

Kraków, 13.11.2024

RECENZJA

**pracy doktorskiej Pana mgr inż. Konrada Kłosoka
zatytułowanej „Wpływ suplementowania modelowego ciasta chlebowego
wybranymi kwasami fenolowymi na strukturę białek glutenowych”**

Wstęp i podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Recenzja została opracowana w odpowiedzi na pismo Pana prof. dr hab. Cezarego Sławińskiego, Dyrektora, Członka Korespondencyjnego Polskiej Akademii Nauk z dnia 26 września 2024 r. (RN-431-1/24), oraz uchwałę Nr 163/P14/2024 Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie z dnia 23 września 2024 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej mgra Konrada Kłosoka zatytułowanej „Wpływ suplementowania modelowego ciasta chlebowego wybranymi kwasami fenolowymi na strukturę białek glutenowych”.

Recenzowana rozprawa doktorska mgra Konrada Kłoska została zrealizowana w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, pod kierunkiem promotorki, Pani prof. dr hab. Agnieszki Nawrockiej, oraz promotorki pomocniczej, Pani dr Renaty Welc-Stanowskiej.

Problematyka podejmowana przez doktoranta doskonale koresponduje z kierunkiem badań prowadzonych w Instytucie Agrofizyki PAN, w Laboratorium Oceny Jakości Surowców Zbożowych. Profesor Nawrocka od wielu lat z powodzeniem prowadzi badania nad zastosowaniem metod spektroskopii oscylacyjnej w analizie żywności. Temat rozprawy doktorskiej stanowi zatem naturalne rozwinięcie tej linii badawczej, łącząc zaawansowane techniki spektroskopowe z analizą prozdrowotnych i odżywczych produktów zbożowych, co przyczynia się do rozwoju takich dyscyplin jak rolnictwo i ogrodnictwo. Tematyka pracy koncentruje się na zagadnieniach o znacznym potencjale aplikacyjnym, łącząc technologie żywności, chemię białek oraz właściwości prozdrowotne. Takie podejście sprawia, że praca ta ma wartość zarówno naukową, jak i praktyczną.



WYDZIAŁ FIZYKI I INFORMATYKI STOSOWANEJ
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki
Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków
tel: +48 12 617 2951, +48 12 633 3740, fax: +48 12 634 0010
e-mail: fizagh@ftj.agh.edu.pl, www.fis.agh.edu.pl

Ogólna charakterystyka rozprawy

Rozprawa doktorska dotyczy fortyfikacji pieczywa pszennego różnymi dodatkami, w szczególności preparatami błonnikowymi i ekstraktami polifenolowymi, które zyskują na popularności ze względu na rosnącą świadomość zdrowotną konsumentów. Głównym celem pracy było zbadanie wpływu wybranych kwasów fenolowych na strukturę sieci glutenowej w modelowym cieście pszennym oraz ocena ich właściwości antyoksydacyjnych. Gluten, będący kluczowym białkiem w cieście pszennym, tworzy sieć lepkością, która może wiązać polifenole, naturalne przeciwutleniacze. Badania skupiły się na analizie wpływu pochodnych kwasu benzoowego oraz hydroksycynamonowego na gluten. Eksperymenty przeprowadzono na modelowej mące, eliminując wpływ innych składników obecnych w mące pszennej. Do analizy strukturalnych zmian sieci glutenowej oraz jej białek, gliadyn i glutenin, zastosowano metody spektroskopowe, takie jak spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) oraz spektroskopia rozpraszania ramanowskiego z transformacją Fouriera (FT-Raman). Właściwości antyoksydacyjne badano z wykorzystaniem metod spektrofometrycznych, takich jak testu zdolności redukcji kationorodnika ABTS (2,2'-azyno-bis(3-etylenobenzotiazolino-6-kwasu sulfonowego)) oraz testu zdolności redukcji jonów żelaza (*FRAP*, ang. *ferric reducing antioxidant power assay*). Wyniki wykazały, że oba rodzaje kwasów fenolowych wpływają na strukturę glutenu, w szczególności zmieniając strukturę β kartki w gluteninach oraz α -helis w gliadynach. Fortyfikacja ciasta kwasami fenolowymi, zwłaszcza pochodnymi hydroksycynamonowymi, poprawiła jego właściwości przeciwutleniające, co wiązano z obecnością dodatkowych grup hydroksylowych w strukturze chemicznej tych kwasów.

Praca charakteryzuje się szczegółowym podejściem badawczym, które wykorzystuje zaawansowane techniki spektroskopowe oraz testy antyoksydacyjne, umożliwiając dogłębną analizę oddziaływań między polifenolami a białkami glutenowymi. Realizacja założonych celów badawczych wymagała od autora połączenia solidnej wiedzy teoretycznej i praktycznej znajomości metod spektroskopowych z zaawansowaną wiedzą z zakresu biochemii białek, co nadaje rozprawie wyraźny charakter interdyscyplinarny i znacząco podnosi jej wartość naukową. Uzyskane wyniki badań wskazują na istotne zmiany w strukturze glutenu w wyniku fortyfikacji, co może mieć znaczące implikacje zarówno dla przemysłu piekarniczego, jak i sektora zdrowotnego oraz rolniczego.

Ocena merytoryczna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa stanowi zbiór czterech wieloautorskich publikacji, które zostały opublikowane w czasopismach o relatywnie wysokich współczynnikach wpływu (w zakresie od 2.200 do 4.927, przy średnim IF na pracę = 3.682). Trzy prace to prace oryginalne, a jedna jest pracą przeglądową.

Do pełnych tekstów publikacji dołączono streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz wstęp teoretyczny, liczący 20 stron, który wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy, a także przedstawia informacje dotyczące zastosowanych metod badawczych oraz badanych układów. W rozdziale II autor szczegółowo formułuje cele oraz hipotezy badawcze pracy.

Nadrzędnym celem pracy było zbadanie wpływu wybranych kwasów fenolowych, naturalnie występujących w preparatach błonnikowych, na strukturę oraz właściwości biochemiczne sieci glutenowej oraz poszczególnych białek glutenowych (gliadyn i glutenin). Dodatkowo, praca koncentruje się na identyfikacji i analizie zmian we właściwościach antyoksydacyjnych kwasów fenolowych, które zostały wbudowane w sieć glutenową podczas procesu mieszenia ciasta chlebowego oraz na ocenie, jak te interakcje wpływają na strukturę glutenu. Kolejno Autor sformułował następujące cele szczegółowe, które następnie były realizowane, a ich wyniki opisane w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

- Identyfikacja typu i zakresu zmian strukturalnych spowodowanych przez oddziaływania glutenu, gliadyn oraz glutenin z wybranymi kwasami fenolowymi w modelowym cieście pszennym.
- Określenie, które białka glutenowe - gliadyny czy gluteniny - wykazują wyższe powinowactwo do kwasów fenolowych.
- Analiza mechanizmu oddziaływań pomiędzy kwasami fenolowymi i białkami glutenowymi w zależności od charakteru i ilości grup funkcyjnych obecnych w pierścieniu aromatycznym kwasu fenolowego oraz od rozmiaru cząsteczki kwasu.
- Ustalenie korelacji między zmianami strukturalnymi w sieci glutenowej a jej właściwościami biochemicznymi.
- Określenie, czy wbudowanie kwasów fenolowych w sieć glutenową zmienia ich właściwości przeciwutleniające.

Następnie, w rozdziale III, rozprawa przechodzi do części eksperymentalnej, w której szczegółowo opisano zastosowaną metodykę badawczą. Rozdział IV obejmuje

analizę i interpretację uzyskanych wyników, które zostały przedstawione w formie czterech opublikowanych artykułów naukowych, a ich najważniejsze wnioski zostały zebrane i podsumowane w rozdziale V. Zakończenie pracy, od strony 44, zawiera bibliografię, obejmującą szeroki zakres literatury przedmiotu.

W związku z formą rozprawy, która opiera się na omówieniu prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, zadaniem recenzenta jest ocena adekwatności przypisania wybranych przez doktoranta publikacji jako podstawy pracy doktorskiej. Oceniam, że następujący wybrany przez doktoranta cykl czterech publikacji adekwatnie analizuje i opisuje wpływ suplementowania modelowego ciasta chlebowego wybranymi kwasami fenolowymi na strukturę białek glutenowych:

- P.1: 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 (IF=4.927);
- P.2: Kłosok K., Welc R., Szymańska-Chargot M., Nawrocka, A. (2022). Phenolic acids-induced aggregation of gluten proteins. Structural analysis of the gluten network using FT-Raman spectroscopy. *Journal of Cereal Science*, 107, 103503 (IF=3.8);
- P.3: Kłosok K., Welc-Stanowska R., Nawrocka, A. (2023). Changes in the conformation and biochemical properties of gluten network after phenolic acid supplementation. *Journal of Cereal Science*, 110, 103651 (IF=3.8);
- P.4: Kłosok K., Welc-Stanowska R., Nawrocka A. (2024), Effects of phenolic acid molecular structure on the structural properties of gliadins and glutenins. *International Agrophysics* 38, 127-137 (IF=2.2).

Pan mgr Konrad Kłosok jest pierwszym autorem ww. prac, jak i jasno zdefiniował swój indywidualny wkład w powstanie każdej pracy. Mimo że oświadczenia współautorów nie są przedstawione, to w większości opublikowanych prac, załączonych do rozprawy doktoranckiej, indywidualny udział każdego autora przedstawiono w odpowiedniej sekcji (*ang. author contribution section*). Z przedstawionych w rozprawie, jak i publikacjach opisów wynika, że doktorant był współautorem koncepcji większości badań, opracował metodologię, przeprowadzał większość pomiarów oraz analizował dane, a także był odpowiedzialny za przygotowanie wstępnej wersji publikacji. Zakres prac oraz fakt, że doktorant jest ich pierwszym autorem sugerują, że odegrał kluczową rolę w ich powstaniu, a jego wkład można uznać za przeważający.

Cykl ww. prac charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym i stanowi cenny wkład w rozwój badań nad fortyfikacją pieczywa pszennego kwasami fenolowymi

oraz ich wpływem na strukturę glutenu i właściwości antyoksydacyjne. Poniżej przedstawiono najważniejsze i najciekawsze elementy ww. cyklu prac.

Praca przeglądowa P1. prezentuje szczegółową analizę zastosowania metod spektroskopii oscylacyjnej w badaniach struktury sieci glutenowej oraz białek glutenu (gliadyn i glutenin). Omawia zarówno aspekty biochemiczne, jak i technologiczne, co świadczy o wszechstronności podejścia. Autorzy podkreślają, że metody spektroskopii oscylacyjnej dostarczają wzajemnie uzupełniających się informacji o strukturze białek. Na podstawie danych literaturowych dokonują szczegółowej analizy oscylacyjnej pasm ramanowskich i IR, istotnych z punktu widzenia analizy struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej białek, konformacji mostków disiarczkowych, a także zmian w mikorośrodkowisku wybranych aminokwasów. Praca omawia zmiany w strukturze glutenu wywołane różnymi czynnikami, takimi jak poziom nawodnienia ciasta, mieszanie w różnych warunkach, dodatek błonnika pokarmowego, polisacharydów i polifenoli itp. To pokazuje praktyczne zastosowanie metod spektroskopowych w ocenie jakości produktów na bazie pszenicy. Autorzy zwracają uwagę na kluczową rolę wody w kształtowaniu struktury glutenu (wpływ na strukturę drugorzędową białek), co jest istotne z punktu widzenia produkcji pieczywa i innych produktów pszenicznych. Ten aspekt jest dobrze rozwinięty i poparty licznymi odniesieniami do literatury. Przegląd obejmuje nie tylko badania podstawowe, ale również praktyczne zastosowanie metod spektroskopowych w analizie technologicznej jakości produktów z pszenicy, co zwiększa wartość użytkową pracy.

Praca P2 podejmuje temat badania interakcji kwasów fenolowych (zarówno z grupy hydroksycynamonowych, jak i hydroksybenzoesowych) z siecią glutenową. Zastosowanie spektroskopii FT-RS pozwoliło na szczegółową analizę zmian w strukturze drugorzędowej i trzeciorzędowej białek glutenowych. Wszystkie kwasy fenolowe wywoływały zmiany w strukturze białek, głównie tworzenie agregatów z α -helis, β -kardtek i zakrętów β , a kwasy hydroksybenzoesowe szczególnie intensywnie wpływały na tworzenie pseudo- β -kardtek. Obserwowano różne interakcje między kwasami fenolowymi a wybranymi aminokwasami aromatycznymi, zależne od rodzaju i stężenia kwasu. Wyniki wskazują, że polifenole wpływają na sieć glutenową, szczególnie na gluteniny, co prowadzi do zmian w stabilności wiązań wodorowych i formowaniu się agregatów białkowych.

Praca P3 koncentruje się na aplikacji FT-IR do analizy wpływu dodatku kwasów fenolowych ciasta pszennego. Analiza spektroskopowa wykazała, że kwasy te prowadzą do wzrostu liczby struktur β -kardtek kosztem α -helis, co sugeruje interakcję głównie z gluteninami, potwierdzając również konkluzje pracy P2. Dodatkowo fortyfikacja ciasta kwasami fenolowymi prowadzi do tworzenia się zakrętów β i antyrównoległych β -kardtek

kosztem pseudo- β -kardk i zakrętów β z wiązaniami wodorowymi. Zmiany te nie wpłynęły znacząco na hydrofobowość sieci glutenowej, ale poprawiły jej właściwości przeciwutleniające, szczególnie w przypadku kwasów hydroksycynamonowych. Właściwości przeciwutleniające białek glutenowych wzrastały wraz ze stężeniem kwasów fenolowych, co wskazuje na potencjalne korzyści zdrowotne związane z ich użyciem w produktach z pszenicy.

Praca P4 kontynuuje tematykę pracy P3, a więc analizę FT-IR zmian w strukturze drugorzędowej białek po dodaniu kwasów fenolowych do ciasta pszennego. Wyniki potwierdziły poprzednie wnioski, że kwasy fenolowe powodują zmiany w strukturze drugorzędowej obu typów białek, a zakres tych zmian zależy od rodzaju kwasu i jego stężenia. Większość interakcji prowadziło do powstawania struktur nieuporządkowanych, wpływając na wiązania wodorowe w białkach. W gliadynach zaobserwowano zmiany w konformacji α -helis, a w gluteninach zwiększenie zawartości struktur β . Badania sugerują, że modyfikacja glutenu kwasami fenolowymi może wpłynąć na jego alergiczność, szczególnie przez redukcję zakrętów β w gluteninach. Wnioski te wskazują na potencjał kwasów fenolowych w tworzeniu żywności funkcjonalnej, poprawiającej właściwości zdrowotne, zwłaszcza dla osób z nadwrażliwością na gluten. Zrozumienie mechanizmów interakcji między białkami glutenowymi a polifenolami może pomóc w opracowywaniu nowych produktów o lepszych właściwościach zdrowotnych i sensorycznych.

Poniżej zebrałam pytania, które nasuwają się podczas lektury rozprawy. Mam nadzieję, że doktorant będzie miał możliwość skomentowania ich w czasie publicznej obrony doktoratu.

1. Choć ukazane dane w ww. cyklu prac bardzo dobrze analizują zalety zastosowania metod spektroskopii oscylacyjnej do badanego materiału, nie przedstawiono dokładnie ich ograniczeń. Bardzo proszę o komentarz doktoranta w tym zakresie np. na temat takich parametrów jak możliwość analizy ilościowej, czułość, precyzja, czy trudności w interpretacji wyników w niektórych przypadkach.
2. Rozdział 3.14. W przypadku jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) przyjmuje się normalność rozkładu danych. Brakuje informacji, czy te założenia zostały zweryfikowane i jakie testy zastosowano w celu ich sprawdzenia (np. test Shapiro-Wilka). Nie podano liczebności próbek (czyli ile próbek było badanych w każdej grupie), co jest kluczowe, aby ocenić, czy wyniki są reprezentatywne i mają odpowiednią moc statystyczną.

3. Jak kwasy fenolowe mogą wpłynąć na trwałość i jakość wypieków podczas przechowywania, w tym ich odporność na procesy starzenia? Bardzo proszę o komentarz doktoranta w tym zakresie.
4. Czy i jak zastosowane przez doktoranta techniki mogą być wdrażane w przemyśle spożywczym i jakie są ich praktyczne korzyści oraz ograniczenia w rzeczywistych warunkach produkcji.

Należy również zwrócić uwagę pewne błędy i słabości, które mogą wpłynąć na jasność i spójność tekstu:

5. W rozdziale 3.1. chlorek sodu jest wymieniony dwukrotnie. Zakładam, że w pierwszym przypadku chodziło o kwas solny.
6. Skrótów takie jak "CTL14", "CTL22" i "CTL36" nie są dostatecznie wytłumaczone w kontekście badań – choć są wprowadzane, brakuje wyjaśnienia ich pełnego znaczenia dla czytelnika.
7. W sekcji 3.2 dotyczącej pobierania próbek ciasta brak jest pełnej jasności na temat procesu ustalania optymalnego czasu. Stwierdzenie, że „odejmowano 4 minuty” od załamania konsystencji, nie tłumaczy dlaczego dokładnie tyle minut odejmowano i na jakiej podstawie. Dobrze byłoby uwzględnić uzasadnienie tej decyzji.
8. W metodach dotyczących przygotowania próbek do analiz brakuje informacji na temat temperatury podczas liofilizacji, co może być istotne dla powtarzalności badania.

Ocena dorobku naukowego

Analiza dorobku naukowego Pana mgr Konrada Kłosoka wskazuje, że jest on odpowiedni i zgodny z etapem rozwoju jego kariery naukowej. Oprócz czterech prac włączonych do rozprawy doktorskiej, doktorant jest współautorem sześciu publikacji niezwiązanych bezpośrednio z tematyką rozprawy. Łącznie jest współautorem 10 publikacji, które uzyskały 110 cytowań, a wskaźnik Hirscha (H-index) według bazy Scopus na dzień 13.11.2024 wynosi 5.

Chociaż w rozprawie nie zamieszczono listy wystąpień konferencyjnych ani staży naukowych doktoranta, to z analizy podziękowań w publikacjach wynika, że Pan Konrad Kłosok brał udział w realizacji projektów badawczych, co dodatkowo świadczy o jego zaangażowaniu i aktywności naukowej. Całokształt dotychczasowego dorobku wskazuje na

odpowiedni poziom rozwoju naukowego, jakiego oczekuje się od osoby na tym etapie kariery badawczej.

Podsumowanie

Podsumowując, stwierdzam, że założone przez doktoranta cele zostały osiągnięte i można mówić, iż praca ta stanowi istotny przyczynek do rozwoju nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzyńskiego PAN w Lublinie o dopuszczenie Pana mgra Konrada Kłosoka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na interdyscyplinarną tematykę rozprawy, jej opracowanie, jak i uwzględniając dorobek publikacyjny doktoranta (współautor 10 publikacji, HI=5 według Scopus) wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzyńskiego PAN w Lublinie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgra Konrada Kłosoka.

dr hab. Katarzyna M. Marzec, prof. AGH