



dr hab. inż. Joanna Depciuch-Czarny

Kraków 02.11.2024 r.

Zakład Nanomateriałów Funkcjonalnych

Instytut Fizyki Jądrowej PAN

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Konrada Kłosok zatytułowanej “ Wpływ suplementowania modelowego ciasta chlebowego wybranymi kwasami fenolowymi na strukturę białek glutenowych” wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Agnieszki Nawrockiej oraz promotora pomocniczego dr Renaty Welc-Stanowskiej w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie.

Temat podjęty przez doktoranta wpisuje się w bardzo ważny nurt naukowy z zakresu rolnictwa, żywności i żywienia, a nawet medycyny (alergologii). Biorąc pod uwagę fakt, że coraz większa część społeczeństwa ma świadomość wpływu diety na organizm, rozwój żywności funkcjonalnej, wzbogaconej w naturalne przeciwutleniacze, nie tylko przyczynia się do rozwoju przemysłu żywieniowego, ale przede wszystkim rolniczego, od którego zależy jakość zebranych plonów, w tym zboża, z którego następnie otrzymywana jest mąka. Niestety w ostatnich latach zauważa się również wzrost osób cierpiących na alergię pokarmowe, w tym na gluten. Dlatego też badania, które Doktorant podjął w ramach swojej pracy doktorskiej mają znaczenie nie tylko poznawcze, ale również aplikacyjne, co należy podkreślić i pochwalić. Wykorzystując naturalne dodatki (kwasy fenolowe), w produkcji żywności, Doktorant wpisał się w nurt zrównoważonego rolnictwa przy jednoczesnym pozytywnym, jak się dowiadujemy z przedstawionej dysertacji, wpływie na chleb będący podstawą diety u większość społeczeństwa. Ponadto, wykorzystując techniki spektroskopowe Doktorant wpisał się w nurt światowej nauki, gdzie spektroskopia ramanowska, oscylacyjna spektroskopia w podczerwieni wykorzystane są coraz częściej w przemyśle rolniczym, do oszacowania zmian biochemicznych wywołanych czynnikami zewnętrznymi. W przypadku przedstawionej dysertacji czynnikiem zewnętrznym były kwasy fenolowe. Co należy podkreślić, przedstawione w ramach dysertacji badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki i stanowią kolejny argument przemawiający za tym, że podjęty temat jest bardzo ważny i ciągle jeszcze mało poznany. Szkoda tylko, że tym faktem Doktorant nie pochwalił się w przedstawionej do recenzji dysertacji, a dopiero w publikacjach można było znaleźć informacje o tym fakcie.



Formalna ocena pracy

Recenzowana praca magistra Konrada Kłosok została opracowana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami dla prac doktorskich ze zbioru publikacji. Praca składa się łącznie ze 49 stron oraz dołączanych czterech publikacji. Pierwsze 49 strony stanowią część wprowadzającą i opisującą w skrócie wyniki, które dogłębnie opisane są w przedstawionych czterech publikacjach. Z tej części dowiadujemy się czym jest gluten, metody spektroskopowe, które stanowią podstawę wykonywanych eksperymentów, a także dowiadujemy się czym są polifenole, jakie jest ich znaczenie w przemyśle żywnościowym i jakie są mechanizmy ich oddziaływania z kwasami fenolowymi. Następnie przedstawione są cele pracy, metodyka, skrótowe przedstawienie wyników badań oraz wnioski i bibliografia. Owe skrótowe przedstawienie wyników badań w żadnym, nawet najmniejszym stopniu nie umniejsza wysokiej jakości pracy doktorskiej, ponieważ ich obszerny opis a także dyskusja znajduje się w załączonych trzech pracach, ponieważ czwarta stanowi pracę przeglądową, która jest doskonałym wstępem do następnie wykonanych badań.

Dysertacja oparta jest na 4 publikacjach: *“Effects of physical and chemical factors on the structure of gluten, gliadins and glutenins as studied with spectroscopic methods”*, która jest pracą przeglądową, oraz z trzech prac eksperymentalnych: *„Phenolic acids-induced aggregation of gluten proteins. Structural analysis of the gluten network using FT-Raman spectroscopy”*, *„Changes in the conformation and biochemical properties of gluten network after phenolic acid supplementation”* oraz *“Effects of phenolic acid molecular structure on the structural properties of gliadins and glutenins”*. Należy podkreślić, że we wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, co świadczy o jego bardzo dużym wkładzie w powstanie załączonych publikacji. Prace te opublikowane zostały w czasopiśmie naukowych (kolejno): *Molecules*, *Journal of Cereal Science*, *Journal of Cereal Science* oraz *International Agrophysics*, o łącznym współczynniku wpływu Impact Factor (IF) równym 14.00.

Celem niniejszej dysertacji było zbadanie wpływu wybranych kwasów fenolowych (kwas 4-hydroksybenzoesowy, protokatechowy, wanilinowy, syringowy, p-kumarowy, kawowy, ferulowy oraz synapinowy), naturalnie występujących w preparatach błonnikowych, na strukturę oraz właściwości biochemiczne sieci glutenowej oraz poszczególnych białek glutenowych (gliadyn i glutenin). W tym celu wykorzystano spektroskopię oscylacyjną (ramanowską i



FTIR). Ponadto, Doktorant wykorzystał inne metody, takie jak: zmodyfikowaną procedurę Schopf i Scherf w celu oznaczenia liczby wolnych grup SH i grup SS w próbach glutenu, testy ABTS oraz FRAP w celu ustalenia zdolności antyoksydacyjnej kwasów fenolowych w próbkach ciasta modelowego oraz czystych kwasów, a także metodę pozwalającą określić hydrofobowość powierzchni glutenu.

Kwasy fenolowe, które zostały dodane do pszennego ciasta modelowego, stanowią najbardziej rozpowszechniony rodzaj roślinnych związków fenolowych. Zdobyły one zainteresowanie ze względu na ich relatywnie wysoką aktywność antyoksydacyjną oraz efektywną absorpcję w przewodzie pokarmowym. W literaturze można znaleźć informacje, że kwasy fenolowe mogą zahamować odpowiedź immunologiczną u osób borykających się z problemami alergii pokarmowej. W przedstawionej do oceny dysertacji, Doktorant nie tylko potwierdził znane już w literaturze fakty, ale też sprawdził wpływ, aż ośmiu rodzajów kwasów fenolowych, gdzie każdy występował w trzech różnych stężeniach, na właściwości biochemiczne sieci glutenowej oraz poszczególnych białek glutenowych (gliadyn i glutenin). Wyniki otrzymanych badań zostały opublikowane w trzech eksperymentalnych artykułach czasopism z listy filadelfijskiej. W każdej z publikacji znaleźć można wstęp, jasno określony cel, szczegółowo opisaną metodykę oraz wyniki wraz z dyskusją i wnioskami. W pracach tych widać dociekliwość Doktoranta, jego umiejętności zarówno manualne, jak i analityczne. W tym miejscu chciałam również pochwalić Doktoranta za pracę przeglądową stanowiącą pierwszą publikację w cyklu. Magister Kłosok wykazał się bardzo dużą dociekłością i starannością w napisaniu pracy przeglądowej, która stanowi niezwykle cenną pozycję literaturową z bardzo dogłębnie przeanalizowanym materiałem literaturowym dotyczącym wykorzystania metod spektroskopowych w ocenie struktury glutenu, gliadyn i glutenin. Jednocześnie praca ta pokazała, że wykonane następnie badania eksperymentalne przedstawione w trzech kolejnych pracach stanowiących cykl, nie były dotychczasowo przeprowadzone, co jednoznacznie skazuje na aspekt nowości ocenianej dysertacji.

Po przeczytaniu całości nasuwa mi się jednak kilka uwag oraz pytań, na których udzielenie odpowiedzi prosiłabym Doktoranta podczas publicznej obrony pracy doktorskiej:

1. Na stronie 14 Doktorant napisał „*Pasmo amid I jest powszechnie uznawane za jedno z najbardziej istotnych narzędzi do analizy struktury drugorzędowej białek. Związane jest ono głównie z drganiami rozciągającymi grup karbonylowych (C=O) w grupach amidowych*



białek i peptydów (ok. 90%). Do drgań obserwowanych w ramach pasma amid I zalicza się również drgania zginające wiązań N-H oraz C-N (ok. 10%).”. Na jakiej podstawie Doktorant wymienił procentowe zawartości poszczególnych grup funkcyjnych? Czy są to dane literaturowe (jeśli tak powinna zostać dodana referencja), czy też własne wyliczenia?

2. Na stronie 19 Doktorant napisał „Po dodaniu kwasów fenolowych w białkach glutenowych występują zmiany strukturalne, takie jak ekspozycja grup aminokwasowych i wydłużenie łańcucha peptydowego. Te zmiany prowadzą do różnorodnych interakcji między cząsteczkami białka a kwasami fenolowymi, w tym oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych”. Czy w ramach wykonanych doświadczeń, pomiarów i analiz udało się Doktorantowi ustalić jaki jest skutek w/w zmian?

3. W metodyce uzyskania widm FT-ramanowskich Doktorant wykonał pomiar wykorzystując 256 skanów z rozdzielczością 8 cm^{-1} , natomiast w przypadku widm IR było to 128 skanów i rozdzielczość 4 cm^{-1} . Na jakiej podstawie zostały dobrane parametry pomiaru? Czemu nie zdecydowano się na lepszą rozdzielczość spektralną?

4. Dlaczego wykonano uśrednienie z pięciu pomiarów? Czy pomiary wykonane były dla tej samej próbki, czy też próbkę zmieniano? Jeśli dla tej samej próbki, czy widma rejestrowano z różnych miejsc?

5. Doktorant wspomniał, że w celu uzyskania informacji o strukturze drugorzędowej białek można wykonać dekonwolucję lub obliczyć widma różnicowe. Doktorant zdecydował się na drugie podejście. Dlaczego?

6. Doktorant wskazał, że widma były zbierane dla sproszkowanej formy badanych próbek. Jednakże nie znalazłam informacji jaka waga była proszku i czy była identyczna dla wszystkich mierzonych próbek?

7. Wnioski umieszczone na stronach 42 i 43 niekiedy brzmią jak wynik. Przetoczę tutaj tylko jeden z wniosków: „W badanych próbkach zmodyfikowanych gliadyn stwierdzono zmiany w konformacji α -helis. Obserwacja jest zgodna z danymi literaturowymi, które wskazują, że konformacja α -helis stanowi najliczniej powtarzającą się strukturę drugorzędową w gliadynach.” Jaki z tego stwierdzenia płynie wniosek? Czy pod wpływem tych zmian, gliadyny np. agregują, ich stabilność spada?

8. Figury w publikacjach „Phenolic acids-induced aggregation of gluten proteins. Structural analysis of the gluten network using FT-Raman spectroscopy”, „Changes in the conformation and biochemical properties of gluten network after phenolic acid supplementation” oraz



“Effects of phenolic acid molecular structure on the structural properties of gliadins and glutenins” są bardzo niejasno opisane. Np. figura 2 w pracy *„Phenolic acids-induced aggregation of gluten proteins. Structural analysis of the gluten network using FT-Raman spectroscopy”*. W opisie figury brakuje dokładnego wyjaśnienia co przedstawia rycina a, b, c, itd. Nie wspomnę o figurze 3, gdzie przy słupkach można zauważyć litery fg, h. Co one oznaczają? Bardzo ciężko analizuje się te figury i niestety zauważalne jest to we wszystkich trzech pracach eksperymentalnych.

9. W pracy *„Changes in the conformation and biochemical properties of gluten network after phenolic acid supplementation”* Doktorant napisał *„A spectrum of 10% of aqueous solution of D₂O was subtracted from all samples spectra”*. Dlaczego właśnie 10% roztwór D₂O? Ponadto, w tej samej pracy nie podano informacji, czy próbki były kładzione bezpośrednio na kryształ ATR, czy też metodyka była inna. Prosiłabym aby Doktorant dokładniej opowiedział o metodzie pomiaru.

10. Czy zastanawiał się Doktorant jaki był wpływ na badany obiekt mieszanki np. dwóch wybranych kwasów fenolowych? Może zaobserwowano by synergję lub addycję? Czy myślał Doktorant nad przeprowadzeniem kolejnych badań w temacie rozprawy doktorskiej?

11. W pracy można napotkać się również na błędy edytorskie. Doktorant raz używa FT-Raman raz Raman. Zauważyć można również błędy interpunkcyjne lub literowe, ale jest ich bardzo mała liczba przez co pracę czyta się bardzo przyjemnie i płynnie.

Na koniec chciałabym podkreślić całokształt pracy Doktoranta. Oprócz dorobku związanego bezpośrednio z tematyką pracy doktorskiej (4 prace o łącznym IF = 14.00), Pan mgr Konrad Kłosok jest współautorem również sześciu (wg bazy Scopus) innych prac o łącznym współczynniku oddziaływania IF wynoszącym 27.4, w tym jedna z prac została opublikowana w czasopiśmie Food Chemistry o IF = 8.5. Ponadto, na stronie Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie można znaleźć informacje o udziale Doktoranta w licznych konferencjach, w tym również międzynarodowych.

Podsumowując, stwierdzam, że treść recenzowanej pracy odpowiada tytułowi, a sposób jej zredagowania oceniam jako bardzo dobry. Badania przeprowadzone przez Doktoranta stanowią nowoczesny i oryginalny wkład w rozwój szeroko pojętych nauk rolniczych, czy nauk o żywieniu człowieka. Doktorant wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną oraz posiadaniem umiejętności do samodzielnego prowadzenia eksperymentów



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

naukowych i prawidłowego interpretowania wyników. W mojej opinii, przedstawioną pracę doktorską należy ocenić wysoko. Wobec szerokiego zakresu prezentowanych badań i bardzo wartościowych wyników, które zostały opublikowane w czasopismach naukowych, przedstawione powyżej krytyczne uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości całej pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej Pana mgr Konrada Kłosok.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Konrada Kłosok zatytułowana „Wpływ suplementowania modelowego ciasta chlebowego wybranymi kwasami fenolowymi na strukturę białek glutenowych” spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane kandydatom w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn.zm). Na tej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie o dopuszczenie Pana mgr Konrada Kłosok do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką jakość wykonanych badań, dociekliwość Doktoranta, dogłębne przedstawienie otrzymanych wyników, a przede wszystkim niezwykle ważny podjęty temat, wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej.

Joanna Depucich-
Korzyńska