

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

Konrad Kłosok

**Wpływ suplementowania modelowego ciasta chlebowego wybranymi kwasami
fenolowymi na strukturę białek glutenowych**

**Effect of the model bread dough supplementation with selected phenolic acids on the
structure of gluten proteins**

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska przygotowana pod kierunkiem

Promotorki: prof. dr hab. Agnieszki Nawrockiej

Promotorki pomocniczej: dr Renaty Welc-Stanowskiej

© Konrad Kłosok

Lublin 2024

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 Profesor Agnieszce Nawrockiej,
za poświęcony czas, nieoceniona pomoc i cenne wskazówki,
które towarzyszyły mi na każdym etapie mojej pracy doktorskiej.*

*Dziękuję również Doktor Renacie Welc-Stanowskiej,
za wszelkie rady i nieustanne wsparcie naukowe.*

*Jestem niezwykle wdzięczny za Waszą wyrozumiałość,
cierpliwość i życzliwość, które pozwoliły mi się rozwijać naukowo.*

Streszczenie

Fortyfikacja pieczywa pszennego różnymi dodatkami, takimi jak preparaty błonnikowe i ekstrakty polifenolowe, staje się coraz bardziej powszechna ze względu na rosnącą świadomość konsumentów na temat zdrowej żywności. Ponadto pieczywo pszenne, będące popularnym produktem spożywczym, może pełnić rolę nośnika, wspomagającego efektywne dostarczanie prozdrowotnych składników do ludzkiego organizmu. W pieczywie znajdują się białka tworzące ciągłą, lepkosprężystą sieć w cieście, nazywaną glutenem. Gluten jest tworzony przez dwa rodzaje białek: polimeryczne gluteniny oraz monomeryczne gliadyny. Białka glutenowe zawierają duże ilości glutaminy i proliny, co pozwala im się wiązać się z polifenolami, które są naturalnymi przeciwutleniaczami.

Mechanizm oddziaływań między białkami glutenowymi a polifenolami jest wciąż słabo zbadany, zwłaszcza podczas procesu miesienia ciasta. Proces ten może prowadzić do zmian w strukturze sieci glutenowej oraz jej właściwościach mechanicznych. Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było określenie wpływu wybranych kwasów fenolowych na strukturę sieci glutenowej oraz jej poszczególnych białek w modelowym cieście pszennym, a także zbadanie wpływu fortyfikacji kwasami fenolowymi na właściwości antyoksydacyjne glutenu. W badaniach wykorzystano kwasy fenolowe będące pochodnymi kwasu benzoowego (kwas 4-hydroksybenzoowy, protokatechowy, wanilinowy, syryngowy) oraz pochodnymi kwasu hydroksycynamonowego (kwas kumarowy, kawowy, ferulowy, synapinowy).

Badania przeprowadzono na mące modelowej, składającej się z mieszaniny skrobi pszennej i glutenu pszennego w proporcji 80:15 (w/w), w celu wyeliminowania wpływu innych składników naturalnie obecnych w mące pszennej. Analizy wykonano za pomocą metod spektroskopowych, takich jak spektroskopia w podczerwieni (FT-IR) oraz spektroskopia ramanowska (FT-Raman). Dodatkowo, wykorzystując technikę absorpcji UV-VIS, określono

zawartość wolnych kwasów fenolowych wyekstrahowanych z próbek glutenu modyfikowanego tymi kwasami. Zbadano właściwości antyoksydacyjne ekstraktów, używając testów ABTS i FRAP.

Analiza spektroskopowa wykazała, że zarówno pochodne kwasów hydroksycynamonowych, jak i hydroksybenzoesowych wpływają na strukturę drugorzędową sieci glutenowej oraz na oba typy białek: gliadyny i gluteniny. W modyfikowanych gluteninach dominujące zmiany strukturalne dotyczą struktur β . W próbkach zmodyfikowanych gliadyn głównie obserwowano zmiany w konformacji α -helis. Badanie właściwości antyoksydacyjnych wykazało, że wzbogacanie ciasta kwasami fenolowymi, zwłaszcza pochodnymi hydroksycynamonowymi, poprawia właściwości przeciwutleniające sieci glutenowej. Ta zmiana jest prawdopodobnie związana z obecnością dodatkowych grup hydroksylowych w strukturze chemicznej dodanego kwasu fenolowego.

Słowa kluczowe: sieć glutenowa, gliadyny, gluteniny, kwasy fenolowe, FT-IR, FT-Raman, struktura drugorzędowa, właściwości antyoksydacyjne

Abstract

Fortification of wheat bread with various additives, such as fiber preparations and polyphenol extracts, is becoming increasingly common due to growing consumer awareness of healthy foods. In addition, wheat bread, being a popular food product, can act as a carrier to help deliver health-promoting ingredients to the human body. Bread contains proteins that form a continuous viscoelastic network in the dough, called gluten. Gluten is formed by two types of proteins: polymeric glutenins and monomeric gliadins. Gluten proteins contain large amounts of glutamine and proline, which allows them to bind to polyphenols, which are natural antioxidants.

The mechanism of interactions between gluten proteins and polyphenols is still poorly understood, especially during the dough mixing process. This process can lead to changes in the structure of the gluten network and its mechanical properties. The purpose of the research presented in this paper was to determine the effect of selected phenolic acids on the structure of the gluten network and its individual proteins in a model wheat dough, and to study the effect of phenolic acid fortification on the antioxidant properties of gluten. Phenolic acids used in the study were benzoic acid derivatives (4-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, syringic acid) and hydroxycinnamic acid derivatives (coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, synapinic acid).

The assays were carried out on a model flour, consisting of a mixture of wheat starch and wheat gluten in a ratio of 80:15 (w/w), in order to eliminate the influence of other components naturally present in wheat flour. Analyses were performed using spectroscopic methods such as infrared spectroscopy (FT-IR) and Raman spectroscopy (FT-Raman). In addition, the content of free phenolic acids extracted from phenolic acid-modified gluten by extraction with methanol was examined. The antioxidant properties of the extracts were investigated using ABTS and FRAP assays.

Spectroscopic analysis showed that both hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid derivatives affect the secondary structure of the gluten network and both gliadin and glutenin protein types. In modified glutenins, the predominant structural changes involve β -structures. In modified gliadin samples, changes in α -helix conformation were mainly observed. The study of antioxidant properties showed that enrichment of the dough with phenolic acids, especially hydroxycinnamic derivatives, improves the antioxidant properties of the gluten network. This change is probably related to the presence of additional hydroxyl groups in the structure of the added phenolic acid.

Keywords: gluten network, gliadins, glutenins, phenolic acids, FT-IR, FT-Raman, secondary structure, antioxidant properties

Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

Rozprawa doktorska oparta jest na cyklu czterech publikacji na temat:

„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.

DOI:10.3390/molecules26020508

Czasopismo umieszczone na liście filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: **4.927**; punktacja MNiSW: 100 punktów.

Indywidualny wkład: Opracowanie pierwszej wersji manuskryptu oraz współpraca przy korekcie i finalizacji wersji końcowej

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.

Czasopismo umieszczone na liście filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: **3.8**; punktacja MNiSW: 140 punktów.

DOI:10.1016/j.jcs.2022.103503

Indywidualny wkład: Przygotowanie prób ciasta modelowego fortyfikowanych wybranymi kwasami fenolowymi, przetwarzanie danych farinograficznych, przygotowanie widm ramanowskich do analizy, analiza danych i interpretacja wyników, opracowanie pierwszej wersji manuskryptu oraz współpraca przy korekcie i finalizacji wersji końcowej.

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.

Czasopismo umieszczone na liście filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: **3.8**; punktacja MNiSW: 140 punktów.

DOI:10.1016/j.jcs.2023.103651

Indywidualny wkład: Przygotowanie prób ciasta modelowego fortyfikowanych wybranymi kwasami fenolowymi, przygotowanie ekstraktów metanolowych, rejestracja widm FT-IR, przeprowadzenie testów właściwości antyoksydacyjnych wolnych kwasów fenolowych oraz prób glutenu modyfikowanych wybranymi kwasami fenolowymi (ABTS, FRAP), pomiar hydrofobowości prób glutenu modyfikowanych wybranymi kwasami fenolowymi, przetwarzanie danych, analiza danych i interpretacja wyników, opracowanie pierwszej wersji manuskryptu oraz współpraca przy korekcie i finalizacji wersji końcowej.

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

Czasopismo umieszczone na liście filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: **2.2**; punktacja MNiSW: 100 punktów.

DOI:10.31545/intagr/184005

Indywidualny wkład: Ekstrakcja gliadyn i glutenin z prób glutenu modyfikowanych wybranymi kwasami fenolowymi, rejestracja widm FT-IR, przygotowanie widm FT-IR do analizy, analiza widm FT-IR i interpretacja wyników, opracowanie pierwszej wersji manuskryptu, współpraca przy korekcie i finalizacji wersji końcowej.

Spis treści

1. WSTĘP	13
1.1. CZYM JEST GLUTEN?	13
1.2. METODY SPEKTROSKOPOWE STOSOWANE W BADANIACH STRUKTURY GLUTENU	14
1.3. CHARAKTERYSTYKA POLIFENOLI ORAZ ICH ZNACZENIE W ŻYWNOŚCI	17
1.4. MECHANIZM ODDZIAŁYWANIA POMIĘDZY BIAŁKAMI GLUTENOWYMI I KWASAMI FENOLOWYMI	18
2. CELE I HIPOTEZY BADAWCZE.....	21
3. METODYKA	24
3.1. MATERIAŁY	24
3.2. PRZYGOTOWANIE PSZENNEGO CIASTA MODELOWEGO FORTYFIKOWANEGO KWASAMI FENOLOWYMI	24
3.3. PRZYGOTOWANIE PRÓB GLUTENU DO ANALIZ SPEKTROSKOPOWYCH.....	25
3.4. REJESTROWANIE WIDM ORAZ ANALIZA WIDM FT-RAMANA.....	25
3.5. PRZYGOTOWANIE PRÓB GLUTENU DO POMIARÓW FT-IR	26
3.6. REJESTROWANIE ORAZ ANALIZA WIDM FT-IR PRÓB GLUTENU.....	26
3.7. OZNACZANIE ILOŚCI WOLNYCH GRUP SH I GRUP SS W PRÓBACH GLUTENU	27
3.8. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTÓW KWASÓW FENOLOWYCH.....	28
3.9. OZNACZANIE STĘŻENIA KWASÓW FENOLOWYCH W EKSTRAKTACH METANOLOWYCH.....	28
3.10. OKREŚLANIE WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNYCH EKSTRAKTÓW KWASÓW FENOLOWYCH	29
3.10.1 Test ABTS.....	29
3.10.2. Test FRAP	29
3.11 . HYDROFOBOWOŚĆ POWIERZCHNI GLUTENU	30
3.12. EKSTRAKCJA GLIADYN I GLUTENIN	30
3.13. PRZYGOTOWANIE PRÓB GLIADYN I GLUTENIN DO ANALIZ SPEKTROSKOPOWYCH	31
3.14. ANALIZY STATYSTYCZNE	31
4. OMÓWIENIE UZYSKANYCH WYNIKÓW BADAŃ	33
4.1. PUBLIKACJA P.1 (EFFECTS OF PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS ON THE STRUCTURE OF GLUTEN, GLIADINS AND GLUTENINS AS STUDIED WITH SPECTROSCOPIC METHODS)	33
4.2. PUBLIKACJA P.2 (PHENOLIC ACIDS-INDUCED AGGREGATION OF GLUTEN PROTEINS. STRUCTURAL ANALYSIS OF THE GLUTEN NETWORK USING FT-RAMAN SPECTROSCOPY)	35
4.3. PUBLIKACJA P.3 (CHANGES IN THE CONFORMATION AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF GLUTEN NETWORK AFTER PHENOLIC ACID SUPPLEMENTATION).....	38
4.4. PUBLIKACJA P.4 (EFFECTS OF PHENOLIC ACID MOLECULAR STRUCTURE ON THE STRUCTURAL PROPERTIES OF GLIADINS AND GLUTENINS).....	40

5. WNIOSKI.....	42
6. BIBLIOGRAFIA	44

Wykaz skrótów:

FT-IR: Spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera

FT-Raman: Spektroskopia Ramana z transformatą 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)

4XY – kwas 4-hydroksybenzoesowy

COU – kwas kumarowy

PCAT – kwas protokatechowy

CAF – kwas kawowy

VAN – kwas wanilinowy

FER – kwas ferulowy

SYR – kwas syringowy

SYN – kwas synapinowy

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

TRP: tryptofan

1. Wstęp

1.1. Czym jest gluten?

Gluten jest lepkością siecią powstającą w trakcie mieszenia ciasta pszenne i składa się z dwóch rodzajów białek: gliadyn oraz glutenin. Białka te charakteryzują się wysoką zawartością glutaminy (26-53% mol) i proliny (10-29% mol), co sprawia, że są one odporne na działanie enzymów trawiennych człowieka. W rezultacie, duże fragmenty tych białek mogą docierać do jelita cienkiego, indukując reakcję autoimmunologiczną u osób cierpiących na celiakię (Scherf i wsp., 2016). Sieć glutenowa zawiera białka, które są jednymi z największych biopolimerów występujących w naturze. Dzięki swojej złożonej trójwymiarowej strukturze, gluten odgrywa kluczową rolę w nadawaniu pożądanych cech produktom pszenym w tym lepkość, zdolność absorpcji wody i zatrzymywania gazu (Chompoorat i wsp., 2022). Formowanie tekstury ciasta oraz proces pieczenia chleba pszenne w znacznej mierze zależą od frakcji białkowych składających się na gluten, a mianowicie od gliadyn i glutenin. Białka te wchodzi z sobą w interakcje, tworząc lepkość sieć glutenową w obecności wody podczas procesu mieszenia ciasta. Struktura i właściwości tej sieci są kluczowymi czynnikami determinującymi jakość pieczywa (Schefer i wsp., 2021).

Białka glutenowe można podzielić na dwa główne typy: monomeryczne podjednostki - gliadyny i polimeryczne podjednostki - gluteniny (Wieser, 2007). Każda z tych frakcji odgrywa zasadniczą rolę w kształtowaniu właściwości reologicznych ciasta. Gliadyny, charakteryzujące się kulistą strukturą i stosunkowo niską masą cząsteczkową, są rozpuszczalne w alkoholu i przyczyniają się do rozciągliwości ciasta. Na podstawie ich ruchliwości elektroforetycznej są one klasyfikowane na trzy podtypy: α - i γ -gliadyny, które są bogate w siarkę i mają średnią masę cząsteczkową (MW) wynoszącą 30-35 kDa, oraz ω -gliadyny, które są pozbawione siarki, z MW wynoszącym 44-88 kDa. Gliadyny tworzą głównie wewnątrzcząsteczkowe wiązania

disiarczkowe i oddziałują z gluteninami za pomocą wiązań niekowalencyjnych (Girard i Awika, 2020). Z drugiej strony, gluteniny, które są zbudowane z podjednostek o dużej (HMW) oraz małej masie cząsteczkowej (LMW) to polimeryczne białka, które łączą się między sobą poprzez międzyłańcuchowe wiązania disiarczkowe. Ich masa może wynosić od około 500 kDa do ponad 10 MDa. Gluteniny są niezbędne dla zwiększenia wytrzymałości i elastyczności ciasta. Oba rodzaje wiązań: disiarczkowe i wodorowe, są kluczowe dla reologii glutenu (Li i wsp., 2016).

Zrozumienie interakcji pomiędzy białkami glutenowymi jest istotne dla pełnego zrozumienia funkcjonalności glutenu w procesach miesienia ciasta i wypieku. Struktura glutenu jest determinowana przez szereg czynników, w tym równowagę między wiązaniami kowalencyjnymi i niekowalencyjnymi, obecność międzyłańcuchowych mostków diarczkowych oraz układ przestrzenny białkowych polimerów. Struktura przestrzenna glutenu i ilość wiązań disiarczkowych są ściśle ze sobą powiązane, przy czym międzycząsteczkowe mostki disiarczkowe odgrywają istotną rolę w zachowaniu integralności strukturalnej sieci glutenowej (Wieser, 2007). Natomiast wolne grupy sulfhydrylowe pełnią funkcję niezbędnych mediatorów w wymianach tiolowo-disiarczkowych. (Morel i wsp., 2002).

1.2. Metody spektroskopowe stosowane w badaniach struktury glutenu

Metody spektroskopowe, a w szczególności spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FT-IR) oraz spektroskopia ramanowska z transformatą Fouriera (FT-Raman), są szeroko stosowane w celu określenia struktury drugo- i trzeciorzędowej białek. Spektroskopia FT-IR jest wykorzystywana jako kluczowe narzędzie do badania różnych aspektów struktury białek (Barth, 2007). Pasma 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%). Pasma amid I typowo obserwuje się w zakresie spektralnym od 1580 do 1720 cm^{-1} . Pasma amid III, chociaż cechuje się mniejszą intensywnością w porównaniu do pasma amid I, odznacza się znaczącą wrażliwością na strukturę drugorzędową białek oraz nie zawiera pasma związanego z oscylacjami wiązań chemicznych w cząsteczce wody. Zwykle to pasmo obserwuje się w zakresie od 1200 do 1350 cm^{-1} i wynika z kompleksowej superpozycji drgań zginających wiązań N-H, rozciągających wiązań C-N oraz skręcania łańcuchów bocznych. Obydwa pasma amidowe dostarczają komplementarnych informacji strukturalnych, co pozwala lepiej zrozumieć strukturę białek (Stani i wsp., 2020). Dodatkowo, analiza regionu spektralnego związanego z β -karkami w paśmie amid III może ujawnić formowanie się dwóch typów wiązań wodorowych: typu I i II (Zhang i wsp., 2008). Wiązania wodorowe typu I ($-\text{HN}---\text{O}=\text{C}-$), charakteryzujące się pasmem zlokalizowanym przy ok. 1230 cm^{-1} , mogą tworzyć się między różnymi łańcuchami polipeptydowymi w macierzy glutenu, co sprzyja procesowi agregacji. Z kolei wiązania wodorowe typu II ($-\text{HN}---\text{O}$, wiązanie eterowe) z pasmem przy około 1220 cm^{-1} , są wynikiem interakcji między białkami glutenowymi a różnymi związkami (np. polisacharydy, polifenole), które są używane do wzbogacania ciasta pszennego (Nawrocka i wsp., 2023).

Spektroskopia ramanowska odgrywa kluczową rolę w analizie struktury białek glutenowych, ze szczególnym uwzględnieniem konfiguracji mostków disiarczkowych oraz mikrośrodowiska aminokwasów aromatycznych (tyrozyny i tryptofanu). Ta metoda pozwala na identyfikację trzech głównych konformacji mostków disiarczkowych: gauche-gauche-gauche (g-g-g), trans-gauche-gauche (t-g-g) oraz trans-gauche-trans (t-g-t), których charakterystyczne drgania można obserwować w zakresie spektralnym od 490 do 550 cm^{-1} , z wyraźnymi pikami przyporządkowanymi do poszczególnych konformacji mostków przy wartościach około 505, 520 i 530 cm^{-1} (Sugeta, 1975). Mikrośrodowisko jednego z aminokwasów aromatycznych – tyrozyny (TYR) analizuje się z wykorzystaniem dubletu

tyrozynowego ($I(850)/I(830)$), który jest zdefiniowany jako stosunek intensywności pasm przy 850 i 830 cm^{-1} . Obniżenie wartości dubletu tyrozynowego sugeruje chowanie się reszt TYR wewnątrz kompleksu białkowego i tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Przeciwnie, wzrost wartości stosunku wskazuje na ekspozycję reszt TYR na powierzchni kompleksu białkowego (Meng i wsp., 2003). Natomiast zmiana intensywności pasma przy 760 cm^{-1} dostarcza informacji o hydrofobowości pierścienia indolowego tryptofanu. Badania przeprowadzone przez Herrero i wsp. (2008) wykazały, że niższa intensywność pasma TRP przy 760 cm^{-1} w widmie Ramana sugeruje ekspozycję reszt TRP na powierzchni kompleksu białkowego, podczas gdy wyższa intensywność wskazuje na jego tendencję do lokowania się wewnątrz kompleksu białkowego.

Spektroskopia ramanowska dostarcza również informacji dotyczących struktury drugorzędowej białek poprzez analizę pasma amid I, tak jak spektroskopia w podczerwieni. Pasma amid I dostarcza cennych informacji o podstawowych strukturach drugorzędowych białek, takich jak α -helisy, β -kartki, zakręty β , a także o strukturach zagregowanych (Nawrocka i wsp., 2017, 2018). Analiza tego pasma może również ujawnić zmiany w układzie wiązań wodorowych w białkach, co pozwala na głębsze zrozumienie konformacyjnych przemian zachodzących w białkach.

W celu określenia struktury drugorzędowej białek można stosować dwie metody analizy widm FT-IR i Ramana. Pierwsza metoda, dekonwolucja pasma amid I, wykorzystuje krzywe Gaussa lub Lorentza do identyfikacji zakresów spektralnych odpowiadających konkretnym strukturom drugorzędowym. Dekonwolucja pasma umożliwia uzyskanie ilościowych informacji o zawartości poszczególnych struktur drugorzędowych, zapewniając szczegółowy wgląd w zmiany struktury białek (Gruszecki i wsp., 2009). Druga metoda, obliczanie widma różnicowego, polega na odjęciu widma próby kontrolnej od widma próby zmodyfikowanej, przy czym oba widma są normalizowane polem pod badanym pasmem przed wykonaniem

odejmowania widm. Otrzymane widmo różnicowe zawiera zarówno pasma dodatnie, jak i ujemne, co dostarcza informacji jakościowych o strukturach odpowiednio pojawiających się lub zanikających w wyniku interakcji molekularnych (Nawrocka i wsp., 2015).

1.3. Charakterystyka polifenoli oraz ich znaczenie w żywności

Polifenole są związkami naturalnie występującymi w roślinach, które odpowiadają za nadawanie im barwy i charakterystycznego aromatu. Zainteresowanie polifenolami w kontekście diety znacząco wzrosło ze względu na ich liczne pozytywne funkcje biologiczne. Jako silne antyoksydanty, odgrywają one kluczową rolę w neutralizowaniu wolnych rodników w systemach biologicznych. (Sivam i wsp., 2010).

Polifenole roślinne, działające jako naturalne antyoksydanty, przyczyniają się do inhibicji procesów degradacji żywności, tym samym poprawiając jej jakość (Sivam i wsp., 2010). Poprzez eliminację wolnych rodników, mogą one zapobiegać rozwojowi schorzeń układu krążenia, nowotworów, cukrzycy, procesom przedwczesnego starzenia, a także wywierać pozytywny wpływ na funkcjonowanie mózgu i poprawne widzenie (Yildiz i Eydurán, 2009). Polifenole mogą być dodawane do produktów żywnościowych w formie składników preparatów bogatych w błonnik lub jako ekstrakty polifenolowe (Dziki i wsp., 2014).

Termin "kwas fenolowy" odnosi się do klasy związków polifenolowych zawierających jedną grupę karboksylową. Te naturalnie występujące substancje charakteryzują się dwiema głównymi strukturami węglowymi: hydroksycynamonową i hydroksybenzoesową. Mimo, że podstawowa struktura szkieletowa pozostaje niezmienna, różnorodność strukturalna wynika z pozycji i liczby grup funkcyjnych (hydroksylowych i metoksylowych) w pierścieniu aromatycznym (Lorigooini i wsp., 2020).

Kwasy fenolowe, stanowiące najbardziej rozpowszechniony rodzaj roślinnych związków fenolowych, zdobyły znaczące zainteresowanie ze względu na ich relatywnie

wysoką aktywność antyoksydacyjną oraz efektywną absorpcję w przewodzie pokarmowym (Piazzon i wsp., 2012). Związki fenolowe mogą również wchodzić w interakcje z różnymi składnikami żywności, poprzez oddziaływania chemiczne takie jak wiązania wodorowe, jonowe oraz hydrofobowe (Czajkowska–González i wsp., 2021).

W kontekście obecnych trendów żywieniowych, które promują zdrowszą dietę, obserwuje się rosnące zainteresowanie spożywaniem pieczywa wzbogaconego o wysokie ilości błonnika oraz innych korzystnych składników bioaktywnych. Polifenole roślinne jako naturalne antyoksydanty, mogą być włączane do składu chleba pszennego w formie dodatków. Należy jednak zauważyć, że wysokie stężenia polifenoli mogą niekorzystnie wpływać na właściwości organoleptyczne chleba, powodując wzrost odczucia cierpkości i gorzkiego smaku (Jaeger i wsp., 2009). W trakcie produkcji i przetwarzania żywności, związki fenolowe podlegają zmianom chemicznym i mogą oddziaływać z łańcuchami polipeptydowymi białek glutenowych. Zrozumienie tych interakcji jest kluczowe dla rozwoju żywności funkcjonalnej, która posiadałaby wyższy poziom substancji bioaktywnych przy jednoczesnym zachowaniu cech sensorycznych na akceptowalnym poziomie.

1.4. Mechanizm oddziaływania pomiędzy białkami glutenowymi i kwasami fenolowymi

Polifenole mogą wchodzić w interakcje z bogatymi w prolinę białkami glutenowymi, ponieważ jej reszty stanowią potencjalne miejsca wiązania dla związków polifenolowych (Richard i wsp., 2006). Interakcje między polifenolami a białkami bogatymi w prolinę, takimi jak białka glutenowe, są szczególnie interesujące w kontekście nauk o żywności i zdrowia ludzi. Te interakcje mogą przybierać formę zarówno odwracalnych – w tym wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych lub oddziaływań Van der Waalsa, jak i nieodwracalnych, charakteryzujących się tworzeniem wiązań kowalencyjnych (Richard i wsp., 2006). Obie formy interakcji indukują znaczące zmiany strukturalne i funkcjonalne w białkach glutenowych, które obejmują agregację, modyfikacje konformacji mostków disiarczkowych oraz zmiany

w środowisku aminokwasów aromatycznych (tyrozyny i tryptofanu) (Gómez i wsp., 2013; Krekora i wsp., 2020). Równocześnie dochodzi do modyfikacji właściwości antyoksydacyjnych polifenoli, ogólnej zawartości związków fenolowych, ich indywidualnej zawartości oraz biodostępności. Na mechanizm oddziaływania między białkami a polifenolami wpływa szereg czynników, w tym temperatura, pH, rodzaj i stężenie i struktura białek, a także struktura, typ i rozpuszczalność związków fenolowych (Ozdal i wsp., 2013).

Oddziaływania pomiędzy białkami a polifenolami określano głównie z wykorzystaniem technik elektroforetycznych oraz spektroskopowych. Sivam i współpracownicy (2012, 2013) zbadali oddziaływania związków fenolowych i preparatów błonnikowych z białkami glutenowymi, wykorzystując spektroskopię FT-Ramana oraz FT-IR. Obserwowane zmiany w strukturze białek obejmowały wzrost zawartości struktur nieuporządkowanych i β -katek oraz spadek zawartości zakrętów β . Małe cząsteczki kwasów fenolowych mogą być wbudowywane w sieć glutenową, co prowadzi do agregacji białek. W rezultacie, duże polimerowe struktury białek glutenowych (agregaty) zwiększały konsystencję ciasta oraz jego właściwości lepkosprężyste, co w efekcie wzmocniło strukturę ciasta. Badania dokowania molekularnego przeprowadzone przez Fenga i współpracowników (2022) wykazały, że wybrane kwasy fenolowe mogą wchodzić w interakcje z gluteninami lub gliadynami za pośrednictwem wiązań wodorowych. 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 (Feng i wsp., 2022). Gliadyny są szczególnie interesującym celem dla interakcji z polifenolami ze względu na ich bogactwo w reszty prolinowe oraz struktury z motywami helikalnymi poliproliny II (PPII), co jak wykazano, ułatwia interakcje z polifenolami (Van Buiten i Elias, 2021).

Biorąc pod uwagę powszechne spożycie produktów pszennych, mogą one służyć jako doskonały nośnik związków odżywczych, takich jak związki fenolowe, potencjalnie przynoszące konsumentom różne korzyści zdrowotne. Włączenie związków fenolowych do produktów na bazie pszenicy może pozytywnie wpłynąć na zdrowie ludzi poprzez poprawę ich profilu żywieniowego.

2. Cele i hipotezy badawcze

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej, opartej na cyklu złożonym z czterech publikacji, jest zbadanie wpływu wybranych kwasów fenolowych, naturalnie występujących w preparatach błonnikowych, na strukturę oraz właściwości biochemiczne sieci glutenowej oraz poszczególnych białek glutenowych (gliadyn i glutenin). Zrozumienie mechanizmów oddziaływań między białkami a kwasami fenolowymi, takimi jak kwas 4-hydroksybenzoesowy, protokatechowy, wanilinowy, syryngowy, p-kumarowy, kawowy, ferulowy oraz synapinowy, ma kluczowe znaczenie dla określenia potencjalnych zmian w strukturze oraz właściwościach biochemicznych glutenu w cieście pszennym, który został wzbogacony o te związki.

Badania przeprowadzone zostały przy zastosowaniu metod spektroskopowych, w tym spektroskopii FT-IR oraz FT-Ramana, które umożliwiają precyzyjną analizę zmian w strukturze glutenu oraz poszczególnych białek glutenowych w odpowiedzi na oddziaływanie z kwasami fenolowymi. 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 oraz białek wchodzących w jego skład.

Sformułowano następujące cele szczegółowe:

- Identyfikacja typu (odwracalnych oraz nieodwracalnych) i zakresu zmian strukturalnych spowodowanych przez oddziaływanie 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.

Sformułowano następujące hipotezy badawcze:

- Przyłączenie cząsteczek kwasu fenolowego wpływa na strukturę drugorzędową oraz konformację mostków disiarczkowych glutenu, co prowadzi do zmiany właściwości biochemicznych sieci glutenowej.
- Kwasy fenolowe wchodzą w interakcje z białkami glutenowymi poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych, wodorowych oraz hydrofobowych.
- Struktura, rodzaj i liczba grup funkcyjnych poszczególnych kwasów fenolowych wpływają na strukturę drugorzędową oraz właściwości biochemiczne glutenu.
- Kwasy fenolowe oddziałują zarówno z monomerycznymi gliadynami, jak i z polimerycznymi gluteninami w strukturze sieci glutenowej.
- Kwasy fenolowe wykazują silniejsze oddziaływanie z gluteninami w porównaniu do gliadyn.
- Struktura chemiczna kwasu fenolowego dodawanego do ciasta wpływa na właściwości antyoksydacyjne kompleksu białkowego.

Badania przeprowadzone w ramach tej rozprawy doktorskiej wnoszą istotny wkład w dyscyplinę rolnictwo i ogrodnictwo. Szczegółowa analiza wpływu oddziaływań kwasów

fenolowych na właściwości biochemiczne i strukturalne glutenu pozwala zrozumieć, w jaki sposób związki bioaktywne, takie jak kwasy fenolowe, mogą wpływać na profil zdrowotny i odżywczy produktów zbożowych.

Rozwój żywności funkcjonalnej, wzbogaconej w naturalne przeciwutleniacze, odpowiada na rosnące zapotrzebowanie konsumentów na produkty wspierające zdrowy tryb życia. Produkty zbożowe, będące podstawowym składnikiem diety człowieka, stanowią odpowiedni nośnik dla tych związków. Ponadto, w kontekście trendów dywersyfikacji żywności, produkty zbożowe wzbogacone o przeciwutleniacze mogą być bardziej atrakcyjne dla konsumentów. Wzbogacanie produktów pszennych wybranymi związkami fenolowymi może zmniejszać ryzyko chorób cywilizacyjnych, takich jak cukrzyca czy choroba wieńcowa, oraz korzystnie wpływać na układ nerwowy. Opracowanie i wdrożenie takich produktów może wspierać strategie zdrowotne w rolnictwie i promować zdrowy styl życia, co jest kluczowe dla poprawy jakości życia społeczeństwa.

Badania te mogą również przyczynić się do zrównoważonego rozwoju rolnictwa poprzez promowanie wykorzystania naturalnych dodatków, takich jak kwasy fenolowe, w produkcji żywności. Redukcja stosowania sztucznych dodatków i poprawa jakości żywności za pomocą naturalnych związków wspierają produkcję bardziej ekologicznych i zdrowych produktów.

3. Metodyka

3.1. Materiały

Gluten pszenny, skrobia pszenna, chlorek sodu (HCl), fosforan sodu dwuwodny ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), borowodorek sodu, kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), dodecylosiarczan sodu (SDS), kwas 5,5'-ditiobis-2 nitrobenzoesowy (DTNB), L-glutation utleniony (GSSG), kwas kumarowy (COU), kwas 4-hydroksybenzoesowy (4XY), kwas ferulowy (FER), kwas kawowy (CAF), kwas wanilinowy (VAN), kwas protokatechowy (PCAT), nadsiarczan potasu ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), 2,2'-azyno-bis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian diamonu) (ABTS), chlorek sodu, 3 M bufor octanowy, 2,4,6-Tri (2-pirydył) -s-triazyna (TPTZ), siarczan żelaza (II), chlorek żelaza (III), kwas 8-anilino-1-naftalenosulfonowy (8-ANS), metanol, zostały zakupione w Sigma Aldrich (Polska). Kwas syringowy (SYR) został zakupiony w firmie Alfa Aesar (Polska). Kwas sinapinowy (SYN) kupiono od Apollo Scientific (Wielka Brytania). Stosowano wodę podwójnie destylowaną.

3.2. Przygotowanie pszennego ciasta modelowego fortyfikowanego kwasami fenolowymi

Modelowe próbki ciasta pszennego fortyfikowane ośmioma kwasami fenolowymi (4XY, VAN, FER, CAF, COU, PCAT, SYR, SYN) przygotowano w farinografie E (Brabender, Niemcy) zgodnie z metodą opisaną przez Krekora i wsp. (2020). Dodatek kwasów fenolowych wynosił 0,05 %, 0,1 % i 0,2 % (w/w). Wszystkie próby zostały przygotowane w trzech niezależnych powtórzeniach. Próby ciasta pobierano przed momentem wystąpieniem zjawiska załamania konsystencji ciasta (ang. *before dough breakdown*). Czas ten ustalono w oparciu o średnią z trzech niezależnych przebiegów farinograficznych. Następnie od średniej wartości czasu po jakim obserwowano pojawienie się zjawiska załamania konsystencji ciasta odejmowano 4 minuty i otrzymany wynik przyjmowano jako optymalny czas pobierania próbek ciasta do dalszych analiz. Moment załamania się konsystencji ciasta obserwowany był jako ostry pik na farinogramie. Celem tej procedury było zagwarantowanie odpowiedniej

struktury ciasta dla każdego powtórzenia. Ze względu na obserwowane różnice w czasie, który był potrzebny do załamania się konsystencji ciasta w zależności od rodzaju dodanych kwasów fenolowych, pobieranie próbek kontrolnych odbywało się w trzech różnych momentach: po 14 minutach (CTL14) dla CAF, FER i SYN, po 22 minutach (CTL22) dla PCAT i COU oraz po 36 minutach (CTL36) dla 4XY, SYR i VAN. Mąka modelowa, użyta do eksperymentów, składała się z komercyjnie dostępnej na rynku skrobi pszennej i glutenu pszennego zmieszanych w określonej proporcji wagowej 80:15 (w/w).

3.3. Przygotowanie prób glutenu do analiz spektroskopowych

Próby glutenu zostały wymyte z niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych kwasem fenolowym próbek ciasta modelowego przy użyciu Glutomatic 2200 (Pertin Instruments, USA), postępując zgodnie ze standardową procedurą ICC 155. Następnie, próby glutenu liofilizowano przez 24 godziny, mielono na proszek w młynku laboratoryjnym i używano do pomiarów FT-Ramana i FT-IR.

3.4. Rejestrowanie widm oraz analiza widm FT-Ramana

Widma FT-Ramana zarejestrowano przy użyciu spektrofotometru FT-Raman (NXR FT-Raman) wyposażonego w stanowisko Nicolet 6700 FT-IR przy użyciu detektora InGaAs, rozdzielacza wiązki CaF_2 (Thermo Scientific, Madison, USA), zgodnie z protokołem stosowanym przez Nawrocka i wsp., (2015). Próby umieszczono w komorze wykonanej ze stali nierdzewnej i naświetlano laserem Nd:YAG o długości fali 1064 nm i maksymalnej mocy 1 W. Widma rejestrowano w zakresie $3500\text{--}150\text{ cm}^{-1}$, przy czym każde z nich stanowiło średnią z 256 skanów przy rozdzielczości 8 cm^{-1} . Do analiz użyto widm uśrednionych z pięciu pomiarów. Próby glutenu badano w postaci proszku. Dane spektralne przygotowano do analizy zgodnie z metodologią opracowaną przez Krekora i wsp. (2020) przy użyciu ORIGIN (v. 2019b PRO, OriginLab Corporation, USA). Obliczono widma różnicowe w paśmie amid I, aby

określić zmiany w strukturze drugorzędowej glutenu, postępując zgodnie z procedurą opracowaną przez Krekorę i wsp. (2020). Drugie widmo różnicowe obliczono dla glutenu fortyfikowanego kwasami COU i SYN, ponieważ charakterystyczne dla nich pasma zostały zidentyfikowane w pierwszym widmie różnicowym. Ponadto, aby uniknąć zakłóceń w analizie przedziału spektralnego związanego z mostkami disiarczkowymi, od widma glutenu odjęto widmo skrobi, co było konieczne z powodu silnego pasma skrobi obserwowanego przy około 478 cm^{-1} . Widma wszystkich próbek glutenu i skrobi pszennej znormalizowano, biorąc pod uwagę intensywność pasma skrobi. Widma po odjęciu nie wykazywały żadnych pasm z maksimum przy 478 cm^{-1} .

3.5. Przygotowanie prób glutenu do pomiarów FT-IR

Sproszkowane próby glutenu były nawilżane przez 4 godziny w eksykatorze, w którym znajdowały się pary 10% wodnego roztworu tlenu deuteru (D_2O). Celem tego procesu było wyeliminowanie drgań wiązań chemicznych w cząsteczkach wody, które wpływają na kształt pasma amid I, co ma kluczowe znaczenie dla dokładności analiz zmian w strukturze drugorzędowej białek. Probki ważono przed i po ekspozycji na pary D_2O , a zaobserwowany przyrost wagi świadczył o absorpcji D_2O . Na końcu, przygotowane w ten sposób próby glutenu analizowano z użyciem techniki FT-IR.

3.6. Rejestrowanie oraz analiza widm FT-IR prób glutenu

Widma FT-IR zostały zarejestrowane przy użyciu spektrometru FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA), wyposażonego w diamentową przystawkę jednoodbiciową ATR (ang. *Attenuated Total Refelction*). Procedura zbierania i przetwarzania danych została przeprowadzona zgodnie z metodologią opracowaną przez Nawrocką i wsp. (2017). Rejestracja widm odbywała się w zakresie od 4000 do 400 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1} , przy czym sygnał był uśredniany z 128 skanów. Analizowane widma stanowiły średnią z pięciu uzyskanych

widm. Następnie wszystkie widma zostały znormalizowane na paśmie D₂O przy 2485 cm⁻¹. W celu redukcji interferencji pochodzących od wody w paśmie amid I, od każdego z widm badanych prób glutenu odjęto znormalizowane widmo 10% roztworu D₂O. Do przetwarzania zarejestrowanych widm zastosowano oprogramowanie ORIGIN (wersja 2019b PRO, OriginLab Corporation, USA).

W ramach analizy strukturalnej, dla lepszego zrozumienia zmian w strukturze białek, obliczono widma różnicowe dla pasm amid I (1580 - 1720 cm⁻¹) oraz amid III (1200 - 1340 cm⁻¹). Uzyskano je poprzez odjęcie widma próbki kontrolnej (czystego glutenu) od widma kompleksu gluten-kwas fenolowy.

3.7. Oznaczanie ilości wolnych grup SH i grup SS w próbach glutenu

W celu określenia ilości wolnych grup sulfhydrylowych (SH) i zawartości grup disulfidowych (SS) zastosowano zmodyfikowaną procedurę Schopf i Scherf (2021). Do obliczenia całkowitej ilości wolnych grup SH, 2 mg sproszkowanej próby glutenu dodano do 0,9 ml buforu fosforanowego (0,05 M), który zawierał 9 g dwuwodnego fosforanu sodu, 180,18 g mocznika, 0,292 g EDTA i 20 g SDS na litr wody. Próbę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 23°C. Następnie próbę odwirowano z prędkością 11 000 × g przez 5 minut, aby uzyskać supernatant. Do supernatantu dodano 200 µl odczynnika Ellmana (1 mg DTNB rozpuszczonego w 1 ml buforu fosforanowego) i inkubowano przez 45 minut w temperaturze 23°C. Absorbancję supernatantu z odczynnikiem Ellmana mierzono przy 412 nm za pomocą spektrofotometru UV-VIS (Cary 300 / Biomelt, Varian Pty, USA). Zawartość wolnych grup SH obliczono korzystając z metody zaproponowanej przez Hu i wsp. (2011). Zawartość grup SH obliczono poprzez użycie wzoru:

$$\mu\text{M SH/g} = 73,53 \cdot A_{412}/C \quad (1)$$

73,53 jest wartością ilorazu konwersji z podstawy molowej na $\mu\text{M}/\text{mL}$ oraz z mg na g (10^6), przez molowy współczynnik absorpcji wynoszący $1,34 \cdot 10^4$. A_{412} to absorbancja przy długości fali 412 nm, a C to stężenie próby glutenu suplementowanej poszczególnymi kwasami fenolowymi. Pomiar dla każdej próby przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach (Hu i wsp., 2011)

Aby określić całkowitą zawartość grup SS, do 2 mg próby glutenu dodano 200 μl roztworu NaBH_4 (2,5% w/v) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 50°C . Po inkubacji do próby dodano 100 μl HCl (1 M) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 23°C . Następnie przeprowadzono procedurę analogiczną do tej używanej przy oznaczaniu wolnych grup sulfhydrylowych. Całkowita zawartość grup SS została obliczona na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla GSSG (glutathion zredukowany) jako wzorca. Także te pomiary wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach dla każdej próby.

3.8. Przygotowanie ekstraktów kwasów fenolowych

Kwasy fenolowe obecne w sieci glutenowej zostały wyekstrahowane zgodnie ze zmodyfikowaną metodą opartą na protokole opisanym przez Sivam i wsp. (2013). W pierwszym etapie, 7,5 mg sproszkowanych prób glutenu – zarówno niezmodyfikowanych (kontrolnych), jak i zmodyfikowanych poprzez dodanie kwasów fenolowych – ekstrahowano przez 16 godzin w 1,5 ml metanolu. Następnie, ekstrakty wirowano przy prędkości $14\,000 \times g$ przez 3 minuty. Uzyskany supernatant wykorzystano do oznaczenia stężenia kwasów fenolowych, testów ABTS i FRAP i pomiaru hydrofobowości powierzchni glutenu.

3.9. Oznaczanie stężenia kwasów fenolowych w ekstraktach metanolowych

Ekstrakt kwasów fenolowych poddano analizie z wykorzystaniem spektroskopii UV-VIS, korzystając ze spektrofotometru Cary 300 / Biomelt (Varian Pty., USA). Do określania stężenia molowego kwasów fenolowych w ekstraktach wykorzystano prawo Lamberta-Beera,

które umożliwia obliczenie stężenia substancji rozpuszczonej w określonym rozpuszczalniku na podstawie jej absorbancji oraz wartości molowego współczynnika absorpcji:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \quad (2)$$

Absorbancja (A) roztworu jest funkcją molowego współczynnika absorpcji (ϵ), który odzwierciedla zdolność rozpuszczonej substancji do pochłaniania światła o określonej długości fali, stężenia (C) tej substancji w roztworze, wyrażonego w molach na litr, oraz długości drogi optycznej światła (l) przechodzącego przez roztwór, zazwyczaj $l = 1$ cm.

3.10. Określanie właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów kwasów fenolowych

3.10.1 Test ABTS

Test ABTS został przeprowadzony w oparciu o metodę Dudonné i wsp., (2009), z pewnymi modyfikacjami. Aby przygotować roztwór podstawowy kationu ABTS, pozostawiono go do inkubacji w ciemności w temperaturze pokojowej przez 16 godzin przed użyciem. Następnie roztwór podstawowy rozcieńczono w metanolu, aby uzyskać absorbancję na poziomie $0,70 \pm 0,05$ przy długości fali 745 nm, co pozwoliło na otrzymanie roztworu roboczego przeznaczonego do oceny aktywności zmiatania wolnych rodników przez ABTS.

W eksperymencie, 50 μ l ekstraktu danej próby zmieszano z 650 μ l roztworu roboczego ABTS. Uzyskaną mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze pokojowej przez 6 minut, a następnie zmierzono jej absorbancję przy 745 nm z użyciem spektrofotometru Cary 300 / Biomelt (Varian Pty., USA).

Dodatkowo, aby porównać zdolności antyoksydacyjne między kompleksami gluten-kwas fenolowy a samymi kwasami fenolowymi, przeprowadzono pomiar właściwości przeciwutleniających czystych roztworów kwasów fenolowych.

3.10.2. Test FRAP

Test FRAP przeprowadzono zgodnie z procedurą opracowaną przez Dudonné i wsp., (2009) z niewielkimi modyfikacjami. 650 μ l odczynnika FRAP zmieszano z 50 μ l próbki

ekstraktu. Następnie mieszaninę inkubowano przez 30 minut w ciemności, aby umożliwić redukcję jonów żelaza Fe^{3+} do Fe^{2+} . Absorbancję zabarwionego produktu reakcji, kompleksu tripirydylotriazyny z żelazem (Fe^{2+}), zmierzono przy długości fali 594 nm z użyciem spektrofotometru Cary 300 / Biomelt (Varian Pty., USA).

W celu dokładniejszego porównania zdolności redukcyjnych kompleksów gluten-kwas fenolowy oraz wolnych kwasów fenolowych, przeprowadzono również pomiary właściwości przeciwutleniających czystych roztworów kwasów fenolowych. To pozwoliło na bezpośrednie porównanie aktywności antyoksydacyjnej badanych próbek z właściwościami wolnych kwasów fenolowych.

3.11 . Hydrofobowość powierzchni glutenu

Hydrofobowość powierzchni glutenu została zmierzona z użyciem kwasu 8-anilinonaftalenosulfonowego (8-ANS) jako sondy fluorescencyjnej, stosując metodę Iwaki i wsp. (2021) z pewnymi modyfikacjami. Do 250 μl ekstraktu glutenu przygotowanego zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.8 dodano 10 μl roztworu 8-ANS o stężeniu 0,5 μM . Następnie mieszaninę rozcieńczono do objętości 2 ml za pomocą 95% metanolu (MeOH). Widma emisji mierzono w zakresie od 390 do 620 nm, aby monitorować fluorescencję 8-ANS. Pomiar przeprowadzono przy długości fali wzbudzenia wynoszącej 370 nm. Szerokość szczelin monochromatora ustawionego na drodze wzbudzenia oraz monochromatora na drodze emisji wynosiła 5 nm.

3.12. Ekstrakcja gliadyn i glutenin

Ekstrakcja gliadyn i glutenin z prób glutenu została przeprowadzona zgodnie z lekko zmodyfikowaną metodą opisaną przez Taddei i wsp. (2013). Na początku procesu, 120 mg sproszkowanego glutenu rozpuszczono w 40 ml 70% etanolu. Mieszanie prowadzono w temperaturze pokojowej (25 °C) przez 4 godziny, wykorzystując do tego celu mieszadło

magnetyczne. Po zakończeniu mieszania, mieszaninę odwirowano przy prędkości $4000 \times g$ przez 10 minut, co umożliwiło oddzielenie supernatantu zawierającego rozpuszczone gliadyny. Następnie supernatant zebrano do osobnej probówki typu Falcon i poddano procesowi liofilizacji, aby uzyskać sproszkowane gliadyny przeznaczone do dalszej analizy.

Procedurę ekstrakcji przeprowadzono łącznie trzykrotnie, aby zapewnić jak najdokładniejsze odseparowanie gliadyn. Nierozpuszczalna w etanolu frakcja białkowa, zawierająca głównie gluteniny, również została poddana liofilizacji.

3.13. Przygotowanie prób gliadyn i glutenin do analiz spektroskopowych

Po zakończeniu procesu liofilizacji, zarówno sproszkowane gliadyny, jak i gluteniny przechowywano w eksykatorze w celu zachowania stałej i jak najniższej wilgotności próbki aż do momentu przeprowadzenia rejestracji widm FT-IR.

Proces zbierania i przetwarzania danych został przeprowadzony zgodnie z metodologią opracowaną przez Nawrocką i wsp. (2017). Widma rejestrowano w zakresie od 4000 do 400 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1} , przy czym sygnał został uśredniony z 128 skanów. Analizowane widma stanowiły średnią z pięciu uzyskanych widm.

W ramach analizy strukturalnej, dla lepszego zrozumienia zmian w strukturze białek, obliczono widma różnicowe dla pasm amid I (1580 - 1720 cm^{-1}) oraz amid III (1200 – 1340 cm^{-1}). Uzyskano je poprzez odjęcie widma próbki kontrolnej od widma kompleksu gluten-kwas fenolowy.

3.14. Analizy statystyczne

Analizę statystyczną danych przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Statistica (wersja 13.1, TIBCO Software Inc., Tulsa, USA). W celu porównania różnic między grupami zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a dla dokładniejszego ustalenia między którymi grupami występują istotne statystycznie różnice, wykorzystano test

post hoc Tukeya ($p = 0,05$). Wszystkie dane zaprezentowano w formie średnich wartości wraz z odchyleniami standardowymi, uzyskane na podstawie trzech powtórzeń eksperymentalnych.

4. Omówienie uzyskanych wyników badań

4.1. Publikacja P.1 (Effects of physical and chemical factors on the structure of gluten, gliadins and glutenins as studied with spectroscopic methods)

Niniejszy artykuł przeglądowy prezentuje zastosowanie metod spektroskopowych – spektroskopii w podczerwieni (FT-IR) oraz spektroskopii Ramana – w badaniach nad strukturą sieci glutenowej oraz białek wchodzących w skład tej sieci czyli gliadyn i glutenin. Obie techniki dostarczają komplementarnych informacji dotyczących struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej białek, poprzez analizę m.in. pasm amid I i amid III, konformacji mostków disiarczkowych, a także zmian w mikrośrodowisku tyrozyny i tryptofanu oraz populacjach wody.

W literaturze, badania zmian w strukturze glutenu były przeprowadzane w kontekście różnych warunków, takich jak różne poziomy uwodnienia ciasta, zmiany temperatury, proces zamrażania i przechowywania ciasta, a także wpływ różnych dodatków, takich jak emulsyfikatory i stabilizatory ciasta, preparaty błonnika pokarmowego, polisacharydy, ekstrakty polifenolowe i wolne polifenole. Przeprowadzono analizę różnych form glutenu, które obejmowały: gluten z tradycyjnego ciasta pszennego, z pszennego ciasta modelowego (złożonego wyłącznie ze skrobi pszennej i glutenu pszennego), z ciasta glutenowego bez dodatku skrobi. Badania strukturalne przeprowadzono również na wyekstrahowanych z glutenu: gliadynach i gluteninach. Analizy wykonano na próbach w różnych stanach: ciasto uwodnione, w formie proszku czy roztworu.

Przegląd literatury wykazał, że woda odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu struktury glutenu, gdzie sieć glutenowa o różnych stopniach uwodnienia tworzy odmienne struktury drugorzędowe. Gluten z małą zawartością wody jest bogatszy w nieuporządkowane struktury, natomiast zwiększenie uwodnienia prowadzi do formowania struktur takich jak α -helisy, β -kartki i zakręty β , co znajduje odzwierciedlenie w modelu „pętli i pociągów” (ang.

„*loops and trains*”) sieci glutenowej, zaproponowanym przez Beltona i wsp. (2001). Dodatkowo, dodawanie różnych związków do ciasta wpływa na interakcje między wodą a białkami glutenowymi, co może prowadzić do dehydratacji sieci glutenowej, jak w przypadku dodatku błonnika pokarmowego i polisacharydów, lub do innych zmian strukturalnych, jak zaobserwowano po dodaniu polifenoli.

Przegląd literatury potwierdza, że spektroskopia w podczerwieni (FT-IR) i spektroskopia Ramana są odpowiednimi technikami do badania struktury sieci glutenowej, umożliwiającymi głębsze zrozumienie zmian zachodzących na poziomie molekularnym. Badania te są istotne dla rozwoju nowych produktów piekarniczych, a także dla poprawy jakości i właściwości mechanicznych istniejących produktów, przy uwzględnieniu różnych dodatków i warunków przechowywania.

4.2. Publikacja P.2 (Phenolic acids-induced aggregation of gluten proteins. Structural analysis of the gluten network using FT-Raman spectroscopy)

Dodatek polifenoli do ciasta pszennego wpływa na strukturę i właściwości mechaniczne sieci glutenowej. Celem przeprowadzonego eksperymentu było zbadanie zmian w strukturze drugo- i trzeciorzędowej sieci glutenowej wywołanych przez wybrane kwasy hydroksycynamonowe i hydroksybenzoesowe, wykorzystując do tego celu spektroskopię FT-Ramana. W badaniach zastosowano kwasy fenolowe w stężeniach 0,05%, 0,1% i 0,2% (w/w) w modelowym cieście pszennym.

Stwierdzono, że wszystkie kwasy fenolowe indukowały podobne zmiany w strukturze drugorzędowej białek glutenowych tj. tworzenie się struktur zagregowanych z α -helis oraz β -katek i zakrętów β połączonych wiązaniami wodorowymi wewnątrz- lub/i międzycząsteczkowymi. W szczególności kwasy hydroksybenzoesowe powodowały bardziej intensywne zmiany strukturalne, w tym tworzenie tzw. pseudo- β -katek. Struktura pseudo- β -katek, różni się od konwencjonalnych β -katek poprzez występowanie dodatkowych wiązań wodorowych międzylańcuchowych (Biran i wsp., 2014, Ng i wsp., 2010). Zauważono także, że w cieście z dodatkiem kwasów hydroksycynamonowych szybciej następowało załamanie się konsystencji ciasta (ang. *dough breakdown*), w porównaniu do ciasta modyfikowanego kwasami hydroksybenzoesowymi, co sugeruje silniejsze interakcje między kwasami hydroksycynamonowymi a siecią glutenową.

Analiza widm wykazała, że kwasy fenolowe wywierają wpływ na mikrośrodowisko aminokwasów aromatycznych TYR i TRP. To wskazuje na złożone interakcje między kwasami fenolowymi a białkami glutenowymi, które zależą od struktury chemicznej kwasów, ich stężenia oraz obecności różnych grup funkcyjnych w pierścieniu aromatycznym. Suplementacja ciasta kwasem 4XY skutkowała wynikiem podobnym do grupy kontrolnej oznaczonej jako CTRL36. Dodanie kwasów fenolowych, takich jak COU, PCAT, VAN, FER,

SYN i SYR , zwiększyło intensywność pasma TRP w porównaniu z próbą kontrolną. Zwiększenie intensywności pasma może być związane z lokowaniem się reszt TRP w hydrofobowym środowisku kompleksu białkowego. Te wyniki korelują z danymi otrzymanymi z analiz zmian w strukturze drugorzędowej sieci glutenowej, które sugerują tworzenie się agregatów w obecności kwasów fenolowych. Wzrost ilości reszt TRP, które ułożyły się wewnątrz kompleksu białkowego, może również przyczynić się do częściowego odwodnienia sieci glutenowej w fazie miesienia ciasta, jak wskazują Nawrocka i wsp., (2017). Suplementacja ciasta kwasem CAF o najniższym stężeniu nie wywołała istotnych zmian w środowisku TRP, podczas gdy wyższe stężenia spowodowały zmniejszenie intensywności pasm TRP. Najwyższe stężenie COU także spowodowało obniżenie intensywności pasma TRP.

Wartości stosunku dubletu tyrozynowego (I(850)/I(830)) we wszystkich badanych próbkach przekraczały wartość 1,43, co sugeruje ekspozycję reszt tyrozynowych pełniących funkcję akceptorów protonów w wiązaniach wodorowych. Taka ekspozycja reszt tyrozynowych może utrudniać proces zwijania się białek glutenowych podczas procesu miesienia ciasta. Z kolei lokowanie się reszt tryptofanowych (TRP) w środowisku hydrofobowym kompleksu białkowego obserwowano głównie w obecności kwasów fenolowych zawierających grupę metoksyłową, takich jak kwas wanilinowy (VAN), kwas ferulowy (FER), kwas syringowy (SYR) oraz kwas synapinowy (SYN). Podobne zjawisko zauważono także w przypadku kwasu protokatechowego (PCAT) oraz przy niższych stężeniach kwasu p-kumarowego (COU).

Podsumowując, fortyfikacja ciasta kwasami fenolowymi prowadzi do zmian w strukturze białek glutenowych, wpływając na rozwój sieci glutenowej podczas procesu miesienia ciasta. Zmiany te dotyczą przede wszystkim tworzenia się struktur zagregowanych, zwiększenia udziału pseudo- β -katektów i wpływu na stabilność wiązań wodorowych. Interakcje między kwasami fenolowymi a siecią glutenową są złożone i zależą od wielu czynników, w tym

struktury chemicznej dodanych związków. Ponadto, badania wskazują na możliwą silniejszą interakcję kwasów fenolowych z gluteninami, w porównaniu do gliadyn. Główne zmiany strukturalne zidentyfikowane w analizowanych próbkach to tworzenie się struktur: β -kardk i agregatów z α -helis i zakrętów β . Wskazuje to, że kwasy fenolowe mogą oddziaływać głównie z gluteninami. Gliadyny, które mają głównie struktury α -helikalne, prawdopodobnie nie są zaangażowane w interakcje z kwasami fenolowymi w takim stopniu jak gluteniny, z powodu braku dodatniego pasma w obszarze spektralnym 1648-1657 cm^{-1} (Wellner i wsp., 2005).

4.3. Publikacja P.3 (Changes in the conformation and biochemical properties of gluten network after phenolic acid supplementation)

Niniejsze badania skupiały się na ocenie wpływu dodatku wybranych kwasów fenolowych – hydroksycynamonowych i hydroksybenzoesowych – na strukturę drugorzędową i trzeciorzędową sieci glutenowej w modelowym cieście pszennym. Do badań wykorzystano technikę spektroskopii w podczerwieni (FT-IR). Kwasy fenolowe dodawano do ciasta w stężeniach 0,05%, 0,1% i 0,2% (w/w).

Analiza pasma amid I pokazała, że fortyfikacja ciasta chlebowego kwasami fenolowymi prowadzi do tworzenia się zakrętów β i antyrównoległych β -katek. Struktury te powstają kosztem pseudo- β -katek i zakrętów β z wiązaniami wodorowymi. Analogiczny zakres zmian w strukturze drugorzędowej zaobserwowano w paśmie amid III. Zarejestrowano wzrost zawartości β -katek wraz ze spadkiem udziału α -helis i zakrętów β . Niewielkie zmiany zostały także zauważone w obszarze pasma OH po dodaniu kwasów fenolowych.

Dodatkowe badania, wykorzystujące spektroskopię UV-Vis, wykazały, że gluten modyfikowany kwasami hydroksycynamonowymi wykazuje silniejsze właściwości przeciwutleniające w porównaniu do prób modyfikowanych kwasami hydroksybenzoesowymi. Obecność dodatkowej grupy hydroksylowej (-OH) w strukturze kwasu fenolowego istotnie wpływała na zwiększenie aktywności przeciwutleniającej fortyfikowanego glutenu. Po dodatku kwasów fenolowych, nie zaobserwowano znaczącego wzrostu hydrofobowości powierzchni sieci glutenowej.

Podsumowując, fortyfikacja kwasami fenolowymi wywołuje znaczące zmiany w strukturze i właściwościach biochemicznych sieci glutenowej. Zmiany w pasmach amid I i amid III sugerują, że kwasy fenolowe oddziałują głównie z gluteninami, co prowadzi do zwiększenia liczby β -katek kosztem α -helis. Dodatek kwasów fenolowych nie miał jednak istotnego wpływu na hydratację ani hydrofobowość sieci glutenowej. Z kolei właściwości

przeciwutleniające białek glutenowych poprawiły się, co korelowało z właściwościami przeciwutleniającymi dodanych kwasów. Poprawa w zmiataniu wolnych rodników oraz redukcji jonów żelaza do jonów żelaznych wzrastała wraz ze zwiększaniem stężenia dodanego kwasu fenolowego, co było zależne od struktury chemicznej oraz obecności grup funkcyjnych w badanych związkach. Te wyniki wskazują na potencjalne korzyści zdrowotne wynikające z użycia kwasów fenolowych w produktach na bazie pszenicy, poprzez znaczące zwiększenie właściwości przeciwutleniających białek glutenowych.

4.4. Publikacja P.4 (Effects of phenolic acid molecular structure on the structural properties of gliadins and glutenins)

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu dodatku kwasów fenolowych na strukturę poszczególnych białek glutenowych, czyli gliadyn i glutenin. Wykorzystano spektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera (FT-IR) do analizy zmian w strukturze drugorzędowej poszczególnych białek glutenowych po dodaniu wybranych kwasów fenolowych do modelowego ciasta pszennego w stężeniach 0,05%, 0,1% i 0,2% (w/w).

Wyniki wskazują, że dodatek kwasów fenolowych prowadzi do zmian w strukturze drugorzędowej zarówno gliadyn, jak i glutenin, przy czym zakres tych zmian zależy od specyficznej struktury i stężenia kwasu fenolowego. Obserwowano, że większość interakcji między tymi kwasami, a białkami prowadzi do powstawania struktur nieuporządkowanych. Wykazano, że dodatek konkretnych kwasów fenolowych ma wpływ na wiązania wodorowe w obu typach białek glutenowych.

W analizowanych próbkach gliadyn modyfikowanych kwasami fenolowymi zaobserwowano zmiany w konformacji α -helis. Wyniki te są zgodne z literaturą, która wskazuje, że α -helisy są najczęściej występującym motywem struktury drugorzędowej w gliadynach (Wellner i wsp. 2005). Zauważono jednak, że zmiany strukturalne indukowane przez kwasy fenolowe są bardziej złożone w gliadynach niż w gluteninach. Różnice we wpływie kwasów fenolowych na gliadyny mogą wynikać z faktu, że kwasy fenolowe zastosowane w naszym eksperymencie mogą oddziaływać z różnymi podjednostkami gliadyn. Gluteniny, które zostały zmodyfikowane kwasem fenolowym, prawdopodobnie wykazują zwiększoną zawartość struktur β w porównaniu do próby kontrolnej. Obserwację potwierdza spadek intensywności pasm przypisanych do zawartości α -helis, a wzrost intensywności pasm przypisanych do struktur β .

Z badań wynika, że wpływ kwasów fenolowych na strukturę białek glutenowych może potencjalnie zmieniać ich alergiczność, szczególnie przez redukcję ilości zakrętów β w gluteninach, co może mieć znaczenie dla osób z alergią na gluten. Odkrycia te mogą otworzyć nowe perspektywy dla chemii żywności, umożliwiając opracowanie strategii mających na celu modyfikację właściwości glutenu i łagodzenie reakcji alergicznych na gluten poprzez zastosowanie kwasów fenolowych.

Ponadto, badania te podkreślają potencjał stosowania kwasów fenolowych w tworzeniu żywności funkcjonalnej, która mogłaby lepiej odpowiadać na specyficzne wymagania dietetyczne, w tym dla osób z nadwrażliwością na gluten. Zrozumienie dokładnych mechanizmów interakcji między białkami glutenowymi a polifenolami może prowadzić do opracowania nowych produktów żywnościowych charakteryzujących się zoptymalizowanymi właściwościami zdrowotnymi i sensorycznymi.

5. Wnioski

Przedstawione w niniejszej pracy hipotezy badawcze zostały potwierdzone przy pomocy przedstawionych wyników badań i opublikowane w czasopismach z listy JCR.

Na podstawie tych badań sformułowano następujące wnioski:

- Zarówno gliadyny jak i gluteniny wykazują powinowactwo do kwasów fenolowych.
- Gluteniny cechują się zwiększonym powinowactwem do kwasów fenolowych. Świadczą o tym zmiany obserwowane w pasmach przypisanych do struktur β obserwowanych podczas analiz pasm amid I oraz amid III.
- Kwasy fenolowe wbudowują się w sieć glutenową w sposób odwracalny, głównie tworząc wiązania wodorowe.
- Dodatek pochodnych kwasu hydroksycynamonowego prowadził do szybszego załamania się konsystencji ciasta podczas procesu miesienia. Jest to związane prawdopodobnie z większymi właściwościami antyoksydacyjnymi oraz dodatkowym wiązaniem podwójnym w budowie tych kwasów.
- Kwasy fenolowe, zarówno pochodne kwasów hydroksycynamonowych jak i hydroksybenzoesowych, wpływają na strukturę drugorzędową sieci glutenowej oraz obu typu białek: gliadyn oraz glutenin.
- Dodatek kwasów fenolowych do modelowego ciasta powoduje agregację sieci glutenowej.
- Oddziaływania kwasów fenolowych z gliadynami lub gluteninami prowadzą do tworzenia struktur zagregowanych. Zmiany strukturalne w gliadynach modyfikowanych kwasami fenolowymi są bardziej zróżnicowane niż w gluteninach.
- Analiza spektralna modyfikowanych glutenin wskazuje, że dominujące zmiany strukturalne dotyczą struktur β . Jest to poparte obecnością dodatnich pasm przypisanych tym strukturom i występuje kosztem α -helis.

- 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.
- Wzbogacanie ciasta kwasami fenolowymi, szczególnie pochodnymi hydroksycynamonowymi, poprawia właściwości przeciwutleniające sieci glutenowej. Zmiana ta jest prawdopodobnie związana z obecnością dodatkowych grup hydroksylowych w strukturze kwasów i jest bardziej widoczna w przypadku wyższego stężenia kwasów wskazując na potencjalne korzyści zdrowotne płynące z ich zastosowania w produktach zbożowych.
- Zmiany strukturalne w sieci glutenowej, gliadynach i gluteninach zależą od liczby i rodzaju grup funkcyjnych obecnych w pierścieniu aromatycznym kwasów fenolowych, ich zdolnościach antyoksydacyjnych, oraz obecności dodatkowego wiązania podwójnego w cząsteczce kwasów hydroksycynamonowych.

6. Bibliografia

- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>
- Biran, S., Gat, Y., & Fass, D. (2014). The Eps1p Protein Disulfide Isomerase Conserves Classic Thioredoxin Superfamily Amino Acid Motifs but Not Their Functional Geometries. *PLOS ONE*, 9(12), e113431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113431>
- Chompoorat, P., Fasasi, A., Lavine, B. K., & Rayas-Duarte, P. (2022). Gluten Conformation at Different Temperatures and Additive Treatments. *Foods*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/foods11030430>
- Czajkowska-González, Y. A., Alvarez-Parrilla, E., del Rocío Martínez-Ruiz, N., Vázquez-Flores, A. A., Gaytán-Martínez, M., & de la Rosa, L. A. (2021). Addition of phenolic compounds to bread: Antioxidant benefits and impact on food structure and sensory characteristics. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s43014-021-00068-8>
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768–1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- Dziki, D., Różyło, R., Gawlik-Dziki, U., & Świeca, M. (2014). Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 40(1), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.010>
- 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*, 102(15), 7387–7396.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.12107>
- 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*, 19(4), 2164–2199.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12572>
- Gómez, A. V., Ferrer, E. G., Añón, M. C., & Puppo, M. C. (2013). Changes in secondary structure of gluten proteins due to emulsifiers. *Journal of Molecular Structure*, 1033, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.08.031>
- Gruszecki, W. I., Janik, E., Luchowski, R., Kernen, P., Grudzinski, W., Gryczynski, I., & Gryczynski, Z. (2009). Supramolecular Organization of the Main Photosynthetic Antenna Complex LHCII: A Monomolecular Layer Study. *Langmuir*, 25(16), 9384–9391. <https://doi.org/10.1021/la900630a>
- Herrero, A. M., Carmona, P., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2008). Raman spectroscopic determination of structural changes in meat batters upon soy protein addition and heat treatment. *Food Research International*, 41(7), 765–772.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.06.001>
- Hu, X., Zhao, M., Sun, W., Zhao, G., & Ren, J. (2011). Effects of Microfluidization Treatment and Transglutaminase Cross-Linking on Physicochemical, Functional, and Conformational Properties of Peanut Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16), 8886–8894. <https://doi.org/10.1021/jf201781z>
- Iwaki, S., Hayakawa, K., Fu, B.-X., & Otake, C. (2021). Changes in Hydrophobic Interactions among Gluten Proteins during Dough Formation. *Processes*, 9(7), Article 7.
<https://doi.org/10.3390/pr9071244>

- Jaeger, S., Axten, L., Wohlers, M., & Sun-Waterhouse, D. (2009). Polyphenol-rich beverages: Insights from sensory and consumer science. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2356–2363. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3721>
- 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>
- Li, X., Lv, Y., Chen, Y., & Chen, J. (2016). A Study on the Relationship Between Rheological Properties of Wheat Flour, Gluten Structure, and Dumpling Wrapper Quality. *International Journal of Food Properties*, 19(7), 1566–1582. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.951894>
- Lorigooini, Z., Jamshidi-kia, F., & Hosseini, Z. (2020). Chapter 4—Analysis of aromatic acids (phenolic acids and hydroxycinnamic acids). In A. Sanches Silva, S. F. Nabavi, M. Saeedi, & S. M. Nabavi (Eds.), *Recent Advances in Natural Products Analysis* (pp. 199–219). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00004-4>
- Meng, G., Ma, C.-Y., & Phillips, D. L. (2003). Raman spectroscopic study of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean). *Food Chemistry*, 81(3), 411–420. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00471-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00471-5)
- Morel, M.-H., Redl, A., & Guilbert, S. (2002). Mechanism of Heat and Shear Mediated Aggregation of Wheat Gluten Protein upon Mixing. *Biomacromolecules*, 3, 488–497. <https://doi.org/10.1021/bm015639p>
- Nawrocka, A., Krekora, M., Niewiadomski, Z., & Miś, A. (2018). FTIR studies of gluten matrix dehydration after fibre polysaccharide addition. *Food Chemistry*, 252, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.110>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.02.001>
- Nawrocka, A., Szymańska-Chargot, M., Miś, A., Ptaszyńska, A. A., Kowalski, R., Waśko, P., & Gruszecki, W. I. (2015). Influence of dietary fibre on gluten proteins structure – a study on model flour with application of FT-Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(3), 309–316. <https://doi.org/10.1002/jrs.4648>
- Nawrocka, A., Zarzycki, P., Kłosok, K., Welc, R., Wirkijowska, A., & Teterycz, D. (2023). Effect of dietary fibre waste originating from food production on the gluten structure in common wheat dough. *International Agrophysics*, 37(1), 101–109. <https://doi.org/10.31545/intagr/159236>
- Ng, C. L., Lang, K., Meenan, N. A. G., Sharma, A., Kelley, A. C., Kleanthous, C., & Ramakrishnan, V. (2010). Structural basis for 16S ribosomal RNA cleavage by the cytotoxic domain of colicin E3. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(10), 1241–1246. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1896>
- Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954–970. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>
- Piazzon, A., Vrhovsek, U., Masuero, D., Mattivi, F., Mandoj, F., & Nardini, M. (2012). Antioxidant Activity of Phenolic Acids and Their Metabolites: Synthesis and Antioxidant Properties of the Sulfate Derivatives of Ferulic and Caffeic Acids and of the Acyl Glucuronide of Ferulic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), 12312–12323. <https://doi.org/10.1021/jf304076z>

- Richard, T., Lefeuvre, D., Descendit, A., Quideau, S., & Monti, J. P. (2006). Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1760(6), 951–958. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.01.005>
- Schefer, S., Oest, M., & Rohn, S. (2021). Interactions between Phenolic Acids, Proteins, and Carbohydrates—Influence on Dough and Bread Properties. *Foods*, 10(11), 2798. <https://doi.org/10.3390/foods10112798>
- Scherf, K., Wieser, H., & Koehler, P. (2016). Improved Quantitation of Gluten in Wheat Starch for Celiac Disease Patients by Gel-Permeation High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (GP-HPLC-FLD). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02512>
- Schopf, M., & Scherf, K. A. (2021). Water Absorption Capacity Determines the Functionality of Vital Gluten Related to Specific Bread Volume. *Foods*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/foods10020228>
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C. O., & Waterhouse, G. I. N. (2012). Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; a FTIR and HPLC investigation. *Food Chemistry*, 131(3), 802–810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.047>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.039>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01815.x>

- Stani, C., Vaccari, L., Mitri, E., & Birarda, G. (2020). FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: New insight into the amide III band. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 229, 118006. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.118006>
- Sugeta, H. (1975). Normal vibrations and molecular conformations of dialkyl disulfides. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 31(11), 1729–1737. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(75\)80116-4](https://doi.org/10.1016/0584-8539(75)80116-4)
- Taddei, P., Zanna, N., & Tozzi, S. (2013). Raman characterization of the interactions between gliadins and anthocyanins. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(10), 1435–1439. <https://doi.org/10.1002/jrs.4288>
- Van Buiten, C. B., & Elias, R. J. (2021). Gliadin Sequestration as a Novel Therapy for Celiac Disease: A Prospective Application for Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms22020595>
- Wellner, N., Mills, E. N. C., Brownsey, G., Wilson, R. H., Brown, N., Freeman, J., Halford, N. G., Shewry, P. R., & Belton, P. S. (2005). Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by dynamic fourier transform infrared spectroscopy. *Biomacromolecules*, 6(1), 255–261. <https://doi.org/10.1021/bm049584d>
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>
- Yildiz, Ö., & Eydurán, S. (2009). Functional components of berry fruits and their usage in food technologies. *African Journal of Agricultural Research*, 4.
- Zhang, C., Ren, Z., Yin, Z., Qian, H., & Ma, D. (2008). Amide II and Amide III Bands in Polyurethane Model Soft and Hard Segments. *Polymer Bulletin*, 60(1), 97–101. <https://doi.org/10.1007/s00289-007-0837-y>