

**INSTYTUT AGROFIZYKI IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

Magdalena Krekora

**Wpływ polifenolowych komponentów preparatów błonnikowych na strukturę białek
glutenowych i właściwości reologiczne ciasta**

**Influence of polyphenolic components of fiber preparations on the structure of gluten
proteins and rheological properties of dough**

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska przygotowana pod kierunkiem

Promotora: dr hab. Agnieszki Nawrockiej

© Magdalena Krekora

Lublin 2022

OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data..... Podpis promotora rozprawy

OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY

Świadomy odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza rozprawa jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data..... Podpis autora rozprawy

*Składam serdeczne podziękowania promotorce
Pani dr hab. Agnieszce Nawrockiej
za pomoc, mobilizację,
merytoryczne wsparcie oraz poświęcony czas.*

Streszczenie

Rosnące zainteresowanie konsumentów zdrową żywnością i jej pozytywnym wpływem na organizm wymusza wprowadzenie na rynek prozdrowotnych produktów żywnościowych. Pieczywo pszenne, jako podstawowy element codziennej diety, odgrywa istotną rolę w żywieniu człowieka i z tego względu może być uważane za odpowiedni nośnik cennych i niezbędnych dla organizmu substancji prozdrowotnych. Obecnie pieczywo jak i inne produkty pszenne wytwarzane są z mąki rafinowanej, pozbawionej ważnych składników odżywczych tj. błonnik pokarmowy i związki polifenolowe. Wyżej wymienione substancje odżywcze wchodzi w skład preparatów błonnikowych. Wykorzystanie preparatów błonnikowych oraz ich komponentów do suplementacji pieczywa pszennego może być uważane za zagospodarowanie odpadów po produkcji zbożowej i/lub owocowo-warzywnej, co jest zgodne z polityką Unii Europejskiej. Ważnymi komponentami preparatów błonnikowych są związki polifenolowe, które wykazują silne właściwości przeciwutleniające. Związki polifenolowe mogą być dodawane do ciasta w postaci ekstraktów lub barwników spożywczych. Zrozumienie podstawowych mechanizmów oddziaływania związków polifenolowych z poszczególnymi składnikami ciasta chlebowego może w przyszłości umożliwić stworzenie odpowiedniej technologii wytwarzania chleba, który będzie charakteryzował się właściwościami prozdrowotnymi, a jednocześnie będzie posiadał jakość pożądaną przez konsumentów.

Jakość pieczywa ściśle związana jest ze strukturą białek glutenowych, które determinują właściwości mechaniczne ciasta. Badania przeprowadzone z zastosowaniem preparatów błonnikowych w cieście pszennym pokazały, że obserwowane zmiany w strukturze białek glutenowych są związane głównie z obecnością polisacharydów. Dlatego też wykonano badania, w których zastosowano czyste polisacharydy. Zaobserwowane zmiany w strukturze białek glutenowych nie pokrywały się w pełni ze zmianami wywołanymi przez preparaty błonnikowe. Z tego też względu celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było określenie wpływu wybranych kwasów fenolowych różniących się ilością i rodzajem grup funkcyjnych (kwasu cynamonowego, kawowego, ferulowego, chlorogenowego, kumarowego), jak również wielkością cząsteczki (kwasu galusowego, elagowego oraz taninowego) na strukturę białek glutenowych w modelowym i glutenowym cieście pszennym oraz zbadanie wpływu tych polifenoli na właściwości reologiczne ciasta. Badania zostały przeprowadzone na mące modelowej (skrobia pszenna: gluten pszenny w proporcji 80:15 w/w) oraz glutenie pszennym (bez obecności skrobi pszennej) w celu wyeliminowania wpływu pozostałych składników naturalnie obecnych w mące pszennej (błonnik pokarmowy, lipidy, polifenole) na uzyskane wyniki. Badania te przeprowadzono przy użyciu metod spektroskopowych

(spektroskopii w podczerwieni (FT-IR) oraz spektroskopii ramanowskiej (FT-Ramana)) i metody farinograficznej.

Wyniki badań farinograficznych pokazały zmianę w przebiegu procesu miesienia ciasta w obecności kwasów fenolowych, którą uznano za rozpad ciasta (ang. *dough breakdown*). Zjawisko to zachodziło najszybciej w przypadku kwasu kawowego, a najwolniej w przypadku kwasu *p*-kumarowego, które charakteryzują się odpowiednio najwyższą i najniższą aktywnością przeciwutleniającą spośród badanych kwasów fenolowych. W przypadku kwasów z szeregu pochodnych kwasu benzoowego (kwas galusowy i elagowy) również obserwowano rozpad ciasta. Jedynie kwas taninowy (największa cząsteczka) wykazał odmienne zachowanie i stabilizował sieć glutenową.

Wyniki badań spektroskopowych wykazały, że zmiany obserwowane w strukturze sieci glutenowej w wyniku suplementacji ciasta kwasami fenolowymi zależą od liczby i rodzaju grup funkcyjnych obecnych przy pierścieniu aromatycznym tych kwasów, aktywności antyoksydacyjnej polifenoli, jak również wielkości cząsteczki.

Słowa kluczowe: gluten, kwasy fenolowe, FT-IR, FT-Raman, struktura drugorzędowa, struktura trzeciorzędowa, farinograf

Abstract

The growing interest of consumers in healthy food and its positive impact on the human body induces the introduction of health-promoting food products to the market. Wheat bread, as a basic element of the daily diet, plays an important role in human nutrition, and therefore can be considered as an appropriate carrier of valuable and health-promoting substances necessary for the human body. Currently, bread and other wheat products are made of refined flour, devoid of important nutrients, i.e. dietary fiber and polyphenolic compounds. The above-mentioned nutrients are included in the fiber preparations. The use of fiber preparations and their components for the supplementation of wheat bread can be considered as the waste management from cereal and/or fruit and vegetable production, which is in line with the policy of the European Union. Important components of fiber preparations are polyphenolic compounds that have strong antioxidant properties. Polyphenolic compounds can be added to the dough in the form of extracts or food colors. Understanding the basic mechanism of interaction of polyphenolic compounds with individual components of bread dough may in the future enable the creation of an appropriate technology for the production of bread that will be characterized by health-promoting properties and at the same time will have the quality desired by consumers.

The quality of bread is closely related to the structure of gluten proteins. The proteins' structure also affects the rheological properties of the dough. The research, concerning effects of the dietary fiber preparations on the structure of gluten proteins in wheat dough showed that the observed structural changes in these proteins are mainly related to the presence of polysaccharides. Therefore, studies were performed in which pure polysaccharides were used. The observed changes in the structure of gluten proteins did not fully coincide with the changes caused by the dietary fiber preparations. For this reason, the aim of the present research was to determine the effect of selected phenolic acids, differing in the amount and type of functional groups at the aromatic ring (cinnamic, caffeic, ferulic, chlorogenic, coumaric acid) as well as the size of the molecule (gallic, ellagic and tannic acid) on the structure of gluten proteins in the model and gluten dough. Moreover, the influence of these polyphenols on the rheological properties of the dough was investigated. The researches were carried out on model flour (wheat starch: wheat gluten in the proportion 80:15 w/w) and wheat gluten (without the presence of wheat starch) in order to eliminate the influence of other ingredients naturally present in wheat flour (dietary fiber, lipids, polyphenols) on obtained results. These studies were carried out using spectroscopic methods (Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and Raman spectroscopy (FT-Raman)) and the farinographic method.

The results of farinographic studies showed a change in the behavior of the dough in the presence of phenolic acids, which was regarded as a “*dough breakdown*”. This phenomenon was the fastest in the case of caffeic acid, and the slowest in the case of *p*-coumaric acid, which are characterized by the highest and the lowest antioxidant activity, respectively. Dough breakdown was also observed in the case of the benzoic acid series (gallic and ellagic acid). Only tannic acid (the largest molecule) showed a different behavior and stabilized the gluten network.

The results of spectroscopic studies showed that the changes observed in the structure of the gluten network as a result of the dough supplementation with phenolic acids depend on the number and type of functional groups present at the aromatic ring of the acids, their antioxidant activity, as well as molecular size.

Keywords: gluten, phenolic acids, FT-IR, FT-Raman, secondary structure, tertiary structure, farinograph

Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

Rozprawa doktorska oparta jest na cyklu czterech publikacji na temat „**Wpływ polifenolowych komponentów preparatów błonnikowych na strukturę białek glutenowych i właściwości reologiczne ciasta**”:

P.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>.

Czasopismo umieszczone na liście filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: 5.893; punktacja MNiSW: 140 punktów.

Indywidualny wkład: przygotowanie prób ciasta modelowego suplementowanego wybranymi kwasami fenolowymi z szeregu kwasu cynamonowego, wykonanie pomiarów widm z zastosowaniem spektroskopii FT-Ramana, przygotowanie wyników farinograficznych i spektroskopowych do analizy, analiza wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu oraz współudział w tworzeniu wersji ostatecznej. Mój udział oceniam na 60 %.

P.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.

Czasopismo umieszczone na liście filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: 3.340; punktacja MNiSW: 70 punktów.

Indywidualny wkład: przygotowanie prób ciasta modelowego suplementowanego wybranymi kwasami fenolowymi z szeregu kwasu benzoowego, wykonanie pomiarów widm z zastosowaniem spektroskopii FT-Ramana, przygotowanie wyników farinograficznych i spektroskopowych do analizy, analiza wyników, przygotowanie manuskryptu. Mój udział oceniam na 70 %.

P.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>.

Czasopismo umieszczone na liście filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: 2.938; punktacja MNiSW: 140 punktów.

Indywidualny wkład: przygotowanie prób ciasta modelowego suplementowanego wybranymi kwasami fenolowymi z szeregu kwasu cytrynowego oraz benzoowego, rejestracja widm FT-IR prób glutenu, przygotowanie wyników do analizy, analiza wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu oraz współudział w tworzeniu wersji ostatecznej. Mój udział oceniam na 60 %.

P.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>.

Czasopismo umieszczone na liście filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: 4.075; punktacja MNiSW: 140 punktów.

Indywidualny wkład: przygotowanie prób ciasta glutenowego suplementowanego wybranymi kwasami fenolowymi z szeregu kwasu cytrynowego oraz benzoowego, wykonanie pomiarów widm z zastosowaniem spektroskopii FT-Ramana oraz FT-IR, przygotowanie wyników spektroskopowych do analizy, analiza wyników, przygotowanie manuskryptu. Mój udział oceniam na 70 %.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	12
1.1 Gluten-charakterystyka	12
1.2 Struktura glutenu.....	12
1.3 Polifenole - podział i charakterystyka	14
1.4 Rodzaje oddziaływań białko – polifenol	16
2. CELE I HIPOTEZY BADAWCZE	20
3. METODYKA	21
3.1 Materiały.....	21
3.2 Przygotowanie ciasta modelowego.....	21
3.3 Przygotowanie ciasta glutenowego.....	23
3.4 Przygotowanie prób glutenu do badań spektroskopowych i biochemicznych	23
3.5 Metody pomiaru.....	23
3.5.1 Spektroskopia FT-Ramana.....	23
3.5.2 Spektroskopia FT-IR.....	24
3.6 Sposób przygotowania widm do analizy	25
3.7 Oznaczanie wolnych grup SH.....	26
3.8 Analizy statystyczne	26
4. OMÓWIENIE UZYSKANYCH WYNIKÓW BADAŃ	27
4.1 Publikacja P.1	27
4.2 Publikacja P.2	31
4.3 Publikacja P.3	33
4.4 Publikacja P.4	34
5. WNIOSKI	35
6. BIBLIOGRAFIA	37

Wykaz skrótów:

FT-IR: Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

FT-Raman: Spektroskopia Ramana z transformacją Fouriera

LMW: gluteniny o małej masie cząsteczkowej

HMW: gluteniny o dużej masie cząsteczkowej

SDS: dodecylosiarczan sodu

TRIS: (hydroksymetylo) aminometan

DTNB: kwas 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzoesowy)

CINA: kwas cynamonowy

CAFA: kwas kawowy

COUA: kwas kumarowy

CHLA: kwas chlorogenowy

FERA: kwas ferulowy

GALA: kwas galusowy

ELAA: kwas elagowy

TANA: kwas taninowy

EDTA: z *ang.* ethylenediaminetetraacetic acid

ANOVA: analiza wariancji

g-g-g: gauche-gauche-gauche

t-g-g: trans-gauche-gauche

t-g-t: trans-gauche-trans

TYR: tyrozyna

TD: dublet tyrozynowy

TRP: tryptofan

1. Wstęp

1.1 Gluten-charakterystyka

Gluten definiuje się jako lepko-sprężystą masę, która pozostaje po przemyciu ciasta pszennego 2% roztworem wodnym NaCl w celu usunięcia skrobi i składników mąki rozpuszczalnych w wodzie. W zależności od dokładności wymycia, sucha masa zawiera 75-85% białka i 5-10% skrobi (Grant i wsp., 1999). Na gluten pszenny składają się dwa rodzaje białek: gliadyny i gluteniny. Białka te są białkami zapasowymi pszenicy i odgrywają decydującą rolę w powstawaniu ciasta pszennego, jak również w procesie wypieku chleba. Gliadyny odpowiadają za lepkość i rozciągliwość ciasta pszennego, natomiast gluteniny za wytrzymałość i sprężystość ciasta (Wieser, 2007).

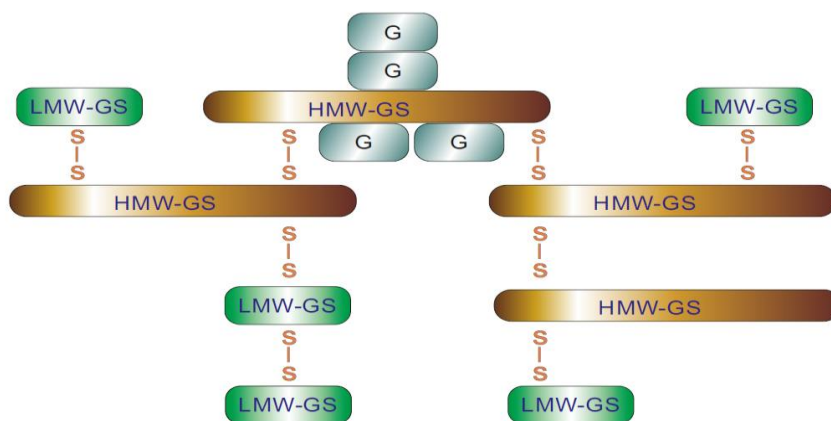
1.2 Struktura glutenu

Na poziomie cząsteczkowym gluten jest przestrzennie ciągłą siecią zbudowaną z łańcuchów polipeptydowych połączonych ze sobą za pomocą różnego rodzaju wiązań chemicznych, takich jak wiązania disiarczkowe, wodorowe czy oddziaływania hydrofobowe. Gluten tworzą dwie frakcje białek: rozpuszczalne w alkoholu gliadyny i nierozpuszczalne w alkoholu gluteniny (Vasil i Anderson, 1997).

Białka glutenowe charakteryzują się wysoką zawartością glutaminy (35%), glicyny (20%) i proliny (10%) oraz niską zawartością aminokwasów z grupami naładowanymi (Kłosok i wsp., 2021). Dodatkowo, w sekwencji aminokwasowej tych białek obecne jest około 2% cysteiny. Reszty cysteiny biorą udział w tworzeniu mostków disiarczkowych – wiązań chemicznych niezbędnych do utworzenia prawidłowej sieci glutenowej (Abedi i Pourmohammadi, 2020).

Gliadyny są białkami monomerycznymi, które w zależności od ruchliwości białka w niskim pH określonej za pomocą elektroforezy żelowej, podzielono na trzy grupy: α -/ β -, γ - i ω -gliadyny. α -/ β - i γ -gliadyny są podobne pod względem masy cząsteczkowej, która mieści się w przedziale 30-35 kDa. Frakcje te, dzięki obecności cysteiny w sekwencji aminokwasowej tworzą głównie wewnątrz-łańcuchowe wiązania disiarczkowe (S-S). Niektóre gliadyny mają nieparzystą liczbę cystein, co pozwala im na utworzenie międzycząsteczkowych wiązań disiarczkowych. Pełnią one także funkcję terminatora polimeryzacji gluteniny. ω -gliadyny nie zawierają cysteiny, dlatego też białka te nie tworzą mostków disiarczkowych. Masa cząsteczkowa ω -gliadyn wynosi 44-88 kDa (Kłosok i wsp., 2021).

Gluteniny są białkami polimerycznymi, a ich masa cząsteczkowa waha się od 500 kDa do 10 MDa. Gluteniny składają się z dwóch frakcji, które różnią się masą cząsteczkową – gluteniny o niskiej (LMW) i dużej masie cząsteczkowej (HMW). Gluteniny, ze względu na różną ruchliwość w polu elektrycznym, można podzielić na cztery podgrupy A, B, C i D. Grupę A stanowi frakcja glutenin HMW, natomiast frakcja LMW glutenin zaliczana jest do grupy B, C i D (Gianibelli i wsp., 2001). Do grupy B zaliczają się wyłącznie gluteniny LMW o masie cząsteczkowej 42-51 kDa, natomiast do grupy C oraz D oprócz glutenin LMW (30-40 kDa) zalicza się również α -, γ -gliadyny i ω -gliadyny. Podjednostki gluteninowe o małej masie cząsteczkowej (LMW) mają podobną sekwencję aminokwasową do gliadyn, dlatego też wykazują do nich silne powinowactwo. W przeciwieństwie do gliadyn, gluteniny LMW biorą udział w tworzeniu między-łańcuchowych wiązań S-S, które umożliwiają tworzenie rozgałęzionej sieci gluteninowej. Ponadto, wśród glutenin HMW wyróżnia się dwie podjednostki, x- i y-, różniące się masą cząsteczkową (83-88 kDa i 67-74 kDa) (Johansson i wsp., 2013).



Rys. 1. Uproszczony schemat przedstawiający strukturę glutenu, gdzie: HMW-GS- gluteniny wysokocząsteczkowe, LMW-GS -gluteniny niskocząsteczkowe, G-gliadyny, S-S- wiązanie disiarczkowe.

Gliadyny i gluteniny w trakcie procesu mieszenia ciasta oddziałują ze sobą w obecności wody poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych i niekowalencyjnych, tworząc sieć glutenową (Rys.1). Jednym z najważniejszych wiązań kowalencyjnych występujących w sieci glutenowej są mostki disiarczkowe, które powstają pomiędzy dwiema resztami cysteinowymi. Jak wspomniano powyżej, gliadyny tworzą głównie wewnątrz-łańcuchowe mostki disiarczkowe,

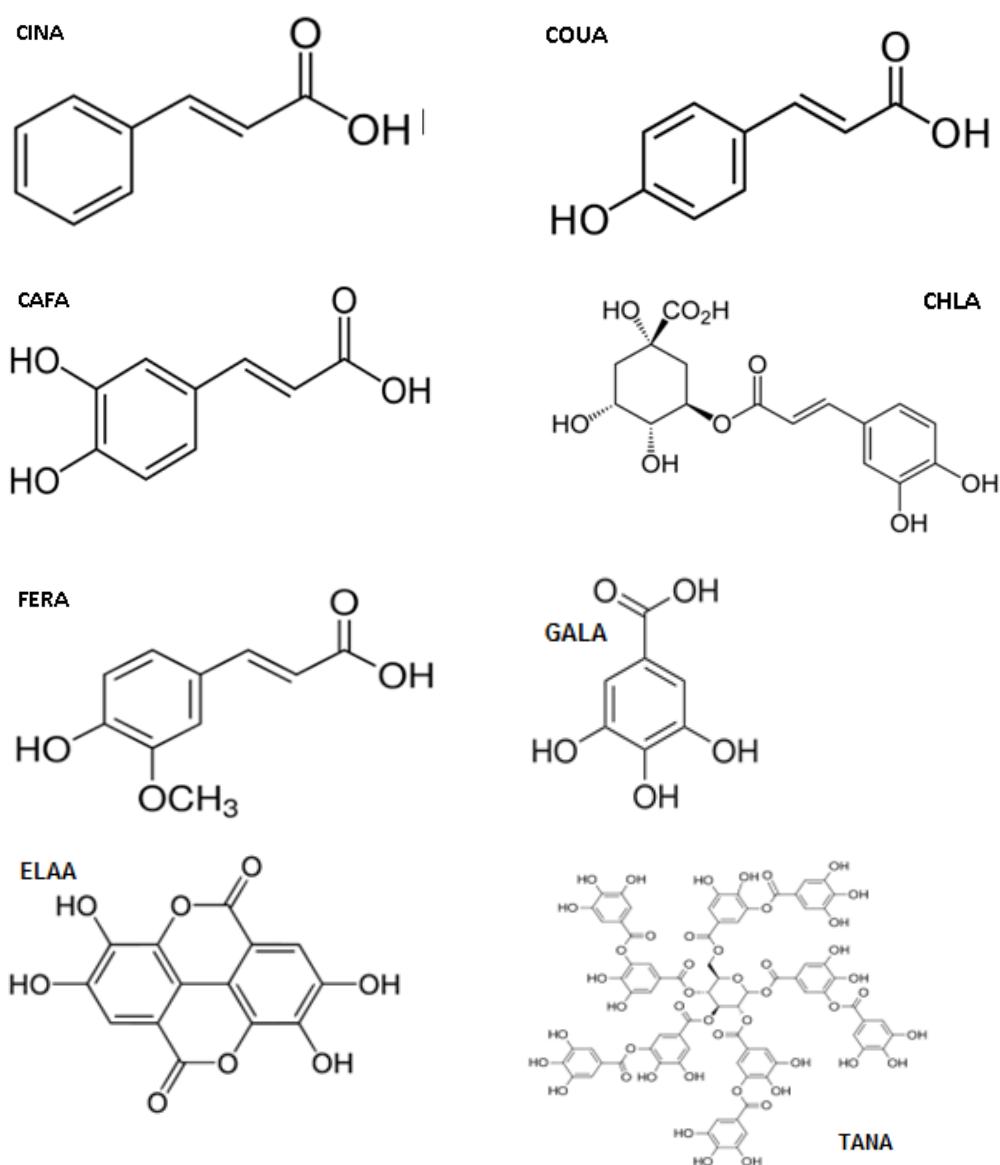
podczas gdy gluteniny uczestniczą w tworzeniu wewnątrz- i między-łańcuchowych wiązań S-S. Z tego powodu gliadyny z wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami S-S nie biorą udziału w wymianie SH-SS, która zachodzi podczas procesu miesienia ciasta. Wymiana SH-SS dotyczy tylko międzycząsteczkowych mostków disiarczkowych w gluteninach. Z tego względu obie podjednostki glutenin mogą pełnić rolę fragmentu wydłużającego łańcuch polipeptydowy (Shewry i wsp., 2002). Wśród innych wiązań kowalencyjnych tworzonych podczas miesienia ciasta można wyróżnić wiązania tyrozyna-tyrozyna pomiędzy łańcuchami polipeptydowymi glutenu oraz wiązania tworzone pomiędzy tyrozyną a kwasem dehydroferulowym i białkami glutenowymi a arabinoksylianami (Kłosok i wsp., 2021). Jednakże te dwa rodzaje wiązań powstają rzadko. Ponadto, sieć glutenowa powstaje również dzięki obecności oddziaływań niekowalencyjnych, takich jak wiązania wodorowe, jonowe, hydrofobowe i siły Van der Waalsa (Kłosok i wsp., 2021).

1.3 Polifenole - podział i charakterystyka

Polifenole są organicznymi związkami, które powszechnie występują w roślinach. Związki te są wtórnymi metabolitami roślinnymi, które wykazują korzystny wpływ na organizm człowieka (Upadhyay i Dixit, 2015). W swojej strukturze posiadają one przynajmniej jedną grupę hydroksylową (–OH), która determinuje ich właściwości antyoksydacyjne. Oprócz posiadania silnych właściwości przeciwutleniających, związki te mogą wpływać na cechy sensoryczne produktów spożywczych. Źródłem związków polifenolowych dla człowieka jest żywność pochodzenia roślinnego, głównie świeże owoce i warzywa, jak też przetworzone produkty roślinne: soki, wino czy herbata. Obecnie poznanych zostało około 8000 polifenoli (Cory i wsp., 2018). Wśród tej dużej grupy związków, na podstawie struktury podstawowego szkieletu węglowego, wyróżniono następujące grupy polifenoli: kwasy fenolowe, flawonoidy, stilbeny, lignany i ligniny (Rudrapal i wsp., 2022).

Kwasy fenolowe stanowią około jednej trzeciej wszystkich związków fenolowych. W swojej budowie posiadają przynajmniej jedną grupę hydroksylową oraz grupę karboksylową. W świecie roślin związki te występują jako pochodne kwasu cynamonowego oraz pochodne kwasu benzoowego. Do badań przedstawionych w niniejszej pracy wykorzystano kwasy fenolowe pochodzące z obydwu grup. Spośród pochodnych kwasu cynamonowego wybrano kwas cynamonowy, ferulowy, kawowy, kumarowy oraz chlorogenowy. Kwasy te różniły się między sobą ilością i rodzajem grup funkcyjnych przyłączonych do pierścienia aromatycznego. Kwas galusowy, elagowy oraz taninowy

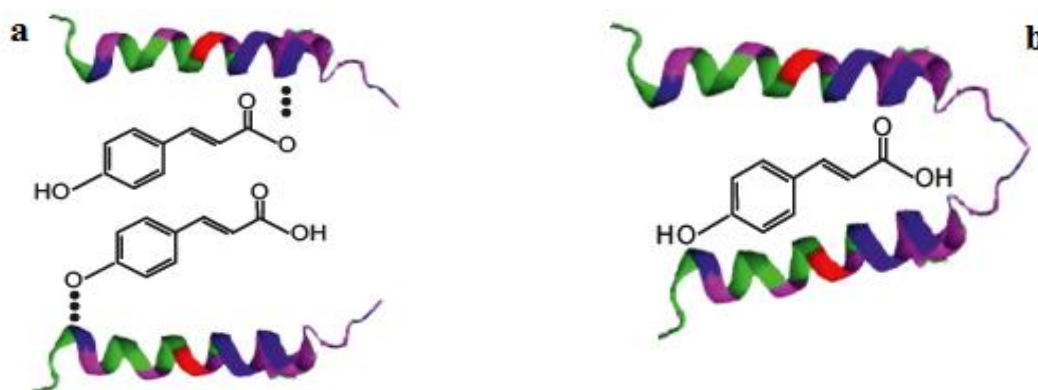
wybrano jako przedstawicieli pochodnych kwasu benzoowego. Kwasy te różniły się między sobą wielkością cząsteczki i liczbą grup hydroksylowych. Poniżej przedstawiono struktury tych kwasów (Rys. 2).



Rys. 2. Struktura wybranych do badań kwasów fenolowych: kwas cynamonowy (CINA), kwas kumarowy (COUA), kwas kawowy (CAFA), kwas chlorogenowy (CHLA), kwas ferulowy (FERA), kwas galusowy (GALA), kwas elagowy (ELAA), kwas taninowy (TANA).

1.4 Rodzaje oddziaływań białko – polifenol

Kwasy fenolowe oddziałują z białkami glutenowymi tworząc kompleksy. Prowadzi to do zmian strukturalnych i funkcjonalnych w obu związkach. Na interakcje pomiędzy kwasami fenolowymi a białkami wpływają różne czynniki, w tym temperatura, pH, rodzaj i stężenie białka, jak również struktura związków fenolowych (w tym rodzaj i ilość grup funkcyjnych przy pierścieniu aromatycznym) oraz ich masa cząsteczkowa. Polifenole mogą tworzyć z białkami wiązania odwracalne tj. wiązania wodorowe, hydrofobowe i siły Van der Waalsa oraz nieodwracalne (wiązania kowalencyjne) (Rys.3a). Mechanizm oddziaływań białko - polifenole może obejmować kilka faz. Pierwsza faza polega na utlenieniu związku fenolowego do ortochinonu. Następnie ortochinon tworzy wiązania kowalencyjne z łańcuchami bocznymi aminowymi (C-N) i/lub sulfhydryłowymi (C-S) polipeptydów (Ozdal i wsp., 2013). Zarówno oddziaływania kowalencyjne, jak i niekowalencyjne wpływają na strukturę chemiczną białek i związków fenolowych, które zmieniają również ich właściwości odżywcze, funkcjonalne i biologiczne (Yilmaz i wsp., 2022). Ponadto, związki fenolowe mogą być zamykane w kieszeniach hydrofobowych utworzonych przez białko, nie tworząc wtedy wiązań z łańcuchami polipeptydowymi (Rys. 3b) (Sivam i wsp., 2010).



Rys. 3. Schemat oddziaływań pomiędzy polifenolami a łańcuchami białkowymi, **a**- oddziaływania za pomocą wiązań odwracalnych, bądź nieodwracalnych, **b**- polifenol zamknięty w kieszeni hydrofobowej utworzonej przez białko.

Istnieją badania, które potwierdzają interakcje pomiędzy białkami glutenowymi a polifenolami. Sivam i wsp. (2013) badali interakcje pomiędzy białkami glutenowymi a pektynami i polifenolami ekstrahowanymi z jagód, z użyciem spektroskopii FT-IR oraz

FT-Ramana, w pieczywie modelowym i pszennym. W chlebie poddanym obróbce wzrosła ilość β -katektów kosztem zakrętów β , wzrosła również ilość struktur nieuporządkowanych, zwłaszcza w obecności polifenoli jagodowych. Welc i wsp. (2022a) badali zmiany w strukturze drugorzędowej i trzeciorzędowej białek glutenowych wywołane przez wybrane kwasy fenolowe z grupy kwasów hydroksycynamonowych i hydroksybenzoesowych. Badania z wykorzystaniem spektroskopii FT-Ramana pokazały, że badane kwasy fenolowe przyczyniają się do tworzenia nieuporządkowanych i zagregowanych struktur kosztem β -katektów czy zakrętów β . Analiza spektrofotometryczna wykazała, że kwasy hydroksycynamonowe oddziaływały silniej z białkami glutenowymi w porównaniu z kwasami hydroksybenzoesowymi. Jest to związane prawdopodobnie z obecnością dodatkowego łańcucha węglowodorowego z wiązaniem C=C w strukturze kwasu cynamonowego i jego pochodnych. Kwasy należące do grupy kwasów hydroksycynamonowych nie wbudowywały się lub wbudowywały się tylko częściowo w sieć glutenową poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych lub wodorowych. W innych badaniach Welc i wsp. (2022b) określali oddziaływania kwasów fenolowych z gliadynami z wykorzystaniem spektroskopii FT-IR oraz spektroskopii fluorescencyjnej. Jako modyfikatory gliadyn zastosowano kwas 4-hydroksybenzoesowy, protokatechowy, wanilinowy, syringowy, kumarowy, kawowy, ferulowy oraz synapowy. Wyniki badań wykazały, że kwasy hydroksybenzoesowe ze względu na swoje mniejsze rozmiary wbudowują się w przestrzeń międzyłańcuchowe gliadyn i tworzą z nimi wiązania wodorowe prowadząc do agregacji. Natomiast kwasy hydroksycynamonowe, ze względu na większą sztywność i rozmiar, rozdzielały łańcuchy polipeptydowe prowadząc do dezagregacji gliadyn. Interakcje białek z flawonoidami ekstrahowanymi ze skórki cebuli, jak również liści komosy ryżowej, która bogata jest we flawonoidy, badali Świeca i wsp. (2013, 2014). Wyniki uzyskane za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej pokazały zwiększenie pola powierzchni pików ekstraktów, uzyskanych po trawieniu pieczywa wzbogaconego w polifenole, które wyraźnie wskazywały na tworzenie się kompleksów białkowo-polifenolowych w wyniku interakcji pomiędzy tymi związkami. Taddei i wsp. (2013) wykorzystali spektroskopię Ramana do badań interakcji gliadyn z antocyjanami. Uzyskane przez nich wyniki pokazały, że badane antocyjany indukują w gliadynach zmiany konformacyjne. Obserwowano zmniejszenie ilości struktur nieuporządkowanych i jednocześnie tworzenie nowych wiązań wodorowych pomiędzy gliadynami a antocyjanami. Ponadto, zaobserwowano znaczące zmniejszenie ilości zakrętów β , zmniejszenie wartości dubletu tyrozynowego i ilości mostków disiarczkowych w stabilnej energetycznie konformacji (gauche-gauche-gauche). Zmiany te prowadziły do nieprawidłowego zwinania się lub agregacji

gliadyn. Zhang i wsp. (2021) za pomocą metod spektroskopowych analizowali wpływ kwasu chlorogenowego i luteoliny na gliadyny i gluteniny w pH 7. Kwas chlorogenowy powodował powstanie bardziej nieuporządkowanej struktury gliadyn i glutenin oraz zmniejszał hydrofobowość powierzchni tych białek. Huang i wsp. (2018) badali natomiast wpływ kwasu ferulowego na strukturę glutenu w cieście modelowym. Wzrost stężenia kwasu ferulowego z 1% do 4% powodował wzrost ilości α -helis i zakrętów β przy jednoczesnym zmniejszeniu zawartości β -kardtek i struktur nieuporządkowanych. Autorzy stwierdzili, że zmniejszenie zawartości β -kardtek kosztem zakrętów β może prowadzić do uszkodzenia sieci glutenowej. Feng i wsp. (2022) badali mechanizm interakcji pomiędzy kwasami fenolowymi występującymi naturalnie w zbóżach (kwasem galusowym, kawowym, syringowym i *p*-kumarowym) a białkami glutenowymi. Wyniki wykazały, że wybrane kwasy fenolowe oddziaływały z białkami glutenowymi poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych, jak również wiązań wodorowych, zmieniając tym samym strukturę glutenu. Dodatek kwasu kawowego, *p*-kumarowego oraz galusowego powodował zwiększenie zawartości struktur nieuporządkowanych w białkach glutenowych. Wyższa zawartość struktur nieuporządkowanych wskazuje na mniej uporządkowaną strukturę sieci glutenowej z mniejszą ilością wiązań wodorowych. Tworzenie się wiązań wodorowych w sieci glutenowej zostało prawdopodobnie zaburzone obecnością kwasów fenolowych. Autorzy obserwowali również zmniejszenie ilości β -kardtek pod wpływem kwasu syringowego, co mogło przyczynić się do rozerwania wiązań disiarczkowych a interakcja pomiędzy kwasem syringowym a białkami glutenowymi prowadzi do zmiany struktury łańcuchów peptydowych białka. Han i Koh (2011) badali wpływ kwasów fenolowych na fizyczne właściwości ciasta i chleba pszennego. Ich wyniki sugerowały, że podczas produkcji chleba białka pszenicy ulegają przeorganizowaniu, a kwasy fenolowe redukują podjednostki o dużej masie cząsteczkowej, co przyczynia się również do większej ekstrahowalności białek glutenowych. Ponadto Girard i Awika (2020) twierdzą, że monomeryczne polifenole (np. kwasy fenolowe) mogą skracać czas mieszenia ciasta i poprawiać elastyczność sieci glutenowej. Jednakże polifenole o dużej masie cząsteczkowej (taniny) mogą zwiększać wytrzymałość sieci glutenowej poprzez tworzenie wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofobowych z białkami. Ponadto Wang i wsp. (2015) podczas badań nad wpływem tanin na właściwości fizykochemiczne i strukturalne białek glutenowych wykazali, że związki te indukują powstawanie niekowalencyjnych oddziaływań z białkami glutenowymi. Ilość zakrętów β i α -helis uległa zwiększeniu, natomiast ilość β -kardtek w cieście zawierającym taniny obniżyła

się. Ponadto, dodatek tanin przyczyniał się do agregacji białek glutenowych, modyfikował mikrostrukturę sieci glutenowej, jednocześnie poprawiając właściwości reologiczne ciasta.

2. Cele i hipotezy badawcze

Rozprawa doktorska składa się z cyklu 4 publikacji, połączonych ze sobą tematycznie. Celem tych prac jest określenie wpływu polifenolowych komponentów preparatów błonnikowych (wybranych kwasów fenolowych) na strukturę białek glutenowych w dwóch rodzajach ciasta pszenne (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.

Dane literaturowe wskazują, że polifenole podczas procesu miesienia ciasta mogą ulegać reakcjom chemicznym. Świadczy o tym fakt, że pieczywo wzbogacone w polifenole charakteryzuje się wyższą aktywnością antyoksydacyjną w porównaniu z pieczywem niewzbogaconym w polifenole (Han i Koch, 2010). Dlatego też ważne jest określenie, z jakimi składnikami ciasta oddziałują polifenole oraz jaki jest mechanizm tych oddziaływań. Jednocześnie suplementacja ciasta wybranymi związkami fenolowymi może powodować obniżenie jego jakości, a co za tym idzie również jakości pieczywa. Dlatego też sformułowano następujące hipotezy badawcze:

- w procesie miesienia pszenne 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;
- kwasy fenolowe mogą być zamykane w kieszeniach hydrofobowych utworzonych przez łańcuchy polipeptydowe podczas miesienia ciasta;
- 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;
- kwasy fenolowe powodują agregację białek glutenowych.

3. Metodyka

3.1 Materiały

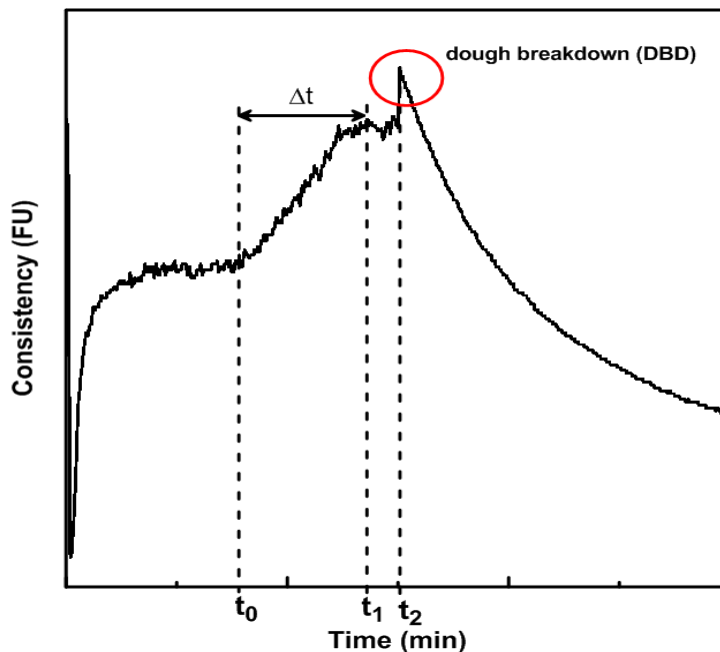
Do przeprowadzenia badań wykorzystano gluten pszenny, skrobię pszenną, chlorek sodu, kwas kumarowy (COUA), kwas ferulowy (FERA), kwas kawowy (CAFA), kwas galusowy (GALA), kwas elagowy (ELAA), kwas taninowy (TANA), tri(hydroksymetylo)aminometan (TRIS), glicynę, kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), dodecylosiarczan sodu (SDS), kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy (DTNB, odczynnik Ellmana). Związki te zakupiono w firmie Sigma Aldrich (Polska). Kwas cynamonowy (CINA) otrzymano od firmy Alfa Aesar (USA), a kwas chlorogenowy (CHLA) zakupiono od firmy Acros Organics (Polska). Używano także wody podwójnie destylowanej.

3.2 Przygotowanie ciasta modelowego

Głównym obiektem badawczym w publikacji P.1, P.2 i P.3 było ciasto modelowe. Ciasto modelowe przygotowywano z mąki modelowej, która została odtworzona z komercyjnie dostępnych skrobi pszennej i glutenu pszennego w stałej proporcji wagowej 80:15 (przy tej samej wilgotności 65%). Proporcje wagowe przyjęto na podstawie rzeczywistych średnich zawartości skrobi i glutenu w mące pszennej. Uproszczony skład mąki modelowej był celowy, ponieważ obecność natywnego błonnika pokarmowego oraz polifenoli w mące pszennej może zakłócić analizę otrzymanych wyników. 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. Z wymienionych wyżej składników przygotowano ciasto modelowe w farinografie (Brabender, Niemcy). Próby ciasta modelowego (ciasta kontrolnego) oraz ciasta suplementowanego wybranymi kwasami fenolowymi były przygotowane według nieznacznie zmodyfikowanej procedury standardowej ICC 115/1. Standardowy czas rejestracji farinogramów (20 min) w przypadku ciasta kontrolnego oraz ciasta suplementowanego kwasami fenolowymi (kwasem cynamonowym, kumarowym, kawowym, ferulowym, chlorogenowym i galusowym) wydłużono do 60 min. Czas mieszenia ciasta został wydłużony, ponieważ zaobserwowano dodatkowe piki na farinogramach suplementowanych próbek. Piki te związane są ze zjawiskiem rozpadu sieci glutenowej (*dough breakdown - DBD*). Przykładowy farinogram z pikiem DBD przedstawiono na Rys.3. Czas mieszenia ciasta suplementowanego kwasem elagowym wydłużono do 75 minut ze względu na późniejsze pojawienie się charakterystycznego piku na farinogramie (P.2 i P.3).

Dla tego kwasu przygotowano również ciasto kontrolne miesione 75 min. Czas miesienia ciasta z kwasem taninowym początkowo wydłużono do 120 minut (maksymalny możliwy czas rejestracji farinogramu). Jednakże pomimo wydłużenia czasu miesienia, dodatkowego piku na farinogramie związanego z DBD nie zarejestrowano. Z tego też względu dla ciasta z kwasem taninowym przyjęto czas miesienia 60 minut. Wszystkie próbki przygotowano w trzech powtórzeniach.

W kolejnym etapie badań próby ciasta suplementowanego wybranymi kwasami fenolowymi również przygotowano w farinografie. Jednakże miesienie ciasta zatrzymywano 4 minuty przed pojawieniem się piku związanego z DBD na farinogramach. Dla tych próbek przygotowano ciasto kontrolne (czas miesienia 30 minut). Wszystkie próbki przygotowano w trzech powtórzeniach.



Rys.3. Schemat przykładowego farinogramu ciasta modelowego suplementowanego kwasami fenolowymi.

3.3 Przygotowanie ciasta glutenowego

Ciasto glutenowe niesuplementowane (próbka kontrolna) oraz modyfikowane wybranymi kwasami fenolowymi (P.4) przygotowano w młynarce wibracyjnej SŻ-1 (Sadkiewicz Instruments, Bydgoszcz, Polska) według metody opisanej przez Nawrocką i wsp. (2016). Do 7 g komercyjnego glutenu dodawano wybrane kwasy fenolowe. Zawartość polifenoli wynosiła 0,05%, 0,1% i 0,2% w stosunku do masy mieszaniny gluten – kwas fenolowy (przy tej samej wilgotności - 65%). Próbki ciasta mieszano z 2% wodnym roztworem NaCl przez 3 min. Wszystkie próbki przygotowano w trzech powtórzeniach.

3.4 Przygotowanie prób glutenu do badań spektroskopowych i biochemicznych

Z prób ciasta modelowego i glutenowego wymyło gluten za pomocą aparatu Glutomatic 2200 (Perten Instruments, Szwecja). Następnie go zamrożono, liofilizowano przez 24 h i sproszkowano. Tak przygotowane próbki użyto do pomiarów FT-Ramana. Część sproszkowanego glutenu nawilżono 10% wodnym roztworem ciężkiej wody (D₂O) i wykonano pomiar z użyciem techniki FT-IR. D₂O użyto jako wzorca wewnętrznego, aby wyeliminować oscylacje pochodzące od cząsteczek wody z pasma amid I we wszystkich badanych próbkach. Nawilżanie za pomocą D₂O polegało na umieszczeniu zliofilizowanej, sproszkowanej próbki glutenu w eksykatorze, w którym umieszczone było naczynie z 20 ml roztworu D₂O na 4 godziny. Aby sprawdzić, czy próbki zostały nawilżone, próbki ważono przed i po nawilżaniu.

3.5 Metody pomiaru

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).

3.5.1 Spektroskopia FT-Ramana

Widma FT-Ramana były mierzone na module FT-Raman (NXR FT Raman) dla stanowiska FT-IR Nicolet 6700 przy użyciu detektora InGaAs i rozdzielacza wiązki CaF₂ (Thermo Scientific, Madison, WI, USA). W metodzie tej używano lasera Nd:YAG o długości fali światła $\lambda=1064$ nm. Maksymalna moc lasera wynosiła 1 W. Widma były rejestrowane

w zakresie 150 - 3500 cm^{-1} , a każde widmo było średnią 256 skanów przy rozdzielczości 8 cm^{-1} . Otrzymane widma uśredniano z pięciu zarejestrowanych widm. Dla uzyskanych widm wykonano korekcję linii bazowej, a następnie widma te normalizowano względem pasma fenyloalaniny przy 1003 cm^{-1} , przy użyciu programu ORIGIN (wersja 9.0 PRO, OriginLab Corporation, USA). Widma FT-Ramana dają informacje dotyczące struktury drugorzędowej białek poprzez analizę pasma amid I (1570-1720 cm^{-1}) oraz struktury trzeciorzędowej poprzez analizę pasma związanego z konformacjami mostków disiarczkowych (490-550 cm^{-1}), pasm związanych z mikrośrodowiskiem dwóch aminokwasów aromatycznych: tyrozyny (dublet tyrozynowy (I(850)/I(830)) oraz tryptofanu (I(760)).

Na podstawie literatury w obszarze pasma amid I wyodrębniono następujące struktury: α -helisa - 1650-1660 cm^{-1} , β -kartki - 1619-1633 cm^{-1} , antyrównoległe β -kartki - 1675-1695 cm^{-1} , zakręty β - 1666-1677 cm^{-1} , pseudo β -kartki - 1610-1625 cm^{-1} , uwodnione β -kartki - 1606-1607 cm^{-1} , związane wiązaniami wodorowymi antyrównoległe β -kartki - 1680 cm^{-1} , związane wiązaniami wodorowymi β -kartki - 1682 cm^{-1} , związane wiązaniami wodorowymi zakręty β - 1646, 1656 cm^{-1} (Nawrocka i wsp., 2017, Linlaud i wsp., 2011, Tozzi i wsp., 2013).

3.5.2 Spektroskopia FT-IR

Widma FT-IR rejestrowano za pomocą spektrometru Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, USA) wyposażonego w diamentową przystawkę odbiciową (Attenuated Total Reflection – ATR). Widma były rejestrowane w zakresie 400-4000 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1} a każde widmo było średnią 128 skanów. Otrzymane widma uśredniano z pięciu zarejestrowanych widm. Dla uzyskanych widm wykonano korekcję linii bazowej, a następnie widma te normalizowano względem pasma ciężkiej wody na 2485 cm^{-1} , przy użyciu programu ORIGIN (wersja 9.0 PRO, OriginLab Corporation, USA). Widma FT-IR dają informację na temat struktury drugorzędowej białek poprzez analizę pasma amid I (1570-1720 cm^{-1}) oraz pasma amid III (1200-1340 cm^{-1}). Ponadto metoda ta umożliwia badanie populacji wody poprzez analizę pasma związanego z drganiami rozciągającymi grup OH (2800-4000 cm^{-1}). Przygotowanie zarejestrowanych widm do analizy wykonano w programie ORIGIN (v.9.0 PRO, OriginLab Corporation, USA). W celu określenia zmian w strukturze drugorzędowej białek glutenowych wyliczono widma różnicowe.

Na podstawie literatury w paśmie amid I odpowiednim przedziałom spektralnym przypisano występowanie poszczególnych struktur drugorzędowych białek: α -helisa - 1649-1655 cm^{-1} , β -kartki - 1680-1687 cm^{-1} , antyrównoległe β -kartki - 1629-1632 cm^{-1} ,

zakręty β - 1666-1677 cm^{-1} . Dodatkowo struktury zagregowane w paśmie amid I przyporządkowano następującym przedziałom spektralnym: pseudo β -kartki - 1613-1615 cm^{-1} , α -helisa związana wiązaniami wodorowymi z cząsteczkami wody - 1648-1651 cm^{-1} , uwodnione β -kartki - 1600-1630 cm^{-1} , związane wiązaniami wodorowymi antyrównoległe β -kartki - 1627, 1690 cm^{-1} , związane wiązaniami wodorowymi β -kartki - 1680-1695 cm^{-1} , związane wiązaniami wodorowymi zakręty β - 1643 cm^{-1} (Secundo i Guerrieri, 2005, Pezolet i wsp., 1992, Georget i Belton, 2006).

Pasmo amid III natomiast zostało podzielone na cztery regiony spektralne, którym przypisano następujące rodzaje struktur drugorzędowych: β -kartki (1200-1250 cm^{-1}), struktury nieuporządkowane (1250-1270 cm^{-1}), zakręty β (1270-1295 cm^{-1}), oraz α -helisy (1295-1330 cm^{-1}) (Cai i Singh, 1999).

3.6 Sposób przygotowania widm do analizy

Do analizy struktury drugorzędowej białek glutenowych użyto dwóch rodzajów widm różnicowych. Pierwszy rodzaj widm różnicowych (normalny) wyliczono poprzez odjęcie widma próbki kontrolnej od widma mieszaniny gluten-kwas fenolowy. Widma były normalizowane polem powierzchni pod pasmem amid I (P.1, P.2, P.3, P.4) oraz amid III (P.3 i P.4). W ten sposób otrzymano pierwsze widmo różnicowe. Dodatkowo dla kwasu cynamonowego, kumarowego oraz chlorogenowego (P.1) liczone drugie widmo różnicowe. Drugie widmo różnicowe w przypadku tych kwasów wyliczono, ponieważ na pierwszym widmie różnicowym obserwowano pasma charakterystyczne dla tych kwasów. Obliczenia polegały na odjęciu od pierwszego widma różnicowego widma czystego kwasu. Pierwsze widmo różnicowe oraz widmo czystego kwasu były normalizowane intensywnością pasma charakterystycznego dla czystego kwasu fenolowego.

W przypadku publikacji P.1, P.2, P.3 liczone również drugi rodzaj widm różnicowych. Ten rodzaj widm otrzymano poprzez odjęcie "widma po rozpadzie ciasta" od widma "przed rozpadem ciasta (DBD)" przy tym samym stężeniu kwasu fenolowego. W przypadku próbek zmodyfikowanych kwasem taninowym, ten rodzaj widm nie był liczony.

3.7 Oznaczanie wolnych grup SH

Zawartość wolnych grup SH oznaczano stosując metodę spektroskopową opracowaną przez Beveridge i wsp. (1974) z niewielkimi modyfikacjami. 40 mg próbki dodawano do 4 ml buforu TGE + SDS (10,4 g Tris, 6,9 g glicyny, 1,2 g EDTA i 2,5 g SDS na litr wody). Próbka była inkubowana przez 30 min w temperaturze 25 °C. Następnie odwirowano ją przy 5000×g i 4 °C przez 10 min, aby uzyskać supernatant. Do supernatantu dodawano 40 µl odczynnika Ellmana i inkubowano przez 30 min w 25 °C. Odczynnik Elmana (20 mg) rozpuszczono w 5 ml TGE.

Absorbancję supernatantu z odczynnikiem Ellmana mierzono przy długości fali 412 nm z użyciem spektrofotometru (Cary 300/Biomelt, Varian Pty, USA). Zawartość wolnych grup SH obliczono według wzoru:

$$C_{SH}=73,53 \times A_{412} \times D/C_g$$

gdzie: 73,53 to wartość współczynnika ekstynkcji, A_{412} to absorbancja przy długości fali 412 nm, D to rozcieńczenie supernatantu, a C_g to stężenie próbki glutenu suplementowanej poszczególnymi kwasami fenolowymi. Wszystkie próbki mierzono w trzech powtórzeniach.

3.8 Analizy statystyczne

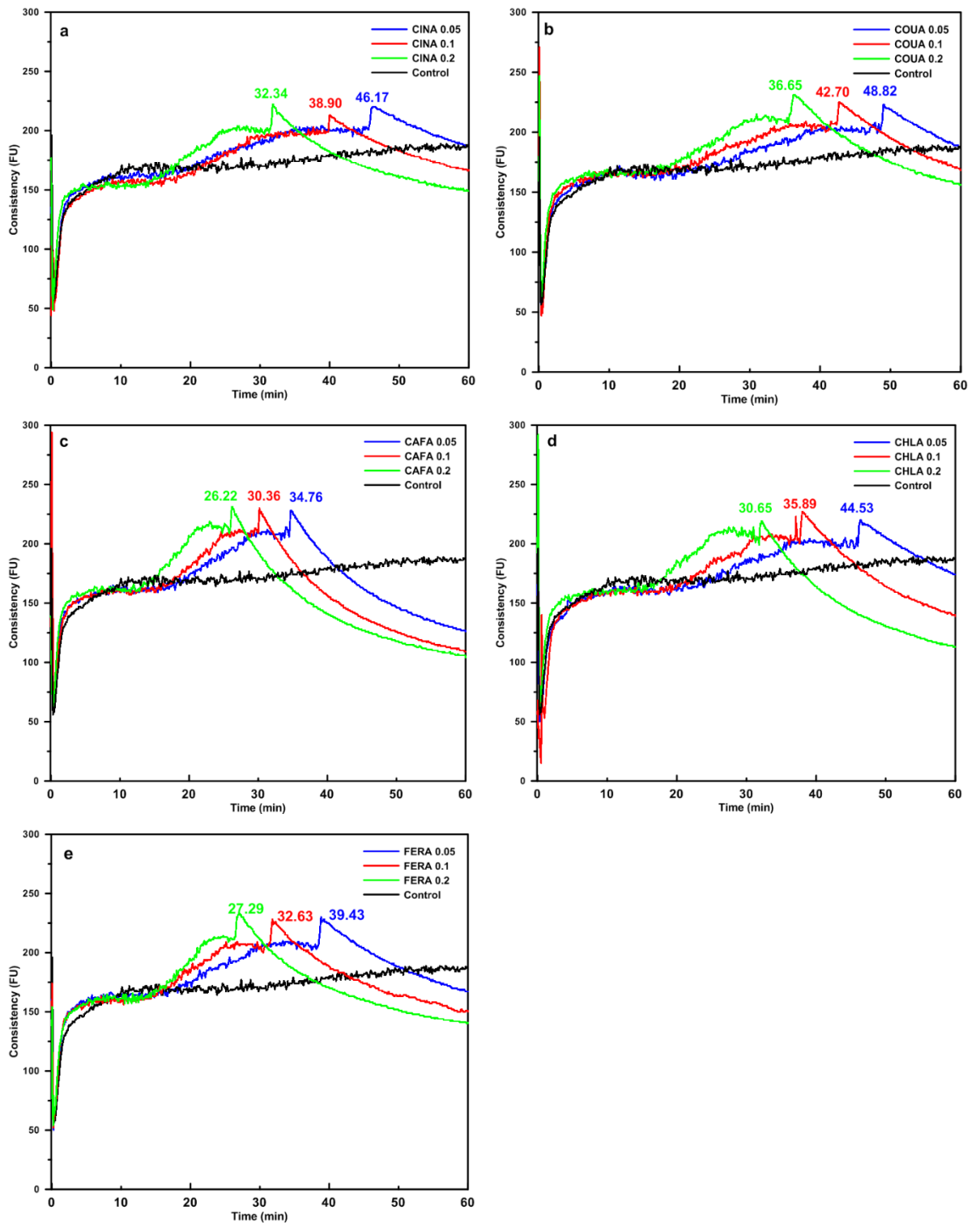
Dla wszystkich badań w przedstawionych w publikacjach P.1, P.2, P.3, P.4 przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA), a następnie test Tukey'a ($\alpha=0,05$). We wszystkich tabelach wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi z trzech powtórzeń.

4. Omówienie uzyskanych wyników badań

4.1 Publikacja P.1 (Effect of cinnamic acid and its derivatives on structure of gluten proteins – A study on model dough with application of FT-Raman spectroscopy)

W publikacji P.1 przedstawiono wpływ pięciu kwasów fenolowych (kwasu cynamonowego, *p*-kumarowego, kawowego, ferulowego i chlorogenowego) na właściwości reologiczne modelowego ciasta pszennego oraz strukturę drugo- i trzeciorzędową białek glutenowych. Głównym celem badań prezentowanych w publikacji P.1 było określenie zmian w strukturze drugo- i trzeciorzędowej glutenu indukowanych kwasami fenolowymi przy użyciu spektroskopii FT-Ramana. Wybrane do badań polifenole różniły się ilością i rodzajem grup funkcyjnych obecnych przy pierścieniu aromatycznym.

Wyniki badań farinograficznych pokazały zmianę zachowania ciasta w obecności wyżej wymienionych kwasów fenolowych, co uznano za rozpad ciasta (*dough breakdown-DBD*). Zjawisko to zachodziło najszybciej w cieście suplementowanym kwasem kawowym a najwolniej w cieście suplementowanym kwasem *p*-kumarowym. Kwasy te charakteryzowały się odpowiednio najwyższą i najniższą aktywnością antyoksydacyjną spośród wybranych polifenoli. Na farinogramach wyszczególniono trzy etapy. W pierwszym etapie miesienia od 0 do t_0 (Rys.4) kwasy fenolowe nie powodowały istotnych zmian w konsystencji ciasta w porównaniu z kontrolą. Na podstawie tej obserwacji wnioskowano, że kwasy fenolowe nie konkurują o wodę z białkami glutenowymi a ich reaktywność chemiczna jest zahamowana. Po czasie t_0 następowało chemiczne uaktywnienie kwasów, co na farinogramie obserwowano jako wzrost konsystencji ciasta w porównaniu z kontrolą. Wzrost zawartości kwasów przyspieszał dynamikę wzrostu konsystencji ciasta a czas trwania drugiego etapu znacznie się skracał. Trzeci etap ($t > t_1$) rozpoczyna się w momencie, gdy kwas fenolowy przestaje oddziaływać ze składnikami ciasta i zaczyna dominować destrukcja mechaniczna sieci glutenowej wywołana dalszym miesieniem ciasta.



Rys.4. Zmiany konsystencji ciasta podczas mieszania (farinogramy) po suplementacji ciasta modelowego kwasami fenolowymi: kwasem cynamonowym (CINA), kwasem kumarowym (COUA), kwasem kawowym (CAFA), kwasem chlorogenowym (CHLA), kwasem ferulowym (FERA).

W dalszej części badań analizowano dwa rodzaje próbek, które pobrano tuż przed jego rozpadem (DBD) oraz z ciasta miesionego 60 min ('po rozpadzie ciasta'). Odejmując od siebie te widma otrzymano widma różnicowe drugiego typu (patrz rozdział 3.6). Analiza tych widm różnicowych dla prób kontrolnych wykazała, że w wyniku nadmiernego miesienia ciasta powstała większa ilość agregatów, β -katektów i struktur nieuporządkowanych, podczas gdy próbka kontrolna pobrana przed rozpadem zawierała więcej zakrętów β i antyrównoległych- β katektów z wiązaniami wodorowymi lub bez. Podobne widma różnicowe obliczono dla wszystkich prób gluten - kwas fenolowy przy tym samym stężeniu kwasu. Analiza tych widm pokazała, że charakteryzują się one podobnym układem pasm dla wszystkich badanych kwasów z wyjątkiem kwasu kumarowego. Na widmie kwasu kumarowego obserwowano jego dwa charakterystyczne pasma przy 1606 i 1634 cm^{-1} w paśmie amid I. Obecność tych dwóch pasm oraz wzrost ich intensywności wraz ze wzrostem stężenia kwasu wskazuje, że nie jest on usuwany z ciasta modelowego podczas procesu wymywania w przypadku próbek pobranych przed rozpadem ciasta (DBD). Brak przesunięcia tych pasm może wskazywać, że kwas kumarowy nie jest wbudowywany w sieć glutenową ale może być zamykany w kieszeni hydrofobowej utworzonej przez białko. Ponadto, analiza widm glutenu suplementowanego kwasami fenolowymi pokazała, że kwasy te oddziałują z siecią glutenu m.in. poprzez tworzenie wiązań wodorowych.

Analiza pierwszego typu widm różnicowych dla próbek glutenu modyfikowanego kwasem cynamonowym, kumarowym oraz chlorogenowym pokazała, że dodatek tych kwasów powodował tworzenie agregatów, β -katektów oraz zakrętów β z wiązaniami wodorowymi. Kwasy kawowy i ferulowy natomiast przyczyniały się do powstawania pasm związanych z agregatami, uwodnionymi β -katektami oraz β -katektami. Dodatkowo w przypadku tych kwasów pojawiały się pasma, które mogłyby świadczyć o możliwości wbudowywania się tych kwasów w sieć glutenową za pomocą wiązań kowalencyjnych lub wodorowych.

Analiza regionu spektralnego związanego z drganiami rozciągającymi wiązań S-S próbek kontrolnych pokazała, że zwiększanie czasu miesienia do 60 min prowadziło do wzrostu ilości mostków disiarczkowych w konformacji t-g-t kosztem konformacji g-g-g i t-g-g. Wskazuje to, że długie miesienie ciasta (overmixing) może prowadzić do powstania słabszej sieci glutenowej. Analiza wyników związanych z modyfikowanymi próbkami glutenu pobranymi przed rozpadem ciasta pokazała, że dodatek kwasu cynamonowego, kawowego i chlorogenowego powoduje zmniejszenie liczby wiązań S-S w konformacji g-g-g (najbardziej stabilnej energetycznie) w porównaniu z próbą kontrolną. Liczba mostków disiarczkowych w tej konformacji nie zmieniała się dla kwasu ferulowego, a nieznacznie wzrastała w obecności

kwasu kumarowego. Dla próbek glutenu modyfikowanych kwasami kumarowym i ferulowym, pobranych po rozpadzie ciasta obserwowano wzrost ilości wiązań S-S w konformacji g-g-g w porównaniu do próbki kontrolnej. Generalnie, suplementacja ciasta modelowego kwasami fenolowymi powoduje zmiany w strukturze trzeciorzędowej sieci glutenowej. Uzyskane wyniki mogą sugerować wbudowywanie się kwasów fenolowych w sieć glutenową, ale także obecność kwasów fenolowych w kieszeniach hydrofobowych. W obu przypadkach cząsteczki kwasów fenolowych zmieniają przestrzenne ułożenie łańcuchów polipeptydowych.

Obecność kwasów fenolowych w próbkach pobranych 'po rozpadzie ciasta' spowodowała wzrost zawartości grup SH, co wskazywało na redukcję wiązań disiarczkowych. Największy wzrost wolnych grup SH zaobserwowano w przypadku próbki z kwasem kawowym. Redukcja wiązań disiarczkowych może być związana z nadmiernym mieszaniem i rozpadem ciasta, a także z obecnością kwasów fenolowych, które mogą redukować te wiązania.

Badania mikrośrodowiska aminokwasów aromatycznych tyrozyny i tryptofanu pokazały, że reszty tyrozyny nie uczestniczą w tworzeniu nowych wiązań wodorowych, ponieważ wartość dubletu tyrozynowego nie ulegała zmianie po zastosowaniu kwasów fenolowych. Natomiast niektóre kwasy fenolowe wpływały na mikrośrodowisko tryptofanu. Intensywność pasma tryptofanu nie zmieniała się dla próbek z kwasem kawowym i chlorogenowym a rosła dla próbek z kwasem cytrynowym, kumarowym i ferulowym, które pobrano przed rozpadem ciasta. Wzrost intensywności pasma tryptofanu wskazuje na chowanie się reszt tego aminokwasu w środowisku hydrofobowym (wewnątrz kompleksu białkowego). W przypadku próbek po rozpadzie ciasta, dodatek kwasów fenolowych powodował wzrost intensywności pasma tryptofanu niezależnie od rodzaju użytego kwasu. Wyniki te wskazują, że reszty tryptofanu są bardziej wrażliwe na obecność kwasów fenolowych niż reszty tyrozyny. Ponadto zmiany w środowisku tryptofanu dla próbek 'przed rozpadem ciasta' obserwowano dla kwasów fenolowych charakteryzujących się niższą aktywnością antyoksydacyjną. Natomiast największe zmiany intensywności pasma tryptofanu dla próbek "po rozpadzie ciasta" zaobserwowano dla kwasów fenolowych o najwyższej aktywności antyoksydacyjnej (kwasu kawowego i chlorogenowego). Obecność silnych antyoksydantów prowadziła do lokowania się reszt tryptofanu wewnątrz kompleksu białkowego.

4.2 Publikacja P.2 (Effect of a polyphenol molecular size on the gluten proteins – polyphenols interactions studied with FT-Raman spectroscopy)

Publikacja P.2 prezentuje wpływ polifenoli, zróżnicowanych pod względem wielkości (kwas galusowy, elagowy, taninowy) na strukturę sieci glutenowej. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem spektroskopii FT-Ramana.

Z przeprowadzonych badań wynika, że zmiany strukturalne, jakie obserwuje się po suplementacji ciasta wyżej wymienionymi polifenolami, zależą nie tylko od liczby i rodzaju grup funkcyjnych obecnych przy pierścieniu aromatycznym kwasu fenolowego i aktywności antyoksydacyjnej, ale także od wielkości cząsteczki. Wyniki badań farinograficznych pokazały, że czas pojawienia się pików związanych z rozpadem ciasta wydłuża się wraz ze wzrostem wielkości cząsteczki badanego polifenolu. W przypadku największej cząsteczki (kwas taninowy) nie zaobserwowano pików związanych z rozpadem ciasta. Kwas ten przyczyniał się do stabilizacji sieci glutenowej. Analiza wyników badań spektroskopowych wskazuje, że polifenole mogą oddziaływać z białkami glutenowymi poprzez tworzenie kowalencyjnych lub wodorowych wiązań pomiędzy grupami SH białka a grupami OH polifenolu. Ponadto, obecność polifenoli w sieci glutenowej nie wpływała na tworzenie wiązań wodorowych z tyrozyną. W przeciwieństwie do tyrozyny, mikrośrodowisko tryptofanu zmieniało się znacząco na bardziej hydrofobowe w wyniku suplementacji polifenolami. Może to świadczyć o tworzeniu się bardziej uporządkowanej struktury i zwijaniu się łańcuchów polipeptydowych.

Podobnie jak w przypadku kwasów z szeregu kwasu cytrynowego (P.1), dla kwasu galusowego i elagowego, liczone dwa rodzaje widm różnicowych (patrz rozdział 3.6). Drugi rodzaj widma nie był liczony dla kwasu taninowego, ponieważ na widmie tego kwasu nie zaobserwowano momentu rozpadu ciasta (*dough breakdown*). Analiza widm różnicowych prób suplementowanych kwasem galusowym pokazała, że na widmie próbki przed rozpadem ciasta obecne są głównie pasma odpowiadające podstawowym strukturalnym drugorzędowym (α -helisom, β -kartkom oraz zakrętom β). Obecność struktur niezagregowanych wskazywała na to, że kwas galusowy może częściowo chronić białka glutenowe przed agregacją. Natomiast wzrost stężenia tego kwasu fenolowego w próbce prowadził do zwiększenia zawartości tych struktur. Natomiast zmiany strukturalne obserwowane na widmach prób z kwasem elagowym w niewielkim stopniu zależały od stężenia tego kwasu fenolowego. Jediną strukturą, która zmienia się wraz ze stężeniem kwasu elagowego w próbce były struktury α -helisy. Ich zawartość zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia kwasu, co wskazuje na to, że obecne w

próbkach „przed rozpadem ciasta” α -helisy mogą uczestniczyć w tworzeniu struktur zagregowanych.

Analiza pierwszego typu widm różnicowych w paśmie amid I sugeruje, że zmiany strukturalne dotyczą głównie gliadyn, gdyż na wszystkich widmach obserwowano silne negatywne pasmo odpowiadające α -helisom. Obecność tego negatywnego pasma sugeruje, że struktura gliadyny może być zaburzona przez badane związki, ponieważ α -helisy są uważane za główną strukturę drugorzędową w gliadynach. Ponadto, na widmach obserwowano także negatywne pasma, związane z antyrównoległymi β -kartkami. Obecność tych pasm wskazywała, że zarówno obecność polifenoli, jak i nadmierne mieszanie może prowadzić do zaburzenia ciągłości i stabilności sieci glutenowej.

4.3 Publikacja P.3 (Molecular interactions between gluten network and phenolic acids studied during overmixing process with application of FT-IR spectroscopy)

W publikacji P.3, przy użyciu spektroskopii w podczerwieni (FT-IR), badano zmiany w strukturze drugorzędowej oraz populacjach wody spowodowane suplementacją ciasta modelowego wybranymi kwasami fenolowymi różniącymi się liczbą i rodzajem grup funkcyjnych (kwasu cynamonowego, *p*-kumarowego, kawowego, ferulowego i chlorogenowego), jak również wielkością cząsteczki (kwas galusowy, elagowy, taninowy). Dodatkowo określono wpływ nadmiernego miesienia ciasta na strukturę białek glutenowych.

Uzyskane wyniki wykazały, że wydłużenie czasu miesienia do 75 minut spowodowało powstanie agregatów, rozerwanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w sieci glutenowej oraz rozerwanie silnych wiązań wodorowych pomiędzy białkami glutenu a cząsteczkami wody. Te silne wiązania wodorowe uważa się za niezbędne do uzyskania sieci glutenowej charakteryzującej się odpowiednią strukturą i właściwościami mechanicznymi. Wskazuje to, że nadmierne mieszanie powoduje stopniową mechaniczną destrukcję sieci glutenowej, która dotyczyła głównie glutenin. Suplementacja ciasta modelowego kwasami fenolowymi prowadziła w większości przypadków do rozpadu ciasta. Jedynym związkiem, dla którego nie obserwowano rozpadu ciasta, był kwas taninowy. Obserwowane zmiany strukturalne w sieci glutenowej sugerują, że rozpad ciasta może być wynikiem blokowania grup -SH niezbędnych do międzycząsteczkowej wymiany SH - SS podczas procesu miesienia ciasta. Depolimeryzacja sieci glutenowej związana z procesem miesienia nie jest kompensowana przez odbudowę międzycząsteczkowych wiązań disiarczkowych. Zatem rozpad ciasta można uznać za natychmiastowe zniszczenie sieci glutenowej. Dodatkowo wyniki prób glutenu "przed rozpadem ciasta" wskazują, że kwasy fenolowe z grupy kwasów cynamonowych i z grupy kwasów galusowych w różny sposób oddziaływały z siecią glutenową. Prawdopodobnie kwasy fenolowe z grupy kwasu cynamonowego wbudowywały się w sieć glutenową tworząc wiązania wodorowe, natomiast kwasy z grupy kwasu galusowego zamykały się w kieszeniach hydrofobowych lub w niewielkim stopniu oddziaływały z siecią glutenową. Wyniki dotyczące populacji wody wykazały, że grupa pochodnych kwasu cynamonowego nie konkurowała o wodę z białkami glutenowymi, ponieważ prawdopodobnie nie posiadała wystarczającej liczby grup hydroksylowych, które mogłyby oddziaływać z cząsteczkami wody podczas miesienia ciasta. Odwrotne zachowanie wykazywały pochodne kwasu galusowego.

4.4 Publikacja P.4 (Wpływ wybranych polifenoli na strukturę glutenu - badanie ciasta glutenowego z zastosowaniem spektroskopii FT-IR i FT-Ramana)

W publikacji P.4 badano interakcje wybranych kwasów fenolowych, pochodnych kwasu cytrynowego (kwas cytrynowy, kawowy, kumarowy, ferulowy, chlorogenowy) oraz benzooesowego (kwas galusowy, elagowy i taninowy), z białkami glutenowymi w cieście glutenowym (bez obecności skrobi pszennej). Interakcje te badano przy użyciu dwóch komplementarnych metod, spektroskopii FT-IR oraz FT-Ramana.

Wyniki uzyskane za pomocą metod spektroskopowych wykazały, że suplementacja ciasta glutenowego kwasami fenolowymi powoduje zmiany w strukturze białek glutenowych. Na widmie próbki modyfikowanej kwasem cytrynowym widoczne było dodatkowo pasmo związane z agregatami (1600 cm^{-1}). W przypadku próbek suplementowanych kwasem kawowym, kumarowym, ferulowym, galusowym, elagowym i taninowym pasmo to było ujemne, natomiast obecne było dodatkowo pasmo związane z antyrównoległymi β -karkami (1693 cm^{-1}), co również wskazuje na agregację białek. Kwas cytrynowy jest cząsteczką, która w przeciwieństwie do innych kwasów fenolowych nie posiada żadnej grupy funkcyjnej przyłączonej do pierścienia aromatycznego. Dlatego też powoduje inne zmiany w strukturze białek glutenowych. Może być on wbudowywany w sieć glutenową lub zamykany w kieszeniach hydrofobowych tworzonych przez białko. W przypadku wszystkich kwasów fenolowych obserwowane zmiany dotyczą głównie struktur β , które są strukturami dominującymi dla glutenin. Dodatkowo, badania spektroskopowe próbek z kwasem chlorogenowym wykazały obecność pasm związanych ze strukturą α -helisy (1313 i 1648 cm^{-1}), co może wskazywać, że kwas ten oddziałuje również z gliadynami. Nieco inny sposób oddziaływania kwasu chlorogenowego z białkami glutenowymi jest prawdopodobnie spowodowany obecnością cząsteczki kwasu chinowego w strukturze tego polifenolu. Ponadto, obserwowany niewielki wzrost ilości wiązań disiarczkowych w konformacji g-g-g w obecności kwasu galusowego, elagowego i taninowego może wskazywać, że kwasy te mogą zapobiegać przekształcaniu się wiązań disiarczkowych w konformacje mniej stabilne energetycznie. Wszystkie badane polifenole zwiększały intensywność pasma tryptofanu i zmieniały środowisko tego aminokwasu na bardziej hydrofobowe. Może to świadczyć o tworzeniu bardziej uporządkowanej struktury i związaniu się łańcuchów polipeptydowych.

5. Wnioski

Przedstawione w niniejszej pracy hipotezy badawcze zostały potwierdzone przy pomocy przedstawionych wyników badań i opublikowane w czasopismach. Na podstawie tych badań sformułowano następujące wnioski:

1. W procesie miesienia pszennego ciasta modelowego/glutenowego kwasy fenolowe tworzą kompleksy z białkami glutenowymi poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych, wodorowych oraz hydrofobowych.
2. Kwasy fenolowe z grupy kwasu cyjanonowego wbudowywały się w sieć glutenową tworząc wiązania wodorowe, natomiast kwasy z grupy kwasu benzoowego zamykały się w kieszeniach hydrofobowych lub w niewielkim stopniu oddziaływały z siecią glutenową.
3. Obserwowane zmiany w strukturze drugorzędowej białek mogą dotyczyć zarówno gliadyn jak i glutenin, ponieważ obserwowano zmiany w pasmie związanym ze strukturą α -helisy oraz w strukturach β . α -helisy uważane są za główną strukturę drugorzędową gliadyn, natomiast struktury β - glutenin.
4. Interakcje pomiędzy kwasami fenolowymi a białkami glutenowymi prowadzą do przekształcania wiązań -SS- z konformacji najbardziej stabilnej energetycznie (gauche-gauche-gauche) do mniej stabilnych (trans-gauche-gauche i trans-gauche-trans).
5. Kwasy fenolowe redukują mostki disiarczkowe i prowadzą do wzrostu zawartości wolnych grup SH. Ponadto zaobserwowano tworzenie się wiązań pomiędzy wolnymi grupami SH i wolnymi kwasami fenolowymi, posiadającymi w swojej strukturze większą ilość grup OH.
6. Zarówno kwasy z szeregu kwasu cyjanonowego jak i kwasu benzoowego wpływały na środowisko tryptofanu. Obserwowano wzrost intensywności pasma odpowiadającego temu aminokwasowi aromatycznemu w obecności kwasów fenolowych w cieście modelowym i glutenowym. Wskazywało to na zmianę charakteru środowiska tryptofanu na bardziej hydrofobowe oraz tworzenie bardziej uporządkowanej struktury i zwijaniu łańcuchów polipeptydowych po wpływie działania tych polifenoli.
7. Obserwowane zmiany strukturalne zależą od liczby i rodzaju grup funkcyjnych obecnych przy pierścieniu aromatycznym polifenoli, ich aktywności antyoksydacyjnej, jak również od wielkości cząsteczki suplementowanego polifenolu.
8. Kwasy fenolowe powodują agregację białek glutenowych zarówno w cieście modelowym jak i glutenowym.

9. Wydłużone miesienie ciasta (*overmixing*) spowodowało powstanie agregatów, rozerwanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w sieci glutenowej oraz rozerwanie silnych wiązań wodorowych pomiędzy białkami glutenu a cząsteczkami wody.
10. Nadmierne miesienie ciasta powoduje mechaniczną destrukcję sieci glutenowej w obecności wybranych polifenoli charakteryzujących się małym rozmiarem.
11. Wyniki dotyczące populacji wody wykazały, że grupa pochodnych kwasu cyjankowego nie konkurowała o wodę z białkami glutenowymi, ponieważ prawdopodobnie nie posiadała wystarczającej liczby grup hydroksylowych, które mogłyby oddziaływać z cząsteczkami wody podczas miesienia ciasta. Odwrotne zachowanie wykazywały pochodne kwasu benzoowego.
12. Obecność polifenoli, jak i nadmierne mieszanie może prowadzić do zaburzenia ciągłości i stabilności sieci glutenowej.

6. Bibliografia

1. Abedi, E., & Pourmohammadi, K. (2020). The effect of redox agents on conformation and structure characterization of gluten protein: An extensive review. *Food Science & Nutrition*, 8(12), 6301–6319. doi:10.1002/fsn3.1937
2. Beveridge, T., Toma, S.J., Nakai, S. (1974). Determination of –SH and -S-S- groups in some food proteins using Ellman's reagent. *Journal of Food Science*, 39(1), 49–51. doi:10.1111/j.1365-2621.1974.tb00
3. Cai, S., & Singh, B. R. (1999). Identification of β -turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. *Biophysical Chemistry*, 80, 7–20. doi: 10.1016/s0301-4622(99)00060-5
4. Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5. doi:10.3389/fnut.2018.00087
5. Feng, Y., Feng, X., Liu, S., Zhang, H., Wang, J. (2022). Interaction mechanism between cereal phenolic acids and gluten protein: protein structural changes and binding mode. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi: 10.1002/jsfa.12107
6. Georget, D. M. R., & Belton, P. S. (2006). Effects of Temperature and Water Content on the Secondary Structure of Wheat Gluten Studied by FTIR Spectroscopy. *Biomacromolecules*, 7(2), 469–475. doi:10.1021/bm050667j
7. Gianibelli, M. C., Larroque, O. R., MacRitchie, F., & Wrigley, C. W. (2001). Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and Its Component Subunits. *Cereal Chemistry Journal*, 78(6), 635–646. doi:10.1094/cchem.2001.78.6.635
8. Girard, A. L., & Awika, J. M. (2020). Effects of edible plant polyphenols on gluten protein functionality and potential applications of polyphenol–gluten interactions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi:10.1111/1541-4337.12572
9. Grant, A., Belton, P. S., Colquhoun, I. J., Parker, M. L., Plijter, J. J., Shewry, P. R., Tatham, A.S., Wellner, N. (1999). Effects of Temperature on Sorption of Water by Wheat Gluten Determined Using Deuterium Nuclear Magnetic Resonance. *Cereal Chemistry Journal*, 76(2), 219–226. doi:10.1094/cchem.1999.76.2.219
10. Han, H.-M., & Koh, B.-K. (2010). Antioxidant activity of hard wheat flour, dough and bread prepared using various processes with the addition of different phenolic acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(4), 604–608. doi:10.1002/jsfa.4188

11. Han, H.M. & Koh B.-K. (2011). Effect of phenolic acids on the rheological properties and proteins of hard wheat flour dough and bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2495-2499. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4499>
12. Huang, L., Zhang, X., Zhang, H., & Wang, J. (2018). Interactions between dietary fiber and ferulic acid changed the aggregation of gluten in a whole wheat model system. *LWT*, 91, 55–62. doi:10.1016/j.lwt.2018.01.027
13. Johansson, E., Malik, A. H., Hussain, A., Rasheed, F., Newson, W. R., Plivelic, T., Hedenqvist, M.S., Gällstedt, M., Kuktaite, R. (2013). Wheat Gluten Polymer Structures: The Impact of Genotype, Environment, and Processing on Their Functionality in Various Applications. *Cereal Chemistry Journal*, 90(4), 367–376. doi:10.1094/cchem-08-12-0105-fi
14. Kłosok, K., Welc, R., Fornal, E., & Nawrocka, A. (2021). Effects of Physical and Chemical Factors on the Structure of Gluten, Gliadins and Glutenins as Studied with Spectroscopic Methods. *Molecules*, 26(2), 508. doi:10.3390/molecules26020508
15. Linlaud, N., Ferrer, E., Puppo, M.C., Ferrero, C. (2011). Hydrocolloid interactions with water, protein and starch in wheat dough. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59, 713-719. doi: 10.1021/jf1026197
16. Nawrocka, A., Szymańska-Chargot, M., Miś, A., Kowalski, R., & Gruszecki, W. I. (2016). Raman studies of gluten proteins aggregation induced by dietary fibres. *Food Chemistry*, 194, 86–94. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07
17. Nawrocka, A., Miś, A., & Niewiadomski, Z. (2017). 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*, 74, 86–94. doi: 10.1016/j.jcs.2017.02.001
18. Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954–970. doi:10.1016/j.foodres.2013.02.009
19. Pézolet, M., Bonenfant, S., Dousseau, F., & Popineau, Y. (1992). Conformation of wheat gluten proteins Comparison between functional and solution states as determined by infrared spectroscopy. *FEBS Letters*, 299(3), 247–250. doi:10.1016/0014-5793(92)80125-z
20. Rudrapal, M., Khairnar, S.J., Khan, J., Dukhyil, A.B., Ansari, M.A., Alomary, M. N, Alshabrimi, F.M., Palai, S., Deb, P.K., Devi, R. (2022). Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>

21. Secundo, F., & Guerrieri, N. (2005). ATR-FT/IR Study on the Interactions between Gliadins and Dextrin and Their Effects on Protein Secondary Structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5), 1757–1764. doi:10.1021/jf049061x
22. Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., & Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1418), 133–142. doi:10.1098/rstb.2001.1024
23. Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Quek, S., & Perera, C. O. (2010). Properties of Bread Dough with Added Fiber Polysaccharides and Phenolic Antioxidants: A Review. *Journal of Food Science*, 75(8), R163–R174. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01815.x
24. Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C. O., & Waterhouse, G. I. N. (2013). Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. *Food Research International*, 50(2), 574–585. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.039
25. Świeca, M., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., Czyż, J. (2013). The influence of protein-flavonoid interactions on protein digestibility in vitro and the antioxidant quality of breads enriched with onion skin. *Food Chemistry*, 141, 451-458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.048>
26. Świeca, M., Sęczyk, Ł., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D. (2014). Bread enriched with quinoa leaves – The influence of protein-phenolics interactions on the nutritional and antioxidant quality. *Food Chemistry*, 162, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.044>
27. Taddei, P., Zanna, N., & Tozzi, S. (2013). Raman characterization of the interactions between gliadins and anthocyanins. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(10), 1435–1439. doi:10.1002/jrs.4288
28. Tozzi, S., Zanna, N., Taddei, P. (2013). Study on the interactions between gliadins and a coumarin as molecular model system of the gliadins – anthocyanidins complexes. *Food Chemistry*, 141, 3586-3597. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.136>
29. Upadhyay, S., & Dixit, M. (2015). Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–15. doi:10.1155/2015/504253
30. Vasil, I. K., & Anderson, O. D. (1997). Genetic engineering of wheat gluten. *Trends in Plant Science*, 2(8), 292–297. doi:10.1016/s1360-1385(97)89950
31. Wang, Q., Li, Y., Sun, F., Li, X., Wang, P., Sun, J., Zeng, J., Wang, C., Hu, W., Chang, J., Chen, M., Wang, Y., Li, K., Yang, G., He, G. (2015). Tannins improve dough mixing

- properties through affecting physicochemical and structural properties of wheat gluten proteins. *Food Research International*, 69, 64–71. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.012
32. Welc, R., Kłosok, K., Szymańska-Chargot, M., Nawrocka, A. (2022a). Effect of chemical structure of selected phenolic acids on the structure of gluten proteins, *Food Chemistry*, 389.1339109, 1-9, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133109
 33. Welc, R., Luchowski, R., Gruszecki, W., Nawrocka, A., (2022b). How Do Phenolic Acids Change the Secondary and Tertiary Structure of Gliadin? Studies with an Application of Spectroscopic Techniques, *International Journal of Molecular Sciences*, 23. 6053, str. 1-13. doi: 10.3390/ijms23116053
 34. Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115–119. doi:10.1016/j.fm.2006.07.004
 35. Yilmaz, H., Subasi, B.G., Celebioglu, H.U., Ozdal, T. and Capanoglu, E. (2022). Chemistry of Protein-Phenolic Interactions Toward the Microbiota and Microbial Infections. *Frontiers in Nutrition*, 9, 914118. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.914118>
 36. Zhang, K., Wen, Q., Li, T., Liu, Q., Wang, Y., & Huang, J. (2021). Comparison of interaction mechanism between chlorogenic acid/luteolin and glutenin/gliadin by multi-spectroscopic and thermodynamic methods. *Journal of Molecular Structure*, 1246, 131219. doi:10.1016/j.molstruc.2021.13121