

Lublin, 30-10-2024 r.

prof. dr hab. Michał Świeca
Katedra Biochemii i Chemii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Konrada Kłosoka pt. „Wpływ suplementowania modelowego ciasta chlebowego wybranymi kwasami fenolowymi na strukturę białek glutenowych”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Nawrockiej oraz
dr Renaty Welc-Stanowskiej (promotor pomocniczy)

Podstawa prawna: Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2023, poz. 742 ze zm.)

Podstawą opinii jest pismo prof. dr hab. Cezarego Sławińskiego Dyrektora Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN z dnia 23-09-2024

Uzasadnienie tematyki, informacje ogólne i ocena formalna pracy

Gluten stanowi mieszaninę białek, występującą w ziarniakach zbóż takich jak m.in. pszenica, jęczmień, przez co znajduje się on w kręgu zainteresowań naukowców prowadzących badania w wielu dyscyplinach nauki. Z jednej strony nowoczesne rolnictwo dąży do zwiększenia produktywności, zaś z drugiej podejmuje próby wyselekcjonowania odmian zbóż, które charakteryzuje określony i pożądaný skład tej frakcji, która w dużej mierze kreuje wartość odżywczą pasz oraz funkcjonalność tego surowca dla przetwórstwa spożywczego. Związki polifenolowe, będące naturalnymi metabolitami wtórnymi, z uwagi na swoje wielopoziomowe działanie prozdrowotne, są w ostatnich latach świadomie wprowadzane do diety człowieka. Aby fortyfikacja tego typu miała szeroki i pozytywny wpływ na społeczeństwo ich nośnik powinna charakteryzować m.in. powszechność spożycia. W tym kontekście produkty piekarnicze, w tym wszelkiego rodzaju pieczywo, wydają się być idealnym kandydatem do tworzenia tzw. żywności funkcjonalnej. Powszechnie wiadomo, że polifenole są w stanie oddziaływać z matrycą żywności powodując zmiany fizyko-chemiczne wymuszające modyfikacje technologii. Badania podstawowe dostarczają kluczowych informacji pozwalających na świadome projektowanie nowych produktów o pożądanej charakterystyce, zaś wykorzystanie do analizy składu chemicznego i struktury materiałów/półproduktów komplementarnych technik spektroskopowych stanowi innowacyjne podejście metodyczne.

Podstawę rozprawy doktorskiej Pana mgr Konrada Kłosoka pt. „Wpływ suplementowania modelowego ciasta chlebowego wybranymi kwasami fenolowymi na

strukturę białek glutenowych” stanowią cztery prace naukowe opublikowane w latach 2021-2023 w czasopismach indeksowanych w Journal Citation Reports:

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.
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.
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.
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

Badania realizowane w ramach projektu doktorskiego zostały częściowo sfinansowane w ramach grantu NCN Opus 18 (UMO-2019/35/B/NZ9/002854).

Przedstawione do oceny opracowanie zostało przygotowane zgodnie z zasadami przejętymi dla dysertacji doktorskiej. Rozpoczyna się ono streszczeniem w języku polskim i angielskim, które zwięźle przedstawia tło badań oraz główne wyniki i konkluzje. Kolejno zawarta jest lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, spis treści oraz wykaz używanych skrótów. W rozdziale Wstęp Doktorant dokonuje przeglądu literatury (strony 13-20) skupiając się na podsumowaniu aktualnej wiedzy z zakresu tematu. Dysertacja posiada również jasno zdefiniowane hipotezy badawcze oraz cele badań. W dalszej kolejności Pan Kłosoka przedstawia szczegółową, pozwalającą na odtworzenie eksperymentów, metodologię badań i odnosząc się do kolejnych manuskryptów omawia uzyskane wyniki. Całość osiągnięcia została posumowana w 11 wnioskach odnoszących się do założonych celów badań. Spis literatury zawiera 41 pozycji literaturowych opublikowanych głównie w ostatnich latach w czasopismach tradycyjnie publikujących badania z zakresu nauk rolniczych. Następnie przedstawione zostały pełne wersje manuskryptów wchodzących w skład dysertacji. Wszystkie publikacje wchodzące w skład dysertacji są pracami wieloautorскими i pomimo braku odrębnych oświadczeń współautorów o ich udziale w ich powstawanie, zakres prac wykonanych przez Doktoranta jest jasno określony. Zgodnie z informacjami jest On odpowiedzialny za przygotowanie materiału do badań (ekstrakcja frakcji białkowych, przygotowanie prób ciasta modelowego fortyfikowanych wybranymi kwasami fenolowymi), wykonanie specyficznych analiz (przetwarzanie danych farinograficznych, przygotowanie i analiza widm ramanowskich i FT-IR, oznaczanie potencjału przeciwutleniającego), analizę danych i interpretację wyników, opracowanie pierwotnych wersji manuskryptów oraz współpracę przy korekcie i finalizacji ich ostatecznych wersji. Być może w tym miejscu, pomimo że nie jest to wymagane przepisami Ustawy, należałoby zamieścić odniesienie do dotychczasowego dorobku Doktoranta, co w jeszcze szerszym zakresie pozwoliłoby ocenić jego aktywność w zakresie nauk rolniczych. Pomimo to, analiza rozprawy doktorskiej, ranga

czasopism, w których zostały opublikowane badania oraz kluczowa rola Doktoranta w realizacji projektu doktorskiego jednoznacznie potwierdzają Jego umiejętności w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Ocena merytoryczna pracy

Dotychczasowa wiedza w zakresie tematu została szczegółowo przedstawiona w rozdziale Wstęp (strony 13-18) oraz pierwszej z publikacji (P.1) opublikowanej w czasopiśmie *Molecules*. Pan Kłosok przedstawia informacje na temat składu białkowego glutenu, wskazując rolę w funkcjonalności tego kompleksu w procesach miesienia ciasta i wypieku. W podrozdziale „Metody spektroskopowe stosowane w badaniach struktury glutenu” Aplikant szczegółowo opisuje dotychczasowe aplikacje w/w technik w analizach różnych aspektów struktur białkowych, wskazując kluczowe zagadnienia analityczne pozwalające na określenie zmian konformacyjnych (m.in. pasma amid I i III, identyfikacja mostków disiarczkowych, analiza mikrośrodowiska aminokwasów aromatycznych). Być może, z uwagi, że zagadnienie te zostały szczegółowo scharakteryzowane w publikacji P.1, w tej części należałoby się bardziej ogólnie odnieść do dotychczasowych aplikacji spektroskopii RT-IR i ramanowskiej, aby szerzej pokazać możliwości analityczne tych technik. Podobnie charakterystyka związków polifenolowych oraz ich interakcji z białkami jest dość ogólna i w głównej mierze skupia się na ich roli w kreowaniu właściwości pieczywa. Pomimo faktu, że fortyfikacja pieczywa powoduje wzrost jego właściwości prozdrowotnych w tym miejscu chciałbym zapytać Doktoranta, czy widzi on też jakieś negatywne strony tej strategii związane np. ze zmianami wartości odżywczych, właściwości teksturalnych produktu. Odnosząc się do publikacji P.1, która jako praca przeglądowa również ukazuje tło badań realizowanych w projekcie doktorskim, stwierdzam, że opracowanie to jest bardzo kompleksowe i prócz przytoczonych aspektów analizuje również wpływ zróżnicowanych warunków takich jak poziom nawodnienia, temperatura, mrożenie ciasta i przechowywanie w stanie zamrożonym, a także dodawanie różnych związków do ciasta (np. polepszaczy ciasta, preparatów błonnika pokarmowego, polisacharydów i polifenoli). O aktualności badań i jakości naukowej opracowania niewątpliwie świadczy uznanie środowiska naukowego odzwierciedlone w ilości dotychczasowych cytowań (Scopus; 42). Biorąc to pod uwagę informacje zawarte w rozdziale Wstęp, pierwszej publikacji przeglądowej (P.1) oraz wstępach pozostałych publikacji (P.2-4), chciałbym jednoznacznie stwierdzić, że Doktorant posiada ogólną wiedzę teoretyczną wymaganą od osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora, a tym samym spełnia jedno z wymagań Ustawy stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Hipoteza i cele badań, a w zasadzie cele i hipotezy, są jasno sformułowane i nie pozostawiają wątpliwości co do zakresu prowadzonych badań. Pewne wątpliwości w tym miejscu może budzić jedynie używanie zwrotu „właściwości biochemiczne sieci glutenowej”, w związku z czym prosiłbym Aplikanta o rozszerzenie tego terminu w odniesieniu do prowadzonych w projekcie doktorskim badań.

W kolejnym rozdziale „Metodyka” Pan Kłosok charakteryzuje materiał badawczy oraz metodologię badań. Opisy pozwalają na odtworzenie eksperymentów i wskazują wysokie umiejętności eksperymentalne Doktoranta. Odnosząc się do tej części, chciałbym, aby Doktorant przedstawił bliżej metodologię przygotowania prób do analiz potencjału przeciwutleniającego (podrozdział 3.10). Czy była to frakcja rozpuszczalna w metanolu przygotowana wg opisu z podrozdziału 3.9., czy też analizowano frakcje nierozpuszczalne ze skompleksowanymi kwasami polifenolowymi. W części tej pewne wątpliwości budzi również sposób wyrażenia zawartości grup tioliowych w jednostkach stężenia molowego (μM) nie zaś w jednostkach masy μmol lub mg (podobnie wyrażone są aktywności przeciwutleniające).

Wyniki projektu doktorskiego zostały zawarte w 3 manuskryptach, gdzie zostały one wnikliwie przedyskutowane, skonfrontowane z badaniami innych naukowców, a podjęta przez Doktoranta próba wyjaśnienia mechanizmów zmian i zachodzących zależności potwierdza jego dojrzałość naukową. Z uwagi na fakt, że wyniki badań zostały już poddane recenzji na etapie publikacji, w tej części opinii chciałbym się głównie skupić na ich znaczeniu dla rozwoju wiedzy, zaś w ograniczonym zakresie na bezpośrednich danych liczbowych. Dwa pierwsze manuskrypty zawierające wyniki prac doświadczalnych opublikowano w Journal of Cereal Science i przedstawiają wyniki uzyskane dla modelowego ciasta pszennego fortyfikowanego wybranymi związkami polifenolowymi w różnych stężeniach. Materiał badawczy zawarty w tych manuskryptach analizowano odpowiednio z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej i FT-IR. Stwierdzono, że wszystkie kwasy fenolowe indukowały tworzenie się struktur zagregowanych w glutenie, co wynikało z łączenia się struktur drugorzędowych (α -helis, β -krotek i zakręto β) przy udziale wewnątrz- lub/i międzycząsteczkowymi wiązań wodorowych. Potwierdzono, że kwasy hydroksybenzoesowe wykazują wyższe powinowactwo do białek glutenowych, a w szczególności do frakcji glutenin. Potwierdza to także analiza właściwości przeciwutleniających tj. zmiany zdolności do neutralizowania kationorodnika ABTS⁺ oraz wzrost potencjału redukcyjnego modyfikowanego glutenu. Ostatnia z prac, opublikowana w czasopiśmie International Agrophysics, opisuje zmiany struktury gliadyn i glutein powodowane interakcjami z kwasami fenolowymi. Wykazano, że dodatek badanych związków fenolowych ma wpływ na wiązania wodorowe w obu typach białek glutenowych, zaś zakres i rodzaj zmian jest zależny od specyficznej struktury i stężenia kwasu fenolowego, w tym liczby i rodzaju grup funkcyjnych obecnych w pierścieniu aromatycznym. Doktorant postuluje również, że wykazane obniżenie ilości zakręto β w gluteninach może potencjalnie wiązać się obniżeniem alergenicności tych białek. Całość projektu została podsumowana w formie syntetycznych wniosków (strona 42-43), które odnoszą się do hipotez i założonych celów projektu doktorskiego. W tym miejscu chciałbym jedynie zwrócić uwagę, że za pomocą wykonanych testów nie sposób jest określić jednoznacznie czy tylko wiązania wodorowe odpowiadają za tworzenie kompleksów gluten-fenole (wniosek 3). Analiza wyników nasuwa również pytanie dotyczące „pojemności” glutenu do wiązania związków fenolowych (we wszystkich doświadczeniach stosowano związki fenolowe w najwyższym stężeniu 0.2%). Czy w badaniach optymalizowano ten parametr, czy ewentualnie można wskazać czynniki wpływające na zwiększanie zdolności sorpcyjnych i jakie mogą być ewentualne konsekwencje fortyfikacji pieczywa większymi ilościami polifenoli. Pomimo faktu, że badania interakcji

glutenu z związkami polifenolowymi z użyciem technik spektroskopowych dostarczają wielu cennych i istotnych informacji w tym miejscu chciałbym również zapytać, czy mógłby Pan zaproponować inne modele badawcze lub techniki analityczne, które dodatkowo mogłyby charakteryzować interakcje białko-polifenole.

Podsumowując, wnikliwa analiza zarówno pracy doktorskiej jak i manuskryptów, pozwala mi stwierdzić, że zakładane cele projektu doktorskiego zostały osiągnięte, a dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Aplikant umiejętnie połączył ze sobą zagadnienia z zakresu nauk rolniczych, w tym rolnictwa, technologii żywności oraz towaroznawstwa i wykazał się doskonałą znajomością warsztatu badawczego. Uzyskane przez niego wyniki są wartościowe pod względem poznawczym, potencjalnie aplikacyjnym i pozwalają na uzupełnienie dotychczasowej luki w tym obszarze badawczym. Podjęta tematyka oraz badania potencjalnie mogą posłużyć do opracowania alternatywnych metod zagospodarowania produktów ubocznych z rolnictwa, rozszerzyć wykorzystanie surowców glutenowych oraz świadome projektowanie procesów technologicznych dedykowanych żywności funkcjonalnej. W tym miejscu, chciałbym również podkreślić, że nieliczne uwagi i komentarze przedstawione w mojej recenzji mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną badań i ich poznawczy charakter.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji dysertacja mgr mgr Konrada Kłosoka pt. „Wpływ suplementowania modelowego ciasta chlebowego wybranymi kwasami fenolowymi na strukturę białek glutenowych” spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2023, poz. 742 ze zm.) i w związku z tym wnioskuję o dopuszczanie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Michał Świeca