obecnych w aromatycznym pierścieniu kwasu fenolowego, stały się także bodźcem do przeprowadzenia kolejnych eksperymentów, mających na celu określenie wpływu rozmiaru cząsteczki polifenolu suplementującej ciasto modelowe na strukturę tego ostatniego. Na podstawie przedstawionych wyników tej części badań można stwierdzić, że eksperymenty zostały zaplanowane w sposób logiczny, tak aby sprawdzić jak najwięcej aspektów mogących mieć wpływ na oddziaływania związków dodawanych do ciasta. Tak jak poprzednio, Pani magister, wykonała najpierw badania farinograficzne celem określenia szybkości pojawienia się punktu rozpadu ciasta. Stwierdziła, że wraz ze wzrostem wielkości cząsteczki polifenolu możliwe jest dłuższe jego miesienie. W przypadku dodatku największej analizowanej cząsteczki (kwasu taninowego), nie zaobserwowała ona rozpadu ciasta. Analiza wyników spektroskopowych techniką FT-Raman pokazała, że polifenole mogą wchodzić w interakcje z białkami glutenowymi poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych lub wodorowych między grupami -SH białek i -OH polifenoli. Analiza pasma amid I wskazywała, że zmiany strukturalne suplementowanego ciasta dotyczą gliadyn. Obecność wybranych do badań polifenoli prowadziła do zaburzenia ciągłości i stabilności sieci glutenowej.

W dalszej części eksperymentów Pani mgr Krekora pokusiła się o badania struktury drugorzędowej białek. Interesowało Ją zachowanie sieci glutenowej modyfikowanej kwasami fenolowymi oraz efektem tzw. rozpadu ciasta powodowanym zbyt długim miesieniem. Wyniki badań wskazują na to, że wydłużenie czasu miesienia do 75 min powodowało zrywanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych łączących białka glutenowe, a jednocześnie zrywanie silnych wiązań wodorowych między białkami a cząsteczkami wody. Te ostatnie uważa się za niezbędne do uzyskania nie tylko właściwego sieciowania białek glutenowych, ale odpowiadające również za pożądaną strukturę i właściwości mechaniczne ciasta. Dodatek do ciasta kwasów fenolowych (za wyjątkiem kwasu taninowego) prowadził do rozpadu ciasta, co powodowane było najprawdopodobniej bokowaniem grup -SH. Badania widm oscylacyjnych ciast suplementowanych kwasami fenolowymi z grupy kwasów cynamonowych wskazywały na to, iż tworzyły one wiązania wodorowe z siecią glutenową, natomiast kwasy z grupy galusowych zamykane były w kieszeniach hydrofobowych białek.

Dalsze badania Pani magister dotyczyły zmian struktury drugo- i trzecio-rzędowej białek glutenowych wywołanych suplementacją polifenolami ciasta pozbawionego skrobi. W tym celu przeprowadzono eksperymenty metodami spektroskopii absorpcji w podczerwieni oraz rozproszenia ramanowskiego. Zbadano interakcje białka z ośmioma wybranymi polifenolami przy zawartości procentowej tych ostatnich: 0,05%, 0,1% i 0,2%. Stwierdzono, że kwas galusowy, elagowy i taninowy powodowały wzrost liczebności mostków dwusiarczkowych. Ponadto, dodatek kwasów fenolowych zwiększał intensywność pasma charakterystycznego dla tryptofanu i zmienił środowisko tego aminokwasu na hydrofobowe. Taki wynik wskazywał na fałdowanie się łańcuchów polipeptydowych.

W mojej ocenie wartość merytoryczna osiągnięć badawczych prezentowanych w ramach rozprawy doktorskiej jest bardzo wysoka, zarówno pod względem poznawczym jak i aplikacyjnym. Z formalnego punktu widzenia, w przypadku rozpraw doktorskich stanowiących część wieloautorskiego zbioru artykułów, rozprawa Pani Krekory zawiera więcej niż minimalnie wymaganą liczbę spójnych tematycznie i opublikowanych artykułów w periodykach listy czasopism punktowanych Ministerstwa Edukacji i Nauki. Rozprawa poprzedzona została

wymaganim streszczeniem w języku angielskim oraz rozdziałami, pełniącymi zarazem rolę wstępu jak i przeglądu literaturowego. Część ta zredagowana została, w mojej opinii, z wysoką dbałością o szatę graficzną oraz klarowność treści. Rozdział 3, pt. „*Metodyka*” poświęcony został warsztatowej części pracy. Opis aparatury badawczej, zastosowanych parametrów pomiarowych, przygotowania i suplementowania ciasta uważam za napisany w sposób jasny i wystarczający do odtworzenia wyników pomiarów. Jako „zszywka” zbioru artykułów, rozprawa nie zostawia doktorantowi wiele pola do wykazania się talentem edytorskim. Chciałbym jednak zaznaczyć, że części formalne rozprawy zredagowane zostały w sposób bardzo staranny.

W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka uwag i wątpliwości, które w żaden sposób nie umniejszają mojej pozytywnej oceny pracy, natomiast mam nadzieję, że będą stanowiły podstawę do ciekawej dyskusji w trakcie publicznej obrony:

- Różnice w widmach amid I dyskutowane w pracy jako ubytki bądź wzrosty intensywności określonych grup chemicznych uzyskiwano poprzez odejmowanie od siebie widm próbek suplementowanych i kontrolnych przy założeniu jednakowej zawartości wody w obu próbkach. Czy prowadzone były badania prawdziwości tego założenia, np. poprzez monitorowanie zakresu spektralnego 2000 - 1750 cm^{-1} ?
- Nadmiarowy dodatek polifenoli, w szczególności przyjmowanych w czystej formie tych związków jest uznawany za szkodliwy. Czy Doktorantka ma pomysł na „bezpieczną formę” suplementowania ciasta tymi związkami?
- Pani magister zaobserwowała szereg zmian w strukturze drugorzędowej białek. Czy indukowane zmiany mogą być wrażliwe dla osób z alergiami?
- Jednym z parametrów monitorowanych przez Doktorantkę była ekspozycja tryptofanu na środowisko zewnętrzne (polarne). Czy Pani magister mogłaby zaproponować inne, komplementarne metody badań organizacji łańcuchów polipeptydowych ze wskazaniem ich słabych i mocnych stron?

Podsumowując, chciałbym stwierdzić, iż Pani mgr Magdalena Krekora przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaplanowanych

oraz przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Badania te wymagały swobodnego poruszania się w ramach wielu podejść metodologicznych. Rozprawa doktorska opiera się na oryginalnych wynikach prac oraz analiz ogłoszonych w czterech artykułach opublikowanych w renomowanych międzynarodowych czasopismach specjalistycznych, dowodząc dojrzałości naukowej Doktorantki. W mojej opinii oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymogi zwyczajowe i formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Uprzejmie wnoszę o dopuszczenie Pani magister do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

Mając na uwadze wartość merytoryczną i naukową badań przeprowadzonych przez mgr Krekorę, uprzejmie wnoszę również do Rady Dyscypliny o rozważenie możliwości uznania przedmiotowej rozprawy doktorskiej za wyróżniającą.

Gratuluję Doktorantce oraz Pani Promotor cennych rezultatów badań.

