



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

mgr inż. Liliana Belkowska

**Doskonalenie cech jakościowych wafli przekładanych kremem
w oparciu o badania przechowalnicze**

Improving the quality characteristics of wafers with cream based on storage tests

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk rolniczych
w dyscyplinie technologia żywności i żywienia
Doctoral dissertation in the field of agricultural sciences
in the discipline of food technology and nutrition

Promotor:

prof. dr hab. Jolanta Tomaszewska-Gras

Promotor pomocniczy:

dr inż. Małgorzata Muzolf-Panek

Katedra Zarządzania Jakością

i Bezpieczeństwem Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 2025 rok

Źródło finansowania badań

Praca została zrealizowana w ramach programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. Doktorat wdrożeniowy, numer grantu DWD/3/35/2019.

Serdecznie dziękuję Pani Promotor, prof. dr hab. Jolancie Tomaszewskiej-Gras, za ogromne wsparcie, cierpliwość, wiarę w moje możliwości i motywację do działania. Możliwość bycia doktorantką pod Pani opieką naukową uważam za wielki zaszczyt oraz niezwykle cenne doświadczenie, dzięki któremu mogłam rozwijać swoje umiejętności badawcze i poszerzać horyzonty naukowe. Dzięki Pani ten etap mojego życia pozostanie dla mnie źródłem inspiracji i dumy.

Słowa wdzięczności kieruję również do Pani Promotor pomocniczej, dr inż. Małgorzaty Muzolf-Panek, za poświęcony czas i zaangażowanie. Dziękuję również za życzliwość i motywację, które sprawiły, że proces badawczy był dla mnie cennym i budującym doświadczeniem.

Dziękuję wszystkim współpracownikom wspierającym realizację badań za życzliwość, pomoc techniczną i dzielenie się wiedzą.

Szczególne podziękowania kieruję również do prof. dr hab. Agnieszki Piotrowskiej-Cyplik za nieustanne wsparcie, cierpliwość oraz pomoc w zakresie administracyjnej obsługi projektu.

Jestem również wdzięczna załodze Szkoły Doktorskiej z prof. dr hab. Januszem Olejnikiem na czele, Pani Joannie Cybulskiej oraz Marcie Belka oraz wszystkim Doktorantom. Dzięki Wam ta przygoda była pełna radości.

Serdeczne podziękowania składam pani Annie Przewłóce za zaufanie, wsparcie i możliwość realizacji badań naukowych.

Dziękuję rodzicom za życzliwość i wsparcie oraz pomoc w opiece nad dziećmi podczas intensywnej pracy edytorskiej nad niniejszą rozprawą.

*Dedykuję tę rozprawę
moim ukochanym dzieciom: Ani i Stasiowi,
oraz siostrze Justynie i mężowi Arturowi –
z myślą, by była inspiracją i dowodem,
że z pasją i wytrwałością można osiągać cele.*

Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład zbioru

Przedstawiony poniżej dorobek w postaci cyklu trzech oryginalnych publikacji, zebranych pod wspólnym tytułem „Doskonalenie cech jakościowych wafli przekładanych kremem w oparciu o badania przechowalnicze” stanowi podstawę mojego wniosku o nadanie stopnia naukowego doktora:

Publikacja 1 (P1): Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Islam, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2023). Increasing the Oxidative Stability of the Wafer Lipid Fraction with Fruit Extract during Storage. *Applied Sciences*, 13(1), 103. <https://doi.org/10.3390/app13010103>

MEiN₂₀₂₃ 100 pkt.; IF₂₀₂₃ 2,5

Publikacja 2 (P2): Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Waśkiewicz, A.; Rudzinska, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2025). Oxidative stability and colour changes of fat- and sugar-reduced wafer creams during the storage. *Journal of Stored Products Research*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2025.102653>

MNiSW₂₀₂₅ 100 pkt.; IF₂₀₂₅ 2,8

Publikacja 3 (P3): Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Stangierski, J.; Tomaszewska-Gras, J. The effect of reformulation on quality changes in cream-filled wafers during storage. *LWT* – publikacja w trakcie recenzji, wysłana do czasopisma dnia 17. czerwca 2025 r.

Spis treści

1. Wykaz skrótów i symboli	8
1.1. Wykaz skrótów.....	8
1.2. Wykaz symboli użytych do kodowania próbek	9
2. Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim.....	10
3. Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim	12
4. Wstęp	14
5. Cele i hipotezy badawcze.....	19
6. Materiały i metody badawcze	20
6.1. Materiały do badań.....	20
6.1.1. Wafle przekładane kremem	20
6.1.2. Frakcja lipidowa wyekstrahowana z listków i kremów	22
6.2. Metody badań.....	22
6.2.1. Pomiar barwy	22
6.2.2. Pomiar aktywności wody.....	23
6.2.3. Analiza tekstury	23
6.2.4. Analiza akustyczna.....	23
6.2.5. Obrazowanie mikroskopowe	25
6.2.6. Analiza liczby nadtlencowej.....	25
6.2.7. Analiza zawartości skoniugowanych dienów	26
6.2.8. Analiza stabilności termooksydacyjnej tłuszczów	26
6.2.9. Analiza przemian fazowych tłuszczu	27
6.2.10. Analiza składu kwasów tłuszczowych	28
6.2.11. Analiza aktywności przeciwutleniającej	28
6.2.12. Analiza zawartości związków fenolowych	29
6.2.13. Analiza mikrobiologiczna	30
6.2.14. Analiza sensoryczna	31

6.2.15.	Analiza statystyczna otrzymanych wyników	31
7.	Wyniki badań i ich interpretacja	35
7.1.	Wpływ dodatku ekstraktu z owoców cytrusowych na stabilność oksydacyjną listków waflowych w czasie przechowywania (P1)	35
7.2.	Wpływ reformulacji składu kremów cukierniczych na stabilność oksydacyjną i zmiany barwy w czasie przechowywania (P2)	39
7.3.	Wpływ reformulacji na przebieg zmian jakościowych wafli przekładanych kremem w trakcie przechowywania (P3)	45
7.4.	Wpływ opakowania na jakość przechowalniczą wafli przekładanych kremem (dane niepublikowane)	51
8.	Podsumowanie i wnioski	71
9.	Spis literatury cytowanej w autoreferacie	73
10.	Spis tabel	84
11.	Spis rysunków	85
12.	Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład zbioru	87
	Publikacja 1 (P1)	87
	Publikacja 2 (P2)	101
	Publikacja 3 (P3)	113
13.	Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie opublikowanych artykułów naukowych	164

1. Wykaz skrótów i symboli

1.1. Wykaz skrótów

SYMBOL	ROZWINIĘCIE W JĘZYKU POLSKIM (ANGIELSKIM)
ΔE	Numeryczna różnica między dwoma kolorami (numerical measure of the difference between two colors)
ΔH	Zmiana entalpii (enthalpy change)
ANOVA	Analiza wariancji (analysis of variance)
a_w	Aktywność wody (water activity)
C	Indeks nasycenia barwy, chroma (colour saturation index, chrome)
CA	Analiza skupień (cluster analysis)
CDs	Skoniugowane dieny (conjugated dienes)
CIELab	Przestrzeń barw Międzynarodowej Komisji ds. Oświetlenia (International Commission on Illumination Color Space)
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)
DSC	Różnicowa kalorymetria skaningowa (differential scanning calorimetry)
GDA	Ogólna analiza dyskryminacyjna (general discrimination analysis)
GRM	Ogólny model regresji (general regression model)
h°	Kąt barwy (hue angle)
HORO	Wysokooleinowy olej rzepakowy (high oleic rapeseed oil)
MLR	Wielowymiarowa regresja liniowa (multiple linear regression)
OIT	Czas indukcji utleniania (oxidation induction time)
PCA	Analiza głównych składowych (principal component analysis)
PP	Polipropylen (polypropylene)
PV	Liczba nadtlenkowa (peroxide value)
QDA	Ilościowa analiza opisowa (quantitative descriptive analysis)
SFA	Nasycone kwasy tłuszczowe (saturated fatty acids)
SFI	Wskaźnik zawartości stałej tłuszczu (solid fat index)
TFC	Całkowita zawartość flawonoidów (total flavonoid content)
TPC	Całkowita zawartość związków fenolowych (total phenolic content)
UFA	Nienasycone kwasy tłuszczowe (unsaturated fatty acids)
WI	Indeks bieli (whiteness index)

1.2. Wykaz symboli użytych do kodowania próbek

SYMBOL	ROZWINIĘCIE W JĘZYKU POLSKIM (ANGIELSKIM)
A	Opakowanie A (A package)
B	Opakowanie B (B package)
LWS	Listki wafłowe standardowe (standard wafer sheets)
LWE	Listki wafłowe z dodatkiem ekstraktu przeciwutleniającego (wafer sheets with antioxidant extract addition)
WS	Wafle przekładane kremem standardowym (wafers with standard cream)
WC	Wafle przekładane kremem o obniżonej zawartości cukru (wafers with sugar reduced cream)
WT	Wafle przekładane kremem o obniżonej zawartości tłuszczu (wafers with fat-reduced cream)
WTE	Wafle przekładane kremem o obniżonej zawartości tłuszczu z dodatkiem ekstraktu przeciwutleniającego (wafers with fat-reduced cream and antioxidant extract addition)

2. Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim

Negatywny wpływ nadmiernego spożycia tłuszczu i cukru na zdrowie ludzi sprawia, że poszukiwanie zdrowszych wariantów istniejących produktów jest tematem o dużym znaczeniu technologicznym i społecznym. Wiąże się to jednak z istotnymi wyzwaniami technologicznymi oraz ryzykiem zmian parametrów jakościowych produktu, decydujących o jego akceptacji przez konsumentów. Celem pracy było opracowanie alternatywnych receptur wafli przekładanych kremem o obniżonej zawartości cukru i tłuszczu, którego skład dodatkowo zmodyfikowano eliminując użycie oleju palmowego, z jednoczesnym podwyższeniem stabilności produktów poprzez dodatek komercyjnego ekstraktu z owoców cytrusowych (Flavomix). Wafle przygotowano w warunkach przemysłowych i przechowywano 13 miesięcy w dwóch typach opakowań: folia polipropylenowa (PP) i metalizowana folia polipropylenowa (PP-met). Badaniu poddano listki waflowe (standardowe oraz z dodatkiem ekstraktu) oraz wafle z kremem o standardowej recepturze (WS), o obniżonej zawartości cukru (WC), o zmodyfikowanej fazie tłuszczowej (WT) oraz z dodatkiem ekstraktu (WTE). Oceniano takie cechy jak: stabilność oksydacyjna i mikrobiologiczna, barwa, tekstura, aktywność wody, cechy sensoryczne, profil topnienia i indeks fazy stałej. W pracy wykazano, że dodatek ekstraktu do listków waflowych skutecznie spowalniał utlenianie tłuszczów, wykazując istotne działanie ochronne do 10 miesiąca przechowywania. Podobnie kremy ze zmodyfikowaną fazą tłuszczową na bazie tłuszczu shea i wysokooleinowego oleju rzepakowego (WT, WTE) charakteryzowały się wyższą stabilnością oksydacyjną w porównaniu do próbek WS. W próbie WTE efekt ten był dodatkowo wzmocniony przez dodatek ekstraktu, który, jak wykazano, charakteryzował się wysoką aktywnością przeciwutleniającą i zawartością związków fenolowych. Z kolei krem o obniżonej zawartości cukru (WC) wykazywał podobny przebieg zmian oksydacyjnych jak krem WS, jednak różnił się pod względem barwy, dla której odnotowano znaczne rozjaśnienie, podczas gdy krem z dodatkiem ekstraktu (WTE) charakteryzował się stopniowym ciemnieniem barwy. Badania wykazały także, że wafle WC wykazywały wyższą aktywność wody przez cały okres przechowywania niż pozostałe wafle, co potwierdziło rolę cukru jako składnika ograniczającego dostępność wody. Pod względem tekstury wafle WT i WTE były mniej twarde niż wafle WS i WC. W zakresie stabilności mikrobiologicznej wszystkie warianty wafli wykazały wysoki poziom bezpieczeństwa przez cały okres badań. Dodatkowo wykazano wbrew oczekiwaniom, że folia PP zapewniała wyższą stabilność oksydacyjną fazy tłuszczowej w porównaniu do folii PP-met, która z kolei lepiej chroniła wafle przed zmianami aktywności wody.

Podsumowując, reformulacja kremów, polegająca na eliminacji oleju palmowego i zastosowaniu ekstraktu, poprawiła jakość wafli. Badania przeprowadzone z użyciem komercyjnego ekstraktu są istotne z punktu widzenia przemysłu spożywczego ze względu na jego standaryzację. Mają one także wysoką wartość aplikacyjną, gdyż przeprowadzone w realnych warunkach produkcyjnych lepiej oddają rzeczywiste procesy zachodzące podczas przechowywania, w przeciwieństwie do warunków symulowanych. Pomimo wykazanej skuteczności ekstraktu, jego zastosowanie powinno być w każdym przypadku poprzedzone badaniami optymalizacyjnymi w celu określenia optymalnego stężenia, ze względu na ryzyko prooksydacyjnego działania w przypadku zbyt dużych dawek i/lub warunków sprzyjających procesom utleniania.

Słowa kluczowe: nadzienia na bazie cukru i tłuszczu, reformulacja, wafle, wyroby ciastkarskie, zmiany przechowalnicze

3. Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim

The negative impact of excessive fat and sugar intake on human health highlights the importance of developing healthier alternatives to existing food products, a topic of growing technological and societal relevance. However, this endeavor involves significant technological challenges and carries the risk of altering key quality attributes that determine consumer acceptance. The aim of this study was to develop alternative formulations of wafers with cream with reduced sugar and fat content. Additionally, the formulations were modified by eliminating palm oil and incorporating a commercial citrus fruit extract (Flavomix) to enhance product stability. The wafers were produced under industrial conditions and stored for 13 months in two types of packaging: polypropylene film (PP) and metallized polypropylene film (PP-met). The study included wafer sheets (standard and extract-enriched) and wafers with creams with different formulations: standard (WS), sugar-reduced (WC), modified fat phase based on shea fat and high-oleic rapeseed oil (WT), and extract-enriched (WTE). The following parameters were evaluated: oxidative and microbiological stability, color, texture, water activity, sensory properties, melting profile, and solid fat index. The addition of the citrus extract to wafer sheets effectively slowed down lipid oxidation, demonstrating significant protective effects for up to 10 months of storage. Similarly, the creams with the modified fat phase (WT and WTE) exhibited higher oxidative stability compared to the WS samples. In the WTE sample, this effect was further enhanced by the addition of the extract, which was characterized by high antioxidant activity and a high content of phenolic compounds. In contrast, the sugar-reduced cream (WC) showed oxidative changes comparable to those observed in WS sample, but differed in color characteristics, exhibiting a noticeable lightening, whereas the WTE cream darkened gradually during storage. The study also revealed that WC wafers maintained higher water activity throughout the storage period than other variants, confirming the role of sugar in water-binding capacity. In terms of texture, WT and WTE wafers were less hard than WS and WC samples. All wafer variants demonstrated high microbiological stability over the entire storage period. Unexpectedly, PP film provided better oxidative stability of the fat phase compared to PP-met, although the latter was more effective in protecting the wafers against water activity changes.

In summary, the reformulation of the cream filling, involving palm oil elimination and extract incorporation, improved the overall quality of the wafers. The use of a standardized commercial extract is particularly relevant for the food industry, both from a practical and technological standpoint. Importantly, the study was conducted under real industrial conditions,

which more accurately reflect actual storage processes compared to simulated environments. Despite the demonstrated efficacy of the extract, its use should always be preceded by optimization studies to determine the optimal dosage, as excessive concentrations and/or pro-oxidative conditions may lead to adverse effects.

Keywords: sugar-fat-based fillings, reformulation, wafers, bakery products, storage changes

4. Wstęp

Wyroby ciastkarskie stanowią istotny element codziennej diety wielu konsumentów i są powszechnie spożywane przez społeczeństwo, zarówno w ramach codziennych posiłków, jak i podczas wydarzeń okolicznościowych. Wynika to z ich wysokiej dostępności, różnorodności asortymentu oraz walorów smakowych. Z dostępnych danych wynika, że wafle należą do często spożywanych wyrobów cukierniczych na świecie. Globalny rynek wyrobów cukierniczych z wafli został wyceniony na 15,16 mld dolarów (USD) w 2023 r. i według prognoz osiągnie wartość 24,35 mld USD do 2031 r. (Data Bridge Market Research, 2024). Podobna tendencja obserwowana jest w Polsce, gdzie rynek gofrów i wafli również dynamicznie się rozwija. Według danych IndexBox jego wartość osiągnęła 276 mln USD w 2024 r., co stanowi wzrost o 122% w porównaniu z rokiem poprzednim (IndexBox, 2025). Wafle są sprzedawane w wielu formach i kształtach: jako samodzielne produkty (andruty, wafle do lodów, rurki wafłowe itp.) lub jako element popularnych wyrobów z nadzieniem, warstwą kremu lub czekoladą (jak chociażby globalnie znany KitKat czy polskie Prince Polo, Princessa i Grześki).

Wafle przekładane kremem, produkt będący przedmiotem tej pracy, należą do grupy produktów wysokokalorycznych (500-600 kcal/100 g), co zawdzięczają wysokiej zawartości tłuszczu i cukru, które są głównymi składnikami słodczy (Drewnowski i in., 1998; Vahid-Dastjerdi i in., 2020). Tłuszcz i cukier to zasadnicze komponenty kremu, pełniące rolę wypełniaczy oraz nośników zapachu i smaku (Miele i in., 2015; Tiefenbacher, 2019). Udział nadzienia w wafłach jest znaczny i wynosi od 65% do 82%. W przypadku kremów na bazie cukru i tłuszczu zawartość cukru wynosi zazwyczaj od 30% do 60%, natomiast zawartość tłuszczu od 28% do 42% (Tiefenbacher, 2017a). Otyłość jest skutkiem zaburzenia równowagi między ilością energii dostarczanej z pożywieniem a energią wydatkowaną. Jej konsekwencją mogą być liczne choroby, w tym cukrzyca oraz schorzenia sercowo-wieńcowe, nazywane chorobami cywilizacyjnymi (Bhupathiraju i Hu, 2016; Gupta i in., 2025; Welsh i in., 2024). Powszechnie wiadomo, że nadmierne spożycie niektórych rodzajów żywności, zwłaszcza wysoko przetworzonych produktów bogatych w tłuszcze, zarówno nasycone, jak i nienasycone o konformacji trans oraz sól i cukry proste, wiąże się z podwyższonym ryzykiem wystąpienia chorób cywilizacyjnych. Jednym z powszechnie stosowanych tłuszczów w produktach przetworzonych jest olej palmowy, który budzi kontrowersje zarówno ze względów zdrowotnych, jak i środowiskowych.

Konsumenci często negatywnie postrzegają produkty zawierające olej palmowy, mimo że obecnie jest jednym z najczęściej stosowanych tłuszczów roślinnych na świecie, wykorzystywanym w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym, w tym także w produkcji wyrobów ciastkarskich. Olej palmowy jest bogaty w kwasy tłuszczowe nasycone, które stanowią około 50% jego składu. Dominującym kwasem tłuszczowym jest kwas palmitynowy, którego wysokie spożycie prowadzi do zwiększenia poziomu cholesterolu LDL we krwi, będącego głównym czynnikiem rozwoju miażdżycy (Sun i in., 2015). Ponadto w badaniach przeprowadzonych zarówno na ludziach, jak i na zwierzętach, wykazano, że dieta bogata w tłuszcze nasycone, w tym kwas palmitynowy, może prowadzić do zwiększonej produkcji prostaglandyn, związanych z procesami zapalnymi oraz markerów stanu zapalnego, takich jak CRP (C-reaktywne białko) i interleukina 6 (IL-6) (Estruch i in., 2020; Sun i in., 2015). Kolejnym istotnym problemem związanym z wykorzystaniem oleju palmowego jest wylesianie oraz degradacja środowiska naturalnego w tropikalnych rejonach Azji Południowo-Wschodniej (głównie Indonezja, Malezja, ale także Tajlandia, Papua-Nowa Gwinea, Filipiny), Ameryce Łacińskiej (Kolumbia, Ekwador, Brazylia, Honduras, Gwatemala, Peru, Kostaryka) i Afryce Subsaharyjskiej (Nigeria, Ghana, Kamerun, Wybrzeże Kości Słoniowej, Kongo, Angola) (Dariah i in., 2014; Datta i Krishnamoorti, 2022; Murdiyarso i in., 2024). Intensywna i rozszerzająca się uprawa olejowca gwinejskiego (*Elaeis guineensis* Jacq.), zwanego również palmą olejową, niesie poważne konsekwencje środowiskowe. Obejmują one nie tylko utratę lasów tropikalnych, ale także zanik bioróżnorodności poprzez niszczenie siedlisk roślin i zwierząt, co prowadzi do destabilizacji, a w skrajnych przypadkach do całkowitej degradacji lokalnych ekosystemów. Konsekwencje te mają również wymiar globalny, m.in. poprzez wzrost emisji dwutlenku węgla (CO₂). Wylesianie znacznych obszarów tropikalnych lasów, będących naturalnym „pochłaniaczem” CO₂ zmniejsza ich zdolność do sekwestracji tego gazu, przyczyniając się tym samym do nasilania zmian klimatu.

Jednym z istotnych kroków w zapobieganiu negatywnym konsekwencjom żywieniowym i środowiskowym wynikającym ze stosowania oleju palmowego jest jego ograniczenie lub zastąpienie innymi tłuszczami. Wybierając zamienniki należy jednak uwzględnić konieczność uzyskania podobnych właściwości technologicznych. W kontekście nadzień waflowych, kluczowym parametrem jest odpowiednia zawartość fazy stałej (SFI), która zapewnia kremowi właściwą konsystencję, umożliwiającą utrzymanie się na waflach, a jednocześnie pozwalającą na jego topnienie w ustach podczas spożycia.

Kolejnym składnikiem niekorzystnym z żywieniowego punktu widzenia jest cukier, który oprócz oczywistej funkcji słodzącej i kreowania profilu sensorycznego, pełni również rolę teksturotwórczą, nadając odpowiednią konsystencję, poprzez tworzenie wraz z tłuszczem stabilnej fazy półstałej. Ponadto, dzięki właściwościom higroskopijnym, cukier pomaga w wiązaniu wody, co poprawia stabilność mikrobiologiczną i wydłuża trwałość produktu.

Planując receptury wyrobów, producenci kierują się dostępnością, kosztem oraz właściwościami technologicznymi surowców. Składniki takie jak olej palmowy czy cukier są popularne nie tylko ze względu na swoje cechy funkcjonalne, lecz także korzystny stosunek ceny do wydajności. Ich zastąpienie może prowadzić do wzrostu kosztów lub komplikacji technologicznych. Jednocześnie rośnie znaczenie perspektywy konsumenta. Jak wskazują raporty marketingowe (Cargill, 2022; Costa, 2024; Wholesale Manager, 2023), kupujący coraz częściej zwracają uwagę na wartość odżywczą i ogólną jakość żywności, co stawia przed producentami nowe wyzwania. Z tego względu, w duchu społecznej odpowiedzialności, producenci żywności powinni dążyć do oferowania zdrowszych alternatyw. Wymusza to konieczność reformulacji produktów ciastkarskich w taki sposób, aby odpowiadały aktualnym trendom i oczekiwaniom konsumentom, przy jednoczesnym uwzględnieniu ograniczeń technologicznych oraz uwarunkowań prawnych. W tym kontekście coraz częściej w przestrzeni publicznej pojawia się, termin „czysta etykieta” (ang. clean label), odnoszący się do produktów o krótszym, prostszym składzie, pozbawionym sztucznych dodatków i poddanych minimalnej obróbce (Cegiełka, 2020). Chociaż rosnące zainteresowanie konsumentów tym trendem wynika z oczekiwań dotyczących przejrzystości i naturalnego wizerunku żywności, pojęcie to nie posiada definicji prawnej ani jednoznacznych kryteriów stosowania w przepisach prawa żywnościowego.

Podczas reformulacji produktów często konieczne jest uzupełnienie receptury o inne substancje, które stabilizują matrycę produktu i zapewniają trwałość porównywalną z konwencjonalnymi odpowiednikami. W czasie przechowywania i starzenia żywności zachodzą liczne niekorzystne procesy, w tym oksydacja lipidów, która prowadzi do pogorszenia trwałości, smaku i zapachu. Aby ograniczyć to zjawisko, stosuje się substancje o działaniu przeciwutleniającym. Do najpopularniejszych syntetycznych przeciwutleniaczy należą butylohydroksyanizol (BHA) i butylohydroksytoluen (BHT), które skutecznie hamują utlenianie tłuszczów (Nanditha i Prabhasankar, 2009). Choć ich skuteczność technologiczna jest wysoka, substancje te są coraz mniej akceptowane przez konsumentów, zwłaszcza tych poszukujących produktów o czystej etykiecie. Aby sprostać wspomnianym wymaganiom,

producenci sięgają po naturalne składniki funkcjonalne, które pozwalają skomponować „czystą” formułę produktu bez konieczności stosowania syntetycznych dodatków. Jedną z obiecujących grup takich substancji są ekstrakty roślinne, zwłaszcza te pozyskiwane z odpadów produkcyjnych, takich jak skórki i miąższ owoców. Zawierają one znaczne ilości związków bioaktywnych, między innymi o aktywności przeciwutleniającej, do których należą: flawonoidy, alkaloidy, kumaryny, limonoidy, karotenoidy, kwasy fenolowe i olejki eteryczne (Mahato i in., 2019; Szymanowska i in., 2021; Wedamulla i in., 2022). Chociaż ekstrakty roślinne wykazują wysoką aktywność przeciwutleniającą, ich bezpośrednie zastosowanie w produktach spożywczych może wpływać na cechy sensoryczne, takie jak smak, zapach czy barwa. Przykładowo, dodatek ekstraktu z borówki może nadać produktowi intensywny kolor i charakterystyczny posmak (Francis, 1985; Şengül i in., 2022), podobnie jak ekstrakt z zielonej herbaty, gorzką nutę (Guo i Lai, 2016; Tong i in., 2025; Xu i in., 2018). Aby zminimalizować tego rodzaju efekty i uzyskać preparaty o lepszych właściwościach użytkowych, związki bioaktywne poddaje się procesom izolacji i oczyszczania. Są to metody pozwalające na otrzymanie bezpiecznego, dobrze scharakteryzowanego ekstraktu o wysokiej aktywności przeciwutleniającej i odpowiednim profilu składników bioaktywnych. Standaryzowane ekstrakty mogą być stosowane w przemyśle spożywczym, w którym najważniejsze znaczenie ma stabilność i bezpieczeństwo produktu przez cały okres przydatności do spożycia (Imran i in., 2016; Maire i in., 2013; Mori i in., 2021).

Reformulacja składu wyrobów ciastkarskich oraz ciągle wdrażanie nowych rozwiązań technologicznych wymagają prowadzenia badań przechowalniczych, których celem jest określenie minimalnej trwałości oraz zapewnienie bezpieczeństwa produktu w całym okresie przydatności do spożycia. W trakcie przechowywania mogą zachodzić zarówno przemiany fizyczne, jak i chemiczne, takie jak krystalizacja sacharydów, retrogradacja skrobi, zmiany polimorficzne frakcji tłuszczowej czy peroksydacja lipidów (Alamprese i in., 2017; Kong i Singh, 2016). Zdarza się, że pojawiają się również nieoczekiwane zmiany w strukturze lub składzie produktów, które prowadzą do obniżenia ich jakości w czasie (Ning i in., 2025). Najbardziej wiarygodne wyniki dotyczące trwałości i bezpieczeństwa produktów spożywczych uzyskuje się w badaniach przeprowadzanych w rzeczywistych warunkach przechowywania. Jak zauważa Kmiecik, w przypadku zastosowania testów przyspieszonych, dają one jedynie mniej lub bardziej trafione oszacowanie trwałości produktów (Kmiecik, 2025). Tylko takie podejście umożliwia rzetelną ocenę jakości i bezpieczeństwa nowo opracowanych produktów

w pełnym okresie ich przechowywania, co jest zgodne z zaleceniami zawartymi w literaturze przedmiotu (Fu i Labuza, 1997; Maire i in., 2013).

Uwzględniając wszystkie przedstawione powyżej uwarunkowania, w ramach pracy opracowano nowe receptury wafli przekładanych kremem oraz przeprowadzono badania przechowalnicze, dotyczące stabilności jakości produktów poddanych reformulacji, polegającej na redukcji zawartości cukru i tłuszczu oraz eliminacji oleju palmowego. Dodatkowo oceniono skuteczność zastosowania ekstraktu z owoców cytrusowych w spowalnianiu procesów oksydacyjnych podczas przechowywania. Badania przechowalnicze prowadzono w warunkach rzeczywistych przez 13 miesięcy.

5. Cele i hipotezy badawcze

Głównym celem prowadzonych prac badawczych było opracowanie nowych receptur wafli przekładanych kremem oraz przeprowadzenie badań przechowalniczych nowych wyrobów dla zapewnienia oraz potwierdzenia bezpieczeństwa i stabilności jakości nowych produktów. Wyznaczone cele szczegółowe obejmowały:

- 1) zbadanie wpływu dodatku ekstraktu z owoców cytrusowych na stabilność oksydacyjną listków waflowych w czasie przechowywania;
- 2) zbadanie wpływu reformulacji kremów, polegającej na obniżeniu zawartości cukru, modyfikacji fazy tłuszczowej oraz dodatku ekstraktu z owoców cytrusowych, na stabilność oksydacyjną fazy tłuszczowej i barwę produktu podczas przechowywania;
- 3) zbadanie wpływu reformulacji kremów (obniżenie zawartości cukru, zmiana fazy tłuszczowej oraz dodatek ekstraktu z owoców cytrusowych) na stabilność parametrów jakościowych wafli przekładanych kremem podczas przechowywania, takich jak: stabilność oksydacyjna, barwa, aktywność wody, twardość, chrupkość, cechy sensoryczne, bezpieczeństwo mikrobiologiczne, profil topnienia, indeks fazy stałej;
- 4) zbadanie wpływu rodzaju materiałów opakowaniowych na jakość wafli z kremem w trakcie przechowywania.

Powyżej przedstawione cele wyznaczono na podstawie założonych następujących hipotez badawczych:

- H1.** Zastosowanie naturalnego ekstraktu z owoców cytrusowych zwiększa stabilność oksydacyjną listków waflowych podczas przechowywania.
- H2.** Zredukowanie zawartości cukru oraz modyfikacja fazy tłuszczowej nie powodują pogorszenia stabilności oksydacyjnej i barwy kremów, a dodatek ekstraktu z owoców cytrusowych zwiększa ich stabilność oksydacyjną w czasie przechowywania.
- H3.** Reformulacja kremu obejmująca redukcję zawartości cukru i eliminację oleju palmowego nie powoduje pogorszenia jakości wafli przekładanych kremem w czasie przechowywania.
- H4.** Rodzaj opakowania wpływa na stabilność parametrów jakościowych wafli z kremem w czasie przechowywania.

6. Materiały i metody badawcze

6.1. Materiały do badań

6.1.1. Wafle przekładane kremem

Materiał badawczy stanowiły listki, kremy oraz całe wafle przekładane kremem kakaowym, które zostały przygotowane w skali przemysłowej. Wszystkie składniki zostały pozyskane na polskim rynku.

Do badań równolegle przygotowano listki wafłowe i wafle przekładane kremem kakaowym.

1) Listki wafłowe standardowe (LWS) i listki wafłowe z dodatkiem ekstraktu z owoców cytrusowych (LWE)

Obie próbki listków wafłowych (LWS, LWE) zostały przygotowane według tej samej receptury, przy czym ekstrakt z owoców cytrusowych (Flavomix AX 200, Polypan Group, Moschato, Grecja) został dodany do próbki LWE w ilości 0,13% (w/w). Ciasto na wafle składało się z następujących składników: woda, mąka pszenna, sól, skrobia ziemniaczana, lecytyna słonecznikowa i olej rzepakowy o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (HORO). Zawartość HORO w listkach wafłowych wynosiła 2,2% (w/w). Listki wafłowe wypiekano w piecu wafłowym w temperaturze $170\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 2,5 minuty. Natychmiast po upieczeniu i schłodzeniu listki wafłowe zostały zapakowane w folię polipropylenową (opakowanie A).

2) Wafle przekładane kremem kakaowym: standardowe (WS), o obniżonej zawartości cukru (WC), o obniżonej zawartości tłuszczu (WT) i o obniżonej zawartości tłuszczu z dodatkiem ekstraktu z owoców cytrusowych (WTE)

Próbka kremu o recepturze standardowej (WS) składała się z następujących składników: rafinowany olej palmowy 36% (w/w), cukier 38% (w/w), odtłuszczone kakao w proszku, odtłuszczone mleko w proszku i serwatka w proszku. W kremie o obniżonej zawartości cukru (WC) dodano 16% (w/w) skrobi ryżowej, a zawartość cukru zmniejszono do 27% (w/w). Reszta składu recepturowego kremu WC pozostała bez zmian. Kremy o zmienionej fazie tłuszczowej (WT i WTE) zostały przygotowane według tej samej receptury bazowej (cukier, odtłuszczone kakao w proszku, odtłuszczone mleko w proszku, serwatka w proszku, skrobia ryżowa jako wypełniacz i lecytyna słonecznikowa jako emulgator), przy czym zawartość tłuszczu została zmniejszona do poziomu 24% (w/w). Zamiast oleju palmowego do obu kremów dodano 14% tłuszczu shea i 9% oleju rzepakowego o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (HORO). Do

kremu WTE dodano ekstrakt z owoców cytrusowych (Flavomix BC, polypan) w ilości 0,1% (w/w).

Wszystkie próbki kremu zostały przygotowane w identycznych warunkach i rozsmarowane na listkach waflowych. Następnie bloki waflowe zostały schłodzone, pokrojone, a otrzymane wafle z kremem natychmiast hermetycznie zamknięte w folii polipropylenowej (opakowanie A) oraz metalizowanej folii polipropylenowej (opakowanie B). Parametry techniczne opakowań zestawiono w tabeli 1. Przed przeprowadzeniem analizy zafoliowane próbki były przechowywane w magazynie przez 13 miesięcy w kontrolowanych warunkach temperatury ($18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) i wilgotności względnej (60-65%). Jedno opakowanie produktu było każdorazowo pobrane do badań po następujących okresach przechowywania: 0, 3, 6, 8, 10, 12 i 13 miesięcy.

Tabela 1 Charakterystyka materiałów opakowaniowych. Dane na podstawie specyfikacji producenta. Opracowanie własne

PARAMETR	OPAKOWANIE A	OPAKOWANIE B
Rodzaj materiału	Folia polipropylenowa, PP	Metalizowana folia polipropylenowa, PP-met
Struktura folii	Monofolia orientowana spieniona STD50	Laminat: polipropylen orientowany transparentny/polipropylen metalizowany OPP 20/QFM 35
Grubość folii (μm)	50	57
Przepuszczalność pary wodnej ($\text{g}/\text{m}^2 \times 24\text{ h}$)	0,6 ($23\text{ }^{\circ}\text{C}$, RH 85%)	2,48 ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, RH 75%)
Przepuszczalność tlenu ($\text{cm}^3/(\text{m}^2 \times 24\text{ h} \times 0,1\text{ MPa})$)	< 2800 (nie specyfikuje się, materiał nie jest barierą dla tlenu)	1270 ($23\text{ }^{\circ}\text{C}$, RH 75%)

6.1.2. Frakcja lipidowa wyekstrahowana z listków i kremów

Frakcję lipidową wyekstrahowano z próbek przy użyciu n-heksanu jako rozpuszczalnika. W zależności od rodzaju analizowanej próbki, zastosowano dwie różne procedury: jedną dla samego kremu oddzielonego od wafła (około 50 g), a drugą dla listków waflowych (około 150 g), które uprzednio rozdrobniono przy użyciu moździerza. Do każdej z próbek dodano n-heksan w odpowiednim stosunku wagowym: 1:1 (krem) lub 1:2 (wafle). Tak przygotowane mieszaniny homogenizowano przy użyciu homogenizatora (Zauberstab 2011-8, Unold AG, Hockenheim, Niemcy) przy 20 000 obr./min. przez 3 minuty. Następnie mieszaniny podgrzewano: w przypadku próbki kremu do 35 °C, a w przypadku wafli 30 °C. Po podgrzaniu próbki mieszano na mieszadle magnetycznym (FC6S, Velp Scientifica Srl, Usmate Velate, Włochy) przez 1 godzinę przy sile 112×g. Po zakończeniu mieszania próbki odwirowano (MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska) przy 2382×g przez 15 minut, a supernatant przefiltrowano (sączek MN 640 W, Macherey-Nagel, Düren, Niemcy). W kolejnym etapie n-heksan usunięto poprzez odparowanie w rotacyjnej wyparce próżniowej (Rotavapor® R-300, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Szwajcaria), stosując ciśnienie 264 mbar, prędkość obrotową 30 obr./min., temperaturę łaźni 50 °C oraz czas trwania procesu 30 minut. Pozostałości n-heksanu usunięto poprzez przepłukiwanie uzyskanego tłuszczu azotem przez 1 godzinę. Gotowe próbki zamykano szczelnie i przechowywano pod warstwą azotu w temperaturze -80 °C do momentu analizy.

6.2. Metody badań

6.2.1. Pomiar barwy

Analizę barwy prowadzono przy użyciu spektrofotometru Konica Minolta CM-5 z oprogramowaniem SpectraMagic NX (Konica Minolta, Inc., Tokio, Japonia) w trybie SCI (z ang. Specular Component Included – wektor odbicia lustrzanego uwzględniony), używając lampy D65 jako źródło światła, kąt obserwatora 10 °. Przed każdą serią pomiarów przyrząd kalibrowano za pomocą wzorca bieli i czerni. Badania przeprowadzano bezpośrednio na powierzchni produktu o średnicy 8 mm: osobno na powierzchni listków waflowych (**P3**) oraz kremów po uprzednim oddzieleniu listków od nadzienia (**P2**). Pomiary prowadzono przy użyciu skali CIE $L^*a^*b^*$, gdzie parametr L^* mieści się w zakresie od 0 do 100 wskazując jasność, a^* określa odcień zielony (< 0) lub czerwony (> 0), natomiast b^* niebieski (< 0) lub żółty (> 0). Ponadto, parametry barwy, takie jak nasycenie (C), kąt barwy (h°), różnica barw (ΔE) i wskaźnik bieli (WI), zostały obliczone zgodnie z następującymi wzorami:

$$C = \sqrt{(a *)^2 + (b *)^2} \quad (1)$$

$$h^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b*}{a*} \right) \cdot \frac{180}{\pi} \quad (2)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L *)^2 + (\Delta a *)^2 + (\Delta b *)^2} \quad (\text{Habekost, 2013}) \quad (3)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L *)^2 + a *^2 + b *^2} \quad (\text{Briones i Aguilera, 2005}) \quad (4)$$

6.2.2. Pomiar aktywności wody

Analizę aktywności wody (a_w) próbek wafli z nadzieniem (**P3, dane niepublikowane**) przeprowadzono przy użyciu zestawu AwTherm Rotronic składającego się z miernika HP23-AW-A, sondy HC2-AW i podstawki WP-14 (Rotronic, Bassersdorf, Szwajcaria). Próbkę umieszczono w specjalnych pojemnikach, wypełniając je do około 3/4 wysokości. Następnie pojemnik z próbką umieszczono w mierniku, gdzie pozostawał do zakończenia pomiaru a_w . Czas pomiaru pojedynczej próbki wynosił około 4-5 minut.

6.2.3. Analiza tekstury

Tekstura wafli z kremem (**P3, dane niepublikowane**) została przeanalizowana za pomocą analizatora tekstury TA-XT2i z trzypunktowym urządzeniem do zginania typu HDP/3PB (Stable Micro Systems, LTD., Surrey, Wielka Brytania). Wykresy deformacji w funkcji czasu uzyskano przy użyciu czujnika siły o obciążeniu 25 kg. Za każdym razem próbkę wafła z kremem o powierzchni 25 x 96 mm umieszczano na belkach podstawy w odległości 50 mm między dwiema belkami. Analizator ustawiono z następującymi parametrami: prędkość przed testem 2,0 mm/s; prędkość testu 1,7 mm/s; prędkość po teście 2,0 mm/s; siła wyzwalamąca 3 g; odległość 6 mm i szybkość pozyskiwania danych (PPS) 200. Siła łamania (N) (twardość) próbki została przyjęta jako maksymalna wartość naprężenia krzywej. Nachylenie krzywej (N/s) wskazywało wytrzymałość próbki – im wyższe nachylenie, tym większa wytrzymałość próbki.

6.2.4. Analiza akustyczna

Główne elementy stanowiska do pomiaru obejmowały 3 mikrofony pojemnościowe PreSonus PRM1, 6-kanalowe urządzenie rejestrujące ZOOM F6, 3 mobilne ekrany wygłuszające oraz urządzenie z gilotyną. Mikrofony rozmieszczono równomiernie od siebie, aby zapewnić wysoką jakość akustyczną a zarazem zminimalizować ryzyko wzmocnienia częstotliwości lub pojawienia się niepożądanych efektów tj. sprzężenia akustyczne. Urządzenie rejestrujące wyposażone było w przedwzmacniacz mikrofonowy o wzmocnieniu do 75 dB, co pozwala na rejestrowanie dźwięku o wysokim zakresie czułości oraz charakteryzuje się niskim

poziomem szumów. W celu zminimalizowania ryzyka zewnętrznych źródeł hałasu lub ewentualnych refleksji akustycznych zamontowano wokół próbek wafli i mikrofonów dodatkowo ekrany wygłuszające. Wafle poddawano pomiarom z użyciem gilotyny zamontowanej do stelaża na zasadzie swobodnego spadku z wysokości 70 mm. Każda próba wafli była poddawana pomiarom minimum w 5 powtórzeniach. W ramach przygotowania danych czasowych i amplitudowych pliki .wav (pliki pierwotne) odsłuchano w celu ustalenia przedziału czasowego związanego z przecięciem każdego wafła z danej próby. Wykorzystano również środowisko Python 3.11.11 do przetwarzania plików .wav. Przygotowano skrypty do wyodrębniania przedziałów czasowych dla zdarzenia momentu przecięcia każdego wafła. Zastosowano bibliotekę Pydub, która służy do przetwarzania plików audio. Biblioteka Pydub pozwala na wykonywanie m.in. łączenia, dzielenia czy też przycinania dźwięku. W ramach badań przy pomocy biblioteki Pydub przeprowadzono segmentację plików (podział dźwięku) aby pozyskać rejestrację dźwięku dla wybranego wafła. Po ustaleniu strefy czasowej dotyczącej wyłącznie momentu przecięcia wafła, wykonano segmentację plików oraz wyeksportowano każdy z nich do nowych plików .wav tworząc plik wtórny odpowiadający za rejestr dźwięku pojedynczego wafła. W efekcie otrzymano dokładnie jeden zarejestrowany dźwięk przecięcia wafła z danej próby.

Charakterystyka wafli za pomocą metod akustycznych opierała się na ekstrakcji szeregu parametrów z zarejestrowanych sygnałów dźwiękowych, które korelują z ich właściwościami teksturalnymi, w tym przede wszystkim z chrupkością. Kluczowe parametry akustyczne, które zostały zastosowane w analizie (**dane niepublikowane**) obejmują:

1. Burst count – liczba pęknięć. Parametr ten odnosi się do liczby dyskretnych zdarzeń akustycznych (pęknięć) występujących podczas łamania próbki. Jest to wskaźnik kruchości materiału – produkty bardzo kruche mogą generować wiele krótkich, ostrych pęknięć.
2. Zero crossing rate (ZCR) [1/s] – wskaźnik liczby przejść sygnału przez zero w jednostce czasu. Wyższe wartości ZCR często korelują z obecnością większej ilości składowych wysokoczęstotliwościowych w sygnale, co może być związane z ostrymi, „kruchymi” dźwiękami charakterystycznymi dla chrupkich produktów.
3. Root mean square (RMS) – wartość skuteczna sygnału akustycznego, będąca miarą jego całkowitej energii lub głośności. Wyższe wartości RMS sugerują bardziej energetyczne zdarzenia dźwiękowe, co może wskazywać na większą sztywność lub wytrzymałość próbki przed pęknięciem.

4. Dynamic range [dB] – zakres dynamiki sygnału, czyli różnica między najwyższym a najniższym poziomem amplitudy w skali decybelowej. Szeroki zakres dynamiki może świadczyć o zróżnicowanych zdarzeniach akustycznych w trakcie łamania próbek
5. Peak to peak – różnica między maksymalną a minimalną wartością amplitudy sygnału. Podobnie jak RMS, jest to miara ogólnej amplitudy, ale skupiająca się na ekstremalnych wartościach.
6. Dominant frequency [Hz] – częstotliwość, która posiada największą energię w widmie sygnału akustycznego. Częstotliwość dominująca może być charakterystyczna dla sposobu wibracji materiału podczas pęknięcia i być silnie związana z postrzeganą jakością dźwięku.
7. Spectral centroid [Hz] – środek ciężkości widma częstotliwościowego, będący miarą "ostrości" dźwięku. Wyższe wartości wskazują na większą zawartość wysokich częstotliwości, co jest często silnie korelowane z postrzeganą chrupkością i kruchością produktu
8. Bandwidth [Hz] – szerokość pasma częstotliwości obecnych w sygnale akustycznym. Szerokie pasmo oznacza bogatszy i bardziej złożony dźwięk, podczas gdy wąskie pasmo sugeruje prostszy, bardziej jednorodny sygnał.
9. Wskaźnik chrupkości CI (Crispness index) – jest zintegrowanym wskaźnikiem, wynikającym z kilku powyższych parametrów, mającym na celu przedstawienie ogólnej miary chrupkości za pomocą jednej wartości wg poniższego wzoru:

$$CI = (\text{burst count} \times \text{bandwidth}) \times \text{peak to peak/RMS} \times (\text{spectral centroid} / 1000) \quad (5)$$

6.2.5. Obrazowanie mikroskopowe

Zdjęcia mikroskopowe nadzień (**P3**) wykonano za pomocą mikroskopu AXIO firmy Zeiss. Użyto obiektywu LD A-Plain 40x/0.55ph1 (Zeiss), zastosowano powiększenie 20-krotne, zdjęcia zostały wykonane z kalibracją pola widzenia, wymiar prezentowanego obrazu wynosi 715x400 mm. Obliczone rozkłady poziomów powstały w wyniku uśredniania wszystkich linii profilowych danego zdjęcia.

6.2.6. Analiza liczby nadtlenkowej

W celu oznaczenia produktów utleniania tłuszczu wyekstrahowanego z próbek kremów (**P2, dane niepublikowane**) zbadano liczbę nadtlenkową (PV) zgodnie z normą ISO 3960 (ISO, 2017a).

Przygotowano następujące roztwory do analizy:

- Roztwór tiosiarczanu sodu: 24,9 g tiosiarczanu sodu rozpuszczono w 1 l wody destylowanej (wcześniej przegotowanej), następnie 50 ml tak przygotowanego roztworu zmieszano z 500 ml przegotowanej wody destylowanej;

- Roztwór skrobi i jodku potasu: około 1 g skrobi rozpuszczono w 100 ml wody destylowanej i nasyconym roztworze jodku potasu. Roztwór KI przygotowywano świeżo w dniu analizy rozpuszczając uprzednio 14 g KI w 8 g schłodzonej wody destylowanej.

Analizę wykonano następująco: do kolby odważono 1 g próbki tłuszczu, dodano 50 ml mieszaniny izooktanu i kwasu octowego (3:2 v/v) i mieszano do momentu rozpuszczenia tłuszczu, kolejno dodano kilka kropli roztworu skrobi. Przygotowaną próbkę miareczkowano tiosiarczanem sodu do momentu odbarwienia roztworu.

6.2.7. Analiza zawartości skoniugowanych dienów

Zawartość skoniugowanych dienów (CDs) we frakcji lipidowej wyekstrahowanej z listków waflowych (**P1**) i kremów (**P2, dane niepublikowane**) oznaczono sfektrofotometrycznie, zgodnie z normą T11a-64 (AOCS, 2003). Tłuszcz (20 mg) rozpuszczono w izooktanie (20 ml) i zmierzono absorbancję tak przygotowanej próbki przy długości fali 233 nm w odniesieniu do próby zerowej, którą był izooktan. Jeśli wartość absorbancji była wyższa niż 1, próbkę rozcieńczano izooktanem, aby uzyskać odczyt absorbancji w zakresie 0,2-1,0 (ponieważ najniższy błąd odczytów absorbancji występuje w tym zakresie). Ilość CDs obliczono zgodnie z równaniem:

$$CDs = 0.84 \times \left(\left(\frac{a}{b} \times c \right) - K_0 \right) \quad (6)$$

gdzie a jest absorbancją, b jest długością kuwety (1 cm), c jest stężeniem próbki w izooktanie (g/l), a K_0 reprezentuje absorpcję przez grupy kwasowe lub estrowe (0,07 dla estrów, 0,03 dla kwasów).

6.2.8. Analiza stabilności termooksydacyjnej tłuszczów

Ocenę odporności tłuszczu na procesy termooksydacyjne dokonano za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), po uprzedniej ekstrakcji tłuszczów z listków waflowych (**P1**) oraz nadzień (**P2, dane niepublikowane**), zgodnie z normą ASTM (ASTM, 2019). Do realizacji pomiarów wykorzystano różnicowy kalorymetr skaningowy PerkinElmer DSC 7 (Waltham, Massachusetts, USA) wyposażony w Intracooler II i obsługiwany za pomocą oprogramowania Pyris 10.1 (Waltham, Massachusetts, USA). Urządzenie zostało skalibrowane przy użyciu indu (temperatura topnienia 156,6 °C, $\Delta H_f = 28,45$ J/g) i n-dodekanu (temperatura topnienia -9,65 °C, $\Delta H_f = 216,73$ J/g). W komorze pomiarowej panowała atmosfera azotu o czystości 99,999%. Próbki tłuszczu o masie około 6-9 mg zważono do otwartych aluminiowych tygli o pojemności 50 µl (Perkin Elmer, nr 02190041) i umieszczono w komorze pomiarowej

urządzenia. Punktem odniesienia był ten sam otwarty i pusty aluminiowy tygiel. Analizę procesu oksydacji przeprowadzano w atmosferze tlenu o czystości 99,995%, przepuszczanego z prędkością 20 ml/min., w następujących etapach:

- ustabilizowanie temperatury urządzenia do 25 °C;
- ogrzanie próbki w atmosferze azotu do wartości 100 i 120 °C (tłuszcz wyekstrahowany z listków waflowych) lub 160 °C (tłuszcz wyekstrahowany z kremu);
- zmiana gazu z azotu na tlen i pomiar czasu indukcji utleniania (OIT) przez 60 minut w temperaturze 100 i 120 °C (tłuszcz wyekstrahowany z listków waflowych) lub 160 °C (tłuszcz wyekstrahowany z kremów).

Na podstawie uzyskanych krzywych utleniania wyznaczono parametr OIT (czas indukcji utleniania) po normalizacji krzywej jako punkt przecięcia ekstrapolowanej linii bazowej i linii stycznej do opadającej krzywej egzotermicznej.

6.2.9. Analiza przemian fazowych tłuszczu

Badanie profili przemian fazowych topnienia (**P3**) za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) przeprowadzono zgodnie z metodą opracowaną dla tłuszczu mlecznego, z pewnymi modyfikacjami (Tomaszewska-Gras, 2016). Wykorzystano różnicowy kalorymetr skaningowy Perkin Elmer DSC 8500 PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA), wyposażony w Intracooler II i oprogramowanie Pyris (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). W komorze panowała atmosfera azotu o czystości 99,999%. Próbkę kremu o masie około 6-7 mg zważono do aluminiowych tygli o pojemności 20 µl (Perkin Elmer, nr 0219-0062, Waltham, Massachusetts, USA) i hermetycznie zamknięto, a jako odniesienie wykorzystano analogiczny pusty, hermetycznie zamknięty aluminiowy tygiel. Analizę przeprowadzono w następujących etapach:

- schłodzenie próbki kremu od 25 °C do -30 °C z prędkością 20 °C/min.;
- utrzymanie temperatury -30 °C przez 1 min.;
- ogrzanie próbki z prędkością skanowania 5 °C/min od temperatury -30 °C do 55 °C (pierwszy cykl ogrzewania);
- utrzymanie temperatury 55 °C przez 1 min.;
- schłodzenie próbki z prędkością skanowania 5 °C/min. od 55 °C do -30 °C;
- utrzymanie temperatury -30 °C przez 1 min.;
- ogrzanie próbki z prędkością skanowania 5 °C/min. do temperatury 55 °C (drugi cykl ogrzewania).

Z otrzymanych krzywych topnienia określono różne parametry temperaturowe DSC, tj. temperaturę początkową (T_{on}), która jest związana z punktem początkowym topnienia; temperaturę szczytową (T) oraz temperaturę końcową (T_{end}), która jest związana z temperaturą, w której cała próbka ulega stopieniu. Na podstawie pola powierzchni pod krzywą topnienia obliczono wartości entalpii częściowej (ΔH_p) i całkowitej (ΔH) topnienia. Ponadto, obliczono indeks fazy stałej (SFI) w temperaturze 25 °C, korzystając ze wzoru:

$$SFI (\%) = \frac{\Delta H_p}{\Delta H} \cdot 100 \quad (7)$$

gdzie: ΔH_p jest entalpią (J/g) obliczoną na podstawie obszaru krzywej topnienia w zakresie temperatur od 25 °C do temperatury końcowej (T_{end}), a ΔH jest entalpią całkowitą (J/g) obliczoną na podstawie obszaru pod całą krzywą topnienia w zakresie temperatur od T_{on} do T_{end} .

6.2.10. Analiza składu kwasów tłuszczowych

Skład kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej wyekstrahowanej z kremów (**P2**) wyznaczono chromatograficznie przy użyciu chromatografu gazowego (Trace 1300, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wyposażonego w detektor FID i kolumnę kapilarną SP TM-2650 o wymiarach 100 m × 0,25 mm × 0,2 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), zgodnie z normą AOCS (AOCS, 2005). Wewnętrzny standard przygotowano poprzez rozpuszczenie 0,125 g heptadekanianu metylu (Sigma Aldrich, USA) w 25 ml heksanu, z czego 100 μl dodano do próbki tłuszczu ($\pm 0,01$ g). Następnie mieszaninę tę rozpuszczono w 1 ml heksanu (>99%, Avantor, Gliwice, Polska) i 1 ml 0,4 M metanolu sodowego (Merck, Darmstadt, Niemcy). Mieszaninę rozpuszczono w 1 ml heksanu (>99%, Avantor, Gliwice, Polska) i 1 ml 0,4 M wodorotlenku metylosodowego (Merck, Darmstadt, Niemcy). Po uprzednim, dokładnym wymieszaniu, pozostawiono mieszaninę na 15 minut. Następnie do mieszaniny dodano 5 ml wody destylowanej w celu zatrzymania reakcji. Górną warstwę mieszaniny pobrano do analizy chromatografii gazowej (GC). Jako nośnik w trybie analizy bez podziału zastosowano wodór (1,5 ml/min.). Badania przeprowadzono poprzez ogrzanie pieca do temperatury 160 °C przez 1 minutę, po czym temperaturę podwyższono do 220 °C z prędkością 6 °C/min., natomiast temperaturę wlotu i detektora ustawiono na 240 °C. Poprzez porównanie czasu retencji próbki z materiałem referencyjnym (37 Component FAME Mix, Supelco) określono procentowy udział niektórych znaczących kwasów tłuszczowych w próbce.

6.2.11. Analiza aktywności przeciwutleniającej

Do pomiaru aktywności przeciwutleniającej próbek tłuszczu wyekstrahowanego z listków wafelowych (**P1**) oraz nadzień (**P2, dane niepublikowane**) wykorzystano metodę

DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu) (Espín i in., 2000; Tuberoso i in., 2007). Tłuszcz rozpuszczony uprzednio w octanie etylu (100 mg/100 μ l) dodano do 0,04 mM roztworu rodnika DPPH^{*} w octanie etylu (1:100 v/v). Próbę wymieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez 1 godzinę. Po upływie tego czasu używając spektrofotometru Cary 1E (Varian, Belrose, Australia) zmierzono absorbancję przy długości fali 515 nm, stosując octan etylu jako próbę zerową. Wyniki podano w μ mol TE (ekwiwalent Troloxu) na 100 g tłuszczu.

Do pomiaru aktywności przeciwutleniającej ekstraktu Flavomix AX 200 (**P1**) wykorzystano metodę DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu) (Sánchez-Moreno i in. 1998). 0,1 mM roztwór rodnika DPPH^{*} w metanolu zmieszano z próbkami ekstraktu (0-10%) w stosunku 100:1 (v/v). Po 30 minutach inkubacji w ciemności, w temperaturze pokojowej, dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 515 nm względem metanolu jako próby zerowej. Wyniki wyrażono jako μ mol równoważnika Troloxu (TE) na ml ekstraktu.

6.2.12. Analiza zawartości związków fenolowych

Całkowitą zawartość związków fenolowych (TPC) w ekstrakcie Flavomix AX 200 (**P1**) oznaczono metodą Folina-Ciocalteu'a (Singleton i Rossi, 1965). 20 μ l próbki ekstraktu z owoców cytrusowych (2% w wodzie destylowanej) zmieszano ze 100 μ l odczynnika Folina-Ciocalteu'a. Po 3 minutach inkubacji dodano 300 μ l roztworu węgla sodu (20% m/v) i dopełniono wodą destylowaną do objętości 2 ml. Mieszaninę inkubowano w ciemności przez 2 godziny. Pomiar absorbancji wykonano za pomocą spektrofotometru Cary 1E (Varian, Belrose, Australia) przy długości fali 765 nm względem próby ślepej. Wyniki wyrażono jako mg ekwiwalentu kwasu galusowego (GAE) na ml ekstraktu.

Z kolei całkowitą zawartość flawonoidów (TFC) w ekstrakcie Flavomix AX 200 (**P1**) oznaczono kolorymetryczną metodą z użyciem chlorku glinu (Meda i in., 2005). Próbkę ekstraktu (2% w wodzie destylowanej) zmieszano z 2% roztworem chlorku glinu w metanolu w stosunku 1:10 (v/v). Po 15 minutach inkubacji w ciemności, w temperaturze pokojowej, wykonano pomiar absorbancji za pomocą spektrofotometru Cary 1E (Varian, Belrose, Australia) przy długości fali 410 nm względem metanolu jako próby zerowej. Wyniki wyrażono jako mg równoważnika kwercetyny (QE) na ml ekstraktu.

Natomiast zawartość związków fenolowych w ekstrakcie Flavomix BC (**P2**) oznaczono przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) zgodnie z metodą zmodyfikowaną przez Muzolf-Panek i Waśkiewicz (2022) (Muzolf-Panek i Waśkiewicz, 2022), z zastosowaniem chromatografu cieczowego typu UPLC Aquity (Waters, Manchester,

MA, USA) wyposażonego w detektor z matrycą diod fotoprzewodzących (PDA eλ Detector) oraz spektrometr masowy typu potrójny kwadrupol z jonizacją elektrosprejową (TQD) (Waters, Manchester, MA, USA). Próbkę ekstraktu (1 g) rozpuszczono w 3 ml metanolu i przed analizą filtrowano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,20 μm. Rozdział związków fenolowych przeprowadzono w temperaturze 25 °C na kolumnie Waters Acquity UPLC HSS T3 (150 × 2,1 mm, średnica cząstek 1,8 μm) przy użyciu oprogramowania Empower™ 3 (Waters, Milford, MA, USA). Zastosowano elucję gradientową z wykorzystaniem fazy ruchomej A (woda z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego) oraz fazy B (acetonitryl z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego), przy przepływie 0,3 ml/min. Program gradientu był następujący: 0-5 min. – 25% fazy B, 5-20 min. – 40% B, 20-30 min. – 60% B, 30-35 min. – 90% B, 35-40 min. – 100% B, następnie powrót do warunków początkowych. Objętość iniekcji wynosiła 3 μl. Analizy prowadzono w trybie jonizacji dodatniej lub ujemnej, w pełnym zakresie mas od m/z 100 do 600.

6.2.13. Analiza mikrobiologiczna

Badaniom mikrobiologicznym poddano próbki wafli z kremem (**P3**) i przygotowano je zgodnie z ogólnymi wytycznymi zawartymi w normie PN-EN ISO 6887-1:2017-05 (ISO, 2017c). Wszystkie użyte substraty i pożywki mikrobiologiczne zostały zakupione w firmie BioMaxima w Polsce. Każdą próbkę zważono na wadze analitycznej, umieszczono w sterylnym roztworze soli fizjologicznej w stosunku masowym 1:10 (w/v) w oddzielnej torebce stomacher i zhomogenizowano mechanicznie w stomacherze (Interscience, Francja). Początkowe zawiesiny rozcieńczono metodą dziesiętnego rozcieńczania. Następnie próbki zaszczerpiono na płytkach Petriego z odpowiednim podłożem celem ilościowej analizy:

- pleśni i drożdży zgodnie z PN-ISO 21527-2:2009 (ISO, 2009). Użyto podłoże agar DG18, na którym wykonano posiew powierzchniowy, a następnie inkubowano w temperaturze 25 °C przez 5 dni;
- bakterii z grupy coli zgodnie z PN-ISO 4832:2007 (ISO, 2007). Użyto podłoże agar VRBL, na którym wykonano posiew wgłębnny, a następnie inkubowano w temperaturze 30 °C przez 24 h;
- ogólnej liczby drobnoustrojów zgodnie z PN-EN ISO 4833-1:2013 (ISO, 2013). Użyto podłoże agar PCA, na którym wykonano posiew wgłębnny i inkubowano w temperaturze 30 °C przez 72 h.

Analizę w kierunku obecności *Salmonella* wykonano metodą hodowlaną uzupełnioną testami biochemicznymi, zgodnie z normą PN-EN ISO 6579-1:2017 (ISO, 2017b). 25 g próbki

wstępnie wzbogacono w 225 ml buforowanej wody peptonowej i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 20 godzin. Po wstępnej inkubacji próbki przeniesiono na selektywne pożywki wzbogacające, w tym bulion Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) i bulion Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin (MKTTn), i inkubowano w temperaturze 37 °C przez kolejne 24 godziny. W celu rozróżnienia domniemanych kolonii *Salmonella* zastosowano selektywne podłoża agarowe (XLD i BGA).

6.2.14. Analiza sensoryczna

Ocenę sensoryczną wafli z kremem (**P3**) przeprowadziło 30 przeszkolonych panelistów, wykorzystując ilościową analizę opisową (QDA) w celu opisania właściwości sensorycznych produktu przy użyciu skali hedonicznej (0 – niewykrywalne, nieobecne; 10 – niezwykle silne odczucie). Zespół sensoryczny zidentyfikował i zdefiniował deskryptory, kładąc szczególny nacisk na cechy związane z teksturą (chrupkość i twardość) oraz smakowitością (słodkość, kakaowość i zjęłczenie). Oceny sensoryczne przeprowadzono w sali dedykowanej do analizy sensorycznej. Za każdym razem próbki wafli przekładanych kremem o jednakowej wielkości były kodowane, umieszczane w osobnych plastikowych pudełkach i przedstawiane każdemu oceniającemu w losowej kolejności. Średnie wartości, wariancja i odchylenie standardowe ocen analizy sensorycznej były obliczane oddzielnie dla każdego atrybutu każdej próbki i sesji.

6.2.15. Analiza statystyczna otrzymanych wyników

Analizę statystyczną wszystkich wyników (**P1, P2, P3, dane niepublikowane**) przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 13.3 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Za poziom istotności przyjęto wartość $\alpha = 0,05$. W celu sprawdzenia wpływu zmiennych (czasu i rodzaju próbki oraz opakowania) na wartość badanych parametrów zastosowano analizę wariancji (ANOVA). Jednorodność wariancji została zbadana za pomocą testu Cochran-Bartletta, a jednorodne grupy wyznaczono za pomocą testu HSD Tukeya. Korelacje między parametrami analizowano na podstawie współczynników liniowej korelacji r Pearsona.

W publikacji **P1** wykonano następujące analizy statystyczne:

- Regresję liniową i segmentową;
- Analizę skupień (CA).

W celu wykrycia pewnych wzorców w zbiorze danych zastosowano ogólną analizę skupień (CA) (z metodą Warda jako regułą aglomeracji i odległością euklidesową jako miarą). Przed obliczeniami dane zostały znormalizowane. Przeprowadzono analizę regresji (regresję liniową lub segmentową) w celu wykazania tempa zmian parametrów w czasie. W przypadku regresji

segmentowej punkt przełamania ustalono na 6 miesięcy. Obliczono współczynniki determinacji dla regresji (R^2).

W publikacji **P2** wykonano następujące analizy statystyczne:

- Analizę składowych głównych (PCA);
- Ogólną analizę dyskryminacyjną (GDA);
- Wielowymiarową regresję liniową (MLR) ze zmiennymi fikcyjnymi (dychotomicznymi).

Do wykrycia wzorców w zbiorze danych i wizualizacji zależności między wszystkimi wielkościami wykorzystanymi w publikacji **P2** zastosowano PCA. Z kolei za pomocą GDA obliczono reguły klasyfikacji dla rozróżnienia próbek. Do pokazania różnicy między wpływem czasu i rodzaju próbki na wartości tempa zmian wartości OIT w czasie przechowywania wykorzystano analizę wielowymiarowej regresji liniowej (MLR). Aby porównać tempo (nachylenie równania regresji) zmian parametrów w czasie między próbkami kontrolną a poddanymi reformulacji, zastosowano równanie:

$$y = \beta_0 + \beta_1 t + \alpha D + \gamma Dt + \varepsilon \quad (8)$$

gdzie: y – wartość zmiennej (OIT); β_0 – punkt przecięcia dla kontroli; β_1 – współczynnik regresji dla próbki kontrolnej; α – współczynnik regresji dla zmiennej fikcyjnej; γ – współczynnik regresji dla regresora interakcji; t – czas; D – zmienna fikcyjna dla próbki (0 lub 1); Dt – regresor interakcji: iloczyn zmiennej fikcyjnej i czasu; ε – standardowy błąd oszacowania. Zmienna fikcyjna została zakodowana jako 0 dla WS i 1 dla próbki po reformulacji (WC, WT lub WTE), a regresor interakcji jest równy 0, gdy $D = 0$ lub równy wartościom t , gdy $D = 1$. Następnie równanie (7) zostało zmodyfikowane w następujący sposób: gdy $D=0$ to

$$y = \beta_0 + \beta_1 t + \varepsilon \quad (9)$$

natomiast gdy $D=1$ to

$$y = (\beta_0 + \alpha) + (\beta_1 + \gamma)t + \varepsilon \quad (10)$$

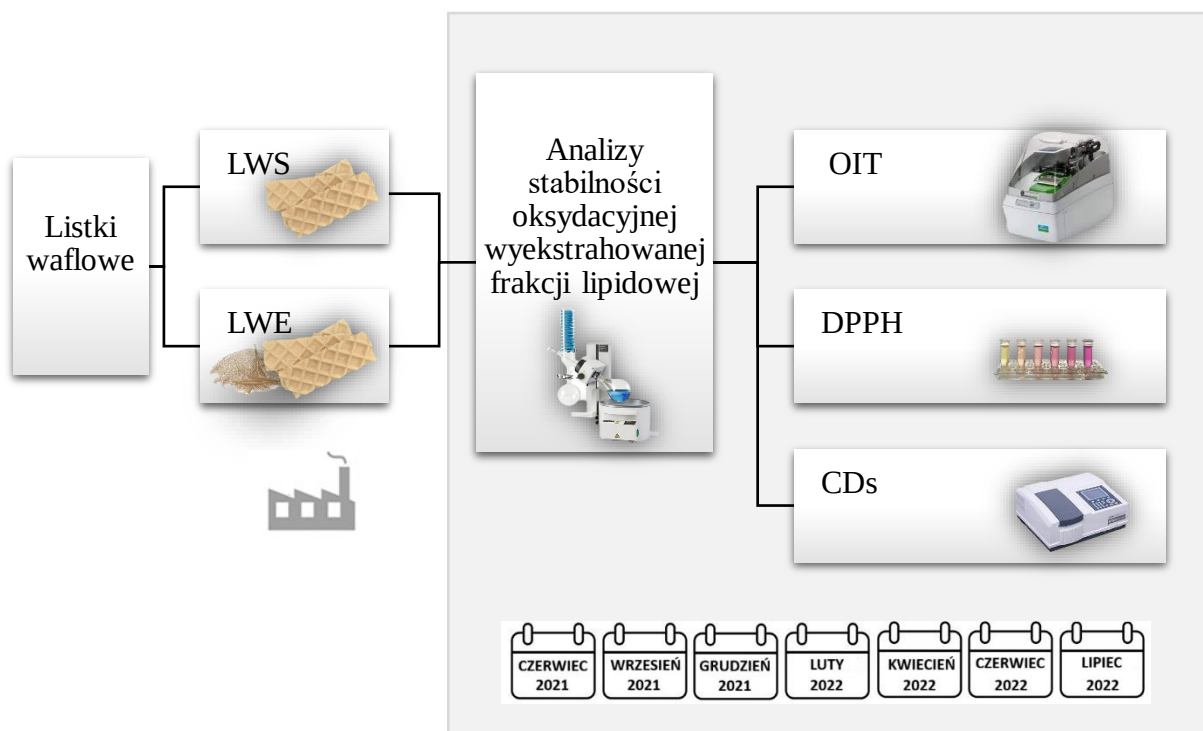
gdzie α podaje różnicę między wyrazami wolnymi WS i innych próbek, natomiast γ podaje różnicę między nachyleniami dwóch grup (WS i próbki o zmienionym składzie). W związku z tym hipoteza zerowa, że dwa nachylenia są równe (test interakcji), jest równoważna $\gamma = 0$. Do oceny istotności współczynników regresji zastosowano test t . Do oceny dopasowania krzywej zastosowano współczynniki dyskryminacyjne (R^2), a do oceny istotności regresji liniowej zastosowano analizę wariancji (ANOVA).

W publikacji **P3** wykonano następujące analizy statystyczne:

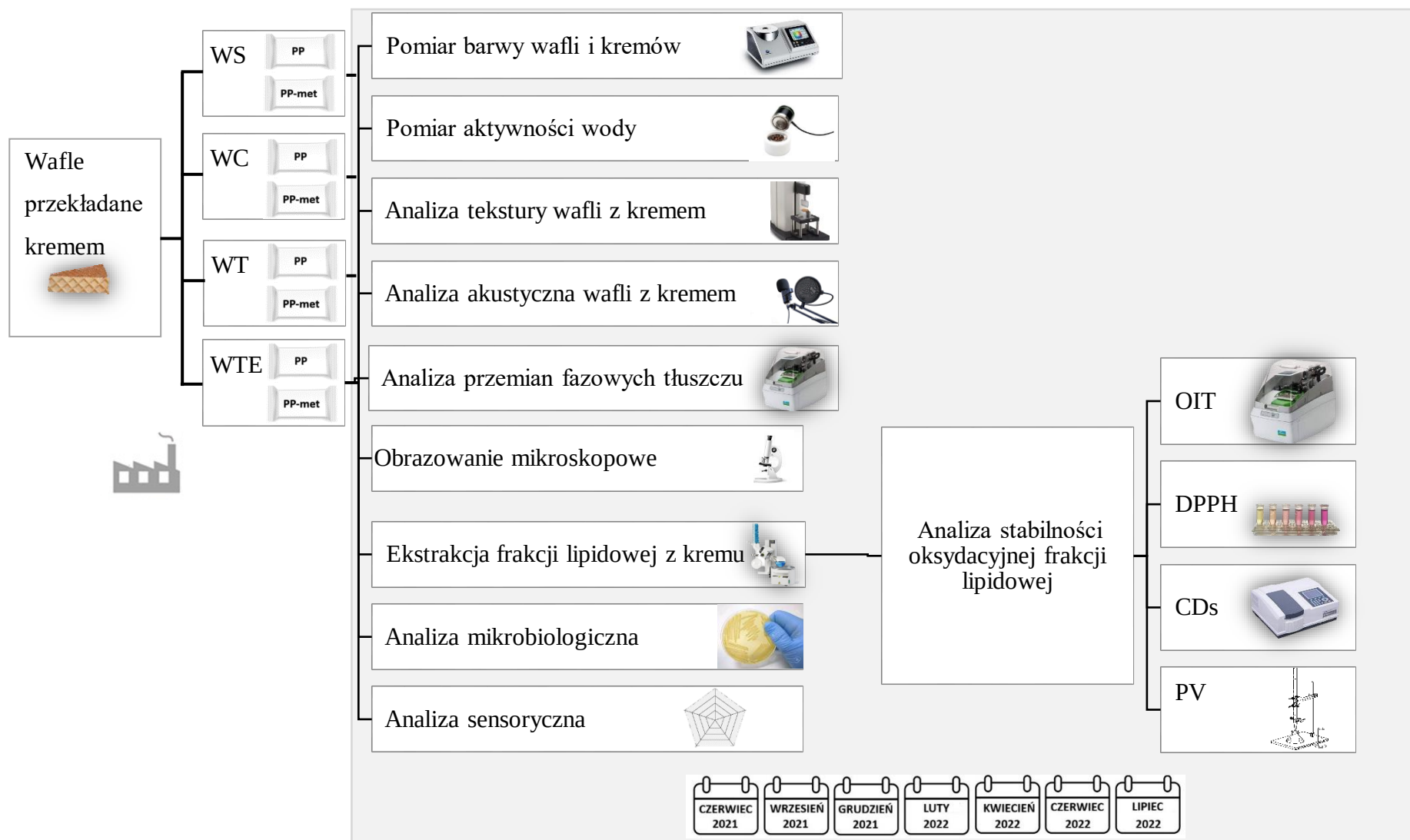
- Analizę składowych głównych (PCA);
- Analizę skupień (CA);
- Ogólne modele regresji z funkcją użyteczności (GRM).

Celem wizualizacji danych analizowanych w publikacji **P3** zastosowano PCA. Ponieważ cała macierz danych (wartości średnie) była słabo uwarunkowana (24x28), zmienne zostały wybrane na podstawie ich znaczenia dla rozróżnienia próbek, przy użyciu narzędzia do eksploracji danych w programie Statistica. Wybrano dziewięć zmiennych (siła łamania, twardość, słodycz, ΔH I, T_{on} I, ΔH II, T_{end} II, T_{end} I, L^*) o wartości $p \leq 0,05$. Przed przeprowadzeniem PCA wykonano pomiar adekwatności próby metodą Kaisera-Meyera-Olkina (KMO) oraz test sferyczności Bartletta. KMO zbadał siłę korelacji częściowej między zmiennymi (jak czynniki wyjaśniają się nawzajem). Test Bartletta zbadał hipotezę zerową, że macierz korelacji jest macierzą tożsamą. Macierz korelacji tożsama oznacza, że zmienne są niepowiązane i nie są idealne do analizy czynnikowej. Z kolei analiza skupień (CA), została wykorzystana jako wstępna ocena informacji w całym zbiorze danych.

W celu sprawdzenia wpływu zmiany receptury zastosowano ogólny model regresji (GRM), wykorzystując czas jako zmienną towarzyszącą oraz parametry jakościowe (rodzaj próbek = zmiana receptury). Zastosowano funkcje użyteczności odpowiedzi, aby wskazać optymalną próbkę (najlepszą) na podstawie wybranych zmiennych (właściwości sensoryczne, wskaźniki SFI i a_w).



Rysunek 1 Schemat badań przechowalniczych listków waflowych prowadzonych przez 13 miesięcy. Opracowanie własne



Rysunek 2 Schemat badań przechowalniczych wafli przekładanych kremem prowadzonych przez 13 miesięcy. Opracowanie własne.

7. Wyniki badań i ich interpretacja

7.1. Wpływ dodatku ekstraktu z owoców cytrusowych na stabilność oksydacyjną listków waflowych w czasie przechowywania (P1)

Wafle stanowią wyroby mające zwykle długi okres przydatności do spożycia, niejednokrotnie nawet 12 miesięcy. Niestety, jako produkty bardzo cienkie (do kilku milimetrów), są narażone na niekorzystne warunki podczas produkcji, tj. na wysoką temperaturę podczas wypieku (150-170 °C), trwającego od 2 do 4 minut, podczas którego cała powierzchnia listka waflowego styka się z płytami wypiekowymi (żelazkami). Głównym składnikiem, który jest bardzo podatny na niepożądane zmiany podczas produkcji i przechowywania jest tłuszcz.

Peroksydacja lipidów to bardzo złożony proces, przebiegający w formie reakcji łańcuchowej z udziałem wolnych rodników i prowadzący do powstawania szerokiej gamy związków. W początkowej fazie z nienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA) tworzą się nadtlenki, wodoronadtlenki i struktury sprzężone ze względu na przegrupowanie wiązań podwójnych w celu stabilizacji stanu rodnikowego (Barriuso i in., 2013; Xia i Budge, 2017). Dlatego w tej fazie nadtlenki i sprzężone dieny są głównymi produktami utleniania, z kolei w kolejnych etapach utleniania dochodzi do tworzenia związków wtórnych takich jak aldehydy, ketony, alkohole i estry. Wspomniane związki mogą nie tylko wpływać negatywnie na smak, zapach i ogólną jakość sensoryczną produktu, ale również obniżać jego wartość odżywczą oraz stwarzać potencjalne zagrożenia zdrowotne (Maire i in., 2013).

Biorąc pod uwagę fakt szczególnej podatności listków waflowych na procesy utleniania, w pierwszym etapie eksperymentu zbadano skuteczność przeciwutleniającego działania dodatku ekstraktu z owoców cytrusowych na stabilność oksydacyjną tłuszczu. W związku z powyższym postawiono hipotezę:

H1. Zastosowanie naturalnego ekstraktu z owoców cytrusowych zwiększa stabilność oksydacyjną listków waflowych podczas przechowywania.

Przeprowadzone badania opublikowano w publikacji **P1**. Produkcję listków prowadzono w skali przemysłowej, dlatego użyto komercyjnie dostępnego ekstraktu z owoców cytrusowych (Flavomix AX 200), który jest prawnie dopuszczony do stosowania w waflach. Aktywność przeciwutleniającą użytego ekstraktu zbadano metodą DPPH, uzyskując wartość $13,68 \pm 0,18$ $\mu\text{mol TE/ml}$. Po uwzględnieniu gęstości nasypowej ekstraktu (średnio 0,3 g/ml, dane producenta) odpowiada to aktywności na poziomie 45,6 $\mu\text{mol TE/g}$. Jest to wartość

zdecydowanie wyższa niż aktywność DPPH wykazana w badaniach prowadzonych przez Mateus i in. (2024) dla mąk cytrusowych, z których najwyższą aktywność wykazała mąka z cytryny (około 0,6 $\mu\text{mol TE/g}$). Aktywność przeciwutleniająca ekstraktu może być efektem zawartości związków fenolowych. Całkowita zawartość związków fenolowych (TPC) w ekstrakcie wynosiła $8,84 \pm 0,42 \text{ mg GAE/ml}$ a całkowita zawartość flawonoidów TFC = $0,823 \pm 0,038 \text{ mg QE/ml}$. Zarówno TPC jak i TFC dla ekstraktu Flavomix AX 200 były wielokrotnie wyższe niż dla mąk cytrusowych (Mateus i in., 2024).

W celu oceny przeciwutleniającej skuteczności ekstraktu w produkcji przygotowano próbki listków waflowych: bez dodatku ekstraktu (LWS) oraz z dodatkiem 0,13% ekstraktu (w/w) (LWE). Następnie z obu próbek wyekstrahowano frakcję lipidową. Stabilność termooksydacyjną wyizolowanej frakcji lipidowej oceniono za pomocą techniki DSC, wyznaczając czas indukcji utleniania (OIT) w temperaturach 100 °C (OIT100) oraz 120 °C (OIT120). Parametr OIT, mierzony izotermicznie, wyraża punkt początkowy procesu oksydacji, wyznaczony z egzotermicznych krzywych utleniania jako przecięcie linii bazowej ze styczną do opadającej krzywej utleniania. Na rysunku 2 w publikacji **P1** przedstawiono porównanie wartości OIT100 i OIT120 w całym okresie przechowywania dla obu analizowanych próbek wafla (LWS i LWE). Generalnie im wyższy parametr OIT, tym wyższa stabilność oksydacyjna próbki. Na podstawie wyników analizy ANOVA wykazano istotny wpływ czasu przechowywania i dodatku ekstraktu na wartości parametrów OIT100 i OIT120 ($p \leq 0,05$). Stwierdzono, że wraz z upływem czasu wartości OIT malały dla obu próbek (LWS i LWE), co wskazuje na obniżanie się stabilności oksydacyjnej tłuszczu. Porównując wartości OIT początkowe (czas 0) i końcowe (czas 13 miesięcy), odnotowano znaczące i istotne statystycznie obniżenie OIT100 dla obu próbek: dla LWS od 28,3 do 7,5 min., a dla LWE od 96,6 do 8,5 min. ($p \leq 0,05$). Podobną zależność stwierdzono dla OIT120. Dla obu wartości OIT (OIT100 i OIT120) zaobserwowano ponadto, że dla próbki z dodatkiem ekstraktu (LWE) były one zawsze istotnie wyższe niż dla próbki LWS przez początkowe osiem miesięcy przechowywania, co wskazuje na skuteczne działanie przeciwutleniające ekstraktu w tym okresie. Po tym czasie wartości OIT nie różniły się istotnie między próbkami LWE i LWS ($p > 0,05$).

Równolegle zbadano zawartość skoniugowanych dienów (CDs) w próbkach tłuszczu wyizolowanych z listków LWS i LWE. W oparciu o dane z wykresu pokazanego na rysunku 3 (**P1**), stwierdzono istotny statystycznie wzrost CDs w czasie przechowywania ($p \leq 0,05$). Różnice w zawartości skoniugowanych dienów między próbkami LWS i LWE były istotne

statystycznie przez okres pierwszych ośmiu miesięcy przechowywania ($p \leq 0,05$), przy czym wyższą zawartość CDs dla próbki LWS niż dla LWE obserwowano jeszcze do 12. miesiąca, co wskazuje na ochronne działanie ekstraktu w próbce LWE. W końcowym etapie przechowywania (13 miesięcy) wartości CDs nie różniły się istotnie pomiędzy próbkami LWS i LWE ($p > 0,05$) i były niższe niż po 12. miesiącach, co wskazuje na tworzenie się wtórnych produktów utleniania.

Przeprowadzono również badania obu próbek listków (LWS i LWE) pod kątem aktywności przeciwutleniającej tłuszczu wyekstrahowanego z listków, za pomocą metody wychwytywania rodników DPPH^{*}. Rysunek 4 (**P1**) ukazuje, że istotny wpływ czasu przechowywania i dodatku ekstraktu na wartości aktywności przeciwutleniającej DPPH widoczny był przez okres 10 miesięcy przechowywania listków ($p \leq 0,05$). Podobnie jak wartości OIT dla obu próbek (LWS i LWE), aktywność przeciwutleniająca malała wraz z czasem przechowywania. Jednakże przez okres 10 miesięcy aktywność antyoksydacyjna dla próbki LWE była w każdym badanym okresie istotnie wyższa niż dla próbki LWS ($p \leq 0,05$). Po sześciu miesiącach przechowywania wartości DPPH dla próbki LWS obniżyły się pięciokrotnie, podczas gdy dla próbki LWE dwukrotnie. Po 12. miesiącach różnice między wartościami DPPH dla obu próbek nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$).

Do określenia siły i kierunku związku między badanymi zmiennymi przeprowadzono analizę korelacji. Dla wszystkich badanych parametrów (OIT100, OIT120, CDs, DPPH) stwierdzono istotne statystycznie zależności liniowe, wyrażone współczynnikami r Pearsona. Ujemne, istotne korelacje stwierdzono pomiędzy: OIT a zawartością CDs, (-0,60 dla OIT120 i -0,64 dla OIT 100), co wskazuje na spadek odporności oksydacyjnej tłuszczu wraz ze wzrostem zawartości sprężonych dienów oraz pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą DPPH i CDs (-0,78), co dowodzi, że wyższa aktywność przeciwutleniająca hamuje tworzenie CDs. Z kolei wysoki dodatni współczynnik r Pearsona dla korelacji pomiędzy DPPH i OIT (0,73 dla OIT120 i 0,70 dla OIT 100) oznacza, że im większa zdolność do wychwytywania rodników DPPH^{*}, tym wyższa termostabilność oksydacyjna lipidów.

Podsumowując uzyskane wyniki, w obu próbkach listków waflowych (LWS i LWE) zaobserwowano wpływ czasu przechowywania na zmiany oksydacyjne, co zostało potwierdzone obniżeniem wartości OIT oraz spadkiem aktywności przeciwutleniającej DPPH, przy jednoczesnym wzroście stężenia CDs. Zmiany oksydacyjne w próbce LWE, zawierającej ekstrakt Flavomix AX 200, przebiegały wolniej. Potwierdzają to wartości współczynników β uzyskane w analizie regresji, których wartość bezwzględna była wyższa dla próbki LWS, co

wskazuje na szybsze tempo zmian każdego z badanych parametrów. Największą skuteczność ochronną ekstraktu odnotowano w ciągu pierwszych sześciu miesięcy przechowywania, co stwierdzono na podstawie wyników analizy skupień (CA), jak pokazano na rysunku 5 (P1). Pierwsze skupienie składa się z próbek LWE0 do LWE6. Jednakże efekt ochronny nie utrzymał się do końca okresu przechowywania (13 miesięcy), bowiem po 10. miesiącach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbkami ($p > 0,05$). Zatem hipotezę **H1** można potwierdzić: zastosowanie naturalnego ekstraktu z owoców cytrusowych zwiększa stabilność oksydacyjną listków waflowych podczas przechowywania, ale z pewnym ograniczeniem dotyczącym okresu działania ekstraktu skróconego do 10 miesięcy. Dodatkowo warto podkreślić, że zastosowanie ekstraktu przeciwutleniającego w produkcie powinno być poprzedzone szczegółowymi badaniami optymalizacyjnymi, mającymi na celu precyzyjne określenie zarówno efektywnej, jak i bezpiecznej dawki. Jest to istotne nie tylko ze względu na możliwość działania prooksydacyjnego przy wysokich stężeniach, ale również dlatego, że działanie prooksydacyjne może wystąpić również przy niższych dawkach, w zależności od warunków środowiskowych, obecności metali przejściowych (np. Fe^{2+} , Cu^{2+}), rodzaju matrycy produktu czy czasu ekspozycji (Rahal i in., 2014).

W literaturze przedmiotu wielokrotnie podkreślano korzystny wpływ wielu gatunków roślin oraz pozyskiwanych z nich ekstraktów, w tym również z owoców cytrusowych, na ograniczanie procesów utleniania tłuszczów w produktach cukierniczych (Bialek i in., 2016; Ismail i in., 2016; Obafaye i Omoba, 2018; Szymanowska i in., 2021). Wyniki badania, które prowadzili Obafaye i Omoba (2018), potwierdziły, że wzbogacenie receptury ciastek o mąkę ze skórek pomarańczy przyczyniło się do wzrostu ich aktywności przeciwutleniającej. Podobny efekt zaobserwowano w pracy Ismaila i współpracowników (2016), gdzie zastosowano ekstrakt z granatu. Natomiast Szymanowska i in. (2021) stwierdzili, że dodatki ekstraktu z malin znacząco zwiększały zdolność preparatów do wychwytywania wolnych rodników, przy czym najwyższe wartości odnotowano w próbkach z najwyższym poziomem wzbogacenia. Warto jednak zaznaczyć, że autorzy ci skupiali się głównie na ogólnej aktywności antyoksydacyjnej produktów, bez uwzględnienia wpływu ekstraktów na frakcję lipidową, a aspekt ten został po raz pierwszy uwzględniony w badaniu prezentowanym w niniejszej pracy.

Stabilność oksydacyjna wyrobów cukierniczych może być zwiększona przez dodatki roślinne, co wykazano we wcześniejszych badaniach (Kozłowska i in., 2019; Mildner-Szkudlarz i in., 2009). Dotychczas jednak analizowano głównie ekstrakty otrzymywane laboratoryjnie, a brakuje danych dotyczących skuteczności komercyjnych preparatów w

gotowych produktach. Z punktu widzenia przemysłu spożywczego, szczególne znaczenie mają dodatki, które zapewniają nie tylko skuteczność, ale także standaryzację i powtarzalność parametrów jakościowych. Zastosowanie ekstraktu pochodzenia naturalnego może dodatkowo wpisywać się w aktualne oczekiwania konsumentów dotyczące tzw. „czystej etykiety” (clean label), co zwiększa akceptowalność takich rozwiązań rynkowych. Należy również podkreślić, że w przeciwieństwie do wielu wcześniejszych badań prowadzonych na niewielką skalę w warunkach laboratoryjnych, niniejsza analiza została przeprowadzona w realnych warunkach produkcyjnych, przy zastosowaniu przemysłowej technologii wytwarzania waflów. Dzięki temu uzyskane wyniki lepiej oddają rzeczywiste procesy zachodzące podczas przechowywania i pozwalają na praktyczną ocenę skuteczności ekstraktu w ograniczaniu utleniania tłuszczów. Produkty cukiernicze są szczególnie narażone na zmiany oksydacyjne ze względu na wysoki udział tłuszczu, wysoką temperaturę stosowaną podczas wypieku oraz długi okres przechowywania (np. około 12 miesięcy w przypadku waflów). Jak wykazali Daglioglu i in. (2004), w trakcie rocznego przechowywania waflów dochodziło do istotnego spadku stabilności tłuszczu, przy czym najbardziej intensywny przebieg utleniania zaobserwowano w ciągu pierwszych trzech miesięcy (Daglioglu i in., 2004). Podobne tendencje zaobserwowano również w niniejszym badaniu. Chociaż testowany ekstrakt Flavomix AX 200 nie był w stanie zahamować procesów utleniania tłuszczów przez cały 13-miesięczny okres przechowywania, to jednak jego działanie ochronne utrzymywało się stosunkowo długo, przez około 10 miesięcy.

7.2. Wpływ reformulacji składu kremów cukierniczych na stabilność oksydacyjną i zmiany barwy w czasie przechowywania (P2)

Kremy stosowane jako nadzienie do waflów zawierają zwykle wysoką zawartość tłuszczu (28-42%) (Tiefenbacher, 2017a), przez co są szczególnie podatne na niekorzystne zmiany, szczególnie oksydacyjne, obniżające zarówno jakość, jak też wpływające na bezpieczeństwo produktu. W związku z tym dla opracowanych receptur kremów o obniżonej zawartości cukru (WC) i zmienionej fazie tłuszczowej (WT, WTE) przeprowadzono badania stabilności oksydacyjnej i stabilności barwy przez okres przechowywania 13 miesięcy. Badania opublikowane w publikacji **P2** miały na celu zweryfikowanie następującej hipotezy badawczej: **H2:** Zredukowanie zawartości cukru oraz modyfikacja fazy tłuszczowej nie powodują pogorszenia stabilności oksydacyjnej i barwy kremów, a dodatek ekstraktu z owoców cytrusowych zwiększa ich stabilność oksydacyjną w czasie przechowywania.

Z próbek kremów do wafli, oznaczonych jako WS, WC, WT i WTE, wyekstrahowano frakcję lipidową, dla której oznaczono skład kwasów tłuszczowych i stabilność oksydacyjną w czasie przechowywania. Na podstawie wyników analizy profilu kwasów tłuszczowych wykazano, że w kremach WS i WC dominował kwas palmitynowy (C16:0) (347,8-419,7 mg/g), podczas gdy w próbkach WT oraz WTE najwięcej było kwasu oleinowego (C18:1) od 370,5 do 396,6 mg/g, co jest efektem zmiany receptury. Po 13. miesiącach przechowywania stwierdzono obniżenie zawartości kwasu α -linolenowego (C18:3, *n*-3) we wszystkich badanych próbkach, natomiast kwasu linolowego (C18:2) tylko w kremach WC i WTE. Podobne zmiany notowano wcześniej w badaniach nad ciastkami z dodatkiem margaryny oraz masła (Bialek i in., 2016).

Ponadto w oparciu o wyniki analizy chromatograficznej wykazano, że głównymi związkami fenolowymi użytego ekstraktu Flavomix BC są kwas wanilinowy (2556,80 μ g/g) oraz chryzyna (1157,90 μ g/g). Całkowita zawartość związków fenolowych wynosiła 5470,4 μ g/g, co jest zbliżone do wartości uzyskanej dla proszku ze skórki pomarańczy (Jeong i in., 2022), choć jest niższą wartością niż oznaczona w mandarynkach rodzaju ponkan (Ho i Lin, 2008).

Stabilność oksydacyjną lipidów wyekstrahowanych z kremów oceniano na podstawie pomiaru czasu indukcji utleniania (OIT160), liczby nadtlencowej (PV) oraz zawartości skoniugowanych dienów (CDs). Stwierdzono, że wartości parametru OIT, przedstawione na rysunku 1 (**P2**), były istotnie wyższe dla próbek WT i WTE niż dla WS i WC w całym okresie przechowywania ($p \leq 0,05$), np. różnice w wartości OIT między świeżymi próbkami WTE a WS wynosiły około 19 min., WT a WS 23,5 min., podczas gdy między próbkami WS a WC tylko około 1 min. Jednakże dla wszystkich próbek obserwowano istotny spadek wartości OIT wraz z upływem 13 miesięcy ($p \leq 0,05$). Po 13. miesiącach różnica między wartościami OIT dla próbek WT i WS zmalała do około 17 min., co potwierdzają wyniki analizy MLR (tabela 3, **P2**) wskazujące na istotność współczynnika dla regresora interakcji (γ). Dla próbki WTE różnica OIT względem próbki WS w 13. miesiącu wynosiła 17 min. W tym okresie wartość OIT dla próbki WTE obniżyła się z 55 do 24 min., natomiast dla WS – z 36 do 7 min., a dla WC – z 35 do 6 min. W oparciu o wyniki analizy regresji stwierdzono, że tempo obniżania się wartości OIT dla próbki WT było większe (-2,9) niż dla próbki WTE (-2,4), co wskazuje, że utrata stabilności oksydacyjnej zachodziła wolniej w próbkach zawierających ekstrakt. Z kolei próbki WC i WS charakteryzowały się podobnym tempem spadku wartości OIT, co sugeruje, że redukcja cukru nie wpływała na stabilność oksydacyjną próbek wyrażoną jako wartość OIT w czasie przechowywania.

W badaniach innych autorów dotyczących stabilności oksydacyjnej ciastek również wykorzystano technikę różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), przy czym stosowano wyłącznie tryb nieizotermiczny z różnymi szybkościami ogrzewania próbek. Dla tych warunków określano temperaturę inicjacji utleniania lipidów. Podobnie jak w niniejszym badaniu, zauważono spadek stabilności oksydacyjnej ciastek w czasie, co przejawiało się obniżeniem temperatury początku utleniania. W badaniach prowadzonych przez Kozłowską i in. (2014) najlepsze właściwości przeciwutleniające wykazał ekstrakt z rozmarynu, który znacząco podnosił temperaturę początku utleniania ciastek po trzech tygodniach przechowywania (Kozłowska i in., 2014). Żbikowska i in. (2018) po trzech miesiącach przechowywania ciastek wzbogaconych o ekstrakty z zielonej herbaty, nasion czarnej porzeczki oraz pokrzywy, również odnotowali wyższe wartości temperatury początku utleniania frakcji lipidowej w porównaniu do próbki kontrolnej (Żbikowska i in., 2018).

W ramach oceny stabilności oksydacyjnej próbek w niniejszej pracy dokonano także pomiaru liczby nadtlenkowej (PV) tłuszczu, wyekstrahowanego z kremów. Jak wynika z tabeli 4 (**P2**), maksymalną wartość PV odnotowano dla próbki standardowej kremu (WS) po 10. miesiącach przechowywania (53,4 meq O₂/kg). Porównując tempo wzrostu wartości PV dla wszystkich próbek kremu w czasie, w przypadku próbki WS był on aż 6-krotny, dla WC 5-krotny, natomiast próbki WT i WTE wykazywały zdecydowanie wolniejsze tempo wzrostu, odpowiednio 1,6- i 2,5-krotne.

Podobne tendencje zaobserwowano również w badaniach przeprowadzonych przez Kozłowską i in. (2019), w warunkach przyspieszonego starzenia (63 °C, 28 dni), gdzie próbki ciast biszkoptowo-tłuszczowych zawierające 1% ekstraktu z zielonej herbaty wykazywały znacznie niższy poziom PV. Próbka kontrolna osiągnęła maksimum PV już po 14 dniach przechowywania na poziomie 89,55 meq O₂/kg, podczas gdy w próbce z 1% ekstraktu najwyższe PV zanotowano po 28 dniach i wyniosło jedynie 43,65 meq O₂/kg (Kozłowska i in., 2019). Zbieżne wyniki przedstawili również Mildner-Szkudlarz i in. (2009), którzy badali wpływ ekstraktu z zielonej herbaty (GT) na stabilność oksydacyjną herbatników w symulowanych warunkach starzenia (60 °C, 20 dni). Również w tym przypadku najwyższe wartości PV osiągnęła próbka bez dodatków (12,54 meq O₂/kg po 20 dniach), natomiast w próbce z 1% dodatkiem ekstraktu liczba nadtlenkowa wyniosła zaledwie 3,44 meq O₂/kg. Co istotne, ekstrakt z zielonej herbaty wykazał wyraźnie silniejsze działanie przeciwutleniające niż syntetyczny BHA (PV = 5,05 meq O₂/kg po 20 dniach), skuteczniej ograniczając procesy utleniania lipidów (Mildner-Szkudlarz i in., 2009).

W odniesieniu do oceny zmian ilości sprzężonych dienów (CDs) w próbkach tłuszczu wyekstrahowanych z kremów stwierdzono, że świeże próbki (czas 0) charakteryzowały się stosunkowo niskim poziomem (poniżej 0,2%), co zostało przedstawione w tabeli 4 (**P2**). Największą ilość CDs odnotowano w próbce WS (1,7%), następnie WT (1,42%), WTE (1,29%) i WC (0,86%). Po osiągnięciu maksymalnej wartości następowało obniżenie zawartości tych związków, wskazujące na tworzenie się wtórnych produktów oksydacji takich jak aldehydy czy ketony. Analiza regresji danych (od czasu 0 do osiągnięcia maksymalnej wartości CDs) wykazała, że szybkość powstawania sprzężonych dienów była najwyższa w próbce WC, następnie w WS i WT, a najniższa w WTE (wykres 1S, suplement **P2**). Potwierdzają to wartości współczynników regresji.

Na proces tworzenia struktur dienowych wpływa nie tylko czas przechowywania, lecz także zarówno jakościowy, jak i ilościowy skład kwasów tłuszczowych oraz obecność innych związków (Jaldani i in., 2024). Szybkość utleniania zależy od liczby i lokalizacji wiązań podwójnych, natomiast rearanżacja tych wiązań w nadtlenkach zachodzi wyłącznie w obecności wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) (Barriuso i in., 2013; Xia i Budge, 2017). Z tego względu wyższa zawartość kwasu linolowego (C18:2) i α -linolenowego (C18:3, n-3) w próbce WT, w porównaniu z próbkami WS i WC, przyczyniła się do zwiększonego poziomu CDs w okresie od trzeciego do ósmego miesiąca przechowywania. Dodatkowo, obecność ekstraktu owocowego w próbce WTE wykazywała działanie przeciwutleniające, ograniczając formowanie się wolnych rodników, a tym samym spowalniając powstawanie CDs w trakcie przechowywania, w porównaniu z próbką WT. Potwierdza to fakt, że maksymalna zawartość CDs w próbce WTE została osiągnięta później o dwa miesiące i była niższa niż w próbce WT.

Ocena aktywności przeciwutleniającej przeprowadzona z użyciem rodnika DPPH^{*} wykazała, że najwyższe wartości dla każdej z próbek odnotowano na początku przechowywania, przy czym próbka WTE osiągnęła 78,3 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), a najniższą wartość zaobserwowano w próbce WS (44,03 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), jak pokazano w tabeli 4 (**P2**). Po 3. miesiącach aktywność zmalała istotnie we wszystkich próbkach, z wyjątkiem próbki WS, dla której wartości utrzymywały się na podobnym poziomie ($p \leq 0,05$). Do końca przechowywania wartości utrzymywały się na zbliżonym poziomie we wszystkich próbkach, w zakresie 31-46 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$. Podobne zjawisko zaobserwowano w badaniach José i in. (2023), gdzie aktywność wychwytywania rodników DPPH^{*} w herbatnikach wzbogaconych ekstraktem z karczocha również ulegała obniżeniu w trakcie przechowywania (José i in., 2023).

Barwa powierzchniowa produktów spożywczych jest jednym z kluczowych czynników wpływających na subiektywną ocenę ich jakości przez konsumentów. Jest to w zasadzie jeden z głównych czynników, które wpływają na to, czy dany produkt zostanie zaakceptowany (León i in., 2006). W przypadku wyrobów cukierniczych, jak kremy waflowe, kolor jest determinowany zarówno przez rodzaj zastosowanych składników, jak i szczegóły procesu produkcji. Zmiany parametrów barwy w czasie przechowywania są istotnym elementem analizy jakości produktu. Dlatego monitorowano je w badaniu trwającym 13 miesięcy za pomocą systemu CIE Lab (L^* , a^* , b^*) oraz wartości obliczonych na ich podstawie, takich jak chroma, inaczej nasycenie (C), kąt barwy, inaczej kąt odcienia (h°) i różnica w barwie (ΔE) oraz indeks bieli (WI). Wyniki zestawiono w tabeli 5 (**P2**). W trakcie 13-miesięcznego przechowywania zaobserwowano zróżnicowane zmiany parametrów barwy w badanych próbkach kremów waflowych. Dla próbki WC stwierdzono największy przyrost wartości L^* w pierwszych trzech miesiącach, świadczący o rozjaśnianiu barwy, natomiast dla próbki WTE obserwowano przeciwny kierunek zmian, zmniejszania się wartości L^* aż do 13. miesiąca, osiągając najniższą wartość L^* spośród wszystkich próbek (41,7). Zmiany te potwierdził również spadek indeksu bieli (WI), co może świadczyć o intensyfikacji ciemniejszych tonów i ciemnieniu próbki kremu WTE. Parametr a^* , związany w zakresie dodatnich wartości z obecnością czerwonej składowej chromatycznej, utrzymywał się na stosunkowo stabilnym poziomie w czasie przechowywania, z wyjątkiem próbki WS, dla której po 12. miesiącach nastąpiło istotne obniżenie wartości do najniższego poziomu spośród wszystkich próbek ($p \leq 0,05$). Parametr b^* , odpowiadający w zakresie dodatnim za barwę żółtą, utrzymywał się na stosunkowo stabilnym poziomie. Na podstawie parametru wyrażającego całkowitą zmianę barwy (ΔE) stwierdzono, że największe zmiany miały miejsce w próbce WC ($\Delta E = 6,67$), sklasyfikowane jako „ekstremalnie wyraźne” (Kim i in., 2002; Young i Whittle, 1985). Pozostałe próbki wykazywały zmiany określane jako „nieznaczne” do „wyraźnych”, w zależności od składu. Z kolei wartości parametru określającego nasycenie barwy (C) mieściły się w przedziale od 18 do 21, co wskazuje na niskie nasycenie barwy, zbliżone do odcieni szarości. Kąt barwy (h°) odzwierciedlający odcień barwy oscylował w zakresie od 58° do 61° , co odpowiada barwom pomiędzy żółcią a czerwienią (Rajagukguk i in., 2024). Wyniki jednoznacznie wskazują, że obecność składników bioaktywnych, jak również modyfikacje składu recepturowego, wpływają nie tylko na właściwości funkcjonalne produktu, ale również na stabilność jego barwy w czasie przechowywania, co szczególnie zaobserwowano w

przypadku ciemnienia kremu z dodatkiem ekstraktu (WTE) i rozjaśnienia próbki o zredukowanej zawartości cukru (WC).

Analiza wielowymiarowa (PCA i GDA), umożliwiła pogłębioną interpretację danych dotyczących procesu utleniania lipidów i zmian barwy próbek kremów. Wysokie współczynniki korelacji Pearsona wskazały na istotną korelację pomiędzy parametrami CDs i PV ($r = 0,65$) oraz pomiędzy DPPH i OIT ($r = 0,62$). Zmiany parametrów barwy kremów, szczególnie L^* , a^* , h° oraz ΔE , były istotnie skorelowane z parametrami oksydacyjnymi (CDs, PV, OIT) i aktywnością przeciwutleniającą (DPPH), co potwierdzono za pomocą analizy PCA. Pierwsze pięć głównych składowych wyjaśniło 87,95% wariancji, przy czym PC1 (wyjaśniające 32,23% wariancji) było opisane przez DPPH, OIT oraz parametry barwy L^* , WI, a^* , h° i ΔE , natomiast PC2 (22,27%) przez CDs, PV i C. Ponieważ PCA nie służy do klasyfikacji, zastosowano także metodę GDA, która umożliwiła uzyskanie funkcji dyskryminacyjnych maksymalizujących różnice między grupami (Berrueta i in., 2007). Dwie pierwsze funkcje dyskryminacyjne były istotne statystycznie, wyjaśniając łącznie 98% wariancji, z czego pierwsza odpowiadała za 71%. Parametry ΔE , L^* i C miały największy wkład w pierwszą funkcję, natomiast WI, h° , OIT, CDs i DPPH w drugą. Modele dyskryminacyjne wykazały wysoką skuteczność klasyfikacji (93%), potwierdzając ich przydatność w rozróżnianiu próbek.

Podsumowując, powyższe dane eksperymentalne jednoznacznie wskazują, że kremy o zredukowanej zawartości cukru wykazywały zbliżony do próbki kontrolnej (WS) przebieg zmian termostabilności (OIT), a w przypadku liczby nadtlenkowej (PV) zmiany miały mniejszą rozpiętość niż dla próbki WS. Z kolei kremy WT i WTE, zawierające zmodyfikowaną fazę tłuszczową, wykazywały wyraźnie wyższe wartości OIT oraz niższe wartości PV w porównaniu do próbek WS i WC, wskazując na zwiększoną stabilność oksydacyjną. Jednocześnie, na początku przechowywania, aktywność przeciwutleniająca (oznaczona metodą wychwytywania rodników DPPH $\cdot$) była istotnie wyższa w próbkach WTE z udziałem ekstraktu roślinnego niż w pozostałych kremach. Zależności pomiędzy parametrami barwy a wskaźnikami utleniania i aktywnością przeciwutleniającą potwierdziła analiza PCA i GDA.

Przedstawione rezultaty wskazują, że zmiana receptury nie pogorszyła stabilności oksydacyjnej kremów o obniżonej zawartości cukru, a nawet ją poprawiła w wariantach o zmodyfikowanej fazie tłuszczowej, szczególnie tych z dodatkiem ekstraktu Flavomix BC. Jednocześnie obniżenie zawartości cukru prowadziło do rozjaśnienia barwy kremu, natomiast dodatek ekstraktu Flavomix BC powodował ciemnienie kremu WTE w trakcie

przechowywania. W związku z tym hipoteza **H2** została częściowo potwierdzona w zakresie stabilności oksydacyjnej, natomiast należy ją odrzucić w odniesieniu do wpływu zmian receptury na barwę.

7.3. Wpływ reformulacji na przebieg zmian jakościowych wafli przekładanych kremem w trakcie przechowywania (P3)

Reformulacja wafli z kremem bogatym w tłuszcz i cukier może prowadzić do znaczących trudności technologicznych oraz niekorzystnych zmian w kluczowych właściwościach produktu, obejmujących m.in. teksturę, jakość sensoryczną, trwałość oraz komfort konsumpcji, które mają bezpośredni wpływ na akceptację konsumencką (Dana i Sonia, 2024; Konar i in., 2022; Popov-Raljić i in., 2013; Souza i in., 2020). W wielu badaniach analizowano bezpośredni wpływ takich zmian na konsystencję, smak i postrzeganie przez konsumentów. Jednak skupiają się one głównie na wynikach krótkoterminowych, kładąc niewielki nacisk na bezpieczeństwo żywności, stabilność i akceptację przez konsumentów w długotrwałym okresie przydatności do spożycia. Aby wypełnić tę lukę, postawiono następującą hipotezę:

H3: Reformulacja kremu obejmująca redukcję zawartości cukru i eliminację oleju palmowego nie powoduje pogorszenia jakości wafli przekładanych kremem w czasie przechowywania.

W celu jej zweryfikowania przeprowadzono 13-miesięczne badania zmian parametrów jakościowych całych wafli z kremem o zmienionym składzie. Ocenie poddano barwę wafli, aktywność wody, teksturę, profil topnienia kremów i indeks fazy stałej, właściwości sensoryczne oraz bezpieczeństwo mikrobiologiczne (**P3**).

Barwa i wygląd powierzchni produktów spożywczych to podstawowe atrybuty wpływające na ich ocenę sensoryczną, jeszcze przed rozpoczęciem konsumpcji. Powyższe przesłanki stały się podstawą do badania zmian barwy powierzchni wafli w trakcie 13-miesięcznego okresu przechowywania. Statystycznie istotne zmiany barwy zaobserwowano we wszystkich kremach waflowych ($p \leq 0,05$). Ocenę przeprowadzono na podstawie parametrów L^* , a^* , b^* , c^* , h° oraz całkowitej różnicy barwy (ΔE), zgodnie z danymi przedstawionymi w tabeli 2 (**P3**). Próbką WTE charakteryzowała się globalnie najniższą średnią wartością L^* (66,99) w porównaniu do WS, WC i WT (67,9-68,5), co świadczy o jej najciemniejszym odcieniu. Próbkę WS i WC wykazywały niewielkie wahania w zakresie a^* i b^* , natomiast w próbkach WT i WTE zauważono stopniowy spadek tych parametrów aż do 10.-12. miesiąca, a następnie ich gwałtowny wzrost. Współczynnik chroma (C) wahał się od 18,1 do 29,8 dla wszystkich próbek (biorąc pod uwagę pojedyncze wyniki), co wskazuje na niskie nasycenie barwy, zbliżone do

szarości. Kąt barwy (h°) pozostawał w przedziale 75,7-88,2°, czyli w zakresie barw żółto-czerwonych. Największe różnice barwy (ΔE) w czasie przechowywania wystąpiły dla próbki WTE, osiągając wartość 9,5 po 12. miesiącach, co oznaczało „wyjątkowo zauważalną zmianę barwy”. Wartości ΔE dla pozostałych próbek mieściły się głównie w przedziałach zmian wyraźnych i bardzo wyraźnych (3,1-7,9) (Kim i in., 2002; Young i Whittle, 1985). Stwierdzono, że reformulacja, zwłaszcza z dodatkiem ekstraktu Flavomix BC, wpłynęła na intensywność oraz kierunek zmian barwy wafli podczas przechowywania.

Jednym z kluczowych parametrów jakościowych wafli jest aktywność wody (a_w), która istotnie wpływa na teksturę produktu oraz jego stabilność mikrobiologiczną (Gunes i in., 2022). Korzystając z danych zamieszczonych na wykresie 2 (**P3**), stwierdzono, że średnie wartości a_w wszystkich próbek w całym okresie przechowywania mieściły się w zakresie 0,07-0,26, a więc znacznie poniżej krytycznego poziomu sprzyjającego rozwojowi drobnoustrojów (0,6) oraz poniżej granicznej wartości 0,3, powyżej której wafle zaczynają szybko chłonać wilgoć, tracąc kruchość (Tiefenbacher, 2017b). Zaobserwowano istotny wpływ czasu przechowywania na zmiany a_w , przy czym w początkowym okresie (do 3. miesiąca) zanotowano wzrost a_w dla wszystkich próbek, po którym do 10. miesiąca następował spadek, a następnie ponowny wzrost. Szczególną uwagę zwraca próbka WC z obniżoną zawartością cukru, dla której wartości a_w były istotnie wyższe niż dla pozostałych próbek przez cały okres przechowywania. Wyniki te potwierdzają tezę, że cukier odgrywa istotną rolę w obniżaniu aktywności wody (Plotnikova i in., 2021). Różnice w dynamice zmian a_w mogą wynikać zarówno z migracji wilgoci między warstwami wafła i kremu, jak i z sorpcji wilgoci z otoczenia przez opakowanie. Wzrost a_w w pierwszych trzech miesiącach może być efektem przenikania pary wodnej z atmosfery wewnątrz opakowania, natomiast późniejszy spadek migracją wody z wafła do kremu, szczególnie w próbkach o wyższej zawartości cukru, zawierającej skrobię ryżową. Po dziesiątym miesiącu nastąpił drugi wzrost a_w , najbardziej wyraźny w próbce WC, która osiągnęła wartość 0,26, podczas gdy pozostałe próbki osiągnęły poziom 0,14-0,16. Możliwe wyjaśnienie tego zjawiska to nie tylko niewystarczające bariery wilgoci w opakowaniu (Tiefenbacher, 2017a), ale także przemiany fazowe cukrów np. przejście ze stanu amorficznego w krystaliczny wiążące się z uwolnieniem wody (Ahlqvist i Taylor, 2002) lub zjawisko retrogradacji skrobi (Chang i in., 2021), co może tłumaczyć zaobserwowany wzrost a_w . Warto również zauważyć, że migracja wody pomiędzy warstwami produktu może wpływać na zmiany tekstury oraz właściwości reologiczne kremu.

Tekstura, jako cecha jakościowa powiązana z aktywnością wody, została oceniona metodą instrumentalną. Uzyskane wyniki wskazały, że siła łamania (twardość) zależała od składu kremu, jak przedstawiono na rysunku 3A (**P3**). Próbki wafli WS i WC charakteryzowały się istotnie wyższymi ($p \leq 0,05$) średnimi wartościami tego parametru niż WT i WTE (odpowiednio 5,9-6,6 N vs. 3,0-3,6 N). Różnice te utrzymywały się przez cały okres przechowywania, co można wytłumaczyć odmiennym profilem kwasów tłuszczowych zastosowanych tłuszczów. Kremy WS i WC zawierały wyłącznie olej palmowy, zawierający 53% nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) i 47% nienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA), natomiast recepturę kremów WT i WTE oparto na mieszance masła shea i HORO (37% SFA, 63% UFA), co skutkowało niższą twardością tych ostatnich. Wyższa zawartość SFA zwiększała udział fazy stałej w temperaturze pokojowej, sprzyjając większej twardości. Lepsza homogeniczność emulsji w kremach WS i WC (potwierdzona analizą mikroskopową – rys. S1 (**P3**)) również mogła przyczynić się do większej odporności mechanicznej. W pierwszych trzech miesiącach przechowywania w próbkach WS, WC i WT zaobserwowano istotny wzrost twardości ($p \leq 0,05$) (odpowiednio do 8,2 N, 8,0 N i 6,2 N), co może być efektem retrogradacji skrobi lub przejść polimorficznych triacylogliceroli. W przeciwieństwie do nich, próbka WTE wykazywała stabilność w całym okresie 10 miesięcy, co może być związane z obecnością ekstraktu z owoców cytrusowych hamującego retrogradację. Największą stabilność siły łamania wykazywała próbka WC, której twardość nie zmieniała się istotnie od 3. do 13. miesiąca przechowywania, osiągając końcową wartość 7,73 N. Dla porównania, najniższe wartości (3,7 N) odnotowano w próbce WT. Wysoka zawartość skrobi w kremach wafli WC mogła pełnić funkcję stabilizującą poprzez właściwości żelujące i wiążące wodę. Analiza drugiego parametru, nachylenia krzywej siły względem czasu (rys. 3B, **P3**) potwierdziła te obserwacje, wykazując istotną korelację pomiędzy gradientem a twardością próbki ($p \leq 0,05$). Gradient nachylenia (N/s) odpowiada nachyleniu krzywej siła-czas i odzwierciedla ogólną wytrzymałość próbki na ściskanie w różnych jej obszarach. Wyższe wartości gradientu wskazują na większą wytrzymałość strukturalną. Najwyższe wartości gradientu (średnio 13,1 N/s) osiągnięto w próbce WC, zaś najniższe (ok. 5,4 N/s) odnotowano w WT i WTE. Zmiany te są rezultatem przejść fazowych składników kremów, zależnych m.in. od zawartości tłuszczów, cukrów, białek oraz dodatku skrobi. Zgodnie z literaturą, migracja wilgoci ma kluczowe znaczenie dla zmian tekstury podczas przechowywania, co potwierdzili Cevoli i in. (2023), wykazując silną korelację (R^2 do 0,84) między aktywnością wody a parametrami mechanicznymi wafli (Cevoli i in., 2023). Podobne obserwacje poczynili Romani i in. (2016)

oraz Alamprese i in. (2017), wskazując na degradację tekstury w wyniku absorpcji wilgoci przez ciastka i paluszki (Alamprese i in., 2017; Romani i in., 2016).

Zróznicowanie twardości wafli WS i WC względem WT i WTE uzasadnia odniesienie się również do charakterystyki fazy tłuszczowej, którą analizowano metodą DSC pod kątem przemian polimorficznych triacylogliceroli w trakcie 13-miesięcznego przechowywania, podczas którego monitorowano zmiany w profilach topnienia frakcji lipidowej kremów WS, WC, WT i WTE. Analiza pierwszego cyklu ogrzewania, mającego odzwierciedlać aktualny stan form polimorficznych występujących w kremach, została przedstawiona na rysunku 4 (**P3**). W profilach topnienia wszystkich próbek zaobserwowano obecność dwóch frakcji topnienia, tj. niskotopliwej ($\Delta H1$ I) i wysokotopliwej ($\Delta H2$ I), zawierających wiele pików (T1I-T9I), wyszczególnionych w tabeli 1S (suplement publikacji **P3**). Profile topnienia próbek WS i WC były zbliżone do tych obserwowanych dla czystego, rafinowanego oleju palmowego (Islam i in., 2023). W miarę upływu czasu przechowywania obserwowano przesunięcia pików oraz ich zanikanie, co świadczyło o zachodzących w kremach przemianach polimorficznych. Szczególnie istotne zmiany wystąpiły po 10 miesiącach, kiedy temperatura początku przemiany (T_{on} I) wzrosła z -27 °C do ok. -11 °C, a całkowita entalpia (ΔH I) uległa gwałtownemu obniżeniu, głównie z powodu redukcji entalpii frakcji niskotopliwej ($\Delta H1$ I). W celu wyjaśnienia tych zjawisk przeanalizowano drugi cykl ogrzewania (rys. 5, **P3**), który nie eliminował już wpływ historii termicznej próbek. Pomimo początkowej stabilności entalpii (ΔH II, $\Delta H1$ II, $\Delta H2$ II) w ciągu pierwszych 10 miesięcy, w dalszym okresie odnotowano istotne obniżenie wartości, podobnie jak w I cyklu, co wyklucza przemiany polimorficzne a skłania do wnioskowania o możliwej migracji niskotopliwych triacylogliceroli do listków waflowych. Porównanie wartości entalpii wszystkich próbek ujawniło wyższe wartości dla WS i WC, co wynika z wyższej zawartości tłuszczu palmowego (36% m/m), w porównaniu do WT i WTE, zawierających jedynie 14% tłuszczu shea i 9% HORO. Dodatkowo na podstawie danych entalpii obliczono indeks fazy stałej (SFI) w 25 °C, który ilustruje udział fazy stałej tłuszczu w danej temperaturze i ma znaczenie dla oceny smarowności kremów. Choć obserwowano statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) zmiany wartości SFI (zarówno SFI I, jak i SFI II) do 10. miesiąca, ich przebieg był relatywnie łagodny, a wartości dla kremów WS i WC pozostawały wyższe niż dla WT i WTE. Różnice te odpowiadały wyższej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych tj. 53% w oleju palmowym w kremach WS, WC w porównaniu do 37% w mieszance tłuszczu shea i HORO (WT, WTE). Po 10. miesiącu wartości SFI II dla wszystkich próbek uległy wyrównaniu, osiągając poziom 34-36%, a w ostatnim miesiącu wartości te były

wyższe dla WT i WTE (63-64%) niż dla WS i WC (48-49%), co może potwierdzać efekt migracji frakcji w fazie płynnej (niskotopliwej) do struktury wafla.

W badaniu sensorycznym dla wszystkich czterech analizowanych próbek oceniono pięć atrybutów: chrupkość, twardość, słodycz, kakaowość i zjełczałość, ocenianych w różnych okresach przechowywania (0, 3, 6, 8, 10, 12 i 13 miesięcy). We wszystkich próbkach zaobserwowano stopniowy spadek chrupkości, co jest typowe dla produktów przechowywanych przez dłuższy czas. Najbardziej dynamiczny spadek tego parametru stwierdzono w próbkach WC, co można powiązać z ich wyższą aktywnością wody oraz większą siłą łamania. Z kolei próbki WS i WT wykazywały bardziej stabilną chrupkość, przy czym WT miały nieco niższe wartości niż WS. Największą stabilność chrupkości zachowały próbki WTE, utrzymując najwyższe wartości aż do dziesiątego miesiąca przechowywania. W zakresie oceny sensorycznej twardości wafla wyodrębniono dwie grupy: twardsze WS i WC oraz bardziej miękkie WT i WTE. Świeże wafle WC i WS charakteryzowały się wyższymi średnimi wartościami (odpowiednio 4,2 i 5,0) niż pozostałe próbki (WT, WTE) w tym samym czasie (3,1 dla obu próbek). W przypadku próbek WS i WC wartości rosły jeszcze przez pierwsze trzy miesiące, po czym ustabilizowały się. Natomiast próbki wafla ze zmienioną fazą tłuszczową (WT i WTE) wykazały stopniowy, ciągły wzrost do poziomu 3,5 odnotowanego dla obu próbek po 13 miesiącach przechowywania. Kakaowość pozostała stabilna we wszystkich wariantach (średnio 7,8), niezależnie od receptury czy czasu przechowywania. Z kolei ocena słodyczy wykazała zróżnicowanie w zależności od receptury kremu. W próbce WC oceniono najniższy jej poziom (6,3), co było zgodne z faktem redukcji cukru w ich składzie, natomiast wyższe wartości słodyczy odnotowano dla próbek WT i WTE (7,6) oraz WS (7,5). Zjełczałość nie była wykrywalna do dziesiątego miesiąca, a pierwsze oznaki tego zjawiska odnotowano w miesiącu dwunastym, głównie w próbkach WT, WC i WS. Próbki WTE wykazały największą odporność na rozwój zjełczałości, co przypisano obecności ekstraktu Flavomix BC o działaniu przeciwutleniającym w ich składzie.

W celu oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego wafla w całym okresie przechowywania analizowano obecność *Salmonella* sp., bakterii z grupy coli, ogólnej liczby drobnoustrojów, a także pleśni i drożdży. We wszystkich próbkach (WS, WC, WT, WTE) oraz we wszystkich analizowanych okresach przechowywania (do 13 miesięcy), *Salmonella* sp. nie została wykryta w 25 g produktu, natomiast liczba pleśni i drożdży oraz bakterii z grupy coli pozostawała poniżej 10 jtk/g. Średnie wartości ogólnej liczby drobnoustrojów dla wszystkich wariantów i okresów wynosiły od 2,15 do 2,26 log jtk/g i nie wykazały istotnych statystycznie

zmian w czasie przechowywania, co świadczy o utrzymaniu wysokich standardów higienicznych i skutecznym reżimie sanitarnym. Dla porównania, Kumari i in. (2021) wykazali wyższe wartości ogólnej liczby bakterii ($3,16-4,25 \log \text{ jtk/g}$) w ciastkach wzbogaconych mąką z pestek dyni po 75 dniach przechowywania (Kumari i in., 2021). Podolak i in. (2010) zwracają uwagę, że produkty o niskiej aktywności wody mogą sprzyjać przetrwaniu patogenów, szczególnie w warunkach niewystarczającej higieny produkcji i nieodpowiedniego nadzoru nad surowcami (Podolak i in., 2010). Ponadto Beuchat i Mann (2015) potwierdzili, że *Salmonella* sp. może przetrwać nawet do 6 miesięcy w produktach o niskiej aktywności wody, takich jak nadzienia do ciastek (Beuchat i Mann, 2015). Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu świadczą jednak o skutecznym ograniczeniu ryzyka mikrobiologicznego, nawet w długim okresie przechowywania.

W ramach identyfikacji zależności między parametrami jakościowymi badanych wafli o różnych składach zastosowano analizę głównych składowych (PCA), którą przedstawiono na rysunku 9 (P3). PCA umożliwiła redukcję liczby zmiennych przy zachowaniu większości informacji i wykazała, że trzy główne składowe (PC1-PC3) wyjaśniały łącznie 89,98% całkowitej wariancji, z czego PC1 odpowiadała za 60,61%, a PC2 za 18,03%. Stwierdzono, że pierwsza składowa (PC1) była silnie dodatnio skorelowana z twardością i parametrami DSC, a ujemnie ze słodyczą. Na podstawie wykresu wyników PCA wyróżniono cztery grupy próbek, różniące się przede wszystkim czasem przechowywania i parametrami teksturalnymi oraz termicznymi. Próbkę WS i WC przechowywane do 10 miesięcy tworzyły grupę o wysokich wartościach PC1, natomiast WT i WTE z tego samego okresu charakteryzowały się wysoką słodyczą i niskimi wartościami siły łamania. Próbkę z 12. i 13. miesiąca (zwłaszcza WT i WTE) tworzyły odrębną grupę z wysokimi wartościami PC2, co wskazuje na zmiany profilu topnienia i pogarszanie się parametrów tekstury.

Analiza skupień (CA) potwierdziła wyniki analizy PCA, tworząc wyraźnie oddzielne klastry dla próbek przechowywanych przez 12 i 13 miesięcy. Dwa odrębne klastry zidentyfikowano również dla wafli przechowywanych do 10 miesięcy: odpowiednio dla próbek WS i WC oraz WT i WTE. Próbkę WS i WC z pierwszych 10 miesięcy tworzyły klaster charakteryzujący się najwyższymi wartościami entalpii i twardości, natomiast WT i WTE z tego okresu wykazywały pośrednie wartości parametrów topnienia. Próbkę ze wszystkich wariantów przechowywanych przez 12-13 miesięcy miały niskie wartości ΔH i T_{end} oraz wysokie wskaźniki SFI.

Ostatecznie, model regresji ogólnej (GRM), przedstawiony na rys. S2 (**P3**), pozwolił ocenić wpływ reformulacji w czasie, wskazując, że próbka WTE, zwłaszcza na początku przechowywania, wykazywała najlepsze: właściwości sensoryczne (bardzo ważne dla konsumentów), wartości SFI, związane z właściwościami profilu topnienia kremu oraz aktywnością wody, związaną ze stabilnością mikrobiologiczną i teksturą, co czyni go najbardziej pożądanym wariantem.

W świetle uzyskanych rezultatów stwierdzono, że hipoteza **H3** została częściowo potwierdzona: eliminacja oleju palmowego nie pogorszyła jakości wafli w trakcie przechowywania, a nawet poprawiła ich parametry. Natomiast redukcja zawartości cukru miała negatywny wpływ na jakość przechowalniczą, co uzasadnia odrzucenie tej części hipotezy.

7.4. Wpływ opakowania na jakość przechowalniczą wafli przekładanych kremem (dane niepublikowane)

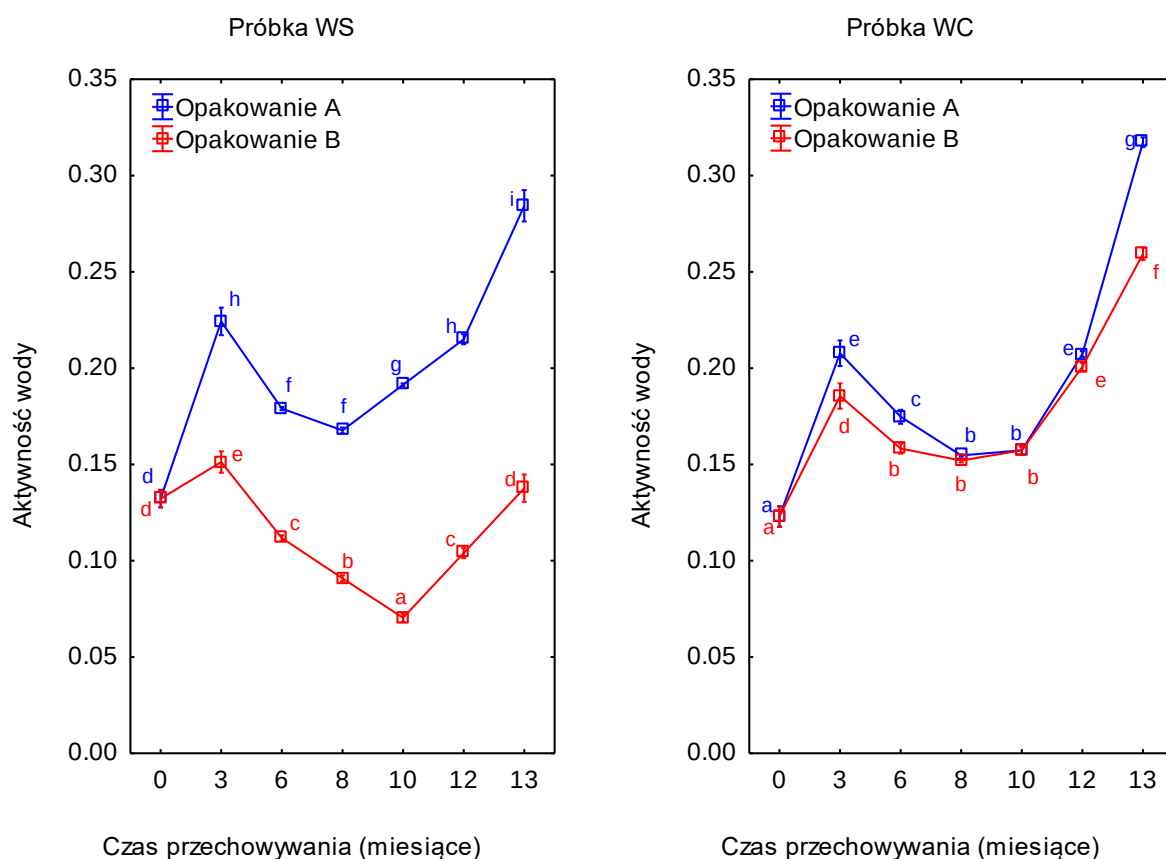
Wafle z kremem stanowią kategorię wyrobów szczególnie atrakcyjnych sensorycznie, łączącą słodczy i kremową konsystencję nadzienia z lekką, chrupiącą strukturą warstw waflowych. Taka budowa, oparta na zestawieniu suchych, chrupiących listków waflowych z lepkiem, jednorodnym nadzieniem o półstałej konsystencji, czyni te produkty szczególnie podatnymi na niekorzystne zmiany jakościowe. Do najczęściej obserwowanych procesów degradacyjnych należą m.in. migracja wilgoci, utrata chrupkości czy utlenianie tłuszczów. Zjawiska te mogą być dodatkowo intensyfikowane przez czynniki środowiskowe: podwyższoną temperaturę i wysoką wilgotność względną powietrza czy obecność tlenu. Kluczowe znaczenie w ograniczaniu tych niekorzystnych procesów ma odpowiednio dobrane opakowanie, które powinno skutecznie chronić produkt przed wpływem czynników zewnętrznych. Liczne badania (Li i in., 2023; Sirpatrawan, 2009; Tolve i in., 2024) potwierdzają, że materiały opakowaniowe o właściwościach barierowych, czyli niskiej przenikalności dla wody i tlenu, istotnie przedłużają trwałość sensoryczną, zwłaszcza chrupkość produktu. Cevoli i in. (2023) wykazali, że zastosowanie opakowania wielomateriałowego znacząco opóźnia utratę chrupkości wafli z nadzieniem (Cevoli i in., 2023). W związku z powyższym sformułowano hipotezę:

H4: Rodzaj opakowania wpływa na stabilność parametrów jakościowych wafli z kremem w czasie przechowywania.

Stąd celem tej części badań była ocena wpływu dwóch typów opakowań: folii polipropylenowej (opakowanie A) i metalizowanej folii polipropylenowej (opakowanie B), na jakość wafli z

kremem: standardowych (WS) i z obniżoną zawartością cukru (WC), w trakcie przechowywania przez 13 miesięcy. Na każdym etapie badań przechowalniczych analizowano następujące parametry fizykochemiczne: aktywność wody; twardość wafli (siłę łamania) i chrupkość ocenianą za pomocą pomiarów akustycznych; stabilność oksydacyjną (OIT, PV, CDs) oraz aktywność przeciwutleniającą (zdolność wychwytywania rodnika DPPH*) frakcji lipidowej kremu.

Aktywność wody (a_w) odgrywa ważną rolę w określaniu jakości i trwałości wyrobów spożywczych, w tym wafli przekładanych kremem. W oparciu o wyniki przebiegu zmian a_w w czasie przechowywania, przedstawione na wykresie (rys. 3), stwierdzono nieliniowy charakter wzrostu tego parametru w obu próbkach (WS i WC) niezależnie od opakowania. Na podstawie analizy ANOVA wykazano istotny wpływ czasu przechowywania, rodzaju opakowania i próbki na aktywność wody ($p \leq 0,05$).



Rysunek 3 Zmiany wartości aktywności wody (a_w) podczas 13 miesięcy przechowywania: a. – dla wafli standardowych (WS), b. – dla wafli o obniżonej zawartości cukru (WC); w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana). Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-i) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).

W przypadku próbki standardowej (WS) przechowywanej w obu rodzajach opakowań zaobserwowano początkowo stopniowy wzrost średniej wartości aktywności wody (a_w). Dla próbki w opakowaniu B (folia polipropylenowa metalizowana) wartość a_w osiągnęła maksymalny poziom 0,15 w trzecim miesiącu. Następnie dla obu próbek odnotowano spadek aktywności wody, aż do osiągnięcia wartości minimalnych: 0,17 w 8. miesiącu w opakowaniu A oraz 0,07 w 10. miesiącu w opakowaniu B. W kolejnych punktach pomiarowych, aż do 13. miesiąca, obserwowano ponowny wzrost wartości a_w – do wartości 0,14 w opakowaniu B oraz 0,28, maksymalnej a_w w opakowaniu A. Na uwagę zasługuje też fakt, że wartości a_w : początkowa i końcowa, zanotowane dla wariantu opakowania B, nie różniły się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$), podczas gdy w przypadku opakowania A wartość początkowa była dwukrotnie niższa od końcowej.

Dla próbki WC (rys. 3b), charakteryzującej się obniżoną zawartością cukru, przebieg zmian a_w w czasie miał podobny charakter (kształt krzywych) jak dla próbki standardowej (WS), jednak wartości a_w w poszczególnych punktach różniły się, przy czym różnice te nie miały stałego charakteru i nie zawsze były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$), z wyjątkiem trzech punktów pomiarowych (w 3., 6. i 13. miesiącu). Zarówno różnice pomiędzy początkową a końcową wartością a_w w obrębie każdego z opakowań, jak i różnice pomiędzy końcowymi wartościami a_w w zależności od rodzaju opakowania, były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$). Dla opakowania A początkowa wartość a_w , wynosząca 0,12, zwiększyła się już po trzech miesiącach o 75%, osiągając poziom 0,21. Dla wafli w opakowaniu B w tym czasie odnotowano wzrost o 58%. Następnie dla obu wariantów obserwowano stopniowy spadek aktywności wody do 8. miesiąca, a dalej stabilizację wartości a_w na poziomie 0,16 do 10. miesiąca. W końcowym etapie, w 13. miesiącu, odnotowano ponowny wzrost wartości a_w do 0,26 i 0,32, odpowiednio dla opakowania A i B.

Podczas 13 miesięcy przechowywania wafli (WS i WC) wartości a_w były niższe w opakowaniu B niż w opakowaniu A, co może świadczyć o lepszych właściwościach barierowych materiału opakowaniowego B, chociaż dla wafli WC statystycznie istotne różnice między opakowaniami pojawiły się tylko w trzech punktach pomiarowych, natomiast dla próbki WS wartości a_w w opakowaniu B były statystycznie istotnie niższe we wszystkich punktach pomiarowych. ($p \leq 0,05$).

W literaturze odnotowano podobne, niskie poziomy aktywności wody dla chrupkich produktów. Jakubczyk i in. (2008) w czasie badania pieczywa chrupkiego prowadzili analizy a_w w przedziale 0,03-0,75. Wykazali, że zwiększenie a_w powyżej 0,255 prowadziło do istotnego

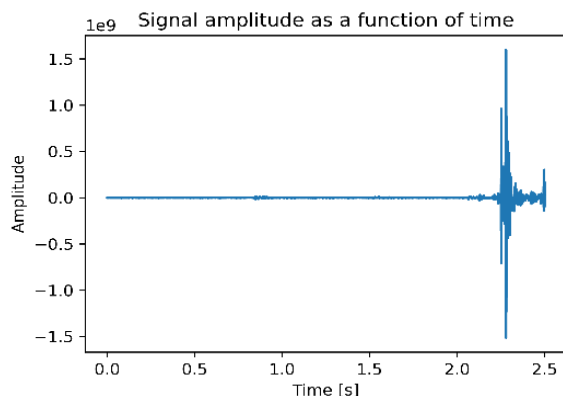
pogorszenia parametrów mechanicznych chrupkiego chleba, w tym spadku odporności na złamanie. Dla chrupkiego chleba pełnoziarnistego zakres krytyczny był w przedziale $a_w = 0,039-0,319$ (Jakubczyk i in., 2008). Katz i Labuza (1981) prowadząc badania nad produktami typu chipsy i krakersy, wskazali, że pogorszenie chrupkości tych produktów jest wyraźnie odczuwalne przy wartościach a_w mieszczących się w zakresie 0,35-0,50 (Katz i Labuza, 1981). Aktywność wody przekraczająca poziom 0,3 sprzyja intensywnemu pochłanianiu wilgoci przez wafle, co prowadzi do pogorszenia ich właściwości teksturalnych (Tiefenbacher, 2017b). Wartość $a_w = 0,32$ uzyskana w niniejszym badaniu dla próbek WC (opakowanie A) mieści się zatem w granicznym zakresie, w którym według literatury obserwuje się negatywny wpływ na teksturę produktów chrupkich takich jak wafle.

Zgodnie z założeniami badania, aktywność wody była analizowana równolegle z parametrami tekstury, aby kompleksowo ocenić wpływ receptury i rodzaju opakowania na stabilność produktów podczas przechowywania. Powiązanie tych parametrów wynika z faktu, że a_w bezpośrednio oddziałuje na właściwości mechaniczne produktów suchych, takich jak wafle, m.in. poprzez zmianę stopnia uwodnienia i zmiękczenie struktury, co może skutkować utratą charakterystycznej chrupkości. Ta cecha, będąca jedną z najbardziej cenionych przez konsumentów właściwości tekstury żywności, odgrywa ważną rolę nie tylko w odbiorze produktu, ale także w projektowaniu i ocenie stabilności technologicznej produktów spożywczych (Surmacka Szczesniak, 2002). W przypadku produktów takich jak wafle, chrupkość stanowi fundamentalną właściwość, determinującą ich atrakcyjność, a wynika z napowietrzonej, porowatej struktury listków waflowych, którą Sundara (2012) określa jako formę pianki – komórkowej substancji stałej utworzonej ze zżelowanej, wysuszonej skrobi, zawierającej zamknięte komórki gazowe. Powstanie tej struktury jest efektem złożonego procesu technologicznego, który rozpoczyna się już na etapie doboru i mieszania składników. Kluczowym czynnikiem wpływającym na finalną teksturę wafła jest wielkość i rozmieszczenie pęcherzyków gazu w upieczonym produkcie (Sundara, 2012). Tradycyjne metody oceny tekstury często opierają się na subiektywnych ocenach sensorycznych, które, choć wartościowe, mogą być trudne do standaryzacji i podatne na zmienność. W odpowiedzi na te wyzwania, metody akustyczne zyskują na znaczeniu jako obiektywne narzędzia do kwantyfikacji właściwości teksturalnych.

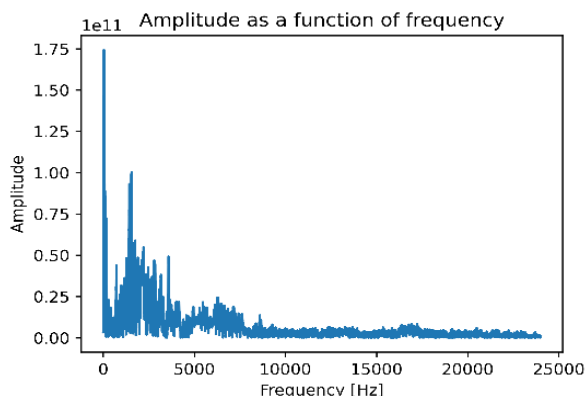
Analiza sygnałów dźwiękowych generowanych podczas łamania, umożliwia uzyskanie szczegółowych informacji o strukturze materiału i jego zachowaniu mechanicznym. Na rysunku 4 przedstawiono przykładowe wykresy zarejestrowanego sygnału akustycznego

(amplituda) w funkcji czasu (s) i częstotliwości (Hz) dla próbek wafli z receptura standardową (WS), zapakowanych w folię metalizowaną (opakowanie B).

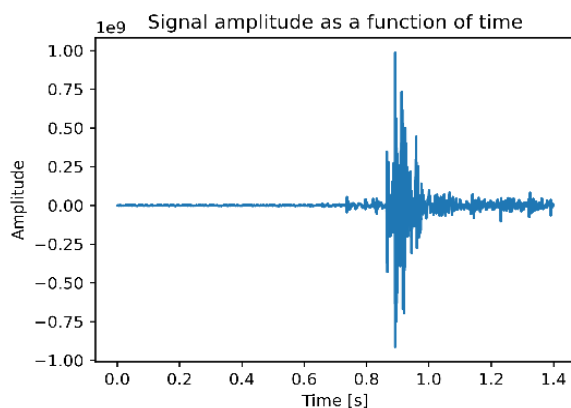
a.



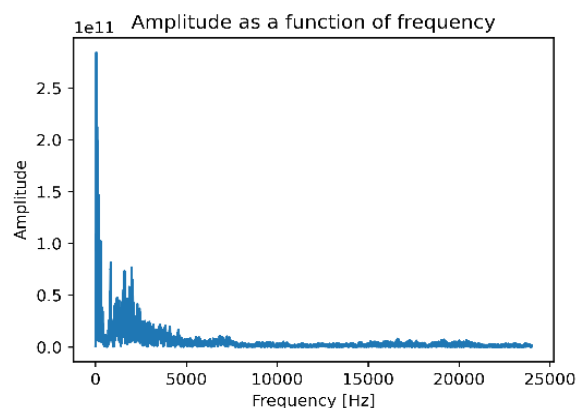
b.



c.

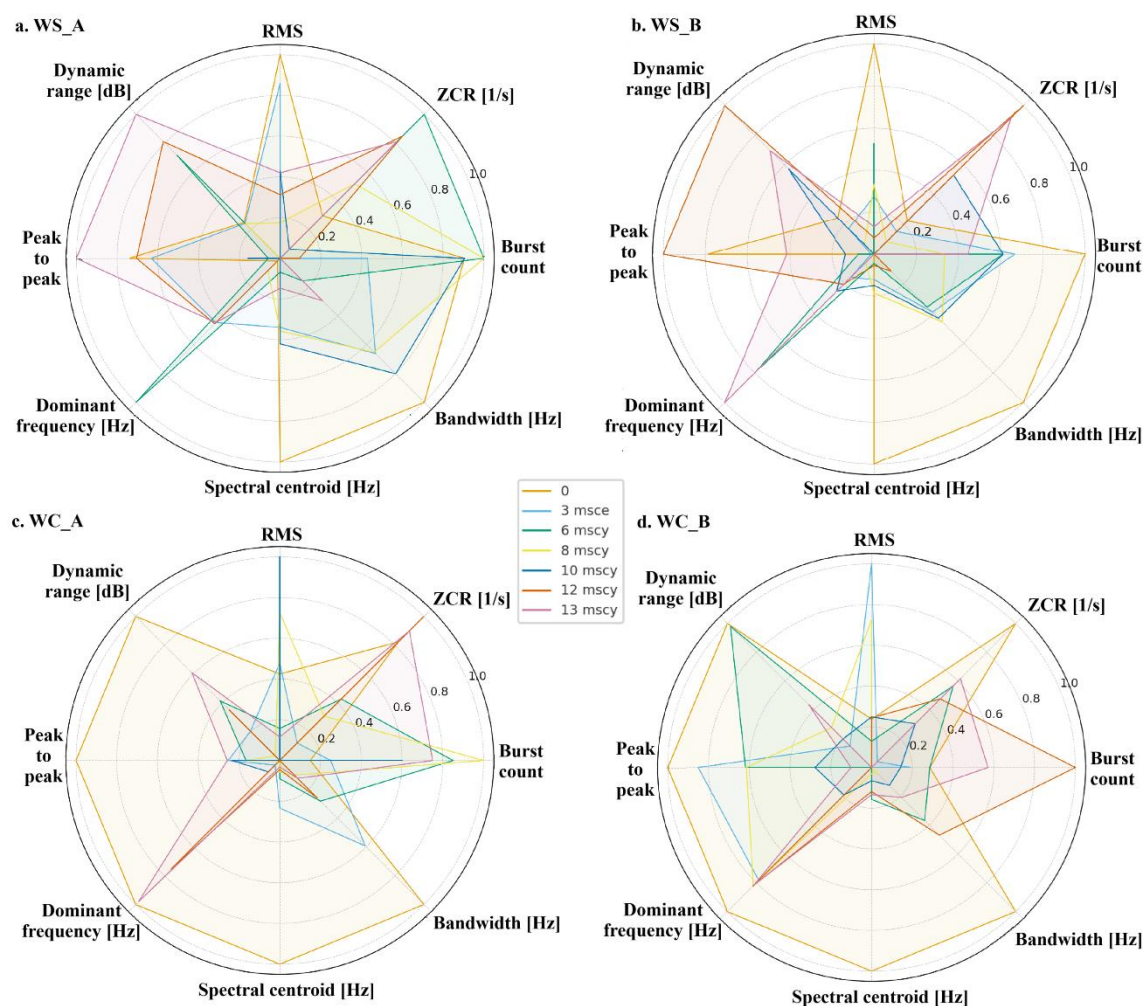


d.



Rysunek 4 Przykładowe sygnały akustyczne (amplituda) zarejestrowane podczas łamania wafli ze standardową recepturą (WS), opakowanych w folię metalizowaną (opakowanie B) jako funkcja czasu i częstotliwości dla próbek świeżych (a., b.) oraz przechowywanych 6 miesięcy (c., d.).

Bazując na analizie uzyskanych danych amplitudy w czasie, porównano różne parametry akustyczne, charakteryzujące chrupkość wafli WS i WC, zapakowanych w dwa rodzaje opakowań (A i B), które przedstawiono w postaci wykresów radarowych (rys. 5). Kompleksowa analiza umożliwiła porównanie profili chrupkości dla czterech próbek wafli.



Rysunek 5 Wykresy radarowe obrazujące zmiany parametrów charakteryzujących chrupkość wafli zapakowanych w dwa opakowania (A i B) w czasie 13 miesięcy przechowywania a. – wafle WS, opakowanie A; b. – wafle WS, opakowanie B; c. – wafle WC, opakowanie A; d. – wafle WC, opakowanie B. (WS – wafle standardowe; WC – wafle o obniżonej zawartości cukru; opakowanie A – folia polipropylenowa; opakowanie B – metalizowana folia polipropylenowa).

Parametry amplitudowe, opisujące energię i dynamikę sygnału dźwiękowego, obejmują:

- Peak to peak (wartość szczyt-szczyt) – odzwierciedla różnicę pomiędzy najwyższym, a najniższym poziomem amplitudy sygnału, co pozwala określić jego zakres dynamiczny.
- RMS (wartość skuteczna sygnału akustycznego) – jest miarą średniego poziomu energii sygnału, określa średnią energię dźwięku emitowanego podczas łamania próbki. Im wyższa wartość RMS i większa dynamika sygnału, tym większe prawdopodobieństwo, że produkt zostanie oceniony jako bardziej chrupki.

- Dynamic range (zakres dynamiczny) – wskazuje na różnicę między najgłośniejszymi a najcichszymi fragmentami dźwięku. Im większy ten zakres, tym bardziej „impulsowy” i wyrazisty może być odbierany dźwięk, co wpływa na postrzeganą chrupkość.

Na podstawie przedstawionego wykresu (rys. 5) można zaobserwować, że parametry amplitudowe (peak to peak oraz dynamic range) osiągały najwyższe wartości dla próbek świeżych wafli o zredukowanej zawartości cukru (WC), zarówno w opakowaniu A jak i B. Natomiast parametry częstotliwościowe to kategoria opisująca skład widmowy dźwięku, czyli rozkład energii w różnych pasmach częstotliwości, które obejmują:

- Dominant frequency (częstotliwość dominująca) – to częstotliwość o najwyższej amplitudzie w widmie sygnału.
- Spectral centroid (centroid widmowy) – to ważona średnia częstotliwości, która wskazuje na „ostrość” dźwięku. Wyższe wartości oznaczają obecność komponentów wysokoczęstotliwościowych, które są postrzegane jako bardziej „chrupkie”
- Bandwidth (szerokość pasma) – mierzy rozpiętość częstotliwości w sygnale. Szersze pasmo, podobnie jak wysoki centroid, koreluje z wyższą percepcją chrupkości.

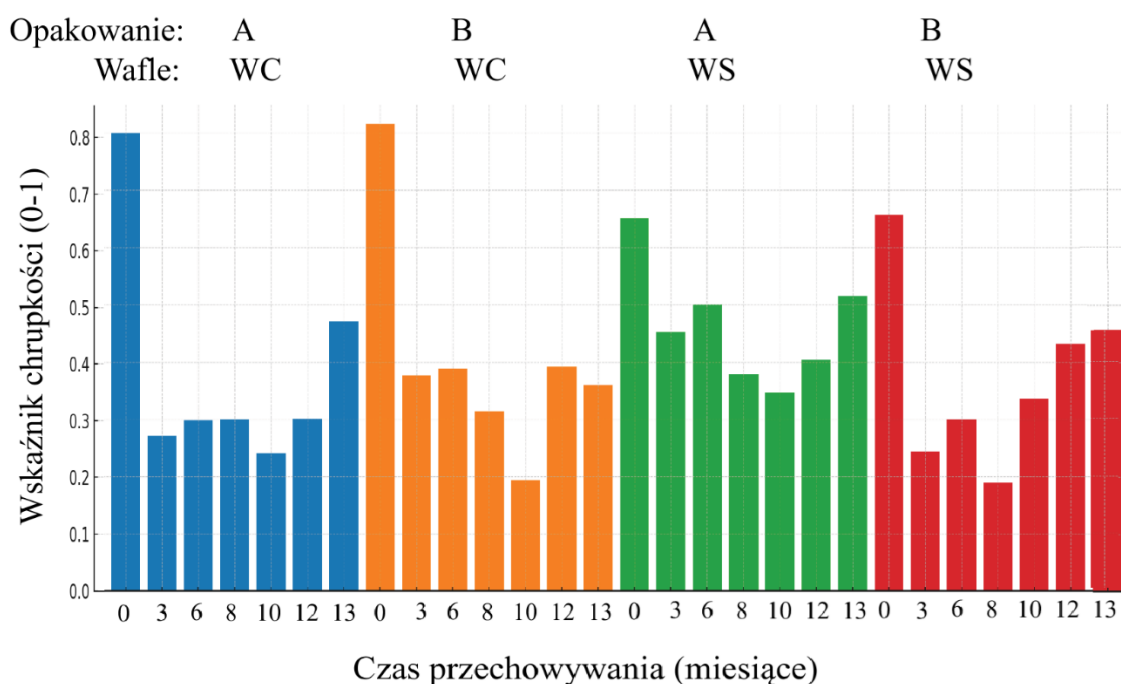
Dwa parametry częstotliwościowe (Bandwidth oraz Spectral centroid) wykazywały wartości maksymalne dla świeżej próbki wafli o standardowej recepturze (WS) dla obu opakowań (A i B). Ostatnią kategorię stanowią parametry impulsowe (czasowe), które odnoszą się do struktury czasowej sygnału i liczby gwałtownych zdarzeń akustycznych, takich jak:

- Burst count (liczba pęknięć) – określa liczbę krótkich, gwałtownych impulsów „chrupnięć”. Percepcja chrupkości pozytywnie koreluje z liczbą tych zdarzeń.
- ZCR (Zero Crossing Rate)- mierzy liczbę zmian znaku sygnału na sekundę. Wyższe wartości ZCR oznaczają bardziej „szorstką” i złożoną strukturę sygnału, co wzmacnia wrażenie chrupkości.

Szczególnie w przypadku wafli WS zaobserwowano wysokie wartości parametru Burst count, utrzymujące się w czasie przechowywania.

Na rysunku 6 przedstawiono zmiany w czasie przechowywania ogólnego wskaźnika chrupkości dla próbek wafli (WS i WC), zapakowanych w opakowania A i B. Wskaźnik chrupkości jest syntetycznym parametrem, który integruje poszczególne parametry akustyczne w jedną, znormalizowaną wartość. Pozwala ona na obiektywne i łatwe porównanie ogólnego poziomu chrupkości między próbkami. Można zaobserwować, że najwyższą wartość wskaźnika (około 0,8) odnotowano dla świeżych wafli WC (opakowanie A i B), natomiast świeże wafle WS charakteryzowały się niższą wartością tego wskaźnika tj. ok. 0,6. Wraz z

czasem przechowywania we wszystkich wafłach nastąpiło znaczne obniżenie wskaźnika chrupkości: po 3 miesiącach przechowywania do poziomu ok. 0,3-0,4 dla wszystkich wafli, z wyjątkiem wafli WS (opakowanie A), dla których wskaźnik utrzymywał się powyżej wartości 0,4 do 6 miesięcy przechowywania.



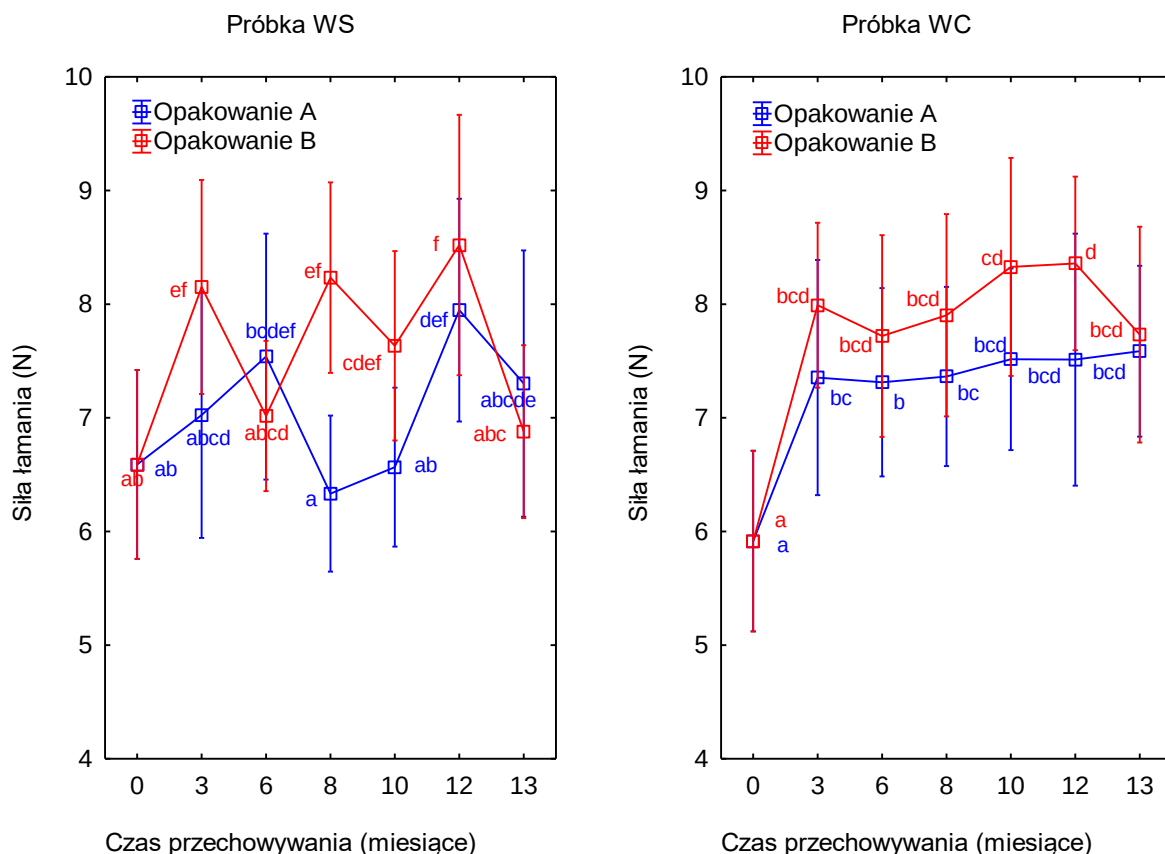
Rysunek 6 Zmiany wskaźnika chrupkości wafli WC i WS, zapakowanych w dwa opakowania (A i B) w czasie 13 miesięcy przechowywania. (WS – wafle standardowe; WC – wafle o obniżonej zawartości cukru; opakowanie A – folia polipropylenowa; opakowanie B – metalizowana folia polipropylenowa).

Z analizy akustycznej wynika, że wafle WS przechowywane w opakowaniu A były najbardziej chrupkie spośród badanych próbek przez cały okres przechowywania, o czym świadczy najwyższy średni wskaźnik chrupkości (0,464), obliczony na podstawie wszystkich pomiarów w tym czasie. Ten rezultat prawdopodobnie wiąże się z największą średnią liczbą pęknięć (Burst count) oraz wysokimi wartościami Peak to peak i Spectral centroid, czyli wyraźniejszym dźwiękiem, bogatym w wysokie tony, które są kluczowe dla odczucia chrupkości. Z kolei wafle WS w opakowaniu B były najmniej chrupkie, cechowały się najniższym wskaźnikiem chrupkości (0,372), co jest związane z najniższymi wartościami parametrów akustycznych takich jak Spectral centroid oraz Dominant frequency. Wskazuje to na bardziej stłumiony charakter dźwięku pęknięcia, co może przekładać się na osłabione subiektywne odczucie chrupkości. Wafle WC przechowywane w opakowaniu A wykazały

porównywalną, niską wartość wskaźnika chrupkości (0,383), zbliżoną do wartości odnotowanej dla tych wafli przechowywanych w drugim wariancie opakowania (0,406).

Chrupkość jest cechą złożoną, wynikającą z synergii kilku kluczowych czynników akustycznych, do których należą wysoka energia amplitud (mierzona przez RMS), duża liczba impulsów (Burst count) odpowiadająca za wrażenie wielokrotnych pęknięć, oraz bogate widmo wysokoczęstotliwościowe, wyrażone przez wysokie wartości Spectral centroid i Bandwidth. Dodatkowo, wysokie wartości współczynnika Zero crossing rate (ZCR) wskazują intensywniejsze odczucie chrupkości, co może świadczyć o bardziej złożonej strukturze sygnału akustycznego towarzyszącego łamaniu. We wszystkich czterech analizowanych próbkach wafli, produkty świeże (czas 0) osiągały najwyższe wskaźniki chrupkości. Spójność tego wyniku czyni ją jednoznacznym wzorcem pod względem pożądanych cech akustycznych, który może służyć jako punkt odniesienia w dalszych pracach rozwojowych. Na podstawie średnich parametrów chrupkości obliczonych z całego okresu przechowywania ustalono, że wafle WS w opakowaniu A charakteryzowały się najwyższym średnim poziomem chrupkości spośród wszystkich wafli. Wykazano, że zróżnicowane profile akustyczne mogą być skutecznie wykorzystywane do obiektywnej charakterystyki jakościowej produktów oraz ich różnicowania w odniesieniu do cech teksturalnych. Analiza akustyczna może stanowić zatem cenne, powtarzalne i precyzyjne narzędzie wspierające procesy kontroli jakości, optymalizacji receptur oraz rozwoju nowych produktów.

Chrupkość wafli przekładanych kremem związana jest także z ich odpornością mechaniczną na działanie siły łamiącej. Parametr ten można ilościowo ocenić na podstawie wartości siły łamania, utożsamianej z twardością struktury. W związku z tym przeprowadzono badania siły łamania wafli standardowych (WS) i o obniżonej zawartości cukru (WC) podczas 13 miesięcy przechowywania w dwóch rodzajach opakowań: folii polipropylenowej (A) oraz folii polipropylenowej metalizowanej (B). Graficzne przedstawienie wyników zamieszczono na rysunku 7.



Rysunek 7 Zmiany siły łamania podczas 13 miesięcy przechowywania: a. – dla waflów standardowych (WS), b. – dla waflów o obniżonej zawartości cukru (WC); w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana). Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-f) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).

Analiza danych z rysunku 7 ujawnia, że w przypadku próbek WS (rys. 7a) siła łamania podlegała istotnym wahaniom w czasie 13-miesięcznego okresu przechowywania, przy czym obserwowane wysokie odchylenia standardowe są konsekwencją naturalnej heterogeniczności wszystkich próbek. W przypadku opakowania A, siła łamania wahała się od 6,59 N (miesiąc 0) do 7,30 N (miesiąc 13). Najniższą wartość (6,33 N) odnotowano w 8. miesiącu. Z kolei w opakowaniu B, średnie wartości siły łamania były nieznacznie wyższe niż dla opakowania A, osiągając w 12. miesiącu maksimum na poziomie 8,52 N, co może sugerować minimalnie lepsze właściwości ochronne metalizowanej folii. W trakcie całego okresu przechowywania największe zmiany siły łamania, podobnie jak w przypadku akustycznej analizy chrupkości miały miejsce po 3 miesiącach. Na podstawie analizy ANOVA wykazano istotne różnice badanej wielkości pomiędzy kolejnymi punktami czasowymi, natomiast różnica pomiędzy

pierwszym a ostatnim pomiarem dla próbki WS w obu wariantach opakowań nie była statystycznie istotna ($p \leq 0,05$).

Dla próbek o obniżonej zawartości cukru WC (rys. 7b), zaobserwowano mniejsze wahania siły łamania w czasie w porównaniu do wafli standardowych (WS). W przypadku opakowania A siła łamania wzrosła w ciągu pierwszych 3 miesięcy od wartości 5,92 N do 7,35 N i utrzymywała się na względnie stałym poziomie do końca okresu przechowywania. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) wystąpiły wyłącznie między wartością zmierzoną na początku, a wynikami uzyskanymi w późniejszych miesiącach. Dla tej próbki w opakowaniu B, wartość siły łamania, w 0 i 13 miesiącu, była podobna do tej uzyskanej dla opakowania A, a od 3. do 12. miesiąca wartości te były minimalnie wyższe. Najwyższe wartości zanotowano w czasie 10-12 miesięcy (8,3 N).

W dalszej części interpretacji wyników zwrócono uwagę na zależności pomiędzy aktywnością wody a teksturą, które, jak wskazują również dane literaturowe, odgrywają istotną rolę w kształtowaniu jakości i trwałości produktów podczas przechowywania. Badając chrupkość skórki pieczywa, van Nieuwenhuijzen i in. (2008) stwierdzili, że zarówno zawartość wody, jak i aktywność wody mają istotny wpływ na percepcję chrupkości, wyrażaną m.in. liczbą pików akustycznych rejestrowanych podczas łamania chrupkich produktów piekarniczych. (van Nieuwenhuijzen i in., 2008). Z kolei badania Tjahjono (2025) potwierdziły odczuwalne zmiany tekstury i smaku już po 3. miesiącach przechowywania w standardowych opakowaniach z laminatu VMCPP/OPP (ang. Vacuum Metallized Cast Polypropylene/Oriented Polypropylene – polipropylen odlewany metalizowany próżniowo/polipropylen orientowany) (Tjahjono, 2025).

W eksperymencie przeprowadzonym w ramach tej pracy zauważono, że na przestrzeni 13 miesięcy trwania badań standardowe próbki wafli z kremem (WS) wykazywały większe wahania siły łamania oraz a_w w porównaniu do próbek o obniżonej zawartości cukru (WC). Zarówno aktywność wody (a_w), jak i tekstura ulegały zmianom w czasie przechowywania, przy czym obserwowane różnice były zależne od składu recepturowego oraz rodzaju zastosowanego opakowania ($p \leq 0,05$). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że dla obu wariantów wafli opakowanie typu B (metalizowana folia polipropylenowa) zapewniało lepszą ochronę przed migracją wody oraz ograniczało zmiany tekstury niż opakowanie A. Sugeruje to, że oprócz właściwości bariery wilgociowej, na kontrolę aktywności wody wpływ mogą mieć również inne czynniki, takie jak właściwości fizykochemiczne opakowania czy interakcje między produktem a materiałem opakowaniowym. Giannakourou (2025) w swoich badaniach

odnotował, że aktywność wody produktu może być modyfikowana przez interakcje z materiałem opakowaniowym (Giannakourou i in., 2025). Z perspektywy środowiskowej warto zaznaczyć, że opakowania wielomateriałowe, czyli łączące różne rodzaje materiałów (np. polimery i folie metaliczne), pomimo korzystnych właściwości barierowych, mogą stwarzać trudności w procesach utylizacji, szczególnie w kontekście recyklingu mechanicznego, ze względu na ograniczone możliwości rozdzielania komponentów w standardowych systemach przetwórczych.

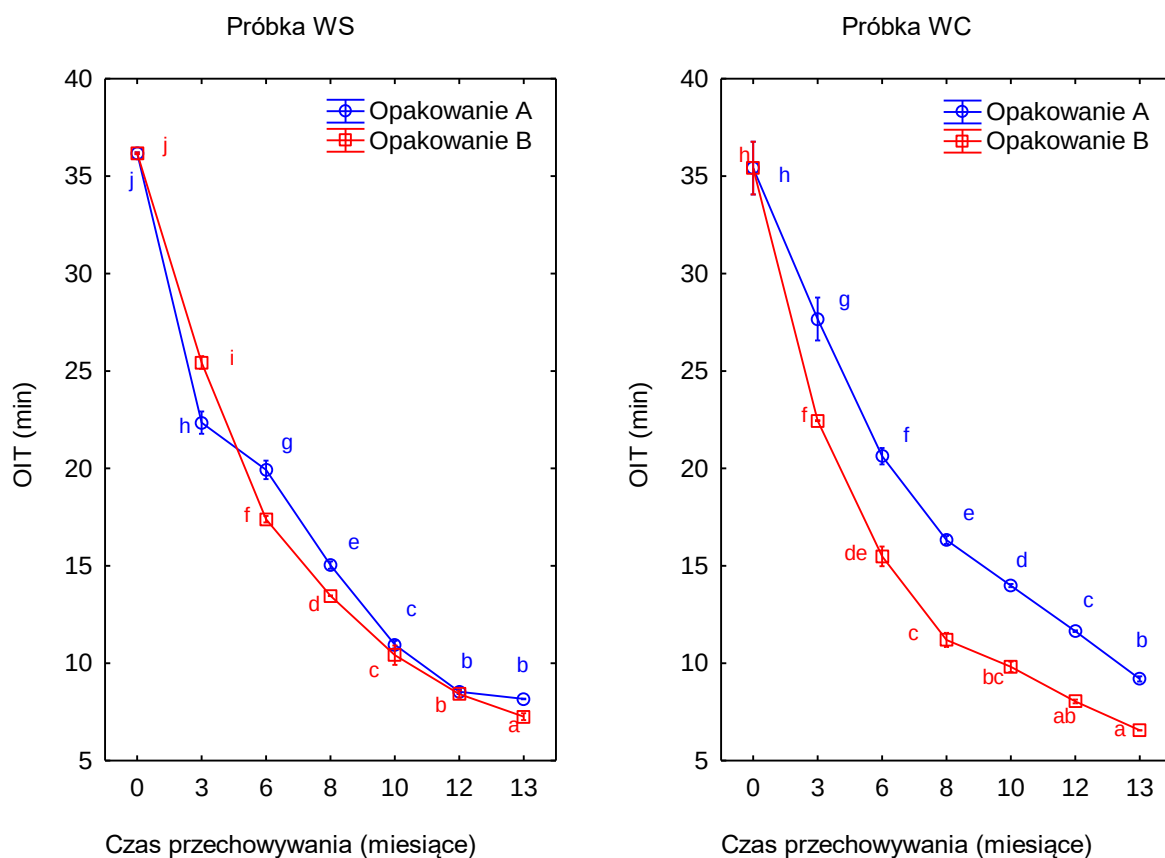
Do oceny wpływu opakowania na stabilność oksydacyjną frakcji lipidowej wyekstrahowanej z kremów stosowanych w produkcji wafli oznaczono następujące parametry: czas indukcji utleniania (OIT), zawartość sprzężonych dienów (CDs) oraz liczbę nadtlenną (PV). Dodatkowo określono zdolność wychwytywania wolnych rodników przy użyciu metody DPPH.

Stabilność termooksydacyjną wyznaczano na podstawie wartości OIT, uzyskanej z izotermicznego przebiegu utleniania rejestrowanego techniką różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) w temperaturze 160 °C. Wartość OIT wskazuje moment rozpoczęcia reakcji utleniania i jest wskaźnikiem procesów oksydacyjnych zachodzących w tłuszczach podczas przechowywania. Na rysunku 8 przedstawiono zmiany czasu indukcji utleniania (OIT) frakcji lipidowej wyekstrahowanej z wafli standardowych (WS) i o obniżonej zawartości cukru (WC) podczas 13 miesięcy przechowywania w dwóch rodzajach opakowań.

W oparciu o dane z wykresu zależności czasu indukcji utleniania (OIT) frakcji lipidowej wyekstrahowanej z badanych próbek od czasu przechowywania, stwierdzono spadek wartości OIT wraz z upływem czasu, co jest zgodne z typowym przebiegiem procesów utleniania tłuszczów podczas długoterminowego składowania (Frankel, 1980). Zaobserwowano również wyraźny wpływ typu opakowania (A – folia polipropylenowa; B – metalizowana folia polipropylenowa) na przebieg zmian OIT w czasie, zarówno w przypadku próbki WS jak i WC. Dla obu próbek różnice wartości OIT były statystycznie istotnie wyższe w przypadku opakowania A niż B praktycznie w całym okresie przechowywania ($p \leq 0,05$). Zatem folia PP (opakowanie A) lepiej chroniła przed utlenianiem lipidów niż folia PP-met (opakowanie B).

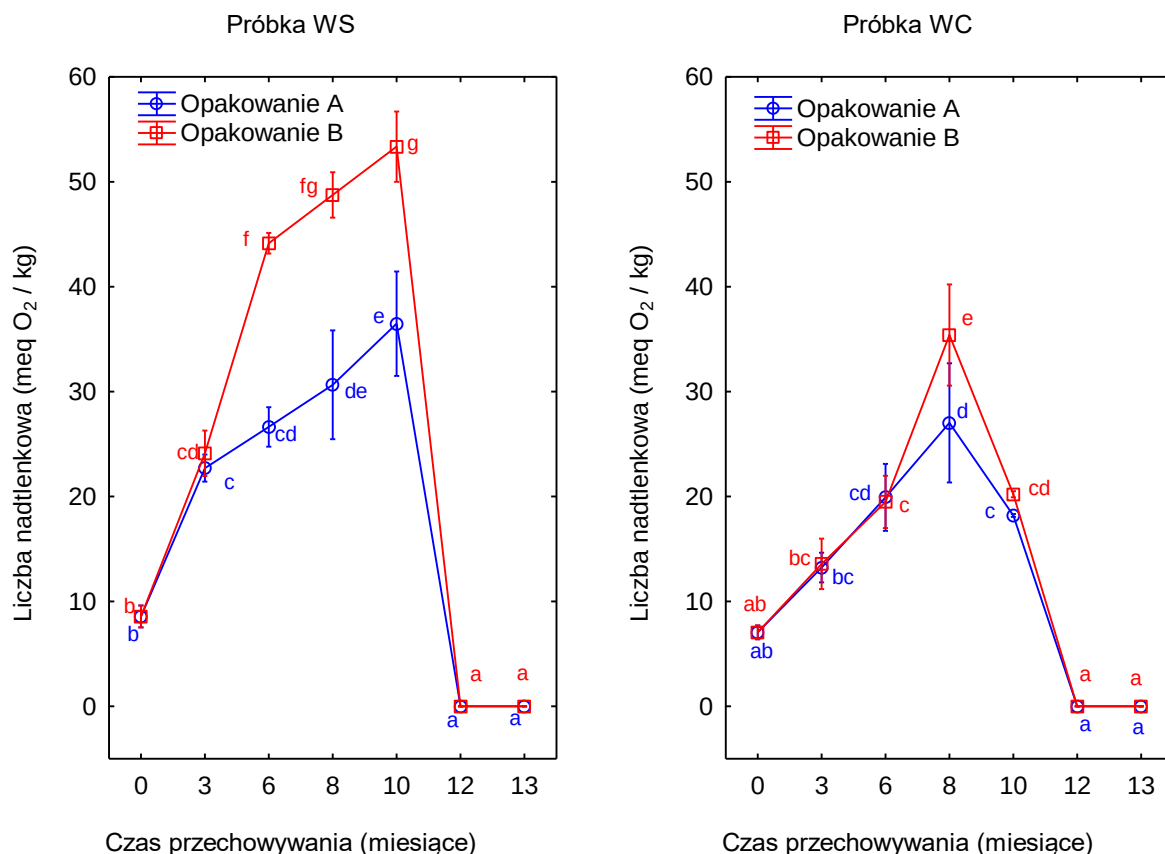
Dla standardowej próbki (WS) początkowa wartość OIT wynosząca 36,2 min spadła w ciągu 13 miesięcy do poziomu 8,2 min i 7,3 min, odpowiednio w wariancie opakowań A i B, podczas gdy dla próbki o obniżonej zawartości cukru zanotowano zmianę z 35,4 min do 9,2 min (opakowanie A) oraz 6,6 min (opakowanie B). Różnice wartości OIT dla próbek WS i WC mogą wynikać z różnic w składzie produktów. Zjawisko to zostało wcześniej zaobserwowane

w badaniach krakersów, gdzie podkreślono, że reformulacja produktu wpływa na tempo utleniania lipidów (Gumus i Decker, 2021).



Rysunek 8 Wyniki czasu indukcji utleniania (OIT) frakcji lipidowej wyekstrahowanej: a. – z wafli standardowych (WS), b. – z wafli o obniżonej zawartości cukru (WC); podczas 13 miesięcy przechowywania w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana). Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-j) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).

Podczas przetwarzania i długotrwałego przechowywania żywności zawierającej tłuszcz zachodzą złożone procesy utleniania lipidów, prowadzące do powstawania różnorodnych związków chemicznych, które wpływają na końcową jakość produktu. Dlatego, w ramach pełniejszej charakterystyki procesów oksydacyjnych, kolejnym etapem analizy było oznaczenie liczby nadtlenkowej, odzwierciedlającej zawartość pierwotnych produktów utleniania. Na wykresie (rys. 9) przedstawiono zmiany wartości liczby nadtlenkowej (PV) w standardowych wafłach oraz wafłach o obniżonej zawartości cukru w trakcie 13-miesięcznego okresu przechowywania w opakowaniach A i B.



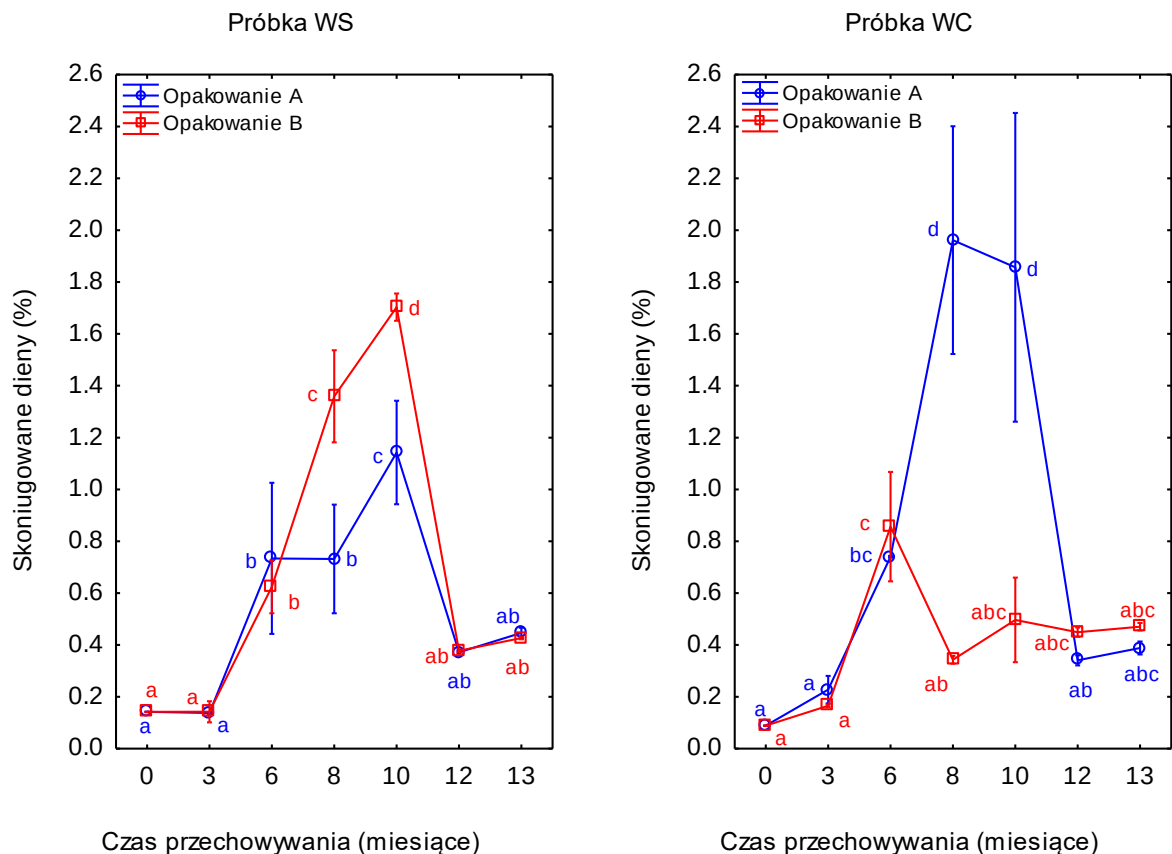
Rysunek 9 Zmiany liczby nadtlenkowej próbek wafli: standardowych (WS) i o obniżonej zawartości cukru (WC) w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana) podczas 13 miesięcy przechowywania. Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-g) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).

Na podstawie analizy ANOVA zaobserwowano istotne różnice zarówno zależności PV od składu produktu, czasu przechowywania, jak i rodzaju zastosowanego opakowania ($p \leq 0,05$). W obu badanych próbkach, niezależnie od zastosowanego materiału opakowaniowego, zaobserwowano podobny przebieg zmian: początkowo dynamiczny wzrost wartości liczby nadtlenkowej aż do osiągnięcia maksimum w 10. miesiącu dla próbki WS i 8. dla próbki WC, po czym szybki spadek do wartości równej 0. W przypadku wafli standardowych (WS) najwyższe wartości PV, wyrażone w meq O₂ / kg, wynosiły 36,5 dla opakowania A oraz 53,4 dla opakowania B. W porównaniu z wartością początkową wynoszącą 8,6 meq O₂ / kg, oznacza to wzrost odpowiednio 4,2- oraz 6,2-krotny. Natomiast dla wafli o obniżonej zawartości cukru (WC) maksymalna wartość PV wynosiła 27,0 dla opakowania A oraz 35,4 dla opakowania B. Odnosząc to do wartości początkowej równej 7,0 meq O₂ / kg, zanotowano odpowiednio 3,9- oraz 5,1-krotny wzrost. Niezależnie od składu produktu, wafle zapakowane w folię

polipropylenową (opakowanie A) wykazywały niższe maksymalne wartości PV, co wskazuje na mniejszą intensywność procesów utleniania lipidów w porównaniu do folii metalizowanej (opakowania B).

Wyniki badań Sharma i Riar dotyczące wpływu okresu przechowywania oraz rodzaju materiału opakowaniowego na cechy jakościowe ciastek z mąki z mieszanki surowego i kiełkowanego prosa potwierdzają obserwowany w niniejszej pracy trend wzrostu wartości liczby nadtlencowej (PV) wraz z upływem czasu przechowywania. W badaniach tych wyroby zapakowane w barierową folię laminowaną składającą się z metalizowanej folii poliestrowej (PET-met) połączonej z polietylenem (PE) (MET PPE) wykazywały wzrost PV z wartości 2,66 meq O₂ / kg na początku przechowywania do 4,23 meq O₂ / kg po 160 dniach, natomiast produkty zapakowane w polietylen o niskiej gęstości (LDPE) osiągnęły wyższy poziom PV – 5,02 meq O₂ / kg po tym samym czasie (Sharma i Riar, 2020). W kontekście uzyskanych wyników zaobserwowano nieoczekiwaną odwrotną zależność, tzn. niższe wartości PV dla wafli przechowywanych w opakowaniu niemetalizowanym. Jest to jednak niezgodne z przewidywaniami wynikającymi z właściwości barierowych materiałów opakowaniowych, gdyż opakowanie metalizowane (B) charakteryzuje się niższą przepuszczalnością tlenu niż opakowanie z folii polipropylenowej (A), co powinno skutkować lepszą ochroną przed utlenianiem. Aby zweryfikować otrzymane wyniki PV w zależności od rodzaju zastosowanej folii opakowaniowej równolegle prowadzono oznaczenie zawartości skoniugowanych dienów (CDs), które, podobnie jak liczba nadtlencowa, jest wskaźnikiem pierwotnych produktów utleniania lipidów. Na rysunku 10 pokazano, jak zmieniała się zawartość skoniugowanych dienów (CDs) w dwóch rodzajach wafli (standardowych i z obniżoną zawartością cukru), przechowywanych przez 13 miesięcy w dwóch rodzajach folii: polipropylenowej (A) oraz polipropylenowej metalizowanej (B).

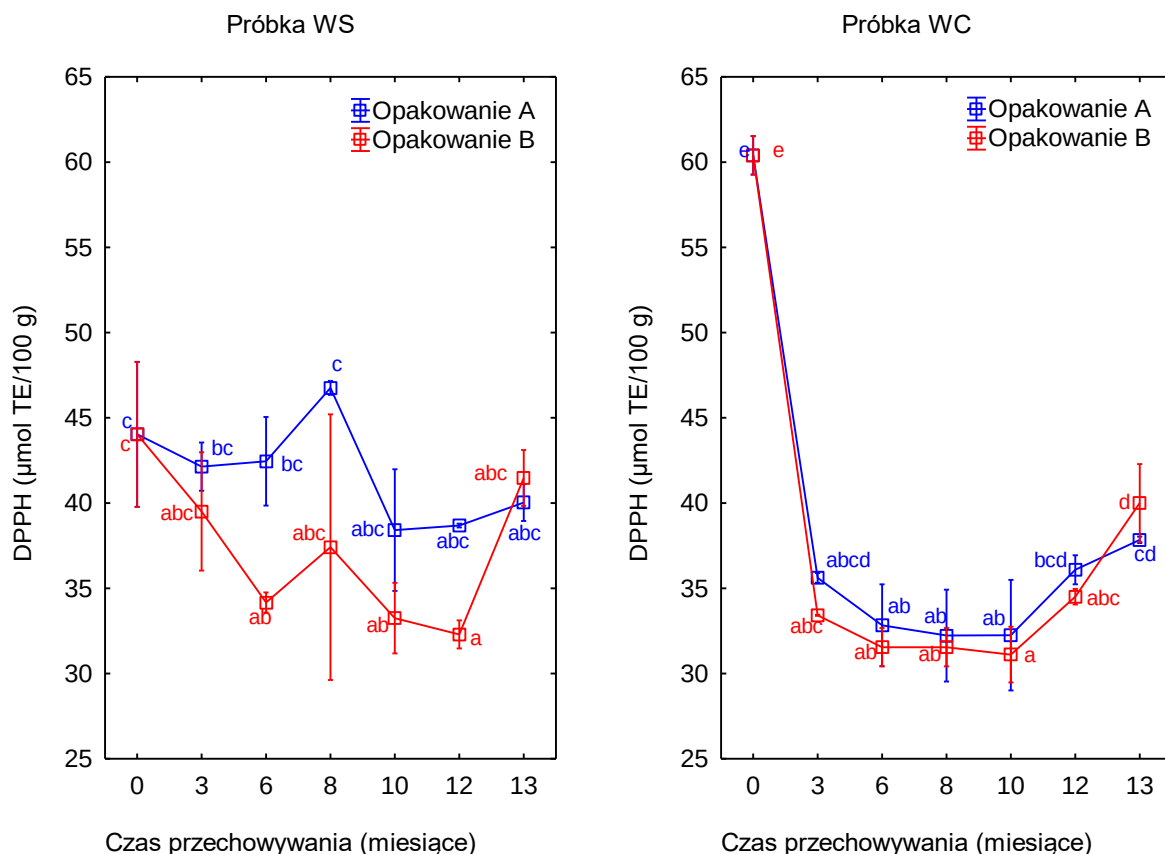
W obu próbkach obserwowano wzrost poziomu CDs wraz z upływem czasu przechowywania i starzeniem produktów. Początkowo odnotowano wzrost CDs do osiągnięcia wartości maksymalnej. Najwyższa wartość dla próbki WS w obu opakowaniach przypada na 10. miesiąc przechowywania (1,14% i 1,70% dla opakowania A i B, odpowiednio). Dla próbki WC różni się w zależności od opakowania – dla folii A zanotowano w 8. miesiącu (1,96%), natomiast dla B – w 6. miesiącu (0,86%). Następnie zawartość dienów ulegała obniżeniu, co wskazuje na dalszy postęp procesu utleniania produktów i tworzenie się innych, wtórnych związków.



Rysunek 10 Zawartość skoniugowanych dienów w próbkach wafli: standardowych (WS) i o obniżonej zawartości cukru (WC) w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana) w czasie 13 miesięcy przechowywania. Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-d) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).

Analiza zmian zawartości CDs w próbkach WS i WC w dwóch opakowaniach (A, B) potwierdziła, że przebieg procesów utleniania jest zależny zarówno od rodzaju opakowania, jak i składu produktu. Metalizowane opakowanie (B) efektywniej ograniczało powstawanie skoniugowanych dienów jedynie w przypadku wafli o obniżonej zawartości cukru, co sugeruje również istotny wpływ modyfikacji składu na podatność lipidów na utlenianie.

Jednocześnie przeprowadzono oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH, aby jeszcze lepiej wyjaśnić zmiany parametrów oksydacyjnych. Szczegółowe wyniki przedstawiono na rysunku 11.



Rysunek 11 Aktywność przeciwutleniająca próbek: standardowych wafli (WS) i wafli o obniżonej zawartości cukru (WC) w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana), mierzona jako zdolność do usuwania rodników DPPH^{*}, podczas 13 miesięcy przechowywania. Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-e) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).

W początkowym okresie przechowywania (0-3 miesiące) wartości DPPH dla próbki WS w obu rodzajach opakowań oscylowały w zakresie 39,5-44,0 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$. Następnie, w przypadku opakowania A, aktywność przeciwutleniająca istotnie wzrosła, osiągając w 8. miesiącu przechowywania wartość maksymalną (46,8 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$), po czym odnotowano jej wyraźny spadek do poziomu 38,4 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ w kolejnym punkcie pomiarowym. Od 10. do 13. miesiąca wartości DPPH pozostawały stabilne i nie wykazywały statystycznie istotnych różnic ($p \leq 0,05$). Z kolei w opakowaniu B zaobserwowano wyraźny spadek aktywności przeciwutleniającej od początku przechowywania do 6. miesiąca, chociaż ogólnie trend spadkowy utrzymywał się do 12. miesiąca. W ostatnim punkcie pomiarowym zaobserwowano ponowny wzrost wartości DPPH. Dla próbki WS zdolność wychwytywania DPPH^{*} przyjmowała zbliżone wartości dla obu wariantów opakowań, szczególnie w początkowej oraz końcowej fazie przechowywania.

Zdecydowanie wyższe różnice wartości parametru DPPH między pomiarami zaobserwowano dla próbki WC (rys. 11b). Początkowa aktywność przeciwutleniająca DPPH w obu opakowaniach wynosiła 60,4 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$, jednak już po 3 miesiącach uległa znacznemu obniżeniu, osiągając poziom 33,4-35,6 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$. W kolejnych miesiącach wartości DPPH ustabilizowały się, utrzymując plateau przez kolejne 7 miesięcy przechowywania.

Analiza ANOVA nie wykazała istotnych różnic pomiędzy rodzajami opakowań w zakresie aktywności przeciwutleniającej w próbce WS i WC praktycznie w całym okresie przechowywania ($p \leq 0,05$). Zaobserwowany w późniejszym okresie przechowywania wzrost aktywności przeciwutleniającej dla obu próbek w każdym wariancie opakowania może być, jak wskazują Salazar-Orbea i in. (2023), wynikiem wtórnych przemian lub powstawania nowych związków o właściwościach antyoksydacyjnych w wyniku degradacji pierwotnych składników (Salazar-Orbea i in., 2023).

Do analizy relacji pomiędzy zmiennymi wykorzystano analizę korelacji, za pomocą której wykazano istotne liniowe zależności pomiędzy wszystkimi badanymi parametrami: zawartością sprzężonych dienów (CDs), liczbą nadtlenną (PV), aktywnością przeciwutleniającą (DPPH) oraz czasem indukcji utleniania (OIT160). Najsilniejszą dodatnią korelację zaobserwowano pomiędzy zawartością sprzężonych dienów a liczbą nadtlenną ($r = 0,71$). Zależność ta wskazuje, że wraz ze wzrostem zawartości CDs, która jest markerem początkowych etapów utleniania lipidów, następuje zwiększenie poziomu nadtlennów – głównych produktów pierwotnego utleniania. Potwierdza to, że oba parametry są ze sobą ściśle powiązane i mogą być stosowane jako wskaźniki wczesnych zmian oksydacyjnych w produktach tłuszczowych. Z kolei między aktywnością przeciwutleniającą (DPPH) a czasem indukcji utleniania (OIT160) odnotowano dodatnią korelację o ($r = 0,44$), co wskazuje, że większa zdolność wychwytywania wolnych rodników może sprzyjać zwiększeniu stabilności oksydacyjnej tłuszczu, wyrażonej wydłużeniem czasu indukcji utleniania. Warto zwrócić uwagę również na istotne ujemne współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy: PV a OIT160 ($r = -0,63$), PV a DPPH ($r = -0,39$), CDs a DPPH ($r = -0,32$), CDs a OIT160 ($r = -0,27$). Zależności te wskazują, że wzrost intensywności procesów utleniania lipidów (wyrażony wyższymi wartościami PV i CDs) wiąże się z obniżeniem zarówno aktywności przeciwutleniającej, jak i stabilności oksydacyjnej badanej próbki. W praktyce przekłada się to na wyższy poziom utlenienia tłuszczu, któremu towarzyszy skrócenie czasu indukcji utleniania oraz zmniejszenie zdolności do wychwytywania wolnych rodników.

W badaniu przeprowadzonym przez Balestrę i in. analizie poddano dwa innowacyjne materiały opakowaniowe a wyniki porównano z tradycyjnym opakowaniem wykonanym z orientowanego polipropylenu (OPP). W trakcie przyspieszonego przechowywania (w warunkach 35 °C i 50% wilgotności względnej przez 105 dni) monitorowano zarówno zmiany fizyczne, takie jak wilgotność, aktywność wody oraz twardość i chrupkość, jak i chemiczne, obejmujące wartość nadtlenkową, zawartość sprzężonych dienów i trienów, a także powstawanie lotnych produktów utleniania lipidów, takich jak heksanal i nonanal. W oparciu o uzyskane wyniki wykazano, że zastosowany rodzaj materiału opakowaniowego nie wpływał istotnie na właściwości tekstury ciastek. Natomiast podczas przechowywania odnotowano wyraźne różnice w rozwoju związków powstających w wyniku utleniania lipidów oraz w zawartości wilgoci i aktywności wody, w zależności od zastosowanego opakowania (Balestra i in., 2019).

Podsumowując, wyniki niniejszych badań wafli przekładanych kremem potwierdzają, że zastosowany rodzaj materiału opakowaniowego wykazał istotny wpływ na stabilność oksydacyjną frakcji lipidowej w analizowanych próbkach wafli przechowywanych przez 13 miesięcy ($p \leq 0,05$). Choć folia metalizowana (opakowanie B; przepuszczalność tlenu $< 1270 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \times 24\text{h}$) charakteryzowała się niższą deklarowaną przepuszczalnością tlenu, więc teoretycznie powinna zapewniać lepszą barierę dla światła i tlenu (Baele i in., 2021; Sharma i Riar, 2020; Williamson, 2017), uzyskane wyniki wskazują, że w tym przypadku folia polipropylenowa (opakowanie A; przepuszczalność tlenu $< 2800 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \times 24\text{h}$) skuteczniej ograniczało procesy utleniania lipidów. Potwierdzają to wyższe wartości czasu indukcji utleniania (OIT160), niższe maksymalne wartości liczby nadtlenkowej (PV) oraz wyższa aktywność przeciwutleniająca DPPH w próbkach przechowywanych w opakowaniu A.

Neelam i in. (2019) wykazali, że jeżeli metalizacja jest wykonana w sposób niejednorodny, cienka warstwa może mieć niewystarczające krycie lub zawierać mikropęknięcia, co prowadzi do nieprzewidywanych przepuszczalności (Neelam i in., 2019). Paradoksalnie niższa skuteczność ochronna barierowego opakowania B mogła charakteryzować się defektami strukturalnymi, takimi jak niejednorodne lub niepełne pokrycie warstwą metalu bądź mikrouszkodzenia powstałe na skutek naprężeń mechanicznych (np. zginania, rozciągania czy zginięcia). Tego rodzaju nieciągłości mogły prowadzić do zwiększonej przepuszczalności tlenu, co sprzyjało procesom utleniania – pomimo teoretycznie wyższej barierowości przypisywanej metalizowanym foliom (Baele i in., 2021; Sharma i Riar, 2020; Williamson, 2017). Jak wskazują Hu i in. (2020), nawet przy ogólnie dobrej barierowości, niektóre folie

mogą wykazywać selektywną przepuszczalność określonych molekuł (np. nadtlenu), zależnie m.in. od powierzchniowej energii i struktury. Powierzchnie PP mogą reagować inaczej z tlenem lub produktami utleniania, a czasem powierzchnia polipropylenowa jest bardziej inercyjna niż cienka metalizacja (Hu i in., 2020). Interakcje tlen-powierzchnia PP (folia polipropylenowa, czyli w tym badaniu opakowanie A) mogły zahamować inicjację utleniania bardziej skutecznie niż metalizowana powierzchnia, mimo teoretycznie gorszej bariery.

Na podstawie powyższych analiz należy przyjąć hipotezę **H4**, ponieważ wykazano, że rodzaj opakowania ma wpływ na utrzymanie jakości produktu i zależy nie tylko od jego parametrów, ale także od receptury produktu i jego wrażliwości na procesy oksydacyjne.

8. Podsumowanie i wnioski

Głównym celem przeprowadzonych badań, wpisujących się w nurt żywności prozdrowotnej, było opracowanie innowacyjnych receptur wafli z kremem oraz ocena ich trwałości przechowalniczej, mająca na celu potwierdzenie bezpieczeństwa i jakości nowych produktów. Cel ten został zrealizowany poprzez opracowanie nowych receptur wafli z kremem o obniżonej zawartości cukru oraz tłuszczu, a także wariantu kremu o obniżonej zawartości tłuszczu wzbogaconego w ekstrakt z owoców cytrusowych o właściwościach przeciwutleniających. W recepturach o zredukowanej zawartości tłuszczu całkowicie wyeliminowano olej palmowy, co dodatkowo podkreśla prozdrowotny charakter produktów.

Najistotniejsze wnioski na podstawie uzyskanych wyników są następujące:

- 1) Dodatek komercyjnego ekstraktu z owoców cytrusowych do listków waflowych istotnie spowolnił tempo zmian oksydacyjnych, postępujących w czasie 13 miesięcy przechowywania. Największą skuteczność ochronną ekstraktu odnotowano w pierwszym półroczu, natomiast po 10 miesiącach przechowywania nie obserwowano już jego istotnego wpływu.
- 2) Dla wszystkich badanych kremów oraz całych wafli, niezależnie od receptury, odnotowano pogorszenie jakości w trakcie 13 miesięcy przechowywania tj. obniżenie stabilności oksydacyjnej, wzrost aktywności wody i twardości, spadek chrupkości, zmiany barwy oraz pogorszenie profilu topnienia i indeksu fazy stałej.
- 3) Kremy o obniżonej zawartości cukru (WC) wykazywały zbliżony przebieg zmian oksydacyjnych w czasie przechowywania w odniesieniu do próbki kontrolnej (WS) oraz największe różnice w barwie (ΔE), wynikające ze wzrostu wartości L^* , związanego z rozjaśnianiem barwy w pierwszych trzech miesiącach.
- 4) Kremy zawierające zmodyfikowaną fazę tłuszczową (WT, WTE), charakteryzowały się wyższą stabilnością oksydacyjną w porównaniu do próbki kontrolnej (WS). Dodatek komercyjnego ekstraktu z owoców cytrusowych zwiększył ten efekt, wpływając na spowolnienie tempa obniżania się wartości OIT, powstawania sprzężonych dienów oraz brak oznak zjełczenia po roku przechowywania w ocenie sensorycznej.
- 5) W waflach oraz kremach z dodatkiem ekstraktu (WTE) zaobserwowano stopniowe ciemnienie barwy w trakcie przechowywania, wyrażające się zmniejszaniem wartości L^* oraz indeksu bieli (WI).
- 6) Wafle z obniżoną zawartością cukru wykazywały istotnie wyższe wartości aktywności wody niż pozostałe próbki, co potwierdza rolę cukru w obniżaniu aktywności wody.

- 7) Wafle z kremem zawierającym zmodyfikowaną fazę tłuszczową na bazie tłuszczu shea i wysokooleinowego oleju rzepakowego (WT, WTE) charakteryzowały się mniejszą twardością niż wafle z kremem na bazie oleju palmowego (WS), natomiast zredukowanie zawartości cukru w kremie (WC) nie wpłynęło na wartości siły łamania w stosunku do próbki kontrolnej.
- 8) Świeże wafle charakteryzowały się najwyższym wskaźnikiem chrupkości ocenionym metodą akustyczną. Wartość tego wskaźnika istotnie obniżyła się we wszystkich próbkach już po 3 miesiącach przechowywania.
- 9) Wbrew oczekiwaniom wafle z kremem przechowywane przez 13 miesięcy w folii polipropylenowej charakteryzowały się wyższą stabilnością oksydacyjną niż zapakowane w folię z metalizowanego polipropylenu, która z kolei lepiej chroniła wafle przed zmianami aktywności wody.

9. Spis literatury cytowanej w autoreferacie

- Ahlqvist, M. U. A., & Taylor, L. S. (2002). Water Diffusion in Hydrated Crystalline and Amorphous Sugars Monitored Using H/D Exchange. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(3), 690–698. <https://doi.org/10.1002/jps.10068>
- Alamprese, C., Cappa, C., Ratti, S., Limbo, S., Signorelli, M., Fessas, D., & Lucisano, M. (2017). Shelf life extension of whole-wheat breadsticks: Formulation and packaging strategies. *Food Chemistry*, 230, 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.092>
- AOCS. (2003). Spectrophotometric Determination of Conjugated Dienoic Acid. In *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists'* (pp. 1–2). AOCS Press.
- AOCS. (2005). Official Method Ce 1 H-05 Determination of Cis-, Trans-, Saturated, Monounsaturated, and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC. off. Methods Recomm. In *Pract. Am. Oil Chem. Soc.*
- ASTM. (2019). *ASTM D3895-19 - Test Method for Oxidative-Induction Time of Polyolefins by Differential Scanning Calorimetry.*
- Baele, M., Vermeulen, A., Adons, D., Peeters, R., Vandemoortele, A., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., & Ragaert, P. (2021). Selecting packaging material for dry food products by trade-off of sustainability and performance: A case study on cookies and milk powder. *Packaging Technology and Science*, 34(5), 303–318. <https://doi.org/10.1002/pts.2561>
- Balestra, F., Verardo, V., Tappi, S., Caboni, M. F., Dalla Rosa, M., & Romani, S. (2019). Chemical and physical changes during storage of differently packed biscuits formulated with sunflower oil. *Journal of Food Science and Technology*, 56(10), 4714–4721. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03918-z>
- Barriuso, B., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2013). A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: A challenging task. *European Food Research and Technology*, 236(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1866-9>
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158(1), 196–214. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.024>
- Beuchat, L. R., & Mann, D. A. (2015). Survival of Salmonella in cookie and cracker sandwiches containing inoculated, low-water activity fillings. *Journal of Food Protection*, 78(10), 1828–1834. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-142>

- Bhupathiraju, S. N., & Hu, F. B. (2016). Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications. *Circulation Research*, 118(11), 1723–1735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306825>
- Bialek, M., Rutkowska, J., Bialek, A., & Adamska, A. (2016). Oxidative Stability of Lipid Fraction of Cookies Enriched with Chokeberry Polyphenols Extract. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(2), 77–84. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0027>
- Briones, V., & Aguilera, J. M. (2005). Image analysis of changes in surface color of chocolate. *Food Research International*, 38(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.09.002>
- Cargill. (2022). *The evolving world of “clean label.”*
- Cegiełka, A. (2020). “CLEAN LABEL” AS ONE OF THE LEADING TRENDS IN THE MEAT INDUSTRY IN THE WORLD AND IN POLAND – A REVIEW. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny / Annals of the National Institute of Hygiene*, 71(1), 43–55. <https://doi.org/10.32394/rpzh.2020.0098>
- Cevoli, C., Evangelisti, A., Gradari, P., & Fabbri, A. (2023). Storage of wafer cookies: Assessment by destructive techniques, and non-destructive spectral detection methods. *Journal of Food Engineering*, 336. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2022.111209>
- Chang, Q., Zheng, B., Zhang, Y., & Zeng, H. (2021). A comprehensive review of the factors influencing the formation of retrograded starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.050>
- Costa, M. (2024, December 16). *New data shows 1 in 5 consumers eating healthy ‘all the time.’* Food Business News.
- Daglioglu, O., Tasan, M., Gecgel, U., & Daglioglu, F. (2004). Changes in Oxidative Stability of Selected Bakery Products during Shelf Life. *Food Sci. Technol. Res*, 10(4), 464–468.
- Dana, H., & Sonia, A. (2024). Substituting Sugar in Pastry and Bakery Products with Functional Ingredients. *Applied Sciences*, 14(18). <https://doi.org/10.3390/app14188563>
- Dariah, A., Marwanto, S., & Agus, F. (2014). Root- and peat-based CO₂ emissions from oil palm plantations. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 19(6), 831–843. <https://doi.org/10.1007/s11027-013-9515-6>
- Data Bridge Market Research. (2024). *Global Wafer Confectionery Market Size, Share, and Trends Analysis Report – Industry Overview and Forecast to 2031*. <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-wafer-confectionery-market>
- Datta, A., & Krishnamoorti, R. (2022). Understanding the Greenhouse Gas Impact of Deforestation Fires in Indonesia and Brazil in 2019 and 2020. *Frontiers in Climate*, 4.

<https://doi.org/10.3389/fclim.2022.799632>

- Drewnowski, A., Nordensten, K., & Dwyer, J. (1998). Replacing sugar and fat in cookies: Impact on product quality and preference. *Food Quality and Preference*, 9(1–2), 13–20. [https://doi.org/10.1016/s0950-3293\(97\)00017-7](https://doi.org/10.1016/s0950-3293(97)00017-7)
- Espín, J. C., Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 648–656. <https://doi.org/10.1021/jf9908188>
- Estruch, R., Vendrell, E., Ruiz-León, A. M., Casas, R., Castro-Barquero, S., & Alvarez, X. (2020). Reformulation of pastry products to improve effects on health. *Nutrients*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/nu12061709>
- Francis, F. J. (1985). Blueberries as a Colorant Ingredient in Food Products. *Journal of Food Science*, 50(3), 754–756. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13789.x>
- Frankel, E. N. (1980). Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, 19(1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(80\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0163-7827(80)90006-5)
- Fu, B., & Labuza, T. P. (1997). *Shelf-Life Testing: Procedures and Prediction Methods BT - Quality in Frozen Food* (M. C. Erickson & Y.-C. Hung (Eds.); pp. 377–415). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5975-7_19
- Giannakourou, M. C., Semenoglou, I., Arvaniti, M., Dermesonlouoglou, E., & Taoukis, P. (2025). Effect of Temperature and Water Activity on the Quality Kinetics of Packaged Fish Powder During Storage. *Food and Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1007/s11947-025-03931-5>
- Gumus, C. E., & Decker, E. A. (2021). Oxidation in low moisture foods as a function of surface lipids and fat content. *Foods*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/foods10040860>
- Gunes, R., Palabiyik, I., Konar, N., & Said Toker, O. (2022). Soft confectionery products: Quality parameters, interactions with processing and ingredients. *Food Chemistry*, 385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132735>
- Guo, Y., & Lai, L. (2016). Analysis on Quality Indicators of Taste and Infusion Color and Discrimination of Famous and Superior Green Tea with Different Appearances in Fujian Province, PR China. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(5), 1084–1092. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12689>
- Gupta, A., Shah, K., & Gupta, V. (2025). Interconnected epidemics: obesity, metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases—insights from research and prevention

- strategies. *Discover Public Health*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12982-025-00496-8>
- Habekost, M. (2013). Which color differencing equation should be used? *International Circular of Graphic Education and Research*, 6(6), 20–33.
- Ho, S. C., & Lin, C. C. (2008). Investigation of heat treating conditions for enhancing the anti-inflammatory activity of citrus fruit (*Citrus reticulata*) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7976–7982. <https://doi.org/10.1021/jf801434c>
- Hu, K., Huyan, Z., Ding, S., Dong, Y., & Yu, X. (2020). Investigation on food packaging polymers: Effects on vegetable oil oxidation. *Food Chemistry*, 315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126299>
- Imran, M., Butt, M. S., Iqbal, M. J., Gilani, S. A., Basharat, S., Saeed, F., & Suleria, H. A. R. (2016). Antioxidant Potential, Physico-chemical, and Sensory Attributes of Cookies Supplemented with Mosambi Peel Extract. *International Journal of Fruit Science*, 16(3), 341–349. <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1143434>
- IndexBox. (2025). *Poland - Waffles and Wafers Without Chocolate - Market Analysis, Forecast, Size, Trends and Insights*. <https://www.indexbox.io/store/poland-waffles-and-wafers-without-chocolate-market-analysis-forecast-size-trends-and-insights/>
- Islam, M., Kaczmarek, A., & Tomaszewska-Gras, J. (2023). Differential scanning calorimetry as a tool to assess the oxidation state of cold-pressed oils during shelf-life. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(6), 6639–6651. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02152-8>
- Ismail, T., Akhtar, S., Riaz, M., Hameed, A., Afzal, K., & Sattar Sheikh, A. (2016). Oxidative and Microbial Stability of Pomegranate Peel Extracts and Bagasse Supplemented Cookies. *Journal of Food Quality*, 39(6), 658–668. <https://doi.org/10.1111/jfq.12231>
- ISO. (2007). *PN-ISO 4832:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique*. Polish Committee for Standardization.
- ISO. (2009). *PN-ISO 21527-2:2009 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95*. Polish Committee for Standardization.
- ISO. (2013). *PN-EN ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique*. Polish Committee for Standardization.

- ISO. (2017a). *ISO 3960. Animal and vegetable fats and oils - determination of peroxide value*.
- ISO. (2017b). PN-EN ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella. Part 1: Detection of Salmonella spp. In *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella Part 1: Detection of Salmonella spp.* Polish Committee for Standardization.
- ISO. (2017c). PN-EN ISO 6887-1:2017-05 Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. Polish Committee for Standardization.
- Jakubczyk, E., Marzec, A., & Lewicki, P. P. (2008). Relationship between water activity of crisp bread and its mechanical properties and structure. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58(1), 45–51.
- Jaldani, S., Sarfaraz Khabbaz, E., Jooyandeh, M., & Farhoosh, R. (2024). Kinetics of simultaneous change in the concentration of total lipid hydroperoxides and total conjugated dienes during peroxidation of canola, sunflower, and olive oils. *Food Chemistry*, 435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137605>
- Jeong, B. G., Gwak, Y. J., Kim, J., Hong, W. H., Park, S. J., Islam, M. A., Jung, J., & Chun, J. (2022). Antioxidative Properties of Machine-Drip Tea Prepared with Citrus Fruit Peels Are Affected by the Type of Fruit and Drying Method. *Foods*, 11(14). <https://doi.org/10.3390/foods11142094>
- José, F. J. S., Collado-Fernández, M., & Álvarez-Castellanos, P. P. (2023). Variation, during Shelf Life, of Functional Properties of Biscuits Enriched with Fibers Extracted from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Nutrients*, 15(15). <https://doi.org/10.3390/nu15153329>
- Katz, E. E., & Labuza, T. P. (1981). Effect of Water Activity on the Sensory Crispness and Mechanical Deformation of Snack Food Products. *Journal of Food Science*, 46(2), 403–409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04871.x>
- Kim, S., Park, J.-B., & Hwang, I.-K. (2002). Quality Attributes of Various Varieties of Korean Red Pepper Powders (*Capsicum annuum* L.) and Color Stability During Sunlight Exposure. *Journal of Food Science*, 67(8), 2957–2961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08845.x>
- Kmieciak, S. (2025). *Określanie i walidacja trwałości przechowalniczej artykułów żywnościowych*. Określanie i Walidacja Trwałości Przechowalniczej Artykułów

- Żywnościowych. https://www.pfpz.pl/nowosci/?id_news=3962&lang_id=1
- Konar, N., Gunes, R., Palabiyik, I., & Toker, O. S. (2022). Health conscious consumers and sugar confectionery: Present aspects and projections. *Trends in Food Science and Technology*, 123, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.001>
- Kong, F., & Singh, R. P. (2016). Chemical Deterioration and Physical Instability of Foods and Beverages. In P. Subramaniam (Ed.), *The Stability and Shelf Life of Food (Second Edition)* (pp. 43–76). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00002-2>
- Kozłowska, M., Żbikowska, A., Gruczyńska, E., Żontała, K., & Półtorak, A. (2014). Effects of spice extracts on lipid fraction oxidative stability of cookies investigated by DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 118(3), 1697–1705. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-4058-y>
- Kozłowska, M., Żbikowska, A., Szpicer, A., & Półtorak, A. (2019). Oxidative stability of lipid fractions of sponge-fat cakes after green tea extracts application. *Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2628–2638. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03750-5>
- Kumari, N., Sindhu, S. C., Rani, V., & Kumari, V. (2021). Shelf Life Evaluation of Biscuits and Cookies Incorporating Germinated Pumpkin Seed Flour. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10(01), 1436–1443. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1001.170>
- León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, J. (2006). Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10), 1084–1091. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.03.006>
- Li, Y., Zhong, K., Wang, X., Wang, H., Zhang, Y., Shi, B., Luo, H., Zhao, L., Jiang, S., & Wang, S. (2023). Sensory Evaluation and Model Prediction of Vacuum-Packed Fresh Corn during Long-Term Storage. *Foods*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/foods12030478>
- Mahato, N., Sinha, M., Sharma, K., Koteswararao, R., & Cho, M. H. (2019). Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes. In *Foods* (Vol. 8, Issue 11). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods8110523>
- Maire, M., Rega, B., Cuvelier, M. E., Soto, P., & Giampaoli, P. (2013). Lipid oxidation in baked products: Impact of formula and process on the generation of volatile compounds. *Food Chemistry*, 141(4), 3510–3518. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.039>
- Mateus, A. R. S., Mariño-Cortegoso, S., Barros, S. C., Sendón, R., Barbosa, L., Pena, A., &

- Sanches-Silva, A. (2024). Citrus by-products: A dual assessment of antioxidant properties and food contaminants towards circular economy. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 95. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103737>
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>
- Miele, N. A., Di Monaco, R., Masi, P., & Cavella, S. (2015). Reduced-calorie filling cream: Formula optimization and mechanical characterization. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 67–72. <https://doi.org/10.3303/CET1543012>
- Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Obuchowski, W., & Gośliński, M. (2009). Evaluation of antioxidant activity of green tea extract and its effect on the biscuits lipid fraction oxidative stability. *Journal of Food Science*, 74(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01313.x>
- Mori, M. R., Kumar Verma, S., Bhola, D. V., Remya, S., & Suyani, N. K. (2021). Effects of orange peel extract on microbiological quality during storage of functional oat cookies fortified with fish protein concentrate from lesser tiger toothed croaker (*Otolithes cuvieri*). *The Pharma Innovation Journal*, 10(10), 190–193.
- Murdiyarso, D., Swails, E., Hergoualc'h, K., Bhomia, R., & Sasmito, S. . (2024). Refining greenhouse gas emission factors for Indonesian peatlands and mangroves to meet ambitious climate targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.2307219121>
- Muzolf-Panek, M., & Waśkiewicz, A. (2022). Relationship between Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Color Parameters of Red Table Grape Skins Using Linear Ordering Analysis. *Applied Sciences*, 12. <https://doi.org/10.3390/app12126146>
- Nanditha, B., & Prabhasankar, P. (2009). Antioxidants in bakery products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 1–27. <https://doi.org/10.1080/10408390701764104>
- Neelam, A., Ishteyaq, S., Hany, O.-, & Mahmood, S. J. (2019). A Comparative Study of Physical Behaviour and Biodegradation of Metalized and Non-Metalized Polypropylene Films. *Current World Environment*, 14(2), 267–275. <https://doi.org/10.12944/cwe.14.2.11>
- Ning, J., Fu, B., Tang, X., Hao, Y., Zhang, Y., & Wang, X. (2025). Starch retrogradation in starch-based foods: Mechanisms, influencing factors, and mitigation strategies.

- Obafaye, R. O., & Omoba, O. S. (2018). Orange peel flour: A potential source of antioxidant and dietary fiber in pearl-millet biscuit. *Journal of Food Biochemistry*, 42(4). <https://doi.org/10.1111/jfbc.12523>
- Plotnikova, I. V., Zharkova, I. M., Magomedov, G. O., Magomedov, M. G., Khvostov, A. A., & Miroshnichenko, E. N. (2021). Forecasting and quality control of confectionery products with the use of “water activity” indicator. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 640. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/640/6/062003>
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. G., & Elliott, P. H. (2010). Sources and Risk Factors for Contamination, Survival, Persistence, and Heat Resistance of Salmonella in Low-Moisture Foods. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1919–1936. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.10.1919>
- Popov-Raljić, J. V., Mastilović, J. S., Laličić-Petronijević, J. G., Kevrešan, Ž. S., & Demin, M. A. (2013). Sensory and color properties of dietary cookies with different fiber sources during 180 days of storage. *Hemijska Industrija*, 67(1), 123–134. <https://doi.org/10.2298/HEMIND120327047P>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Rajagukguk, Y. V., Islam, M., Grygier, A., Siger, A., Rudzińska, M., & Tomaszewska-Gras, J. (2024). Physicochemical characteristics of cold-pressed blackcurrant-, strawberry-, and raspberry seed oils during storage and its influence on thermo-oxidative stability. *NFS Journal*, 37(September). <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2024.100195>
- Romani, S., Rocculi, P., Tappi, S., & Dalla Rosa, M. (2016). Moisture adsorption behaviour of biscuit during storage investigated by using a new Dynamic Dewpoint method. *Food Chemistry*, 195, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.114>
- Salazar-Orbea, G. L., García-Villalba, R., Bernal, M. J., Hernández-Jiménez, A., Egea, J. A., Tomás-Barberán, F. A., & Sánchez-Siles, L. M. (2023). Effect of Storage Conditions on the Stability of Polyphenols of Apple and Strawberry Purees Produced at Industrial Scale by Different Processing Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(5), 2541–2553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07828>
- Şengül, M., Can, B., Ürkek, B., & Gürbüz-Kaçan, Z. (2022). Effect of blueberry addition on

- antioxidant activity, textural, microbiological and physicochemical properties of strained yoghurt. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 94(4). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220201798>
- Sharma, S., & Riar, C. S. (2020). Effect of storage period and packaging materials on textural, phenolic, antioxidant properties of cookies made from raw and germinated minor millet blends flour. *Annals. Food Science and Technology*, 21(1), 74–85. www.afst.valahia.ro
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Sirpatrawan, U. (2009). Shelf-life simulation of packaged rice crackers. *Journal of Food Quality*, 32(2), 224–239. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2009.00247.x>
- Souza, A. M., Bezerra, I. W. L., Pereira, G. S., Torres, K. G., Costa, R. M., & Oliveira, A. G. (2020). Relationships between motivations for food choices and consumption of food groups: A prospective cross-sectional survey in manufacturing workers in Brazil. *Nutrients*, 12. <https://doi.org/10.3390/nu12051490>
- Sun, Y., Neelakantan, N., Wu, Y., Lote-Oke, R., Pan, A., & van Dam, R. M. (2015). Palm oil consumption increases LDL cholesterol compared with vegetable oils low in saturated fat in a meta-analysis of clinical trials. *Journal of Nutrition*, 145(7), 1549–1558. <https://doi.org/10.3945/jn.115.210575>
- Sundara, R. (2012). The Science Behind The Flat Wafer Baking Process. *New Food Magazine*, 15(4), 56–61.
- Surmacka Szczesniak, A. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13, 215–225. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(01\)00039-8](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(01)00039-8)
- Szymanowska, U., Karaś, M., & Bochnak-Niedźwiecka, J. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory potential and consumer acceptance of wafers enriched with Freeze-Dried Raspberry Pomace. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/app11156807>
- Tiefenbacher, K. F. (2017a). Adjuncts filling creams, inclusions, cacao and chocolate. In *The Technology Of Wafers and Waffles I. Operational Aspects* (pp. 313–404). Academic Press.
- Tiefenbacher, K. F. (2017b). Chapter Eight - After-Bake Technology of Crisp Wafers and of Soft Waffles. In *The Technology Of Wafers and Waffles I. Operational Aspects* (pp. 539–586). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809438-9.00008-9>
- Tiefenbacher, K. F. (2019). Introduction and overview. In *The Technology Of Wafers and*

- Waffles II. Recipes, Product Development and Know-how* (pp. 1–12). Academic Press.
- Tjahjono, N. (2025). *Assessing Market Shelf Life Stability of Wafer Products through Sensory Evaluation: Triangle Test*.
- Tolve, R., Sportiello, L., Rainero, G., Pelattieri, A., Trezzi, M., & Favati, F. (2024). A Sensory Shelf-Life Study for the Evaluation of New Eco-Sustainable Packaging of Single-Portion Croissants. *Foods*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/foods13091390>
- Tomaszewska-Gras, J. (2016). DSC coupled with PCA as a tool for butter authenticity assessment. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 126(1), 61–68. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5346-5>
- Tong, X., Wang, X., Chen, Y., Ma, M., Li, Y., Yang, X., Chen, X., Wang, Q., & Huang, Y. (2025). A strategy to reduce the bitterness of green tea extract: Preparation of cyclodextrin inclusion and assessment of its antioxidant activity and stability. *Food Research International*, 204. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.115958>
- Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., & Cabras, P. (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*, 103(4), 1494–1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.014>
- Vahid-Dastjerdi, L., Jazaeri, S., Hadaegh, H., Razeghi Jahromi, S., Hosseini, S. M., Farhoodi, M., & Momken, I. (2020). Sucrose substitution by polyols for the production of shelf stable macaroon: attribution of their molecular weight and synergy. *European Food Research and Technology*, 246(9), 1877–1887. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03542-8>
- van Nieuwenhuijzen, N., Primo-Martín, C., Meinders, M., Tromp, R., Hamer RJ, & van Vliet, T. (2008). Water content or water activity: what rules crispy behavior in bread crust? *J Agric Food Chem*, 15, 6432–6438. <https://doi.org/10.1021/jf800522c>
- Wedamulla, N. E., Fan, M., Choi, Y. J., & Kim, E. K. (2022). Citrus peel as a renewable bioresource: Transforming waste to food additives. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 95). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105163>
- Welsh, A., Hammad, M., Piña, I. L., & Kulinski, J. (2024). Obesity and cardiovascular health. *European Journal of Preventive Cardiology*, 31(8), 1026–1035. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwae025>
- Wholesale Manager. (2023, July 12). *Healthier snacking – Consumers are becoming more interested in the nutritional content of snacks*. Healthier Snacking – Consumers Are Becoming More Interested in the Nutritional Content of Snacks. <https://wholesalemanager.co.uk/healthier-snacking-consumers-are-becoming-more->

interested-in-the-nutritional-content-of-snacks/

- Williamson, T. (2017). *Making the Switch from Foil to Metallized OPP and PET Films*.
- Xia, W., & Budge, S. M. (2017). Techniques for the Analysis of Minor Lipid Oxidation Products Derived from Triacylglycerols: Epoxides, Alcohols, and Ketones. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 735–758. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12276>
- Xu, Y. Q., Zhang, Y. N., Chen, J. X., Wang, F., Du, Q. Z., & Yin, J. F. (2018). Quantitative analyses of the bitterness and astringency of catechins from green tea. *Food Chemistry*, 258, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.042>
- Young, K. W., & Whittle, K. J. (1985). Colour measurement of fish minces using hunter L, a, b values. *Science of Food and Agriculture*, 36(5), 383–392. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740360511>
- Zbikowska, A., Kozłowska, M., Poltorak, A., Kowalska, M., Rutkowska, J., & Kupiec, M. (2018). Effect of addition of plant extracts on the durability and sensory properties of oat flake cookies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 134(2), 1101–1111. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7301-0>

10. Spis tabel

Tabela 1 Charakterystyka materiałów opakowaniowych. Dane na podstawie specyfikacji producenta. Opracowanie własne.....	21
--	----

11. Spis rysunków

Rysunek 1 Schemat badań przechowalniczych listków waflowych prowadzonych przez 13 miesięcy. Opracowanie własne	33
Rysunek 2 Schemat badań przechowalniczych wafli przekładanych kremem prowadzonych przez 13 miesięcy. Opracowanie własne.	34
Rysunek 3 Zmiany wartości aktywności wody (a_w) podczas 13 miesięcy przechowywania: a. – dla wafli standardowych (WS), b. – dla wafli o obniżonej zawartości cukru (WC); w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana). Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-i) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).	52
Rysunek 4 Przykładowe sygnały akustyczne (amplituda) zarejestrowane podczas łamania wafli ze standardową recepturą (WS), opakowanych w folię metalizowaną (opakowanie B) jako funkcja czasu i częstotliwości dla próbek świeżych (a., b.) oraz przechowywanych 6 miesięcy (c., d.).....	55
Rysunek 5 Wykresy radarowe obrazujące zmiany parametrów charakteryzujących chrupkość wafli zapakowanych w dwa opakowania (A i B) w czasie 13 miesięcy przechowywania a. – wafle WS, opakowanie A; b. – wafle WS, opakowanie B; c. – wafle WC, opakowanie A; d. – wafle WC, opakowanie B. (WS – wafle standardowe; WC – wafle o obniżonej zawartości cukru; opakowanie A – folia polipropylenowa; opakowanie B – metalizowana folia polipropylenowa).....	56
Rysunek 6 Zmiany wskaźnika chrupkości wafli WC i WS, zapakowanych w dwa opakowania (A i B) w czasie 13 miesięcy przechowywania. (WS – wafle standardowe; WC – wafle o obniżonej zawartości cukru; opakowanie A – folia polipropylenowa; opakowanie B – metalizowana folia polipropylenowa).	58
Rysunek 7 Zmiany siły łamania podczas 13 miesięcy przechowywania: a. – dla wafli standardowych (WS), b. – dla wafli o obniżonej zawartości cukru (WC); w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana). Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-f) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).	60
Rysunek 8 Wyniki czasu indukcji utleniania (OIT) frakcji lipidowej wyekstrahowanej: a. – z wafli standardowych (WS), b. – z wafli o obniżonej zawartości cukru (WC); podczas 13 miesięcy przechowywania w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana). Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym.	

Różne litery (a-j) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).	63
Rysunek 9 Zmiany liczby nadtlenkowej próbek wafli: standardowych (WS) i o obniżonej zawartości cukru (WC) w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana) podczas 13 miesięcy przechowywania. Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-g) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).	64
Rysunek 10 Zawartość skoniugowanych dienów w próbkach wafli: standardowych (WS) i o obniżonej zawartości cukru (WC) w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana) w czasie 13 miesięcy przechowywania. Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-d) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).	66
Rysunek 11 Aktywność przeciwutleniająca próbek: standardowych wafli (WS) i wafli o obniżonej zawartości cukru (WC) w dwóch rodzajach opakowań (A – folia polipropylenowa; B – folia polipropylenowa metalizowana), mierzona jako zdolność do usuwania rodników DPPH*, podczas 13 miesięcy przechowywania. Wartości podano jako średnią z odchyleniem standardowym. Różne litery (a-e) wskazują istotne różnice między czasem przechowywania w ramach danego rodzaju próbki ($p \leq 0,05$).	67

12. Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład zbioru

Publikacja 1 (P1)

Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Islam, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2023). Increasing the Oxidative Stability of the Wafer Lipid Fraction with Fruit Extract during Storage.

Applied Sciences, 13(1), 103. <https://doi.org/10.3390/app13010103>

Article

Increasing the Oxidative Stability of the Wafer Lipid Fraction with Fruit Extract during Storage

Liliana Belkowska, Małgorzata Muzolf-Panek , Mahbuba Islam  and Jolanta Tomaszewska-Gras * 

Department of Food Quality and Safety Management, Faculty of Food Science and Nutrition,
Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 31/33, 60-624 Poznań, Poland

* Correspondence: jolanta.tomaszewska-gras@up.poznan.pl; Tel.: +48-061-848-7512

Featured Application: Commercial fruit extract was tested in terms of preventing the oxidation of lipids in wafers stored during 13 months. It was proved that fruit extract effectively enhanced the oxidative stability of lipid fraction of wafers up until the 10th month of storage. The results obtained are of particular interest to consumers and producers, as both production and storage took place in real-life conditions. Moreover, for the first time, the effect of commercially available extract of natural origin on the oxidative stability of wafers was tested. The extract is of repeatable quality, which is very important for the producer and at the same time it meets consumers' demands for "clean label".

Abstract: Confectionary products are increasingly popular among consumers. However, since they usually have a long shelf life (about 12 months), their oxidative stability during long-term storage becomes a significant issue. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of addition of commercially available fruit extract on the oxidative stability of lipid fraction, extracted from wafers sheets stored 13 months at 18 °C. For this purpose, the oxidation induction times (OIT) were determined by using isothermal differential scanning calorimetry (DSC). Conjugated diene content (CD) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) antioxidant activity were also monitored. All results obtained showed that the fruit extract addition slowed down effectively the peroxidation process of lipid fraction of wafer sheets. The rate of OIT and CD changes during the first six months of storage were about two times lower for the sample with the extract (LWE) than for the control (LWS). The DPPH antioxidant activity of LWE was higher than for the LWS sample until the 8th month of storage. It was stated that fruit extract effectively enhanced the oxidative stability of lipid fraction of wafers up until the 10th month of storage. After this period, CD values increased significantly for LWS and LWE samples, while at the same time there were no significant differences in OIT and DPPH values between both samples ($p > 0.05$).

Keywords: lipids peroxidation; oxidation induction time OIT; differential scanning calorimetry DSC; DPPH; conjugated dienes



Citation: Belkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Islam, M.; Tomaszewska-Gras, J. Increasing the Oxidative Stability of the Wafer Lipid Fraction with Fruit Extract during Storage. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 103. <https://doi.org/10.3390/app13010103>

Academic Editor: Alessandra Durazzo

Received: 14 November 2022

Revised: 19 December 2022

Accepted: 19 December 2022

Published: 21 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Wafers are becoming more and more popular among consumers. The wafer and biscuits market was worth \$85 billion at the end of 2019 and was predicted to continue to grow strongly [1]. These forecasts proved to be accurate, since according to data from the Nielsen database, in 2020 and 2021 there was an increase in the market, both in terms of value and quantity. Wafers are stable confectionery products that are sold in many forms and shapes: separately (wafers, ice cream wafers, wafer tubes, etc.) or as part of popular products filled, layered with cream or covered with chocolate. Another reason for their popularity is the convenience of buying in bulk. The shelf life of wafers is long and ranges from 3 months for wafer sheets to even 12 months for wafers products. Unfortunately, the wafers as very thin products (up to a few mm) are exposed to unfavorable conditions during

production [2], i.e., to high temperature during baking (150–170 °C), lasting 2–4 min, during which the entire surface of wafer is in contact with the baking plates. The main component, which is very prone to undesirable changes is fat. Daglioglu et al. [3] drew attention to the fact that the highest amount of fat in selected bakery products they tested was in wafers and they mentioned that the good quality of used fat and conditions of storage finished product are really important. The conditions of the baking process (temperature, time) as well as the conditions of storage (temperature, humidity, time) are factors lowering quality of wafers in terms of oxidative stability and sensory characteristics resulting in the development of rancidity [4]. Particularly prone to oxidation are oils with a high content of unsaturated fatty acids, especially when subjected to high temperature treatment. During the oxidation process, which is a free radical chain reaction, new compounds are formed, which are detrimental to health (peroxides, hydroperoxides). Reactive radicals initiate further reactions leading to the formation of secondary oxidation products such as ketones, aldehydes, alcohols and esters [3,5,6].

A significant increase in the stability of fat can be reached by adding synthetic antioxidants, e.g., butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), however they are not well perceived by consumers. They can also have a negative effect on health [7]. Growing interest in the ecological trend is currently observed, which means that consumers pay attention to the origin, source and the method of obtaining ingredients. Therefore, fruit extracts are an alternative to the aforementioned synthetic antioxidants. Thanks to natural compounds with antioxidant potential, i.e., phenolic acids, polyphenols such as flavonoids, it is possible to increase the oxidative stability of products containing fats and oils. Antioxidant activity in different confectionery products was tested by using parts of plants, e.g., leaves, seeds or by using extracts. Gramza-Michałowska et al. [8] reported that ground green and yellow tea leaves added to cookies significantly slowed down the oxidative changes during storage. In turn, Mildner-Szkudlarz et al. [9] proved the protective properties of green tea extract against the oxidation of fats in biscuits. Extracts obtained from various spices and herbs have also been reported to be effective antioxidants [10–14]. Reddy et al. [11] confirmed that the addition of extracts from amla (*Emblia officinalis*), drumstick leaves (*Moringa oleifera*) and raisins (*Vitis vinifera*) improved the antioxidative effect on biscuits compared with the BHA effect. Misan et al. [12] confirmed the antioxidant potential of extracts obtained from mint, parsley, caraway, buckthorn and their mixture named “Vitalplant” and that these substances can delay the lipid oxidation process. Gbenga-Fabusiwa [13] showed the positive effect of ginger on the oxidative stability of biscuits with pigeon pea–wheat composite flour blends. However, in addition to being a source of phenolic compounds, ginger has a very characteristic taste since it was also used as a flavoring agent. Vanilla extract also has similar properties—it both increases the stability of lipids and brings specific flavor, which was described by Anuradha et al. [14].

Similarly, fruit extract is a very good ingredient in confectionery products because of their desirable taste and the abundance of compounds with antioxidant activity. The antioxidant effect of various fruit extracts, ground fruit peels or pomace has been previously shown by others [15–18]. However, only Bialek et al. [16] investigated the oxidative stability of lipid fraction extracted from cookies in contrast to the research of others [15,17,18], where the aqueous or ethanolic extracts obtained from the confectionery products were studied. Moreover, as it was shown by Bialek et al. [16] the protective effect of fruit extract was highly dose-dependent. At high doses (0.025% and 0.1%) of chokeberry extract, the lipid oxidation was even more pronounced than in the control sample. The protective effect of fruit extracts was ascribed to high phenolic content (e.g., polyphenols including anthocyanin content) [15–17]. Ismail et al. [17] showed the positive effect of pomegranate peel extract and pomegranate peel bagasse on the oxidative stability of cookies. They also emphasized the importance of peel, the by-products of processing industry.

Despite the many studies on the antioxidant effects of various plant extracts, there are no studies based on standardized and commercially available fruit extracts that would be tested on final products and could be used in the production of various confectionery

products such as wafers. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of adding commercial fruit extract Flavomix AX 200 on the oxidative stability of the lipid fraction extracted from wafer sheets, stored during 13 months at 18 °C. The novelty of this work is that the commercially available extract of natural origin was tested for the first time in the real production and storage conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The chemical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and Trolox were supplied from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Isooctane, n-hexane and ethyl acetate were obtained from POCh (Gliwice, Poland).

2.2. Preparation of Wafers

The material for this study consisted of two kinds of wafers, namely standard wafers (LWS) and wafers with added fruit extract (LWE). Both samples (LWS, LWE) were prepared according to the same recipe, while the fruit extract (Flavomix AX 200, Polypan Group, Moschato, Greece) was added to the LWE sample in an amount of 0.13% (*w/w*). Since the recipe and production technology is a secret of the Polypan Group company, the producer declare only that it is extract from citrus fruits. The wafers batter consisted of the following ingredients: water, wheat flour, salt, potato starch, sunflower lecithin and high oleic rapeseed oil (HORO). All ingredients were obtained from the Polish market. HORO content in wafer sheets was 2.2% *w/w*. Wafer sheets were obtained by baking in a wafer oven at a temperature of 170 °C ± 1 °C and for 2.5 min. Immediately after baking and cooling, the wafer sheets were wrapped in polypropylene foil and stored at 18 °C ± 2 °C for 13 months. All samples were stored in boxes in a dark place. The temperature in the storage room was 18 ± 2 °C, and relative humidity in the range 60–65%.

2.3. Fruit Extract Analysis

The antioxidant activity by the DPPH method [19] and total phenolic content (TPC) by Folin—Ciocalteu's method [20] and total flavonoid content (TFC) by aluminum chloride meijod [21] were examined in the fruit extract. Briefly, 0.1 mM DPPH in methanol was mixed with extract samples (0–10%) in ratio of 100:1 (*v/v*), respectively. After 30 min of incubation in dark at ambient temperature the absorbance readings were taken at 515 nm against methanol. Results were expressed as µmol Trolox equivalent (TE) per ml of fruit extract. TPC was measured as followed, 20 µL of fruit extract sample (2% in distilled water) was mixed with the 100 µL Folin-ciocalteu's reagent. After 3 min of incubation, 300 µL sodium carbonate (20%) was added and the sample was filled up to 2 mL with distilled water. The mixture was incubated in dark for 2 h. The absorbance was read at 765 nm and the results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per ml of fruit extract. TFC was measured at 410 nm. Fruit extract sample (2%) was mixed with aluminum chloride (2% in methanol) at 1:10 ratio and after 15 min of incubation at dark the absorbance was read against methanol. Results were expressed as mg quercetin equivalent (QE) per ml of fruit extract.

2.4. Extraction of Lipid Fraction

The fraction of lipids was extracted from wafers by n-hexane. Initially, the wafer sheets were weighed (approximately 150 g) into a beaker of 1 L volume and crushed with a mortar. N-hexane was then added in an amount of approximately 300 g, i.e., in ratio of 1:2 (*w/w*). The sample was homogenized (Zauberstab 2011-8, Unold AG Hockenheim, Stwizerland), then heated to 30 °C and stirred continuously on stirrer (FC6S, Velp Scientifica Srl, Usmate Velate, Italy) at 112 × *g* for 60 min. After this time, the sample was centrifuged (MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland) for 15 min at 2382 × *g*. The centrifuged supernatant was filtered (filtrate MN 640 W, Macherey-Nagel, Dueren, Germany) and then n-hexane was evaporated by a rotary vacuum evaporator (The Rotavapor® R-300, BÜCHI Labortechnik

AG, Flawil, Switzerland) under the following conditions: pressure 264 mbar, 30 rpm, bath temperature 50 °C, time 30 min. The fat obtained was poured into a test tube and residual n-hexane was removed by aerating with nitrogen (1 h). Lipid samples were closed and kept under nitrogen until analysis.

2.5. DSC Oxidative Stability Test

Oxidation induction time (OIT) was determined by the differential scanning calorimetry (DSC) following the ISO 11357-6 (ISO, 2018) [22]. Samples of lipid fraction were analyzed in a DSC 7 Perkin Elmer along with an Intracooler II, operated with Pyris software 10.1. The instrument was calibrated using indium (m.p. 156.6 °C, $\Delta H_f = 28.45$ J/g) and n-dodecane (m.p. −9.65 °C, $\Delta H_f = 216.73$ J/g), 99.99% pure nitrogen was used as the purge gas. Oil samples of approximately 6–7 mg were weighed into 50 µL open aluminum pans (Perkin Elmer, No. 02190041) and placed in the equipment's sample chamber. The reference was the same open and empty aluminum pan. Isothermal protocol was followed to determine the oxidative stability characteristics of the oils at a constant temperature of 100 and 120 °C with an oxygen flow of 20 mL/min (purity 99.995%). Based on the oxidation curves obtained, parameters denoted as oxidation induction time (OIT) were determined after curve normalization as the intersection of the extrapolated baseline and the tangent line to the descending exotherm. Oils samples were analyzed in two replications for all DSC measurements.

2.6. DPPH Antioxidant Activity Determination in Lipid Fraction

The antioxidant activity of the samples was measured using a DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) reagent [23,24]. Briefly, 0.04 mM DPPH in ethyl acetate was mixed with a one-hundred-times diluted sample (fat dissolved in ethyl acetate). After 1 h of incubation in the dark at ambient temperature, spectrophotometric measurements were performed on the Cary 1E spectrophotometer (Varian, Belrose, Australia) at a wavelength of 515 nm using ethyl acetate as a blank sample. The results were expressed in µmol TE (Trolox equivalent) per 100 g of fat. All samples were measured in triplicate.

2.7. Diene Content Determination (CDs)

The diene concentration was measured spectrophotometrically using the Ti1a-64 method (AOCS, 2003) [25] Fat (20 mg) was dissolved in isooctane (20 mL) and the absorbance of the sample was read at a wavelength of 233 nm against blank (pure isooctane). If the value of absorbance was above 1, the sample has been diluted accordingly to obtain absorbance reading in the range of 0.2–1.0 (because the lowest error of absorbance readings are in this range). CD was calculated according to Equation (1):

$$CD = 0.84 \times \left(\left(\frac{a}{b} \times c \right) - K_0 \right) \quad (1)$$

where a is the absorbance, b is the cuvette length (1 cm), c is the sample concentration in isooctane (g/L), and K_0 represents the absorptivity by acid or ester groups (0.07 for esters, 0.03 for acids).

2.8. Statistical Analysis

All statistical tests were performed using Statistica 13.3 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). The level of significance was set at 5%. ANOVA with repeated measures was applied to estimate the effect of the variables (time and sample) on the parameters. The homogenous groups were shown using HSD Tukey's test. The Pearson's r coefficient for the linear correlation between parameters was calculated. To detect some pattern in the dataset general cluster analysis (CA) was applied (with Ward's method as the agglomeration rule and Euclidean distance as a metric). Before calculation, the data was standardized. Regression analysis (linear or segmented regression) was performed to show the rate of parameter changes in time. For the segmented regression, the breakpoint was set at the

6th month. The determination coefficients for the regression were calculated (R^2). All tests were performed in triplicate.

3. Results

3.1. DSC Isothermal Oxidative Stability Test of Lipids Extracted from Wafers

Thermo-oxidative stability of lipids extracted from two types of wafers, namely standard wafers (LWS) and wafers with extract (LWE), was measured by means of the DSC technique using the isothermal mode. Oxidation induction time, measured isothermally at 100 °C (OIT100) and 120 °C (OIT120), expresses the starting point of the oxidation process, calculated from the oxidation curves as the intersection of the baseline with the tangent to the descending curve. Figure 1 shows the isothermal oxidation curves of the samples (LWS, LWE) measured at a temperature of 120 °C at the beginning of storage (0 month). Oxidation of lipids manifested during DSC analysis as a sharp exothermic descending curve. The decline of the curve is caused by the initiation of the oxidation process due to heat evolving during the reaction [26,27]. As can be seen in Figure 1, differences are visible between the DSC oxidation curve for the control sample (LWS) and the sample with extract (LWE). In the case of the LWE sample, the oxidation induction time is much longer (shifted to higher values) compared to the sample LWS, which indicates effective protection of the fruit extract against oxidation of the lipid fraction during thermal treatment. Figure 2 shows the results of OIT100 (a) and OIT120 (b), determined from the curves obtained during the whole storage period of 13 months. It can be seen that the higher the oxidation temperature, the faster the oxidation occurred. At the beginning of the storage period (0 month) the OIT values for the LWS sample were 28.3 min at 100 °C and 9.2 min at 120 °C, whereas for LWE they were 96.6 min (OIT100) and 56.4 min (OIT120). As a reference, the HORO oil as a raw material used for the production of wafers was also investigated and oxidation curve was presented in the supplementary material (Figure S1). The analysis was carried out in isothermal conditions at 120 °C. It can be seen that the fresh HORO oil was characterized by high thermal stability expressed by OIT120 value at 50.1 min (Figure S1), which was lower than for LWE sample (56.4 min).

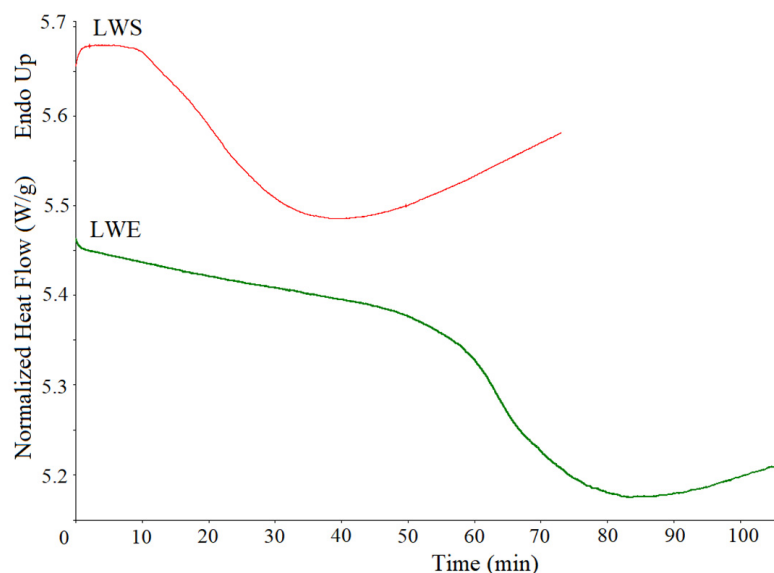


Figure 1. Differential scanning calorimetry (DSC) oxidation induction time (OIT) curves measured for fresh LWS and LWE samples at 120 °C temperature.

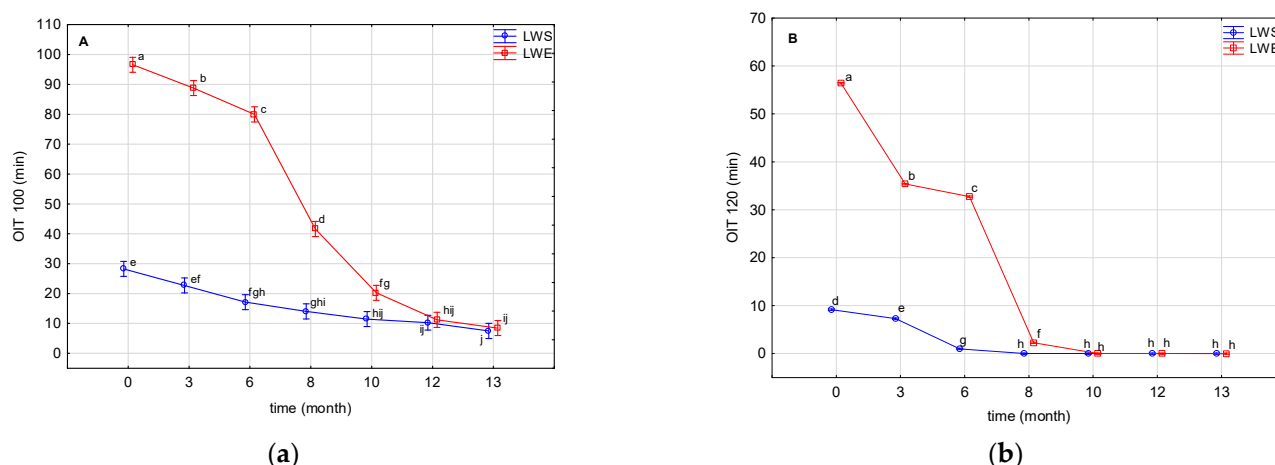


Figure 2. DSC OIT results for lipids extracted from the standard wafers (LWS) and wafers with extract (LWE) during 13 months of storage. (a) DSC OIT index measured at 100 °C (b) DSC OIT index measured at 120 °C. Vertical bars indicate 0.95 confidence intervals, the same letters indicate lack of significant differences between data ($\alpha = 0.05$).

In the case of both measurements (OIT100, OIT120), higher values of the OIT index were stated for sample LWE from the “0” time of storage until the 10th month for OIT 100 (Figure 2a) and until the 8th month for OIT120 (Figure 2b). ANOVA analysis revealed the significant effects of the time of storage and addition of the extract on the OIT values ($p \leq 0.05$). OIT values decreased during storage, which indicates that the oxidation process was progressing over time. However, the addition of the fruit extract increased the oxidative stability of the lipids in the wafers. The OIT100 decreased from 96.6 min (0 month) through 20.27 min (10th month) to 8.5 min (13th month) for LWE, while for the LWS samples it changed from 28.3 min (0 month) through 11.5 min (10th month) to 7.5 min (13th month). A similar tendency was observed at 120 °C, as the OIT120 values of LWE were higher than the OIT values of LWS, but statistically significant differences between samples were observed during 8 months of storage (Figure 2b).

The OIT120 decreased from 56.4 min (0 month) through 2.3 min (8th month) to 0 min (13th month) for LWE and from 9.2 min (0 month) to 0 min (after the 8th month of storage) for LWS samples. It can be stated from Figure 2a,b that the fruit extract effectively enhanced the oxidative stability during 10 months of storage, and after this time there was no significant difference in the OIT values between the LWS and LWE samples ($p > 0.05$). Kozłowska et al. [5] and Żbikowska et al. [28] applied also the DSC technique to monitor the oxidative stability of cookies with green tea extracts. However it was not analyzed in isothermal mode but in the non-isothermal one with different heating rates, which means that the results were expressed as onset temperature, indicating the beginning of lipid oxidation. Thus, the higher the onset temperature, the more stable the sample was. As shown by Kozłowska et al. [5], the onset temperature decreased with storage time, but the decrease was lower in the samples with green tea extracts when compared to the control at the same heating rate. After 14 days of accelerated storage at 63 °C, the onset temperature of fat extracted from cookies with green tea extract (1%) was 168.8 °C, compared to 135.2 °C for the control sample. Kozłowska et al. [29] reported that adding thyme or rosemary extracts increased the oxidative stability of cookies during the 21 days of storage. The effect of the addition of green tea, blackcurrant seeds or nettle extract to oat flake cookies on the DSC thermo-oxidative stability was also tested [28]. It was found that the stability of samples tested after baking and containing the plant extracts was significantly improved in comparison with the sample without plant material. The highest t_{ON} values were observed for the samples containing 1% of green tea extract.

3.2. Conjugated Diene Content and DPPH Antioxidant Activity of Lipids Extracted from Wafers

Lipid peroxidation is a very complex process leading to the formation of a wide variety of products. At the beginning of the process, hydroperoxides are formed from the polyunsaturated fatty acids. This process is accompanied by the rearrangement of double bonds in order to stabilize the radical state resulting in the formation of conjugated structures [6,30]. Therefore, dienes are also the primary lipid oxidation products and the content of these is a good indicator of progress in the oxidation process. The increase in conjugated compounds is proportional to the formation of hydroperoxides [31]. Figure 3 shows the results of determining conjugated dienes (CD) in samples (LWS, LWE) during 13 months of storage. Differences between the LWS and LWE samples in terms of CD concentration are clearly visible, as the concentration of CD was always higher in the LWS sample than the LWE up until the 12th month of storage, which indicates the protective effect of adding the extract.

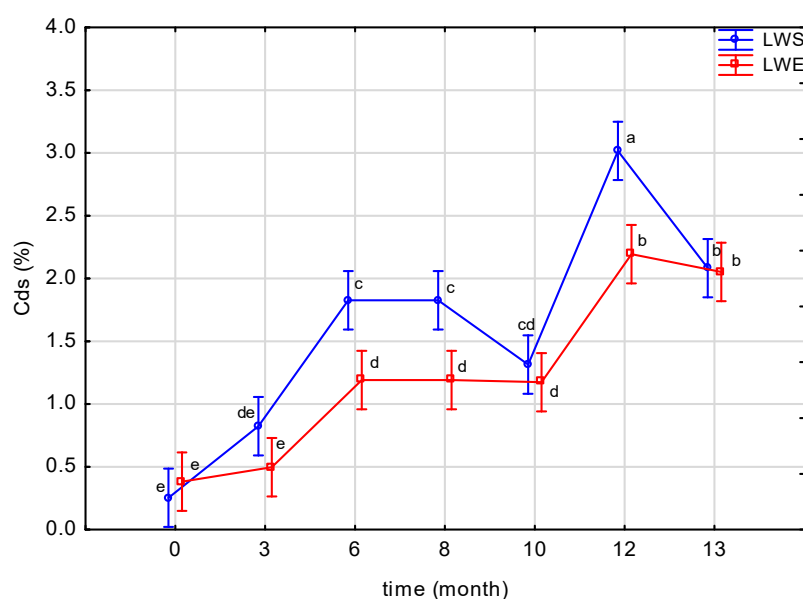


Figure 3. Conjugated diene concentration (CD) of standard wafers (LWS) and wafers with extract (LWE) during 13 months of storage. Vertical bars indicate 0.95 confidence intervals, the same letters indicate a lack of significant differences between data ($\alpha = 0.05$).

The content of dienes increased from 0.25% to 2.08% for the LWS samples and from 0.38% to 2.05% for the LWE during the whole storage period. There were no significant differences ($p > 0.05$) between the LWS and LWE samples at the beginning of storage (0 month) and at the end of storage (13th month). At the beginning of the oxidation process, i.e., in the initiation stage, a lag phase is normally observed. During that period, accumulation of lipid oxidation products is slow. This is mainly due to the slow formation of free radicals prior to hydroperoxides accumulation and that the free radicals preferentially oxidize the antioxidants present in products, which protects lipids at the earliest stages of oxidation [31]. Thus, on the 0 month of storage the CD concentration is similar in LWS and LWE samples. When the oxidation process has proceeded the content of conjugated structure increases in the sample without antioxidant treatment (LWS) in comparison to sample with antioxidant (LWE). Starting from the 3rd month of storage, LWS showed 1.5-times higher CDs (0.82%) than LWE samples (0.49%). A similar trend between both samples was observed until the 12th month. However, similarly to the peroxide value measurement, CD content is only effective at the beginning of the oxidation process. At low oxidation stages hydroperoxides undergo low decomposition but at the end of the process other products of lipid oxidation were formed thus the level of CD decreased [31].

Thus, on the 13th month of storage the level of CD decreased in both samples (LWE and LWS) and no significant differences are observed.

Summing up, it can be stated that the most pronounced changes of CD content took place during first six months of storage. The CD content doubled in the control wafers between 0 and 3rd month and between 3rd and 6th month of storage. The trend was similar to results noted by Daglioglu et al. [3] where the oxidation of lipid fraction of wafers expressed as peroxide value doubled during the first three months of storage from 1.2 to 2.5 meq O₂/kg [3]. The dienes and trienes content in stored cookies was also investigated by Żbikowska et al. [28]. They stated very small changes in fat extracted from stored cookies containing green tea extract, for which the lowest content of both dienes and trienes was detected after 3 months; 2.35 and 0.37, respectively.

However, the question may arise as to whether the extract added to the LWE sample protects the lipids against formation of conjugated dienes. Therefore, the antioxidant activity of both samples (LWS, LWE) was also compared by using the DPPH• radical scavenging method. In Figure 4, the results of the DPPH assay are presented.

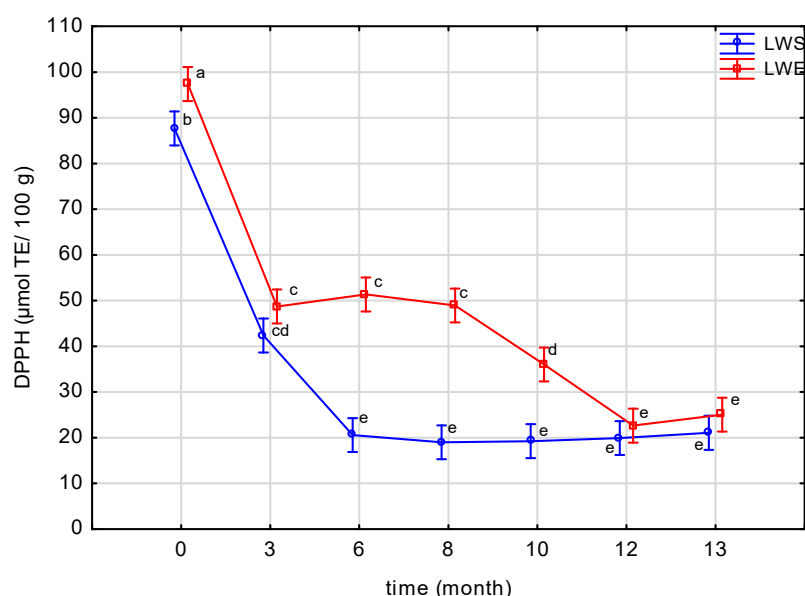


Figure 4. The antioxidant activity of the samples: standard wafers (LWS) and wafers with extract (LWE), measured as DPPH radical scavenging during 13 months of storage. Vertical bars indicate 0.95 confidence intervals, and the same letters indicate a lack of significant differences between data ($\alpha = 0.05$).

Significant effects of storage time and extract addition on the DPPH values were observed. The antioxidant activity of both samples (LWS, LWE) decreased with the wafers' storage time, although the decrease was more pronounced in the LWS samples than in the LWE. The addition of the fruit extract improved the stability of the lipid fraction in the LWE sample because of the active antioxidant compounds contained in the extract. According to the information from producer of the extract, it is composed of maltodextrin and citrus fruit extract. In this study, TPC and TFC of the fruit extract was also tested. TPC equals to 8.84 ± 0.42 mg GAE/mL, whereas TFC is 0.823 ± 0.038 mg QE/mL. High content of phenolic compounds resulted in high antioxidant activity of the fruit extract measured by the DPPH radical scavenging assay which is 13.68 ± 0.18 μmol TE/mL.

Analyzing the changes of the DPPH value during storage of wafers, at the beginning the antioxidant activity of LWE was 97.4 μmol TE/100 g whereas for LWS it was 87.7 μmol TE/100 g. Then a significant decrease in DPPH values was observed, and in the 3rd month, the DPPH values were comparable, i.e., 48.7 and 42.4 μmol TE/100 g for the LWE and LWS samples, respectively. After the 3rd month, the DPPH values of the LWS samples decreased, reaching a value of 20.6 in the 6th month and then the antioxidant activity was at a constant

level until the end of storage. In turn, for the LWE sample, the addition of extract increased the antioxidant activity in comparison to LWS sample, and after the 3rd month of storage the DPPH values were stable until the 8th month (48.7–51.3 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$). After the 8th month, the antioxidant activity of LWE decreased with time, reaching a DPPH value of 22.7 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ in the 12th month of storage, which was not significantly different from the LWS sample at the same storage period ($p > 0.05$). Similarly, after 13 months of storage differences between DPPH value for LWS and LWE were not significant.

Bhat et al. [10] showed that the DPPH radical scavenging activity of cookies with the addition of saffron extracts decreased during storage. This decrease was lower when comparing to control. Moreover, during the first three months of storage not significant changes were observed in DPPH values for saffron-treated cookies. That indicated the protective effect of saffron was the most pronounced during the first 3 months. In our study the decrease of DPPH values of the sample with fruit extract was the highest at the beginning of storage (0–3 months) and after that time the values stabilized until the 8th month. All herb extracts, investigated by Misan et al. [12], also showed significant differences in their ability to reduce the initial concentration of DPPH, which was expressed as the IC_{50} value, defined as the mass concentration of an antioxidant extract that was required to quench 50% of the initial DPPH under the given experimental conditions. Szymanowska et al. [15] also investigated the effect of raspberry pomace addition to wafers on the DPPH antioxidant activity. They stated that the ability of the ethanol extracts to neutralize the DPPH radical increased with the increasing concentration of freeze-dried raspberry pomace. Szymanowska et al. [27] reported that the DPPH radical scavenging activity of the ethanolic extracts of wafers with the raspberry extract was up to 10 times higher than the control sample and varied in the broad range from 61.89 $\mu\text{mol}/100\text{ g d.w.}$ to 157.44 $\mu\text{mol}/100\text{ g d.w.}$ They suggested that it was the effect of higher total phenolic compound content (TPC), which was from 183.68 to 75.99 $\text{mg}/100\text{ g d.w.}$, than in control sample (80.62 $\text{mg}/100\text{ g d.w.}$). Ismail et al. [13] found that supplementation of cookies with 1.0% pomegranate peel extract increased DPPH value from 22.14 to 64.83 $\text{mmol}/100\text{ g}$. The studies on the effect of various content of orange peel in biscuits on the effective concentration (EC_{50}) (the concentration at which sample is effective to exhibit 50% of antioxidants in the reaction) was tested by [18]. Determination of EC_{50} value of DPPH free radical scavenging ability revealed that the sample with the highest substitution (20%) of orange peel had the lowest EC_{50} while the control sample had the highest EC_{50} as the lowest EC_{50} value indicates the highest antioxidants properties.

In order to find a relationship between the parameters measured, a correlation analysis was conducted. Table 1 shows the correlation coefficients between all the parameters tested, and as can be seen, all correlation coefficients were statistically significant, since all the p values calculated for the correlations were below 0.05.

Table 1. Pearson's r coefficients calculated for the correlation between the antioxidant activity (DPPH), diene concentration (CDs) and oxidation induction time (OIT) of the wafer samples.

Parameter	DPPH	CDs	OIT120	OIT100
DPPH	1	−0.78 *	0.73 *	0.70 *
CDs		1	−0.60 *	−0.64 *
OIT 120			1	0.95 *
OIT 100				1

* Significant correlations at $\alpha = 0.05$.

A Pearson's coefficient equal to −0.60 was obtained for the correlation between OIT120 and CDs and −0.64 for the correlation between OIT100 and CDs. A negative correlation indicated that the higher the content of conjugated dienes, the lower the OIT100 and OIT120 values and the lower the oxidative stability of the lipid fraction extracted from the wafers. Correlation analysis between the antioxidant activity (DPPH) and OIT parameters revealed that for the DSC parameters measured (OIT100 and OIT120), high positive correlation coef-

ficients were obtained (0.70 and 0.73, respectively), which means the greater the antioxidant activity, the higher the OIT parameters and the higher the lipids oxidative stability.

4. Discussion

The decrease in the OIT index (OIT100, OIT120) and DPPH value, as well as the increase in the CD concentration in samples LWS and LWE, is proof that the oxidation of lipids has occurred while the wafers were being stored. However, in the case of the LWE samples, the process was slowed down by the fruit extract addition.

To gain more insight into the data obtained, the cluster analysis (CA) and regression analysis were performed. The CA was applied to group samples as the unsupervised pattern recognition technique of multivariate analysis on the basis of similarities in clusters. The Ward method and Euclidean distance between centroids were applied. All data was standardized before analysis. The CA dendrogram enabled three distinct clusters at the Distance of Dlink/Dmax = 58% to be determined (Figure 5). Additionally, a heat map was obtained to show the levels of all parameters in the samples (Figure 5).

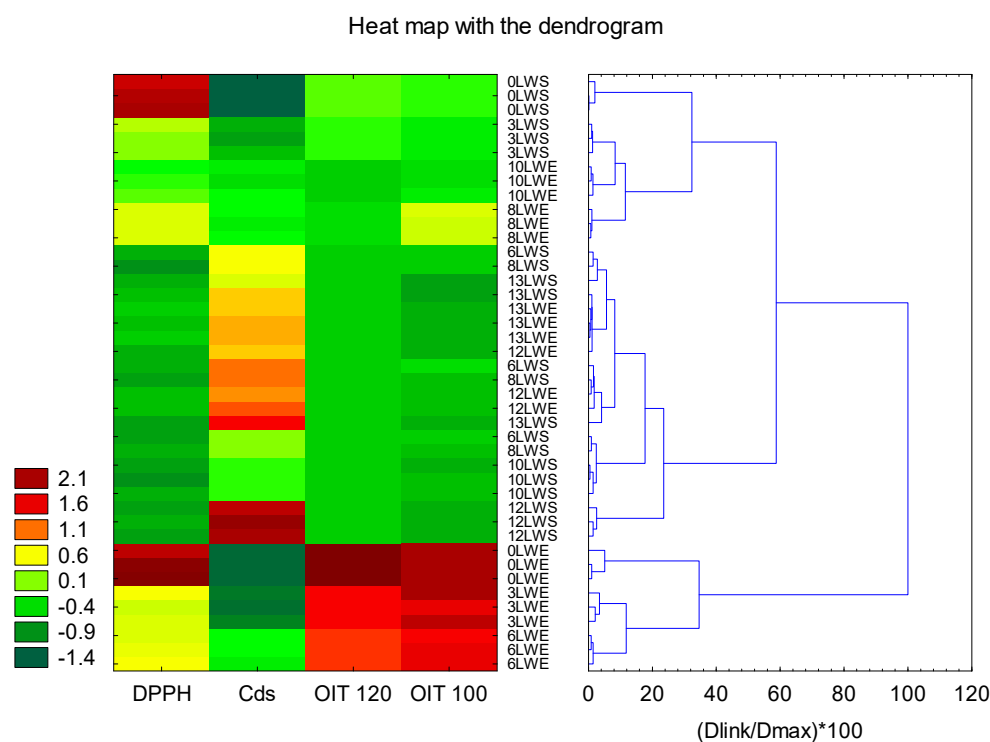


Figure 5. Heat map with the dendrogram of LWS (standard wafers) and LWE (wafers with fruit extract) samples classified using cluster analysis of similarities. Note: DPPH—antioxidant activity; CD—diene concentration; OIT—oxidation induction time 100 °C or 120 °C. Data was standardized.

The first cluster includes the LWE samples stored during the first 6 months: 0LWE, 3LWE, 6LWE (0, 3, 6 months of storage, respectively). Those samples showed the highest OIT and DPPH values and the lowest CD concentration (based on the heat map). The second cluster includes LWS samples stored during the first 3 months (0LWS, 3LWS) and LWE samples after 8 months (8LWE) and 10 months (10LWE) of storage. All other samples were stacked in the third cluster and were characterized by low OIT and DPPH values and high CDs content (as seen from the heat map).

Regression analysis was also applied to show the rate of changes of the parameters measured, as shown in Figure 6a–d.

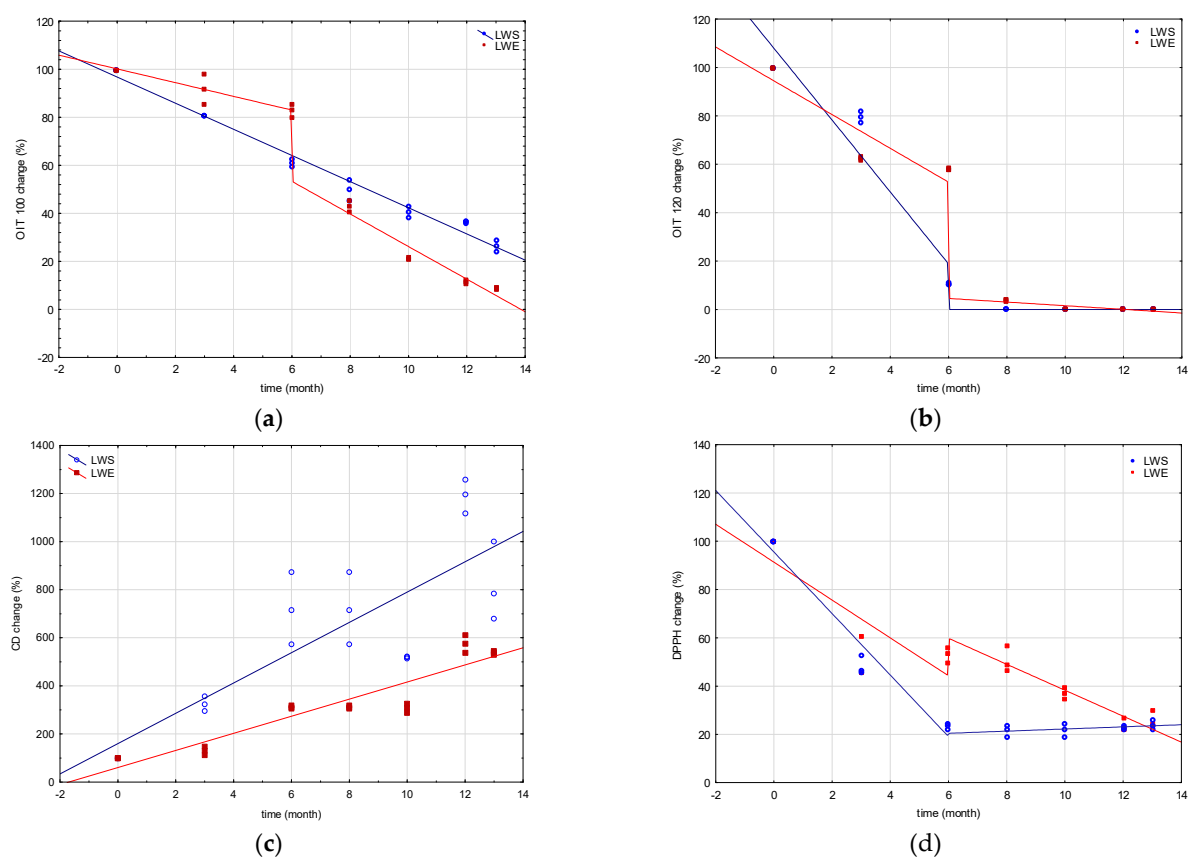


Figure 6. Changes (in %) of (a) DSC OIT index measured at 100 °C, (b) DSC OIT index measured at 120 °C, (c) diene concentration (CD) and (d) the antioxidant activity (DPPH) in time.

When showing the data as %, it enables comparison of the results between various parameters. For the OIT (OIT100 and OIT120) and DPPH values, segmented regression (piecewise regression) was applied. The breakpoint was set at 6 months. The regression coefficients are shown in Table 2.

Table 2. Regression coefficients (β) calculated for changes of the parameters (OIT100, OIT120, CD and DPPH) in time.

Parameter	LWS		LWE	
	β	R^2	β	R^2
OIT 100	$-5.44 (\leq 13)$	0.98	$-2.86 (\leq 6)$ $-6.78 (> 6)$	0.98 0.96
OIT 120	$-14.86 (\leq 6)$ $0^* (> 6)$	0.91 1	$-6.99 (\leq 6)$ $-0.75^* (> 6)$	0.85 1
CDs	$63.03 (\leq 13)$	0.67	$35.57 (\leq 13)$	0.87
DPPH	$-11.32 (\leq 6)$ $-5.37 (> 6)$	0.96 0.85	$-7.85 (\leq 6)$ $2.02^* (> 6)$	0.68 0.98

* Non-significant coefficient at $\alpha = 0.05$.

As can be seen from the figures (Figure 6a–d) and Table 2, the rate of changes is significantly higher in standard (LWS) samples than samples treated with extract (LWE) during the first 6 months of storage for the OIT (Figure 6a,b) and DPPH (Figure 6d) parameters or during the whole storage period for CD parameter (Figure 6c). Predicting changes in OIT after the first month of storage based on the equations in Table 2, it can be noticed the OIT100 value of LWS sample will decrease by 5.44% and OIT120 by 14.86%,

whereas for LWE this decrease will be only by 2.86% (OIT100) and 6.99% (OIT120). At the same time, the CDs will increase two times faster in the LWS sample than the LWE. Moreover, the antioxidant activity changes in the sample with the extract will decrease by 7.85% during one month when compared to the standard sample (LWS) with a decrease of 11.32%. This indicates that the addition of fruit extracts to wafers increased the oxidative stability of the product. The protective effect of the extract is the most evident during the first six months of storage.

Many researchers reported the positive effect of a wide spectrum of plants and their extracts added to the confectionary products including fruit extracts on the oxidative stability of fats [15–18]. Obafaye and Omoba [18] tested the addition of orange peel flour to cookies and confirmed the increase in their antioxidant properties. A similar observation was performed by Ismail et al. [17], after the addition of pomegranate extract to cookies. Szymanowska et al. [15] revealed that the ethanol extract from the wafers with the highest addition of the raspberry extract scavenged the DPPH radical almost ten times more effectively than the control extract. However, all those authors did not investigate the antioxidant activity of the lipid fraction of the confectionary product, which is how it was performed in presented study.

The decrease in the oxidative stability of confectionary products with time [3,10,16] and the protective effect of plant extracts on the lipid fraction has been previously described by other researchers [5,29,32]. However, there are no studies on the oxidative stability of wafers treated with commercially available natural extracts. In the food industry, only ingredients of a repeatable quality could be used to ensure food safety to consumers. Since this extract is of natural origin it can be easily accepted by the consumers and their demands for a “clean label” can be met. Moreover, in contrast to the previous studies carried out at the laboratory scale, in the presented study, wafers were produced in the factory (macro-scale production), which makes these results more valuable for consumers and also producers since they suit to the real production and storage conditions. The oxidation process of confectionary products is of special interest, since the products are treated with high temperature, often contain a high fat content and their storage time is relatively long (12 months for wafers). As it was indicated by Daglioglu et al. [3] the oxidative stability of the wafers decreased during the 12-month storage period and the oxidation process was the most pronounced during the first 3 months. Others [16] showed that the highest peroxide values of cookies with chokeberry extract were obtained after 9 weeks of storage and thereafter decreased. Moreover, there was no protective effect when comparing the treated-samples (with 0.025% and 0.1% of the extract) to control. Similar observations were made in the presented study, that the tested fruit extract was not able to protect lipids for the entire storage period, i.e., 13 months. However, the period of antioxidant activity of extract was relatively long compared to previous studies, i.e., 10 months.

5. Conclusions

The aim of the study was to investigate the effect of adding fruit extract on the oxidative stability of wafers stored for 13 months. For both samples (LWS, LWE), the OIT values and the antioxidant activity decreased, whereas the diene concentration increased with time, indicating the progress of the oxidation process during the storage of wafers. However, the oxidative changes were delayed in the sample with fruit extracts (LWE), proving its antioxidant activity. The protective effect of the extract was most effective during the first six months of storage, since the oxidative changes were two times lower in sample with extract than in control. However, it was not possible to maintain the antioxidative protection of lipids in wafers until the end of storage (13 months), since after 10 months all parameters did not differ significantly for both samples ($p > 0.05$). All in all, in the presented study it was proved at the production scale that the commercial extract can be used for the production of confectionery products, since it was characterized by high stability and effectiveness in delaying oxidation processes during 10 months of storage. The advantage of this extract is that it meets the EU regulations for the use in food and

complies with customers' "clean label" demands, which makes the product more valuable on the market. However some limitations of its use should be highlighted here, such as the risk of its opposite action, which means that it may exhibit prooxidant activity, when added in too high a quantity. Therefore, optimization tests are necessary to adjust the optimal concentration of the extract in the product. Another limitation of the use of the extract is the change in the color of the product, especially when larger amounts of extract are added.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app13010103/s1>, Figure S1: Differential scanning calorimetry (DSC) oxidation induction time (OIT) curve measured for fresh HORO sample at 120 °C temperature.

Author Contributions: Conceptualization, L.B., M.M.-P. and J.T.-G.; methodology, L.B., M.M.-P. and J.T.-G.; formal analysis, L.B., M.M.-P., M.I. and J.T.-G.; investigation, L.B., M.M.-P., M.I. and J.T.-G.; resources, L.B. and J.T.-G.; data curation, L.B., M.M.-P. and J.T.-G.; writing—original draft preparation, L.B., M.M.-P. and J.T.-G.; writing—review and editing, M.M.-P. and J.T.-G.; visualization, L.B., M.M.-P. and J.T.-G.; supervision, M.M.-P. and J.T.-G.; project administration, J.T.-G.; funding acquisition, L.B. and J.T.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministry of Education and Science, grant number DWD/3/35/2019.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- World Wafer Market. Available online: <https://magazinebbm.com/blog/world-wafer-market-1626> (accessed on 2 September 2022).
- Verma, A. *Process Engineering Analysis of Confectionery Wafer Manufacture*; School of Chemical Engineering and Analytical Science: Manchester, UK, 2019.
- Daglioglu, O.; Tasan, M.; Gecgel, U.; Daglioglu, F. Changes in oxidative stability of selected bakery products during shelf life. *Food Sci. Technol. Res.* **2004**, *10*, 464–468. [\[CrossRef\]](#)
- Maire, M.; Rega, B.; Cuvelier, M.E.; Soto, P.; Giampaoli, P. Lipid oxidation in baked products: Impact of formula and process on the generation of volatile compounds. *Food Chem.* **2013**, *141*, 3510–3518. [\[CrossRef\]](#)
- Kozłowska, M.; Żbikowska, A.; Szpicer, A.; Półtorak, A. Oxidative stability of lipid fractions of sponge-fat cakes after green tea extracts application. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 2628–2638. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Xia, W.; Budge, S.M. Techniques for the Analysis of Minor Lipid Oxidation Products Derived from Triacylglycerols: Epoxides, Alcohols, and Ketones. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16*, 735–758. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Barlow, S.M. Toxicological Aspects of Antioxidants Used as Food Additives. In *Food Antioxidants*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1990; pp. 253–307.
- Gramza-Michałowska, A.; Kobus-Cisowska, J.; Kmiecik, D.; Korczak, J.; Helak, B.; Dziedzic, K.; Górecka, D. Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*). *Food Chem.* **2016**, *211*, 448–454. [\[CrossRef\]](#)
- Mildner-Szkudlarz, S.; Zawirska-Wojtasiak, R.; Obuchowski, W.; Gośliński, M. Evaluation of antioxidant activity of green tea extract and its effect on the biscuits lipid fraction oxidative stability. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, S362–S370. [\[CrossRef\]](#)
- Bhat, N.A.; Hamdani, A.M.; Masoodi, F.A. Development of functional cookies using saffron extract. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 4918–4927. [\[CrossRef\]](#)
- Reddy, V.; Urooj, A.; Kumar, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. *Food Chem.* **2005**, *90*, 317–321. [\[CrossRef\]](#)
- Mišan, A.; Mimica-Dukić, N.; Sakač, M.; Mandić, A.; Sedej, I.; Šimurina, O.; Tumbas, V. Antioxidant Activity of Medicinal Plant Extracts in Cookies. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C1239–C1244. [\[CrossRef\]](#)
- Gbenga-Fabusiwa, F.J.; Oladele, E.P.; Oboh, G.; Adefegha, S.A.; Oshodi, A.A. Polyphenol contents and antioxidants activities of biscuits produced from ginger-enriched pigeon pea–wheat composite flour blends. *J. Food Biochem.* **2018**, *42*, e12526. [\[CrossRef\]](#)
- Anuradha, K.; Naidu, M.M.; Manohar, R.S.; Indiramma, A.R. Effect of vanilla extract on radical scavenging activity in biscuits. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 488–492. [\[CrossRef\]](#)
- Szymanowska, U.; Karaś, M.; Bochnak-Niedźwiecka, J. Antioxidant and anti-inflammatory potential and consumer acceptance of wafers enriched with Freeze-Dried Raspberry Pomace. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 6807. [\[CrossRef\]](#)
- Bialek, M.; Rutkowska, J.; Bialek, A.; Adamska, A. Oxidative Stability of Lipid Fraction of Cookies Enriched with Chokeberry Polyphenols Extract. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2016**, *66*, 77–84. [\[CrossRef\]](#)

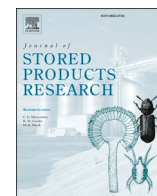
17. Ismail, T.; Akhtar, S.; Riaz, M.; Hameed, A.; Afzal, K.; Sheikh, A.S. Oxidative and Microbial Stability of Pomegranate Peel Extracts and Bagasse Supplemented Cookies. *J. Food Qual.* **2016**, *39*, 658–668. [\[CrossRef\]](#)
18. Obafaye, R.O.; Omoba, O.S. Orange peel flour: A potential source of antioxidant and dietary fiber in pearl-millet biscuit. *J. Food Biochem.* **2018**, *42*, e12523. [\[CrossRef\]](#)
19. Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A.; Saura-calixto, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *270*, 270–276. [\[CrossRef\]](#)
20. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
21. Meda, A.; Lamien, C.E.; Romito, M.; Millogo, J.; Nacoulma, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.* **2005**, *91*, 571–577. [\[CrossRef\]](#)
22. ISO 11357-6; Plastics—Differential Scanning Calorimetry (DSC). European Committee for Standardization: Geneva, Switzerland, 2018.
23. Espin, J.C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 648–656. [\[CrossRef\]](#)
24. Tuberoso, C.I.G.; Kowalczyk, A.; Sarritzu, E.; Cabras, P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chem.* **2007**, *103*, 1494–1501. [\[CrossRef\]](#)
25. AOCS Spectrophotometric Determination of Conjugated Dienoic Acid. In *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists'*; AOCS Press: Champaign, IL, USA, 2003; pp. 1–2.
26. Tomaszewska-Gras, J.; Islam, M.; Grzeca, L.; Kaczmarek, A.; Fornal, E. Comprehensive Thermal Characteristics of Different Cultivars of flaxseed oil (*Linum usitatissimum* L.). *Molecules* **2021**, *26*, 1958. [\[CrossRef\]](#)
27. Islam, M.; Muzolf-Panek, M.; Fornal, E.; Tomaszewska-Gras, J. DSC isothermal and non-isothermal assessment of thermo-oxidative stability of different cultivars of *Camelina sativa* L. seed oils. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2022**, *147*, 10013–10026. [\[CrossRef\]](#)
28. Zbikowska, A.; Kozłowska, M.; Poltorak, A.; Kowalska, M.; Rutkowska, J.; Zbikowska, A. Effect of addition of plant extracts on the durability and sensory properties of oat flake cookies. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2018**, *134*, 1101–1111. [\[CrossRef\]](#)
29. Kozłowska, M.; Zbikowska, A.; Gruczyńska, E.; Żontła, K.; Półtorak, A. Effects of spice extracts on lipid fraction oxidative stability of cookies investigated by DSC. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2014**, *118*, 1697–1705. [\[CrossRef\]](#)
30. Barriuso, B.; Astiasarán, I.; Ansorena, D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: A challenging task. *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, *236*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
31. Domínguez, R.; Pateiro, M.; Gagaoua, M.; Barba, F.J.; Zhang, W.; Lorenzo, J.M. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants* **2019**, *8*, 429. [\[CrossRef\]](#)
32. Zbikowska, A.; Kowalska, M.; Rutkowska, J.; Kozłowska, M.; Onacik-Gür, S. Impact of green tea extract addition on oxidative changes in the lipid fraction of pastry products. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2017**, *16*, 25–35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Publikacja 2 (P2)

Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Waśkiewicz, A.; Rudzinska, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2025). Oxidative stability and colour changes of fat- and sugar-reduced wafer creams during the storage. *Journal of Stored Products Research*, 112.

<https://doi.org/10.1016/j.jspr.2025.102653>



Oxidative stability and colour changes of fat- and sugar-reduced wafer creams during the storage

Liliana Bełkowska^a, Małgorzata Muzolf-Panek^a, Agnieszka Waśkiewicz^b,
Magdalena Rudzinska^a, Jolanta Tomaszewska-Gras^{a,*}

^a Faculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 31/33, 60-624, Poznań, Poland

^b Department of Chemistry, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 75, 60-625, Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr Manoj Nayak

Keywords:

Reformulation
Confectionery product
Wafer filling
Differential scanning calorimetry
Oxidation induction time

ABSTRACT

Consumers are becoming increasingly focused on the quality and nutritional value of their food, particularly in their efforts to combat obesity by reducing sugar and fat content in food products. Newly developed products must therefore undergo thorough evaluation, including storage tests, to confirm their commercial shelf life. The purpose of this research was to examine the effect of reformulation, and specifically, the reduction of fat and sugar content and the addition of 0.1 % natural fruit extract on the quality of wafer creams in a real-time experiment over 13 months of storage. The resulting oxidation induction time (OIT) values showed that reformulation involving fat reduction and fruit extract addition significantly improved the stability of the cream until the final month of storage. This was attributed to the high antioxidant activity of vanillic acid, chrysin, catechin, and pinobanksin, which were found in substantial amounts in the fruit extract powder (a total of 5470.40 µg/g). In contrast, samples with a reduced sugar content exhibited quality parameters similar to those of the control sample, except for colour differences (ΔE), where the highest values were observed. The addition of fruit extract to the wafer cream enhanced the oxidative stability of the lipid fraction, allowing for an extended shelf life without compromising the quality of the wafer fillings.

1. Introduction

Every individual in the world makes food choices based on personal preferences. These decisions are influenced by sociocultural, physiological, and neurological factors (Macbeth, 1997). However, in recent years, consumers have become increasingly focused on the quality and nutritional value of the food they consume. Excessive intake of certain types of food, particularly highly processed products rich in fats, trans-unsaturated fatty acids, salt, and simple sugars, has been linked to an elevated risk of health issues such as overweight and obesity. The alarming rate at which obesity is rising across nearly every part of the world gives cause for serious concern (Estruch et al., 2020; Popkin et al., 2012). Moreover, the global stasis and lockdowns caused by the COVID-19 pandemic contributed to an increased consumption of unhealthy products, such as ultra-processed foods (Ruíz-Roso et al., 2020). The pandemic and ongoing conflicts also disrupted the distribution of raw materials, further complicating supply chains. In light of these challenges, reformulating existing products may become essential due to

various factors (Buttriss, 2013). At the same time, significant environmental concerns, such as global warming, intensify these pressures (Bulkeley and Newell, 2023; Mahato et al., 2019). As a result, production processes must strive for sustainability. Balancing these needs introduces substantial challenges, requiring innovative and forward-thinking solutions. Addressing the challenges of reducing obesity in society involves efforts to lower sugar and fat content in food products. One significant step is limiting the use of palm oil, which has additional justifications beyond its caloric contribution. Palm oil is low in nutritional value due to its high concentration of palmitic acid, known for its pro-inflammatory effects (Estruch et al., 2020). Confectionery products such as cookies, biscuits, and filled wafers are particularly energy-dense because of their high fat and sugar content - the primary ingredients of sweets (Drewnowski et al., 1998; Vahid-Dastjerdi et al., 2020).

Efforts to reformulate confectionery products to reduce caloric value have been explored by various researchers. For instance, in sponge cakes, sucrose was replaced with polyols such as maltitol, xylitol, and

* Corresponding author.

E-mail address: jolanta.tomaszewska-gras@up.poznan.pl (J. Tomaszewska-Gras).

<https://doi.org/10.1016/j.jspr.2025.102653>

Received 16 February 2025; Received in revised form 27 March 2025; Accepted 11 April 2025

Available online 18 April 2025

0022-474X/© 2025 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

erythritol, but only maltitol produced results most similar to sucrose (Hao et al., 2016). Similar studies were conducted on macaroon cookies, where polyols (erythritol, xylitol, sorbitol, and maltitol) were tested as sugar substitutes. The best results were achieved with sucrose being partially or fully replaced by xylitol (Vahid-Dastjerdi et al., 2020). In fat-reduced cookies, wheat and oat bran-based fat replacers in gel form were used. Cookies containing wheat bran gel had higher levels of dietary fibre, minerals and phenolic compounds compared to those with 30 % oat bran gel or full-fat cookies (Milićević et al., 2020). Salehi highlighted the benefits of incorporating powdered fruits and vegetables, which enhance products with vitamins, minerals, natural colorants, polyphenols (PPs), and fibre. Furthermore, since fruits and vegetables are natural rather than synthetic components, they improve consumer acceptance (Salehi, 2020). Potter et al. explored the incorporation of fruit powders (banana, apple, strawberry, and tangerine) into extruded snacks for children and demonstrated a significant impact on the snacks' expansion and density (Potter et al., 2013). The resulting products exhibited an improved nutritional profile compared to traditional extruded snacks, with higher fibre content and reduced levels of fat and sugar. The addition of carrot powder to biscuits was also highlighted as an effective way to enhance dietary fibre content (Salehi, 2020).

Wafers are among the most frequently consumed confectionery products worldwide. Global wafer confectionery market size was valued at USD 15.16 billion in 2023 and is projected to reach USD 24.35 billion by 2031 (Global Market Size, 2024). In Poland, the wafer and wafer market size is also growing significantly. According to IndexBox data, its value reached USD 276 million in 2024, representing a 122 % increase compared to the previous year (Market size in Poland, 2025). Fat and sugar are the primary ingredients used in wafer fillings, serving as carriers for bulk and flavour (Miele et al., 2015; Tiefenbacher, 2019). The proportion of cream in the filling is significant, ranging from 65 % to 82 %. For sugar-fat-based creams, the sugar content typically ranges from 30 % to 60 %, while the fat content falls between 28 % and 42 % (Tiefenbacher, 2017). Due to the high fat content in the filling, preserving freshness by preventing fat oxidation is a key challenge. This is especially important when solid fats are replaced by oils rich in unsaturated fatty acids, which are more susceptible to oxidation, as preserving the product's long-term quality becomes essential. To protect lipids from oxidation, various synthetic or natural antioxidants can be employed. Synthetic antioxidants, such as butylated hydroxyanisole (BHA) or butylated hydroxytoluene (BHT), can enhance stability, but they may also have potential negative health effects (Barlow, 1990). On the other hand, natural antioxidants are more favoured by consumers, as they help maintain a clean label without unwanted "E" additives.

One of the commonly used natural antioxidants in finished products was green tea extract. Research by Mildner Szkudlarz et al. demonstrated that the antioxidant activity of green tea extracts in the biscuits is comparable to synthetic BHA (Mildner-Szkudlarz et al., 2009). Similarly, other studies confirmed not only the beneficial antioxidant effects of adding ground green and yellow tea leaves to cookies but also indicated a significant increase in fibre content (Gramza-Michałowska et al., 2016) and an improvement in the taste, colour, and aroma of the finished product (Ahmad et al., 2015). Kozłowska et al. added spice extracts (thyme and rosemary) to cookies to extend the shelf life of the goods (Kozłowska et al., 2014). Waste raw materials are often used as a source of bioactive compounds including antioxidants (Szymanowska et al., 2021; Wedamulla et al., 2022). The peels, seeds and membrane residues of fresh citrus fruits constitute 50–60 % of total weight (Mahato et al., 2019), and they are rich in flavonoids, alkaloids, coumarins, limonoids, carotenoids, phenolic acids and essential oils. However, not all compounds are present in the same part of fruit. Industrial processing of citrus fruits generates several underexploited by-products, which contain abundant quantities of high-value compounds having numerous health benefits and industrial applications (Panwar et al., 2021).

The processes of isolation and purification enable the acquisition and preparation of a safe extract that remains highly active and rich in

valuable antioxidants. After normalization, it can be utilized in the food industry (Imran et al., 2016), where it is important to produce the food which will remain stable and safe throughout its whole shelf life (Maire et al., 2013; Mori et al., 2021). During storage, physical changes or chemical reactions in ingredients may occur, i.e. crystallization of saccharides, retrogradation of starch or peroxidation of lipids. New developed products need to be fully examined, and storage tests are required to confirm the shelf life of commercial product (Fu and Labuza, 1997; Maire et al., 2013). Therefore, the aim of this study was to examine oxidative stability and quality changes of reformulated three fat-based fillings for wafers: sugar and fat reduced and with citrus fruit extract addition, stored for 13 months at 18 °C.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Preparation of wafer cream samples

All ingredients were sourced from the Polish market. All cream samples were prepared under identical conditions, spread onto wafer sheets, then cooled, cut, and immediately hermetically sealed in polypropylene foil. Before the analysis was conducted, the samples were stored in boxes in storage room for 13 months at 18 °C ± 2 °C and relative humidity 60–65 %. One package of the product was taken for testing after following storage periods: 0, 3, 6, 8, 10, 12 and 13 months. Four creams with different formulations were tested: standard fat-based filling (WS), sugar-reduced (WC), fat-reduced (WT) and fat-reduced with citrus fruit extract addition (WTE) stored for 13 months at 18 °C. The total of sugars and fat content in all samples is shown in Table S1 in the Supplementary material. WS cream sample consisted of the following ingredients: refined palm oil 36 % (w/w), saccharose 38 % (w/w), fat-reduced cocoa powder, skim milk powder and whey powder. In the WC cream, 16 % (w/w) rice starch was added, and sugar content was reduced to 27 % (w/w), while the remaining ingredients were the same as in the WS cream. Both the WT and WTE creams were prepared according to the same recipe (sugar, fat-reduced cocoa powder, skim milk powder, whey powder, rice starch as a filler and sunflower lecithins as emulsifier) and fat content in both samples was reduced to the level of 24 % (w/w). Instead of palm oil, 14 % shea fat and 9 % high oleic rapeseed oil (HORO) were added. A fruit extract (Flavomix BC, polypan) of 0.1 % (w/w) was added to the WTE sample.

2.1.2. Extraction of lipid fraction from cream

The lipid fraction was extracted by n-hexane from the cream, which was separated from the wafer sheets. About 50 g of each type of cream was mixed with n-hexane in a proportion of 1:1 (w/w) and homogenized at 20,000 rpm for 3 min (Zauberstab, 2011-8, Unold AG Hockenheim, Switzerland), after which the mixture was preheated to 35 °C and stirred continuously on a stirrer (FC6S, Velp Scientifica Srl, Usmate Velate, Italy) at 112×g for 1 h. Then the samples were centrifuged (MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland) for 15 min at 2382×g. The centrifuged supernatants were filtered (filter paper MN 640 W, Macherey-Nagel, Dueren, Germany) and n-hexane was evaporated by a rotary vacuum evaporator (The Rotavapor® R-300, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) under the following conditions: pressure 264 mbar, 30 rpm, bath temperature 50 °C, time 30 min. The lipid fraction obtained was poured into a test tube, from which the rest of n-hexane was removed by aerating with nitrogen (1 h). Lipid samples were closed and kept under nitrogen until analysis at temperature –80 °C.

2.2. Determination of antioxidants in fruit extract

The concentration of phenolic compounds in the extract was determined according to the modified method (Muzolf-Panek and Waśkiewicz, 2022), using the Aquity UPLC chromatograph (Waters, Manchester, MA, USA) equipped with a photodiode detector (PDA el

Detector) (Waters, Manchester, MA, USA) and an electrospray ionization triple-quadrupole mass spectrometer (TQD) (Waters, Manchester, MA, USA). The standards and solvents used in chromatographic analysis were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). The sample (1 g) was dissolved in methanol (3 mL) and filtered through a 0.20 µm syringe filter (Chroma-fil, Macherey-Nagel, Duren, Germany) before analyses. The phenolic compounds were separated at 25 °C on a Waters Acquity UPLC HSS T3 column (150 × 2.1 mm/ID, with 1.8 µm particle size) (Waters, Manchester, MA, USA) and applying the EmpowerTM 3 software (Waters, Milford MA, USA). Gradient elution was applied using water containing 0.1 % formic acid (A) and acetonitrile containing 0.1 % formic acid (B) with the flow rate of 0.3 mL/min. The solvent gradient was modified as follows: 0–5 min 25 % B, 5–20 min 40 % B, 20–30 min 60 % B, 30–35 min 90 % B, and 35–40 min 100 % B, followed by a return to the initial conditions. The injection volume was 3 µL. The mass spectrometer was operated in the negative or positive-ion mode with the full scan in the mass range from m/z 100 to 600. The results were presented as the average of three measurements.

2.3. Determining the fatty acid composition

Fatty acid composition was determined by gas chromatography (GC) with chromatograph (Trace 1300, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a FID detector and capillary column SP TM-2650 with a dimension size of 100 m × 0.25 mm × 0.2 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), according to AOCS (AOCS, 2005). An internal standard was prepared by dissolving 0.125 g of methyl heptadecanoate (Sigma Aldrich, USA) in 25 mL of hexane, from which 100 µL was added to the oil sample (±0.01 g). This mixture was then dissolved in 1 mL of hexane (>99 %, Avantor, Gliwice, Poland) and 1 mL of 0.4 M sodium methoxide (Merck, Darmstadt, Germany). The mixture was dissolved in 1 mL of hexane (>99 %, Avantor, Gliwice, Poland) and 1 mL of 0.4 M sodium methoxide (Merck, Darmstadt, Germany). After being properly mixed, the mixtures were kept still for 15 min. Afterwards, 5 mL of distilled water was added into the mixture to stop the reaction. The upper layer of mixtures was taken for GC-analysis. Hydrogen gas (1.5 mL/min) was used as the carrier in the splitless mode of analysis. Analysis was carried out by heating the oven to 160 °C for 1 min, after which the heat was raised to 220 °C by 6 °C/min, while the temperature of inlet and detector was set at 240 °C. By comparing the sample's retention time with the reference material (37 Component FAME Mix, Supelco), the percentage of some prominent fatty acids in the sample was determined.

2.4. DSC oxidative stability test

Thermo-oxidative stability tests of lipids were performed by differential scanning calorimeter (DSC) PerkinElmer DSC 7 equipped with an Intracooler II and operated with Pyris software 10.1., according to the standard ASTM (ASTM, 2019). The apparatus was calibrated using two standards: indium (m.p. 156.6 °C, $\Delta H_f = 28.45$ J/g) and n-dodecane (m.p. -9.65 °C, $\Delta H_f = 216.73$ J/g), 99.99 % pure nitrogen was used as the purge gas. Fat samples of 6–9 mg were weighed into 50 µL open aluminium pans (PerkinElmer, No. 02190041) and transferred to the measuring chamber of the calorimeter. The analysis of the oxidation process was carried out in a permeate oxygen atmosphere at a flow of 20 mL/min (purity 99.995 %). The analysis was carried out in the following steps: stabilizing the temperature of the device to 25 °C, heating the sample under a nitrogen atmosphere to 160 °C, switching the gas from nitrogen to oxygen and measuring the oxidation induction time for 60 min at 160 °C. Analyses were conducted in triplicate. The index of oxidation induction time (OIT) was determined from the normalized DSC curves by calculating the intersection of the extrapolated baseline and the tangent line to the descending exotherm. This was expressed in minutes.

2.5. DPPH antioxidant activity determination in the lipid fraction

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was used to measure the antioxidant activity of fat samples (Espin et al., 2000; Tuberoso et al., 2007). A one-hundred-times-diluted sample of fat was added to a 0.04 mM solution of DPPH in ethyl acetate (the concentration was chosen so that the absorbance reading was in the range of 0.1–0.8). The whole mixture was mixed and incubated at room temperature without light for 1 h. After this time, measurements were taken on a Cary 1E spectrophotometer (Varian, Belrose, Australia) using ethyl acetate as a blank sample. The wavelength of the light was 515 nm. All samples were measured in triplicate. The results were dispatched in µmol TE (Trolox equivalent) per 100 g of fat.

2.6. Conjugated dienes content determination (CD)

For CD determination, the Ti1a-64 method (AOCS, 2005) was used, in which 20 mg of fat sample was mixed with 20 mL of isooctane. If the absorbance readings were too high (above 1), the samples were diluted so that the absorbance did not exceed 1, in order to obtain the lowest error. The dilutions were then included in the calculations. Absorbance (spectra) were measured using a Cary 1E spectrophotometer (Varian, Belrose, Australia), with pure isooctane as a blank sample. A wavelength range of 400 nm–200 nm was used, and results were read at the wavelength 233 nm.

Conjugated dienes concentration was calculated according to the equation:

$$CD = 0.84 \times \left(\left(\frac{a}{b} \times c \right) - K_0 \right) \quad (1)$$

where a is the absorbance, b is the cuvette length (1 cm), c is the sample concentration in isooctane (g/L), and K_0 represents the absorptivity by acid or ester groups (0.07 for esters, 0.03 for acids).

2.7. Peroxide value determination (PV)

In order to assess the primary oxidation products in the fat samples, peroxide value (PV) was determined according to the ISO 3960 standard (ISO 3960, 2017). The sodium thiosulfate (24.9 g) was dissolved in 1L of distilled water (previously boiled). Then, 50 mL of the previously prepared solution was mixed with 500 mL of boiled distilled water. A solution of isooctane and acetic acid was prepared (3:2, v/v). Around 1 g of starch was dissolved in 100 mL of distilled water and a solution of potassium iodide. To do this, 14 g of KI was dissolved in 8 g of cooled distilled water. The solution was saturated, and some of the reagent crystals were at the bottom of the flask. The KI solution was freshly prepared on the day of analysis. A 1 g sample of fat was weighed into the flask, 50 mL of isooctane and acetic acid solution was added, and stirred until the fat was dissolved, then a few drops of starch solution were added. The sample prepared was titrated with sodium thiosulfate until it became discoloured. Analysis was conducted in triplicate.

2.8. Colour measurements

Colour measurements of creams (CIE LAB L^* , a^* , b^*) were carried out using the Konica Minolta CM-5 spectrophotometer (SCI mode - Specular Component Included, D65 as a light source, standard 10° observer) and the SpectraMagic NX software. The instrument was calibrated against a reference white plate before sample measurements. Zero calibration (0 % transmittance) was performed manually before each analysis. To determine the creams' colour, wafer sheets were separated, and the creams were measured directly using the Hunter Lab scale. Parameter L^* indicates lightness (values from 0 to 100 for black and white, respectively), a^* and b^* are chromatic parameters of the colour: parameter a^* takes negative values for the green colour and positive for red one, parameter b^* was determined by blue ($b^* < 0$) and yellow ($b^* > 0$). Each

sample was prepared in three replicates. For one repetition, three automatic measurements were taken on the 8 mm diameter surface of a product.

The colour parameters of the samples analysed, i.e. the chroma (C), hue angle (h°), difference in colour (ΔE) and whiteness index (WI), were calculated according to the formulas (Habekost, 2013; Briones and Aguilera, 2005):

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

$$h^\circ = \tan^{-1}(b^* / a^*) \quad (3)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

2.9. Statistical analysis

The data were analysed using Statistica 13.3 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). ANOVA was performed to check the significance of the effects (time and sample type). The uniformity of variance was tested using the Cochran-Bartlett test. *Post hoc* Tukey's test was applied to create statistically homogeneous groups. The correlation between the parameters was shown using r Pearson's correlation coefficients. Principal component analysis (PCA) was used to detect patterns in dataset and to visualize the relationship between all data. In turn by using General Discrimination Analysis (GDA) classification rules for samples discrimination were calculated. Multivariate linear regression (MLR) analysis was used to show the difference between intercepts and slopes effect of time and sample on OIT values. To compare the rates (slope of the regression equation) of parameter changes with time between the control and treated samples, an equation was used:

$$y = \beta_0 + \beta_1 t + \alpha D + \gamma Dt + \varepsilon \quad (6)$$

where: y - variable value (OIT); β_0 - intercept for control; β_1 - regression coefficient for control sample; α - regression coefficient for dummy variable; γ - regression coefficient for interaction regressor; t - time; D - dummy variable for sample (0 or 1); Dt - interaction regressor: product of dummy variable and time; ε - standard estimation error.

The dummy variable was coded as 0 for WS and 1 for the reformulated sample (WC, WT or WTE), and the interaction regressor is equal to 0 when $D = 0$ or equal to t values, when $D = 1$. Then equation (6) was modified as followed:

$$\text{when } D = 0, y = \beta_0 + \beta_1 t + \varepsilon \quad (7)$$

$$\text{when } D = 1, y = (\beta_0 + \alpha) + (\beta_1 + \gamma)t + \varepsilon \quad (8)$$

α gives the difference in intercepts between WS and other samples, whereas γ gives the difference in slopes between the two groups (WS and reformulated samples). Thus, the null hypothesis that the two slopes are equal (test for interaction) is equivalent to $\gamma = 0$. The t -test was used to evaluate the significance of the regression coefficients. Discrimination coefficients (R^2) were used to assess curve fitting and ANOVA to evaluate the significance of linear regression. The level of significance for all analyses was set at $\alpha = 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Composition of lipid fraction of cream and citrus fruit extract

Table 1 presents the composition of fatty acid of lipid fraction extracted from the wafer creams (WS, WC, WT, WTE). The most abundant fatty acid in a lipid fraction of cream samples was palmitic acid (C16:0) in WS and WC samples (347.8–419.7 mg/g), while in WT and WTE samples, oleic acid (C18:1) was detected in the highest amount (370.5–396.6 mg/g). At the end of storage for all samples, lower content of α -linolenic acid (C18:3, $n-3$) was observed, compared to the fresh samples, while in the case of linoleic acid (C18:2), lower amounts were only determined for WC and WTE samples. A similar observation regarding slight changes in the fatty acid content was also reported in studies on margarine and butter cookies stored for 18 weeks (Bialek et al., 2016).

Table 2 presents the main citrus phenolic acids and flavonoids in

Table 2
Composition of antioxidants in citrus fruit extract.

Compound	Concentration ($\mu\text{g/g}$)
Phenolic acids:	
vanillic acid	2556.80 $\pm$ 22.88
p-coumaric acid	113.10 $\pm$ 8.90
trans-hydroxycinnamic acid	36.10 $\pm$ 2.22
trans-ferulic acid	11.90 $\pm$ 0.44
Flavonoids:	
chrysin	1157.90 $\pm$ 28.86
catechin	608.00 $\pm$ 15.16
pinobanksin	458.60 $\pm$ 2.97
rutin	198.60 $\pm$ 4.67
naringenin	107.90 $\pm$ 1.05
quercetin	138.30 $\pm$ 6.49
pinocembrin	52.00 $\pm$ 2.39
myricetin	31.20 $\pm$ 3.56
Σ total	5470.40

Values are given as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

Table 1

Fatty acid composition of fat fraction of cream samples (WS, WC, WT, WTE) fresh and stored 13 months.

Storage time (months)	Fatty acids content (mg/g)					
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 ($n-3$)
WS						
0	7.8 ^c $\pm$ 0.9	387.5 ^{bc} $\pm$ 33.5	44.5 ^b $\pm$ 4.5	327.7 ^{ab} $\pm$ 30.8	67.8 ^a $\pm$ 5.6	2.9 ^a $\pm$ 0.3
13	7.9 ^c $\pm$ 0.4	419.7 ^c $\pm$ 22.6	47.4 ^b $\pm$ 3.0	335.4 ^{abc} $\pm$ 19.7	68.1 ^a $\pm$ 3.7	2.2 ^a $\pm$ 0.3
WC						
0	7.9 ^c $\pm$ 0.2	415.4 ^{bc} $\pm$ 14.2	44.8 ^b $\pm$ 1.4	327.1 ^{ab} $\pm$ 12.5	68.9 ^{ab} $\pm$ 2.7	2.1 ^a $\pm$ 0.1
13	6.6 ^{bc} $\pm$ 0.2	347.8 ^b $\pm$ 5.8	39.5 ^{ab} $\pm$ 0.5	284.4 ^a $\pm$ 4.4	57.6 ^a $\pm$ 1.4	1.8 ^a $\pm$ 0.2
WT						
0	4.9 ^{ab} $\pm$ 0.1	241.9 ^a $\pm$ 0.1	32.6 ^a $\pm$ 0.2	370.5 ^{bc} $\pm$ 0.8	82.2 ^{bc} $\pm$ 0.4	9.1 ^b $\pm$ 0.1
13	5.2 ^{ab} $\pm$ 0.3	255.0 ^a $\pm$ 7.9	34.3 ^a $\pm$ 0.9	383.9 ^{bc} $\pm$ 11.7	83.5 ^c $\pm$ 1.9	9.0 ^b $\pm$ 0.5
WTE						
0	4.8 ^a $\pm$ 0.4	231.8 ^a $\pm$ 13.7	32.3 ^a $\pm$ 1.5	395.0 ^c $\pm$ 16.0	88.2 ^c $\pm$ 4.1	10.2 ^b $\pm$ 0.8
13	4.9 ^{ab} $\pm$ 0.4	240.2 ^a $\pm$ 13.9	33.2 ^a $\pm$ 1.7	396.6 ^c $\pm$ 19.6	86.2 ^c $\pm$ 4.2	9.6 ^b $\pm$ 0.8

Values are given as mean $\pm$ SD ($n = 3$). Different letters (a, b, c) in the same column indicate significant difference ($p \leq 0.05$). WS - standard, WC- sugar-reduced, WT - fat-reduced and WTE - fat-reduced with fruits extract.

fruits extract powder. The total content of all phenolic compounds was 5470.4 $\mu\text{g/g}$, which is a comparable to the value determined in dried orange peel powder (3661.9–4489.2 $\mu\text{g/g}$) (Jeong et al., 2022). A higher amount of total flavonoids was found in the ponkan mandarins (*Citrus reticulata*) at the level of 9070 $\mu\text{g/g}$ (Ho and Lin, 2008). As can be seen from Table 2, the main phenolic acid present in the largest amount was vanillic acid (2556.80 $\mu\text{g/g}$) and among the flavonoids the most abundant was chrysin (1157.90 $\mu\text{g/g}$). A smaller amount of vanillic acid was found in heat-treated citrus fruit Huyou peel (160.71 $\mu\text{g/g}$) (Xu et al., 2007).

3.2. Effect of reformulation on oxidative stability changes of wafer creams during storage

Oxidative stability measurement of extracted lipid fraction from stored wafer creams included determining their thermo-oxidative stability, expressed as oxidation induction time (OIT), conjugated dienes content (CD), and peroxide value (PV). Additionally, DPPH radical scavenging activity was also assessed. The thermo-oxidative stability of the wafer cream was determined based on the OIT value calculated from DSC oxidation curve, obtained at the isothermal conditions at a temperature of 160 °C. The OIT parameter refers to the starting point of the oxidation process. This parameter was taken into account, as it was assumed that OIT decreases with the deterioration of fat during storage, as proven by previous research (Islam et al., 2023). The changes in the OIT values of the wafer cream samples stored for 13 months are shown in Fig. 1.

As shown in Fig. 1, both time and sample type had a significant impact on the OIT parameter. The OIT values decreased for all samples, indicating that oxidation progressed over time. The entire set of samples can be divided into two distinct groups: the first group includes WS (standard wafer cream) and WC (sugar-reduced wafer cream), while the second consists of WT (fat-reduced wafer cream) and WTE (fat-reduced wafer cream with fruits extract). The greatest difference in OIT between these two groups was observed at the beginning of the storage period. For fresh samples (0 months), the OIT values for WT and WTE were higher than that of WS, with differences of 23.3 and 18.7 min, respectively. In contrast, the difference between fresh samples of WC and WS was minimal (0.8 min). Over time, the OIT values of WT and WTE gradually converged toward those of WS and WC. However, even after 13 months of storage, the difference between the two groups remained

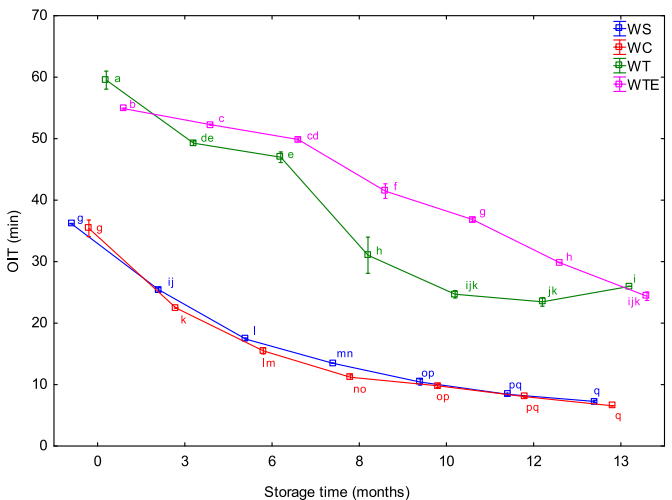


Fig. 1. Changes in DSC OIT values for wafer cream samples: standard (WS), sugar-reduced (WC), fat-reduced (WT) and fat-reduced with fruits extract (WTE) during 13 months of storage. Values are given as mean with standard deviation. Different letters (a–q) indicate significant differences between storage time within cream types ($p \leq 0.05$).

significant. By the 13th month, the OIT values for WT and WTE remained higher than for WS by 18.7 and 17.1 min, respectively. This observation was supported by MLR (multiple linear regression) analysis with dummy variables, representing the factor type of sample and interaction regressor (Table 3). The regression coefficients for dummy variables (α), which gave the difference in intercepts between two regression lines, WS and treated samples (WC, WT or WTE), were statistically significant for the WT and WTE samples and not for WC. This means that the WT as well as the WTE regression lines at time 0 were separated (about 25.9 and 25.9, respectively) from WS. However, because the within-sample type regressions of OIT on time were not parallel (statistically significant regression coefficient ($\gamma = -0.75$) for WT interaction regressor): i.e. the fall for WT was significantly larger than for WS (-2.9 and -2.2 , respectively), the distance between WT and WS regression lines decreased. This was not observed when comparing WS and WTE or WS and WC samples (not statistically different slopes for interaction regressor (γ)- parallel regression lines). There was also a significant difference between the WT and WTE samples observed. Based on the OIT results, the favourable effect of citrus fruit extract during the 12-month storage period could be indicated. For the WT sample, a sharp decrease in OIT was observed up to the 10th month of storage. Between the 3rd and 10th month, the OIT values for WT samples were lower than for WTE, indicating the higher oxidative stability of wafer cream with the extract. From the 10th to the 12th month, OIT for WT remained stable but was significantly lower than for the WTE sample. In the 13th month, the value of the OIT for WT was not statistically different from the values of the OIT for the WTE sample. However, when considering the entire storage period, the slopes of the regression of OIT on time were significantly different between WT and WTE samples (-2.9 and -2.4 , respectively), which is shown by MLR analysis (Table 3). On the other hand, comparing the average results of OIT for WS and WC samples, it can be concluded that reducing sugar levels had no significant effect on OIT. Comparing the mean percentage decrease in OIT from day 0 to the 13th month across all samples, for WS, WC, and WT a reduction of approximately 16 % was observed, while for the WTE sample only a 10 % decrease was noted. This suggests a protective effect of the extract addition. This finding aligns with previous research, where the fruits extract was added to wafer sheets and significantly higher OIT values were observed for lipid fraction from wafer sheets with fruit extract (Bełkowska et al., 2023). In other studies on the oxidative stability of cookies, the DSC technique was also used, although only non-isothermal mode with different heating rates was applied, for which onset temperature lipid oxidation was measured. The rosemary extract was reported as the best antioxidant with significantly higher onset temperature values for cookies after 3 weeks of storage (Kozłowska et al., 2014). In the case of cookies with green tea extracts, with the addition of blackcurrant seeds and nettles the values of onset temperatures for lipid fraction were also significantly higher than for the control sample over 3 months of storage. As in our study, it was reported

Table 3
Results of the multiple linear regression (MLR) analysis with the dummy variables ($D = 0$ for WS, and $D = 1$ for treated samples) and interaction regressors ($D \times \text{time}$) of OIT values for stored wafers cream samples (WS, WC, WT, WTE).

	β_0	β_1	α	γ	ε	p
WS	32.96*	-2.16*	0	0	2.25	0.000
WC	32.96*	-2.16*	-2.09	0.097	2.64	0.000
WT	32.96*	-2.16*	25.89*	-0.75*	3.37	0.000
WTE	32.96*	-2.16*	25.91*	-0.20	2.75	0.000

β_{0-1} , α , γ MLR coefficients: β_0 – intercept for control; β_1 – regression coefficient for control sample (slope); α – regression coefficient for dummy variable (effect of sample, gives the difference in intercepts between the two regression lines – WS and other sample); γ – regression coefficient for interaction (gives the difference in slopes between the two regression lines – WS and other sample); and ε – standard estimation error; p – p values calculated from ANOVA for MLR; * - indicates statistically significant coefficients.

that oxidative stability of cookies declined over the storage time as lower onset temperature were observed (Zbikowska et al., 2018).

With a view to investigating more deeply the progress of lipids oxidation in tested samples (WS, WC, WT, WTE) during 13 months of storage, conjugated dienes (CDs), the peroxide value (PV) and DPPH assay were also determined, for which the results are shown in Table 4. When fat-containing foods are processed and stored for long period, the process of ongoing lipids oxidation is very complex and produces a wide range of new compounds, which affect the final quality of food. The first phase of lipid oxidation leads to peroxides forming from PUFA, called primary oxidation products, which can be measured by peroxide value (PV). Then, electron delocalization occurs to stabilize the radical state, which causes double-bond rearrangement and conjugated dienes and trienes are produced as secondary oxidation products, which can be easily detected at 233 and 268 nm.

In the course of analysing the peroxide value (PV), some differences between four types of creams were observed, depending on both the type of cream and the time of storage (Table 4). The PV values increased over time up to the 10th month for WS and up to the 8th month for WC and WT samples. For the WTE sample, the maximum PVs plateaued between 6 and 10 months of storage. After reaching this maximum level, a decrease in PVs was reported, and after 10 months, the PV values for all samples dropped to 0. The highest PV was observed for the WS sample (53.4 meq O₂/kg), followed by WC (35.4 meq O₂/kg), WTE (39.4 meq O₂/kg) and WT (29.1 meq O₂/kg). It should also be noted that after 3 months the PV value was tripled for WS and was doubled for WC, while for WTE it doubled after 6 months of storage. It is particularly worth noting here that for the WS and WC samples, a 6- and 5-fold increase from the PV value for the fresh sample to the maximum PV value was observed, respectively. In turn, for the WT and WTE samples, this increase was only 1.6- and 2.5-fold, which proves that the oxidation processes were slowed down. These observations confirm the previously presented OIT results (Fig. 1). In other studies on biscuits using an accelerated test, an increase in PV to 12.5 meq O₂/kg for the control sample and to 3.4 meq O₂/kg for sample with green tea extract was also observed, although the storage period was only 20 days (Mildner-Szkudlarz et al., 2009). Higher PVs were observed in an experiment with margarine and butter cookies with addition of chokeberry extract. The highest level of PV, around 5 meq O₂/kg, was noticed after 9 weeks of butter cookies storage (Bialek et al., 2016). The highest

PVs were observed in the study on sponge-fat cakes, for which PV value reached a maximum after 14 days of storage of 89.55 meq O₂/kg. However, with the addition of green tea extract, the PV value dropped to a value of 43 meq O₂/kg (Kozłowska et al., 2019).

The next parameter presented in Table 4 is conjugated dienes (CD) content as secondary oxidation products. It can be seen that in the 0 and 3rd month the content of CD was similar for all the samples and was less than 0.2 %. This was the so-called 'lag phase' of the oxidation process, when the accumulation of diene products is slow (Domínguez et al., 2019). Then, after 3 months, the CD concentration increased and reached a maximum at a time depending on the type of sample (Table 4). Among all the fresh samples, the mean CD value for the WC was the lowest and after 6 months reached its maximum level (0.86 %), followed by a sharp decrease in the 8th month and further stabilization. The highest value of CD (1.7 %) was observed for the WS sample after 10 months of storage, for the WT sample after 8 months (1.42 %), while for the WTE it was after 10 months of storage (1.29 %). The CD values then fall steeply, stabilizing at the level 0.32–0.47 % for all samples. When analysing the exponential function of the regression model of the CD changes over time (up to the point of maximum CD value), it could be seen that the formation of dienes was the fastest in the WC sample, followed in decreasing order by the WS, WT and WTE samples (Fig. 1S, supplementary material). This is supported by the regression coefficient values for time, which were 0.38, 0.29, 0.28 and 0.22 for WC, WS, WT and WTE samples, respectively.

Similar effects of storage time on the conjugated diene formation were observed in other studies, where the K232 value (UV extinction ratio at 232 nm related to CD content) increased during one month of cookie storage or four months of biscuit storage (Giuffrè et al., 2022; Zbikowska et al., 2018). The formation of diene structures is affected not only by the time but also by the fatty acid composition (qualitative and quantitative), as well as the constituting other components (Jaldani et al., 2024). The number and position of double bonds influence the rate of oxidation, with the rearrangement of the double bond in peroxides always requiring polyunsaturated fatty acids (Barriuso et al., 2013; Xia and Budge, 2017). Thus, the higher content of linoleic acid (C18:2) and α -linolenic acid (C18:3, *n*-3) in the WT sample compared to the WS and WC samples contributed to the higher content of CD from the 3rd to the 8th month of storage. Moreover, the fruit extract added to the fat fraction of the WTE sample acted as an antioxidant, scavenging of free

Table 4

Changes in peroxide value (PV), conjugated dienes (CD) and DPPH radical scavenging activity of wafer cream samples (WS, WC, WT, WTE) during 13 months of storage.

	Storage time (months)	WS	WC	WT	WTE
Peroxide Value (PV) (meq O ₂ /kg)	0	8.56 ^d ± 1.04	7.05 ^d ± 0.66	21.58 ^b ± 0.88	15.68 ^b ± 2.32
	3	24.12 ^c ± 2.16	13.57 ^c ± 2.41	16.99 ^c ± 1.10	18.09 ^b ± 0.47
	6	44.14 ^b ± 0.99	19.49 ^{bc} ± 2.49	24.05 ^b ± 2.03	38.57 ^a ± 3.61
	8	48.75 ^{ab} ± 2.17	35.40 ^a ± 4.82	29.13 ^a ± 1.63	39.46 ^a ± 0.99
	10	53.35 ^a ± 3.35	20.22 ^b ± 0.3	23.54 ^b ± 1.46	39.02 ^a ± 3.25
	12	–	–	–	–
	13	–	–	–	–
	–	–	–	–	–
Conjugated Dienes (CD) (%)	0	0.14 ^e ± 0.00	0.09 ^c ± 0.00	0.17 ^c ± 0.01	0.18 ^c ± 0.03
	3	0.14 ^e ± 0.04	0.17 ^c ± 0.01	0.18 ^{de} ± 0.05	0.14 ^e ± 0.02
	6	0.62 ^c ± 0.10	0.86 ^b ± 0.21	0.66 ^b ± 0.11	0.71 ^b ± 0.02
	8	1.36 ^b ± 0.18	0.34 ^{bc} ± 0.02	1.42 ^a ± 0.06	0.72 ^b ± 0.04
	10	1.70 ^a ± 0.05	0.50 ^b ± 0.16	0.68 ^b ± 0.07	1.29 ^a ± 0.01
	12	0.38 ^d ± 0.01	0.45 ^b ± 0.02	0.33 ^{cd} ± 0.01	0.32 ^d ± 0.01
	13	0.43 ^{cd} ± 0.01	0.47 ^b ± 0.01	0.42 ^c ± 0.01	0.39 ^c ± 0.02
	–	–	–	–	–
DPPH [TEAC μmol/100 g]	0	44.03 ^a ± 4.25	60.40 ^a ± 1.13	65.74 ^a ± 5.02	78.31 ^a ± 2.86
	3	39.51 ^{ab} ± 3.47	33.42 ^c ± 0.03	44.07 ^b ± 0.68	44.06 ^b ± 1.62
	6	34.17 ^{ab} ± 0.59	31.55 ^c ± 1.13	45.48 ^b ± 0.99	41.77 ^b ± 4.42
	8	37.41 ^{ab} ± 7.79	31.55 ^c ± 1.13	42.48 ^b ± 1.83	42.69 ^b ± 0.67
	10	33.25 ^b ± 2.07	31.11 ^c ± 1.64	39.48 ^b ± 2.80	37.57 ^b ± 1.27
	12	32.30 ^b ± 0.83	34.51 ^c ± 0.46	42.82 ^b ± 0.02	41.45 ^b ± 2.56
	13	41.48 ^{ab} ± 1.64	40.01 ^b ± 2.28	45.87 ^b ± 4.30	37.61 ^b ± 1.21
	–	–	–	–	–

Values are given as mean ± SD (n = 3). Different letters (a, b, c) in the same column indicate significant difference (p ≤ 0.05). WS - standard, WC - sugar-reduced, WT - fat-reduced and WTE - fat-reduced with fruits extract.

radicals and thus reducing the intensity of CD formation throughout wafer storage compared to the WT sample. This was evidenced by the fact that the highest CD content was reached two months later and was lower than in the WT sample.

Additionally, the antioxidant activity of the four test samples (WS, WC, WT and WTE) was investigated by using the DPPH radical scavenging method. As can be seen from Table 4, a statistically significant effect of time and reformulation was found ($p \leq 0.05$). For fresh samples, the highest antioxidant activity (DPPH) was observed for the WTE sample, followed in decreasing order by WT, WC and WS. The average DPPH values at the beginning of storage (0 month) were: 78.3 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ for WTE, 65.7 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ for WT, 60.40 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ for WC and 44.03 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ for WS. After 3 months, a sharp decrease was observed for all samples, except the WS sample, for which the values remained at a level of values that did not differ statistically until the end of the storage period ($p > 0.05$). In the 13th month, the value decreased to a level that was not statistically different between the samples (WS, WC, WT, WTE), the values ranged from 31 to 46 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ($p > 0.05$). In other studies, a similar effect of the decrease in the DPPH radical scavenging activity in biscuits with the addition artichoke extract during storage was found (José et al., 2023). The protective effect of the herb extract on the oxidative stability of cookies was also observed, where it was stated that the antioxidant activity increased with a correspondingly increasing content of the extract (Mišan et al., 2011). As in our study, the time-dependent effect on the oxidative stability of cookies was also observed. The antioxidant properties of peel extract of mosambi (sweet orange) added to cookies was proved (Imran et al., 2016), with the antibacterial, antifungal, and anti-inflammatory activity of orange peel extract also being demonstrated (Mori et al., 2021; Saleem and Saeed, 2020). Summing up, our results proved that the addition of fruit extract to the wafer cream containing a high amount of phenolic compounds, including phenolic acids and flavonoids, increased the antioxidant activity of the WTE sample, as shown in Table 2. This is the effect of high

antioxidant activity of vanillic acid, chrysin, catechin and pinobanksin, found in substantial amounts from 459 to 2557 $\mu\text{g}/\text{g}$ in the fruit extract (Table 2). Catechin or quercetin showed significantly higher DPPH radical scavenging activity than chrysin (Mohammed et al., 2023).

3.3. Effect of reformulation on the colour changes during storage

The surface colour of food products is the first important characteristic that consumers perceive and this influences food acceptance (León et al., 2006). The colour formation of confectionery products depends on the ingredients used in their production and the processing conditions. The type of functional additives or colorants introduced, as well as the amount used, also has an important impact. In packaged low-moisture foods such as crackers, wafers, and cookies, a crucial factor in quality degradation during storage is fat oxidation (Manzocco et al., 2020). Undesirable changes in food during storage, including lipids oxidation, can cause a decrease in taste quality, nutrient value and colour (Wąsowicz et al., 2004). Table 5 shows the changes in the colour (CIE $L^*a^*b^*$) parameters measured, as well as calculated parameters, such as chroma (C), angle hue (h°) and difference in colour (ΔE) for the four test samples (WS, WC, WT, WTE) during 13 months of storage. A significant effect of storage time on the values of colour parameters $L^*a^*b^*$ for wafer fillings can be observed ($p \leq 0.05$). The values of the L^* parameter for WS sample increased during first eight months, reaching a maximum (48.3) in the 8th month, after which a slight decrease was observed until the 12th month, followed by an increase in the 13th month to the same level as in the 3rd month of storage. The lightness of the sugar-reduced sample (WC) increased during first three months from the value 41.8 to 48.6, after which it remained at the stable level till the end of the storage period. With regard to the WT and WTE samples, it can be seen that the L^* value for WT stood at the same level at the beginning and at the end of storage, registering a minimum value in the 8th month (43.13), while for WTE a decrease to a value of 41.7 was

Table 5

Colour changes ($L^*a^*b^*$, C, h° , ΔE , WI) of four cream samples (WS, WC, WT, WTE) during 13 months of storage.

Sample	Time (months)	L^*	a^*	b^*	C	h°	ΔE	WI
Standard cream (WS)	0	44.91 ^c ±0.22	9.48 ^c ±0.12	16.32 ^b ±0.35	18.87 ^b ±0.36	59.86 ^{abc} ±0.33	–	41.77 ^{cde} ±0.09
	3	46.57 ^b ±0.69	10.09 ^a ±0.09	17.05 ^a ±0.40	19.82 ^a ±0.39	59.41 ^{bc} ±0.38	2.35 ^d ±0.17	43.01 ^{bc} ±0.53
	6	46.52 ^b ±0.28	10.03 ^{ab} ±0.06	17.31 ^a ±0.23	20.01 ^a ±0.22	59.95 ^{abc} ±0.22	1.98 ^d ±0.17	42.90 ^{bcd} ±0.31
	8	48.28 ^a ±0.38	9.96 ^{ab} ±0.04	17.57 ^a ±0.06	20.20 ^a ±0.06	60.47 ^{ab} ±0.11	3.63 ^a ±0.35	44.48 ^a ±0.36
	10	44.52 ^c ±0.31	9.27 ^{cd} ±0.14	15.40 ^c ±0.15	17.97 ^c ±0.20	58.98 ^c ±0.15	1.06 ^{bc} ±0.11	41.68 ^{de} ±0.35
	12	44.39 ^c ±0.40	9.57 ^{bc} ±0.09	15.96 ^{bc} ±0.09	18.61 ^{bc} ±0.12	59.07 ^c ±0.12	0.70 ^c ±0.24	41.36 ^c ±0.42
	13	46.81 ^b ±0.75	8.83 ^d ±0.38	15.72 ^{bc} ±0.16	18.03 ^c ±0.32	60.72 ^a ±0.85	1.63 ^{bd} ±0.14	43.83 ^{ab} ±0.80
Sugar-reduced cream (WC)	0	41.82 ^b ±1.06	9.68 ^b ±0.29	15.83 ^c ±0.59	18.56 ^c ±0.66	58.59 ^d ±0.19	–	38.93 ^b ±1.21
	3	48.62 ^a ±0.20	9.94 ^b ±0.06	17.82 ^a ±0.20	20.41 ^{ab} ±0.15	60.87 ^a ±0.41	7.09 ^a ±0.24	44.72 ^a ±0.14
	6	48.98 ^a ±0.18	9.74 ^b ±0.06	17.05 ^b ±0.16	19.64 ^b ±0.16	60.29 ^b ±0.15	7.27 ^a ±0.17	45.33 ^a ±0.19
	8	48.44 ^a ±0.23	9.73 ^b ±0.07	17.13 ^{ab} ±0.13	19.70 ^{ab} ±0.14	60.44 ^{ab} ±0.08	6.75 ^a ±0.21	44.81 ^a ±0.25
	10	48.32 ^a ±0.38	9.68 ^b ±0.05	17.13 ^{ab} ±0.12	19.67 ^{ab} ±0.13	60.57 ^{ab} ±0.07	6.63 ^a ±0.39	44.70 ^a ±0.32
	12	48.20 ^a ±0.85	9.62 ^b ±0.03	17.13 ^{ab} ±0.14	19.65 ^b ±0.14	60.71 ^{ab} ±0.13	6.52 ^a ±0.85	44.60 ^a ±0.77
	13	48.21 ^a ±0.26	10.33 ^a ±0.02	17.64 ^{ab} ±0.09	20.45 ^a ±0.07	59.68 ^c ±0.17	6.67 ^a ±0.26	44.32 ^a ±0.23
Fat-reduced cream (WT)	0	46.45 ^{ab} ±0.63	10.07 ^c ±0.01	16.35 ^c ±0.21	19.20 ^c ±0.18	58.40 ^b ±0.30	–	43.11 ^{ab} ±0.66
	3	45.84 ^{abc} ±0.44	10.43 ^b ±0.21	17.81 ^b ±0.30	20.64 ^b ±0.35	59.68 ^a ±0.26	1.90 ^c ±0.10	42.04 ^c ±0.51
	6	45.19 ^c ±0.18	10.42 ^b ±0.09	17.83 ^b ±0.19	20.65 ^b ±0.21	59.72 ^a ±0.08	1.98 ^c ±0.05	41.43 ^c ±0.10
	8	43.13 ^d ±0.15	10.42 ^b ±0.04	17.85 ^b ±0.16	20.67 ^b ±0.13	59.76 ^a ±0.30	3.66 ^a ±0.09	39.49 ^d ±0.11
	10	43.85 ^d ±0.08	10.74 ^a ±0.11	18.33 ^a ±0.06	21.25 ^a ±0.04	59.68 ^a ±0.31	3.34 ^b ±0.08	39.96 ^d ±0.08
	12	45.58 ^{bc} ±0.28	10.13 ^c ±0.04	16.45 ^c ±0.09	19.32 ^c ±0.09	58.40 ^b ±0.04	0.71 ^d ±0.10	42.25 ^{bc} ±0.29
	13	46.64 ^a ±0.22	9.95 ^c ±0.08	16.27 ^c ±0.05	19.07 ^c ±0.04	58.58 ^b ±0.24	0.36 ^c ±0.02	43.33 ^a ±0.21
Fat-reduced cream with fruits extract addition (WTE)	0	44.88 ^{ab} ±0.10	9.95 ^b ±0.21	15.89 ^d ±0.18	18.75 ^{cd} ±0.09	57.98 ^c ±0.80	–	41.78 ^{ab} ±0.11
	3	44.50 ^{abc} ±0.21	9.59 ^c ±0.11	15.68 ^d ±0.09	18.38 ^d ±0.12	58.58 ^{abc} ±0.20	0.60 ^c ±0.05	41.54 ^a ±0.24
	6	45.76 ^a ±0.90	9.91 ^{bc} ±0.22	16.14 ^d ±0.43	18.94 ^c ±0.41	58.48 ^{bc} ±0.80	1.51 ^b ±0.20	42.55 ^a ±0.81
	8	44.95 ^{ab} ±0.79	10.22 ^b ±0.08	17.26 ^{bc} ±0.20	20.06 ^b ±0.21	59.39 ^{ab} ±0.19	1.54 ^b ±0.15	41.41 ^{ab} ±0.76
	10	44.14 ^{bc} ±0.67	10.19 ^b ±0.02	17.44 ^{ab} ±0.07	20.20 ^b ±0.07	59.73 ^a ±0.08	1.79 ^b ±0.34	40.60 ^{bc} ±0.63
	12	43.04 ^{cd} ±0.23	10.61 ^a ±0.03	17.94 ^a ±0.07	20.84 ^a ±0.07	59.43 ^{ab} ±0.08	2.73 ^a ±0.11	39.34 ^{cd} ±0.24
	13	41.69 ^d ±0.15	10.25 ^b ±0.04	16.83 ^c ±0.02	19.71 ^b ±0.04	58.70 ^{abc} ±0.07	3.34 ^a ±0.15	38.45 ^d ±0.15

Values are given as mean $\pm$ SD ($n = 3$). Different letters (a, b, c) in the same column indicate significant difference ($p \leq 0.05$). WS - standard, WC - sugar-reduced, WT - fat-reduced and WTE - fat-reduced with fruits extract. c – chroma, h° - angle hue, ΔE - difference in colour, WI - whiteness index.

observed until the 13th month. In other words, the WTE sample was the darkest of all samples at the end. This is supported by the highest decrease in the whiteness index (WI) value over time for the WTE sample. A similar effect of increased colour lightning was also observed in other studies, where the significant effect of time and functional additives on the surface colour of cookies during six months of storage was shown (Popov-Raljić et al., 2013). The authors observed a lighter colour on the top surface of the products after 180 days of storage.

The second parameter of colour measurement is a^* value, which was positive for all samples, indicating the impact of red colour. Throughout the storage period, it remained at a relatively stable level for all samples, except WS, for which a significant decrease occurred after 12 months to the lowest a^* value for all samples (8.83). Taking into account the total mean values of a^* parameter, the samples can be arranged in decreasing a^* order as follows: WT, WTE, WC and WS. In the case of the b^* parameter, all values were positive, which indicated a contribution of yellow colour. Total average values are similar for all tested samples, although the samples can be arranged in descending order as follows: WT, WC, WTE and WS. The profiles of b^* changed over time differ between the sample types. The maximum values were obtained after 3 months of storage for WC, after 8 months for WS, after 10 months for WT and, finally, after 12 months for WTE. The parameter (ΔE) quantifies the difference between the initial colour (0 month) and in subsequent months (3, 6, 8, 10, 12, 13 months) of storage. The greatest general colour changes (ΔE), compared to all the initial values, were observed for the WC sample, for which ΔE parameters were the highest throughout the storage. This means that the WC sample brightened over time. Colour differences ΔE can be categorized as imperceptible differences (0–0.5), slight differences (0.5–1.5), just noticeable differences (1.5–3.0), marked differences (3.0–6.0), extremely marked differences (6.0–12.0) and colours of different shades (above 12.0) (Kim et al., 2006; Young and Whittle, 1985). In our study, the WC sample showed extremely marked differences in whole storage time, while other samples (WS, WT, WTE) had slight, just noticeable and marked differences. Other parameters calculated from the measured $L^*a^*b^*$ values were chroma (C), which indicates the relative saturation and angle hue (h°), which specifies the colour types (red, yellow, green, blue) in the colour wheel (Rajagukguk et al., 2024), shown in Table 5. The values of chroma (C) ranged between 18.0 and 21.0 for all samples and all storage periods, which indicate that the colour intensity was close to a grey colour, taking into account the maximum value of 100. In turn, the values of angle hues (h°) were located on the colour wheel between yellow and red colour in the values range from 58 to 61°.

3.4. Multivariate analysis

More insight can be gained into the data by means of multivariate analysis, such as principal component analysis (PCA) and general discrimination analysis (GDA). Prior to statistical analysis, the Pearson's correlation coefficients were calculated (Table 1S, Supplementary materials) and the data matrix was standardized. From the data matrix it can be observed that CD and PV were strongly correlated ($r = 0.65$), as well as DPPH was significantly correlated with OIT ($r = 0.62$). As suspected, the oxidation process affected the colour of the samples, which was justified by the significant correlation between hue (h°) and all oxidative status parameters (CD, PV, OIT) and DPPH. In particular L^* and a^* colour parameters were correlated with DPPH and OIT values and WI was correlated with PV and OIT, whereas ΔE was correlated with CD, PV and OIT. The correlations observed were supported by PCA results (Fig. 2). PCA gives the possibility to compress the data to a few principal components (PCs) that can later be used to reconstruct data without any preliminary assumptions about their distribution and almost without any loss of information, which helps to understand the relationships between variables. Using eigenvalue criterion, the first five PCs were extracted (eigenvalues >1), which explained 87.95 % of the total variance with PC1 explaining 32.23 % of variance and the PC2

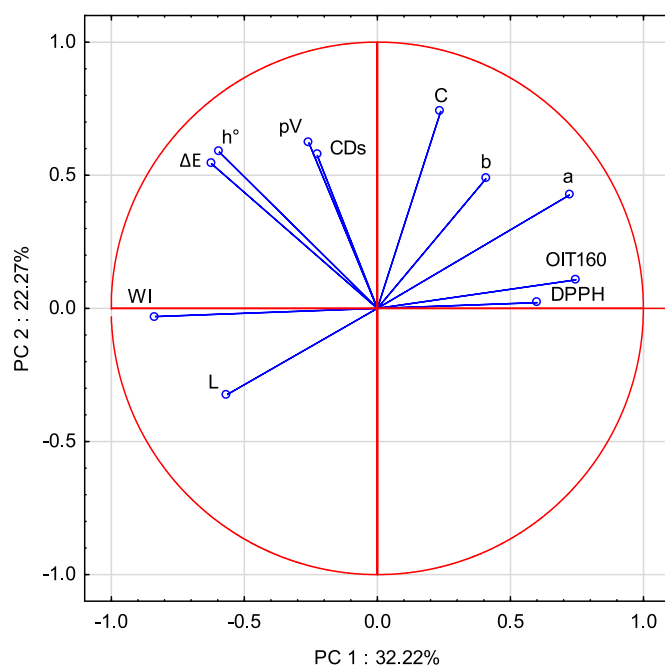


Fig. 2. Projection of the variables on the factor plane defined by PC1 and PC2.

22.27 % of variance. Based on the loaded values, showing the correlations between PCs and variables, it could be stated that PC1 is described by DPPH, OIT, L^* , WI, a^* , h° and ΔE , whereas PC2 is described by CD, PV and C (Fig. 2). The colour parameter b^* was correlated with PC3. This indicates that the first phase of lipid oxidation process (described by CD and PV values) mostly affected the chromatic colour parameters such as colour appearance (h°) and colour changes (ΔE), whereas the second phase of lipid oxidation influenced the achromatic colour parameters (L^* and WI). Since PCA is not a discrimination tool, GDA (general discriminant analysis) was applied. GDA is a supervised pattern recognition technique enable discriminant functions to be obtained, which maximize the ratio of between-class variance and minimize the ratio of within-class variance (Berrueta et al., 2007). The first two discriminant functions were statistically significant and explained 98 % of total variance with the first discriminant function accounted for 71 % of total variance. Based on standardized canonical discriminant function coefficients, the importance of the independent variables in the canonical function is shown in Table 6. The higher the absolute value of standardized coefficient, the higher the discrimination power of the related variable. Thus, ΔE and L^* and C contributed most to the first canonical function, while parameters such as WI, h° , OIT, CD and DPPH contributed to the second one. The discrimination of reformulated wafer cream samples is shown in Fig. 3, with the significant squared Mahalanobis

Table 6
Standardized canonical discriminant function coefficients.

	Root 1	Root 2	Root 3
DPPH	0.45501	0.53855	-0.29640
CDs	0.09070	0.78991	-0.77134
PV	0.39745	-0.53725	0.75682
OIT	0.21351	0.66295	0.35791
L	-1.09332	-1.03172	0.20517
a	0.60569	0.00226	-0.19373
b	-0.07713	0.15692	-0.66894
C	0.91040	0.01962	-0.84243
h°	-0.58578	-0.93840	0.55654
ΔE	-1.39362	0.95635	0.33044
WI	0.07029	1.04898	-1.17376
discrimination %	98.10 %	95.15 %	64.67 %
cumulative %	71.20 %	97.99 %	100 %

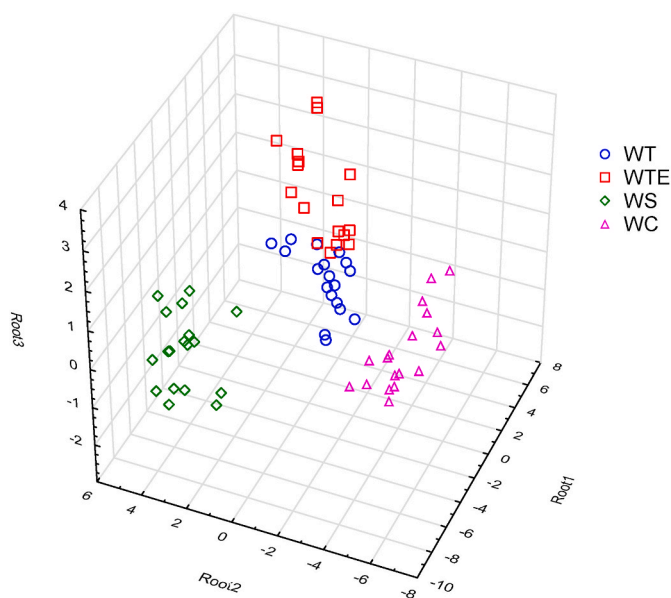


Fig. 3. General discriminant analysis classification of four wafer cream samples: WS - standard, WC - sugar-reduced, WT - fat-reduced and WTE - fat-reduced with fruits extract, stored at 0, 3, 6, 8, 10, 12, 13 months.

distance values. According to the classification matrix, 93 % of the samples were classified correctly, which proved very strong classification ability of the constructed discrimination models. The propriety of classification was 100 % for WT, WC and WS samples and 72 % for WTE samples, since five WTE samples were incorrectly classified as WT samples.

4. Conclusions

All these tests confirmed the oxidative and colour changes in four cream samples (WS, WC, WT, WTE) over 13 months of storage. The results showed that the oxidative stability of the lipid fraction decreased over time; however, the most pronounced changes were observed in the control sample (WS). There was only a 10 % decrease in the OIT values through the storage period for the sample containing fruit extract (WTE), while for the other samples (WS, WC, WT), the reduction was 16 %. This confirmed the protective effect of the extract on the lipid fraction of the cream. The assessment of oxidative quality indicators of lipids (PV, CD) also demonstrated that the extract could be used to extend shelf life. After 3 months, the PV value tripled for WS and doubled for WC, whereas for WTE, it doubled only after 6 months of storage. Moreover, a 6- and 5-fold increase in PV values from month 0 to the maximum value was observed for WS and WC, respectively, while for WT and WTE, this increase was only 1.6- and 2.5-fold. This proved that the oxidation process was significantly slowed down. Additionally, changes in colour parameters were observed, with the weakest changes noted in the cream sample containing the fruit extract. In turn, the sample containing a reduced amount of sugar was characterized by the highest difference in colour (ΔE). This study demonstrated that reducing the fat content in wafer cream is possible without compromising quality. Furthermore, the oxidative stability of the cream was improved by adding citrus fruit extract, rich in phenolic acids and flavonoids, which can help extend the shelf life of the wafer creams.

CRediT authorship contribution statement

Liliana Bełkowska: Writing – original draft, Visualization, Resources, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Małgorzata Muzolf-Panek:** Writing – review & editing, Visualization, Methodology, Investigation,

Formal analysis. **Agnieszka Waśkiewicz:** Investigation. **Magdalena Rudzińska:** Investigation. **Jolanta Tomaszewska-Gras:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization.

Ethical statement

This study did not include any human subjects and animal experiments.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work has been financially supported by Polish Ministry of Science and Higher Education, grant number DWD/3/35/2019.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2025.102653>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Ahmad, M., Baba, W.N., Wani, T.A., Gani, A., Gani, A., Shah, U., Wani, S.M., Masoodi, F. A., 2015. Effect of green tea powder on thermal, rheological & functional properties of wheat flour and physical, nutraceutical & sensory analysis of cookies. *J. Food Sci. Technol.* 52, 5799–5807. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1701-3>.
- AOCS, 2005. Official Method Ce 1 H-05 Determination of Cis-, Trans-, Saturated, Monounsaturated, and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC. off. Methods Recomm, fifth ed. In: *Pract. Am. Oil Chem. Soc.*
- ASTM, 2019. ASTM D3895-19 - Test Method for Oxidative-Induction Time of Polyolefins by Differential Scanning Calorimetry. ASTM Publisher, West Conshohocken, PA, USA.
- Barlow, S.M., 1990. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In: *Food Antioxidants*. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp. 253–307. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0753-9_7.
- Barriuso, B., Astiasarán, I., Ansorena, D., 2013. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *Eur. Food Res. Technol.* 236, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1866-9>.
- Bełkowska, L., Muzolf-Panek, M., Islam, M., Tomaszewska-Gras, J., 2023. Increasing the oxidative stability of the wafer lipid fraction with fruit extract during storage. *Appl. Sci.* 13, 103. <https://doi.org/10.3390/app13010103>.
- Berrueta, L.A., Alonso-Salces, R.M., Heberger, K., 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *J. Chromatogr. A* 1158, 196–214. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.024>.
- Bialek, M., Rutkowska, J., Bialek, A., Adamska, A., 2016. Oxidative stability of lipid fraction of cookies enriched with chokeberry polyphenols extract. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 66, 77–84. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0027>.
- Briones, V., Aguilera, J.M., 2005. Image analysis of changes in surface color of chocolate. *Food Res. Int.* 38, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.09.002>.
- Bulkeley, H., Newell, P., 2023. Governing climate change. In: *Governing Climate Change*. Routledge, London, pp. 1–25. <https://doi.org/10.4324/9781003219828-1>.
- Buttriss, J.L., 2013. Food reformulation: the challenges to the food industry. In: *Proceedings of the Nutrition Society*, pp. 61–69. <https://doi.org/10.1017/S0029665112002868>.
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F.J., Zhang, W., Lorenzo, J.M., 2019. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants* 8, 1–31. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>.
- Drewnowski, A., Nordensten, K., Dwyer, J., 1998. Replacing sugar and fat in cookies: impact on product quality and preference. *Food Qual. Prefer.* 9, 13–20. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(97\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(97)00017-7).
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J., 2000. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *J. Agric. Food Chem.* 48, 648–656.

- Estruch, R., Vendrell, E., Ruiz-León, A.M., Casas, R., Castro-Barquero, S., Alvarez, X., 2020. Reformulation of pastry products to improve effects on health. *Nutrients* 12, 1709. <https://doi.org/10.3390/nu12061709>.
- Fu, B., Labuza, T.P., 1997. Shelf-life testing: procedures and prediction methods. In: Erickson, M.C., Hung, Y.-C. (Eds.), *Quality in Frozen Food*. Springer US, Boston, MA, pp. 377–415. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5975-7_19.
- Giuffrè, A.M., Caracciolo, M., Capocasa, M., Zappia, C., Poiana, M., 2022. Effects of shortening replacement with extra virgin olive oil on the physical-chemical-sensory properties of Italian cantuccini biscuits. *Foods* 11, 299. <https://doi.org/10.3390/foods11030299>.
- Global Market Size [WWW Document], 2024. Glob. Wafer confect. Mark. Size, share, trends anal. Rep. – ind. Overv. Forecast to 2031. <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-wafer-confectionery-market>.
- Gramza-Michałowska, A., Kobus-Cisowska, J., Kmiecik, D., Korczak, J., Helak, B., Dziedzic, K., Górecka, D., 2016. Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*). *Food Chem.* 211, 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.048>.
- Habekost, M., 2013. Which color differencing equation should be used? *Int. Circ. Graph. Educ. Res.* 6, 20–33.
- Hao, Y., Wang, F., Huang, W., Tang, X., Zou, Q., Li, Z., Ogawa, A., 2016. Sucrose substitution by polyols in sponge cake and their effects on the foaming and thermal properties of egg protein. *Food Hydrocoll.* 57, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.006>.
- Ho, S.C., Lin, C.C., 2008. Investigation of heat treating conditions for enhancing the anti-inflammatory activity of citrus fruit (*Citrus reticulata*) peels. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7976–7982. <https://doi.org/10.1021/jf801434c>.
- Imran, M., Butt, M.S., Iqbal, M.J., Gilani, S.A., Basharat, S., Saeed, F., Suleria, H.A.R., 2016. Antioxidant potential, physico-chemical, and sensory attributes of cookies supplemented with mosambi peel extract. *Int. J. Fruit Sci.* 16, 341–349. <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1143434>.
- Islam, M., Kaczmarek, A., Tomaszewska-Gras, J., 2023. Differential scanning calorimetry as a tool to assess the oxidation state of cold-pressed oils during shelf-life. *J. Food Meas. Char.* 17, 6639–6651. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02152-8>.
- ISO 3960, 2017. *Animal and Vegetable Fats and Oils—Determination of Peroxide Value—Iodometric (Visual) Endpoint; Switzerland, Vol. 2017*.
- Jaldani, S., Sarfaraz Khabbazi, E., Jooyandeh, M., Farhoosh, R., 2024. Kinetics of simultaneous change in the concentration of total lipid hydroperoxides and total conjugated dienes during peroxidation of canola, sunflower, and olive oils. *Food Chem.* 435, 137605. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137605>.
- Jeong, B.G., Gwak, Y.J., Kim, J., Hong, W.H., Park, S.J., Islam, M.A., Jung, J., Chun, J., 2022. Antioxidative properties of machine-drip tea prepared with citrus fruit peels are affected by the type of fruit and drying method. *Foods* 11. <https://doi.org/10.3390/foods11142094>.
- Kim, S., Park, J.-B., Hwang, I.-K., 2006. Quality attributes of various varieties of Korean red pepper powders (Capsicum an-nuum L.) and color stability during sunlight exposure. *J. Food Sci.* 67, 2957–2961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08845.x>.
- Kozłowska, M., Żbikowska, A., Gruczyńska, E., Żontała, K., Pótorak, A., 2014. Effects of spice extracts on lipid fraction oxidative stability of cookies investigated by DSC. *J. Therm. Anal. Calorim.* 118, 1697–1705. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-4058-y>.
- Kozłowska, M., Żbikowska, A., Szpicer, A., Pótorak, A., 2019. Oxidative stability of lipid fractions of sponge-fat cakes after green tea extracts application. *J. Food Sci. Technol.* 56, 2628–2638. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03750-5>.
- León, J., Mery, D., Pedreschi, F., León, J., 2006. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Res. Int.* 39, 1084–1091. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.03.006>.
- Macbeth, H., 1997. *Food Preferences and Taste*. Berghahn Books, New York, Oxford. <https://doi.org/10.1515/9781782381884>.
- Mahato, N., Sinha, M., Sharma, K., Koteswararao, R., Cho, M.H., 2019. Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes. *Foods* 8, 523. <https://doi.org/10.3390/foods8110523>.
- Maire, M., Rega, B., Cuvelier, M.-E., Soto, P., Giampaoli, P., 2013. Lipid oxidation in baked products: impact of formula and process on the generation of volatile compounds. *Food Chem.* 141, 3510–3518. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.039>.
- Manzocco, L., Romano, G., Calligaris, S., Nicoli, M.C., 2020. Modeling the effect of the oxidation status of the ingredient oil on stability and shelf life of low-moisture bakery products: the case study of crackers. *Foods* 9, 749. <https://doi.org/10.3390/foods9060749>.
- Market size in Poland [WWW Document], 2025. Pol. - waffles wafers without choc. - mark. Anal. Forecast. Size, trends insights. <https://www.indexbox.io/store/poland-waffles-and-wafers-without-chocolate-market-analysis-forecast-size-trends-and-insights/>.
- Miele, N.A., Di Monaco, R., Masi, P., Cavella, S., 2015. Reduced-calorie filling cream: formula optimization and mechanical characterization. *Chem. Eng. Trans.* 43, 67–72. <https://doi.org/10.3303/CET1543012>.
- Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Obuchowski, W., Gośliński, M., 2009. Evaluation of antioxidant activity of green tea extract and its effect on the biscuits lipid fraction oxidative stability. *J. Food Sci.* 74, 362–370. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01313.x>.
- Miličević, N., Sakač, M., Hadnadev, M., Škrobot, D., Šarić, B., Dapčević Hadnadev, T., Jovanov, P., Pezo, L., 2020. Physico-chemical properties of low-fat cookies containing wheat and oat bran gels as fat replacers. *J. Cereal. Sci.* 95, 103056. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103056>.
- Mišan, A., Mimica-Dukić, N., Sakač, M., Mandić, A., Sedej, I., Šimurina, O., Tumbas, V., 2011. Antioxidant activity of medicinal plant extracts in cookies. *J. Food Sci.* 76, 1239–1244. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02400.x>.
- Mohammed, H.A., Sulaiman, G.M., Albukhaty, S., Al-Saffar, A.Z., Elshibani, F.A., Ragab, E.A., 2023. Chrysin, the flavonoid molecule of antioxidant interest. *ChemistrySelect* 8, e202303306. <https://doi.org/10.1002/slct.202303306>.
- Mori, M.R., Bhola, D.V., Remya, S., Verma, S.K., Suyani, N.K., 2021. Effects of orange peel extract on microbiological quality during storage of functional oat cookies fortified with fish protein concentrate from lesser tiger toothed croaker (*Otolithes cuvieri*). *Pharm. Innov.* 10, 190–193.
- Muzolf-Panek, M., Waśkiewicz, A., 2022. Relationship between phenolic compounds, antioxidant activity and color parameters of red table grape skins using linear ordering analysis. *Appl. Sci.* 12, 6146. <https://doi.org/10.3390/app12126146>.
- Panwar, D., Saini, A., Panesar, P.S., Chopra, H.K., 2021. Unraveling the scientific perspectives of citrus by-products utilization: progress towards circular economy. *Trends Food Sci. Technol.* 111, 549–562. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.018>.
- Popkin, B.M., Adair, L.S., Ng, S.W., 2012. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr. Rev.* 70, 3–21. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00456.x>.
- Popov-Rajlić, J.V., Mastilović, J.S., Laličić-Petronijević, J.G., Kevrešan, Ž.S., Demin, M. A., 2013. Sensory and color properties of dietary cookies with different fiber sources during 180 days of storage. *Hem. Ind.* 67, 123–134. <https://doi.org/10.2298/HEMIND120327047P>.
- Potter, R., Stojceska, V., Plunkett, A., 2013. The use of fruit powders in extruded snacks suitable for Children's diets. *Food Sci. Technol.* 51, 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.015>.
- Rajagukguk, Y., Islam, M., Grygier, A., Siger, A., Rudzińska, M., Tomaszewska-Gras, J., 2024. Physicochemical characteristics of cold-pressed blackcurrant-, strawberry-, and raspberry seed oils during storage and its influence on thermo-oxidative stability. *NFS J* 37, 100195. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2024.100195>.
- Ruiz-Roso, M.B., de Carvalho Padilha, P., Matilla-Escalante, D.C., Brun, P., Ulloa, N., Acevedo-Correa, D., Peres, W.A.F., Martorell, M., Carrilho, T.R.B., Cardoso, L. de O., Carrasco-Marín, F., Paternina-Sierra, K., de las Hazas, M.C.L., Rodríguez-Meza, J.E., Villalba-Montero, L.F., Bernabè, G., Pualetto, A., Taci, X., Cárcamo-Regla, R., Martínez, J., Dávalos, A., 2020. Changes of physical activity and ultra-processed food consumption in adolescents from different countries during covid-19 pandemic: an observational study. *Nutrients* 12, 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu12082289>.
- Saleem, M., Saeed, M.T., 2020. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. *J. King Saud Univ. Sci.* 32, 805–810. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.013>.
- Salehi, F., 2020. Recent applications of powdered fruits and vegetables as novel ingredients in biscuits: a review. *Nutrire* 45, 1. <https://doi.org/10.1186/s41110-019-0103-8>.
- Szymanowska, U., Karaś, M., Bochnak-Niedźwiecka, J., 2021. Antioxidant and anti-inflammatory potential and consumer acceptance of wafers enriched with Freeze-Dried Raspberry Pomace. *Appl. Sci.* 11, 6807. <https://doi.org/10.3390/app11156807>.
- Tiefenbacher, K.F., 2019. Introduction and overview. In: *The Technology of Wafers and Waffles II. Recipes, Product Development and Know-How*. Elsevier Inc. Academic Press, pp. 1–12.
- Tiefenbacher, K.F., 2017. Adjuncts-filling creams, inclusions, cacao and chocolate. In: *The Technology of Wafers and Waffles I. Operational Aspects*. Elsevier Inc. Academic Press, pp. 313–404.
- Tuberoso, C.I.G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., Cabras, P., 2007. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chem.* 103, 1494–1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.014>.
- Vahid-Dastjerdi, L., Jazaeri, S., Hadaegh, H., Razeghi Jahromi, S., Hosseini, S.M., Farhodi, M., Momken, I., 2020. Sucrose substitution by polyols for the production of shelf stable macaroon: attribution of their molecular weight and synergy. *Eur. Food Res. Technol.* 246, 1877–1887. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03542-8>.
- Wąsowicz, E., Gramza, A., Heś, M., Jeleń, H., Korczak, J., Matecka, M., Mildner-Szkudlarz, S., Rudzińska, M., Samotyja, U., Zawirska-Wojtasiak, R., 2004. Oxidation of lipids in foods. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 13, 87–100.
- Wedamulla, N.E., Fan, M., Choi, Y.J., Kim, E.K., 2022. Citrus peel as a renewable bioresource: transforming waste to food additives. *J. Funct. Foods* 95, 105163. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105163>.
- Xia, W., Budge, S.M., 2017. Techniques for the analysis of minor lipid oxidation products derived from triacylglycerols: epoxides, alcohols, and ketones. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16, 735–758. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12276>.
- Xu, G., Ye, X., Chen, J., Liu, D., 2007. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *J. Agric. Food Chem.* 55, 330–335. <https://doi.org/10.1021/jf062517i>.
- Young, K.W., Whittle, K.J., 1985. Colour measurement of fish minces using hunter L, a, b values. *Sci. Food Agric.* 36, 383–392. <https://doi.org/10.1002/jfsa.2740360511>.
- Zbikowska, A., Kozłowska, M., Poltorak, A., Kowalska, M., Rutkowska, J., 2018. Effect of addition of plant extracts on the durability and sensory properties of oat flake cookies. *J. Therm. Anal. Calorim.* 134, 1101–1111. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7301-0>.

Publikacja 3 (P3)

Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Stangierski, J.; Tomaszewska-Gras, J. The effect of reformulation on quality changes in cream-filled wafers during storage. – manuskrypt wysłany do publikacji w czasopiśmie *LWT*

The effect of reformulation on quality changes in cream-filled wafers during storage

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research paper
Keywords:	confectionery; texture; colour; melting behaviour; solid fat index
Corresponding Author:	Jolanta Tomaszewska-Gras, Ph.D. Poznań University of Life Sciences Faculty of Food Science and Nutrition Poznań, POLAND
First Author:	Liliana Bełkowska
Order of Authors:	Liliana Bełkowska
	Małgorzata Muzolf-Panek, Dr
	Jerzy Stangierski, Prof.
	Jolanta Tomaszewska-Gras, prof.
Abstract:	The role of the food industry in providing consumers with healthy and sustainable food has recently received considerable attention. However, the confectionery industry still faces many challenges related to the excessive use of sugar and palm oil. One of the most widely consumed types of confectionery is cream-filled wafers. This study examined the quality changes of reformulated cream-filled wafers: sugar-reduced (WC), fat-reduced (WT) and fat-reduced with the addition of commercially available citrus fruit extract (WTE) during 13 months of storage at 18 °C. The reformulation and storage time significantly affected the quality of all cream-layered wafers, assessed based on the parameters of colour, water activity, texture, melting phase transitions, solid fat index, sensory analysis and microbiology. Multivariate analyses indicated that the fresh fat-reduced wafers with citrus extract (WTE) showed the best overall quality and microbial stability. However, for all samples a sharp deterioration occurred in all the quality parameters except for microbial stability. Cluster and principal component analyses confirmed that 12- and 13-month samples formed a distinct group. Overall, the study demonstrates the feasibility of producing cream-filled wafers with reduced fat and sugar that retain acceptable quality for up to 10 months, offering a promising alternative to conventional formulations.

Poznań, June, 17, 2025

Prof. Jolanta Tomaszewska-Gras

Department of Food Technology of Plant Origin
Faculty of Food Sciences and Nutrition
Poznań University of Life Sciences,
ul. Wojska Polskiego 31/33, 60-637 Poznań, Poland,
jolanta.tomaszewska-gras@up.poznan.pl

Editor-in-Chief

Dr. Rakesh K. Singh, PhD

University of Georgia Department of
Food Science & Technology, Athens,
30602-7501, Georgia, United States

Dear Dr Singh,

Please find enclosed our manuscript titled "*The effect of reformulation on quality changes in cream-filled wafers during storage*", authored by Liliana Bełkowska, Małgorzata Muzolf-Panek, Jerzy Stangierski and Jolanta Tomaszewska-Gras, which we wish to submit for consideration as an Original Research Paper in the *LWT journal*.

This manuscript presents research on the effects of reformulation, specifically the reduction of fat and sugar content and the addition of natural citrus fruit extract, on the quality of cream-filled wafers in a real-time experiment over 13 months of storage. Sugar and fat are two key ingredients in confectionery products; however, dietary guidelines often recommend reducing their amounts to lower calorie intake. Therefore, this study was designed to test the hypothesis that reducing the sugar and fat content in wafer creams would have no impact on product quality.

The obtained research results and presented knowledge may be useful for confectionery manufacturers in making decisions regarding product reformulation.

We would be grateful for the opportunity to share our findings and believe that our work can contribute to the development of a robust database for these niche oils. We confirm that this manuscript has not been published previously and is not under consideration by another journal. The authors have no conflicts of interest to declare.

Yours sincerely,



Jolanta Tomaszewska-Gras

HIGHLIGHTS

The study focused on creating healthier cream-filled wafers with reduced sugar and fat

Three wafer variants (WC, WT, WTE) were tested for 13 months at 18°C to assess quality

Reformulation and storage significantly impacted texture, color, and sensory properties

Wafers with reduced fat and citrus extract (WTE) showed the best quality and stability

After 10 months, all samples showed quality decline, except for microbial stability

Title page

The effect of reformulation on quality changes in cream-filled wafers during storage

Liliana Bełkowska¹, Małgorzata Muzolf-Panek¹, Jerzy Stangierski¹, Jolanta Tomaszewska-Gras^{1*}

¹Faculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 31/33, 60-624 Poznań, Poland

* **Corresponding author:** Jolanta Tomaszewska-Gras

jolanta.tomaszewska-gras@up.poznan.pl

Faculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, ul. Wojska Polskiego 31/33, 60-624 Poznań, Poland.
ORCID: 0000-0003-3964-8093

CRediT authorship contribution statement

Liliana Bełkowska: Conceptualization, Data curation, Visualisation, Formal analysis, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Resources, Writing – original draft.

Małgorzata Muzolf-Panek: Investigation, Formal analysis, Methodology, Visualisation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Jerzy Stangierski:** Investigation,

Jolanta Tomaszewska-Gras: Conceptualization, Data curation, Investigation, Funding acquisition, Resources, Project administration, Methodology, Visualisation, Writing – original draft, Supervision, Writing – review & editing.

Data availability

Data will be made available on request.

Declaration of competing interests

The authors declare that there is no competing interest.

Acknowledgments

This work has been financially supported by Ministry of Education and Science, grant number DWD/3/35/2019.

The effect of reformulation on quality changes in cream-filled wafers during storage

Abstract

The role of the food industry in providing consumers with healthy and sustainable food has recently received considerable attention. However, the confectionery industry still faces many challenges related to the excessive use of sugar and palm oil. One of the most widely consumed types of confectionery is cream-filled wafers. This study examined the quality changes of reformulated cream-filled wafers: sugar-reduced (WC), fat-reduced (WT) and fat-reduced with the addition of commercially available citrus fruit extract (WTE) during 13 months of storage at 18 °C. The reformulation and storage time significantly affected the quality of all cream-layered wafers, assessed based on the parameters of colour, water activity, texture, melting phase transitions, solid fat index, sensory analysis and microbiology. Multivariate analyses indicated that the fresh fat-reduced wafers with citrus extract (WTE) showed the best overall quality and microbial stability. However, for all samples a sharp deterioration occurred in all the quality parameters except for microbial stability. Cluster and principal component analyses confirmed that 12- and 13-month samples formed a distinct group. Overall, the study demonstrates the feasibility of producing cream-filled wafers with reduced fat and sugar that retain acceptable quality for up to 10 months, offering a promising alternative to conventional formulations.

Keywords: confectionery, differential scanning calorimetry, texture, quality, colour, melting behaviour, solid fat index

1. Introduction

Cream-filled wafers are one of the most widely consumed types of confectionery, which is due to their favorable nutritional and sensorial profile, diversity of flavors, and extended shelf life (Bełkowska et al., 2025). This prolonged shelf life primarily results from the selection of ingredients, processing techniques, and, most importantly, low water activity values. These qualities render confectionery an ideal choice for on-the-go consumption. Moreover, the practicality and mobility of these types of foods align with consumer

behaviour, due to fast-paced lives and a growing need for convenience foods. This change in the way consumers snack has driven the popularity of wafers with cream and shaped a much wider redefinition of snacking. As noted by researchers snacking behaviour has evolved towards the contemporary snacking culture that focuses more than just on perceived indulgence and instead influences the functional side of food and its associated health benefits and emotional pleasure (Gallagher-Squires et al., 2023; Gibson et al., 2020; Marangoni et al., 2019). These demand trends have placed even greater emphasis on manufacturers to innovate whilst maintaining the sensorial and structural properties of their products. The confectionery industry has experienced significant growth in recent decades, with wafers becoming an essential component of many manufacturers' product portfolios, including well-known brands such as Kit Kat (Sundara, 2012; Verma, 2019). Despite their prevalent accessibility, wafers with cream are frequently condemned for their nutritional attributes. Numerous commercially produced wafers contain sugar-fat-based wafer creams, which have long been popular for their smooth texture and rich flavor, represent a key challenge in product development. These fillings have elevated sugar and saturated fatty acid levels, and though these substantially enhance their sensory attributes, they also exacerbate health issues, particularly in relation to obesity, diabetes and cardiovascular diseases (Dana & Sonia, 2024; Konar et al., 2022). Recent trends in consumer behavior, coupled with growing awareness about the negative health effects of excessive sugar and fat consumption, have prompted manufacturers to explore alternatives and reformulation strategies. These include reducing sugar and fat, and incorporating healthier fat sources (Chugh et al., 2015; Dana & Sonia, 2024). Research has shown that ingredients like dietary fiber, polyols and plant proteins can be good substitutes in food products. For example, inulin and polydextrose are being assessed as options to replace sugar because they contain fewer calories and can support good gut health (Aidoo et al., 2014). Moreover, plant-based proteins that are emulsified can help give texture and mouthfeel to foods. However, using these ingredients often means adding stabilizers or other agents to maintain the product's correct quality and texture (Di Monaco et al., 2018). Reformulating products such as wafers with sugar-fat-based creams presents unique challenges, as altering the levels of these key ingredients can significantly affect the product's texture, mouthfeel, stability and positive mood enhancement, factors which are critical for consumer acceptance (Dana & Sonia, 2024; Konar et al., 2022; Popov-Raljić et al., 2013; Souza et al., 2020). The principal factors contributing to quality deterioration are undoubtedly linked to texture changes in the wafer sheets owing to water migration or absorption (Tiefenbacher, 2017c) and lipid oxidation (Bełkowska et al., 2023).

107 Wafer sheets constitute one of the two primary components analyzed in this study.
108 They are crunchy and crispy mainly because of their specific composition and aerated
109 structure. The batter consists mainly of flour and water with fat, salt and raising agents added.
110 After baking between hot baking plates, the wafers become thin and contain low moisture
111 levels, making them easily breakable under pressure (Tiefenbacher, 2017b; Verma, 2019).
112 Wafers exhibit a distinctive textural profile and sensory experience, particularly in terms of
113 perceived crispness.

114 The second component of wafers is the sugar-fat-based filling. Fat serves multiple
115 functions, acting not only as a bulking agent but also enhancing flavour, texture, and the
116 overall sensory experience during consumption, especially in starch-based food such as filled
117 wafers (Colla et al., 2018). It is important to note that the filling must remain solid at room
118 temperature, as this reflects the conditions under which it is typically consumed. Therefore,
119 palm or coconut oil is commonly used due to its functional properties as well as its cost-
120 effectiveness and widespread availability. Consequently, replacing these oils with alternative
121 fats or oils that offer greater health benefits presents a significant challenge. Moreover, the
122 shift away from palm and coconut oils is further complicated by their unique functional
123 properties in confectionery, particularly in terms of melting behaviour and oxidative stability.
124 Sustainable sourcing alternatives, such as high-oleic sunflower oil, as well as oils produced
125 through microbial cell culture, require careful formulation and often come with cost or
126 scalability constraints (Ghazani et al., 2024). This highlights the complex interplay between
127 product quality, sustainability, and economic feasibility in modern food design. Attention
128 should be also drawn to environmental issues, climate and biodiversity. Meijaard et al. shed
129 light on problems with palm and coconut agriculture such as ethical or deforestation
130 (Meijaard et al., 2020; Meijaard & Sheil, 2019). In this context, we could choose healthier
131 rapeseed or sunflower oil but must remember that they are liquid and not suitable for filling
132 application without further ingredients. As a healthier substitute for conventional fat-based
133 fillings for bakery applications, Alam et al. developed an innovative filling using honey with
134 watermelon rind paste and xanthan gum as functional ingredients, optimized through a Box-
135 Behnken design to enhance nutritional and rheological properties while reducing food waste
136 (Alam et al., 2024). Sugar, on the other hand, functions not only as a bulking agent but also
137 plays a crucial role in the texture of the filling. It allows the introduction of air into the fat
138 during cream preparation, reduces the viscosity of the cream, provides sweetness, influences
139 the texture and structure of the cream (Zoulias et al., 2002)

Given the increasing demand for healthier yet high-quality confectionery products, there is a growing interest in understanding how formulation modifications, particularly sugar and fat reduction, affect product quality. As highlighted in the literature, reformulation strategies can significantly influence the sensory attributes and structural integrity of confectionery items. Fatah-Jahromi et al. (Fatah-Jahromi et al., 2024) developed a low-calorie cake by replacing fat and sugar with whey protein isolate/sodium alginate/licorice extract ternary foam at three substitution levels of 0, 25, and 50 %. The batter's viscosity, density, fat and carbohydrate content, and total caloric value all significantly decreased as a result of this substitution. Significantly, the 25 % foam substitution sample outperformed the control in terms of sensory evaluations, indicating that the foam is a viable substitute for creating bakery goods that are both acceptable and healthier. In turn, Grzelczyk et al. studied high-fiber cookies with bamboo flour and edible flowers (Grzelczyk et al., 2025). Enriched with dietary fiber and flavonoids, these cookies demonstrate high antioxidant potential and may support digestive health and satiety, although further optimization of flower blend proportions is recommended. In order to create nutritionally improved products with lower levels of sugar and saturated fat, Suo et al. (Suo et al., 2025) examined reformulated cookies that used 100 % pulse flour (chickpea and lentil), a commercial fiber syrup (Meltec®) as a partial sugar substitute, and a structured fiber–sunflower oil–water emulsion as a butter substitute. In selected samples, lentil-based cookies maintained a satisfactory texture and consumer acceptability while exhibiting the most favorable nutritional profile, with a lower predicted glycemic index and higher protein digestibility. Despite the limited sensory evaluation, the results indicate that these formulations may be used as functional snacks for older or health-conscious consumers, which calls for additional refinement and in vivo testing. The use of an olive oil–alginate gelled emulsion as a total fat substitute in cookies by Gutiérrez-Luna (Gutiérrez-Luna et al., 2023) resulted in a significant reduction in both total and saturated fat content, while retaining acceptable sensory qualities despite increased hardness and slightly lower taste and texture scores. Antioxidant inclusion successfully reduced oxidation during in vitro digestion, and no rancidity was observed, despite the reformulated cookies exhibiting higher unsaturated fat content and oxidation markers during 21 days of storage.

Numerous studies have investigated the immediate effects of such changes on texture, flavor, and consumer perception in a manner consistent with the all aforementioned. However, these investigations predominantly focus solely on short-term outcomes, with limited emphasis on food safety, shelf-life stability or prolonged consumer acceptability. To bridge this gap, the present study investigates the quality changes in reformulated cream-filled

wafers during 13 months of storage at 18 °C: sugar-reduced (WC), fat-reduced (WT) and fat-reduced with the addition of commercially available citrus fruit extract (WTE).

2. Materials and methods

2.1.1 Preparation of wafers with cream

The batter for the wafers was composed of water, wheat flour, salt, potato starch, sunflower lecithin, and high oleic rapeseed oil (HORO). All ingredients were procured from the Polish market. The wafer sheets were produced by baking in a wafer oven at 170 ± 1 °C for 2.5 min. Parallely, the cream samples were prepared under consistent conditions, according to four distinct cream formulations: a standard fat-based filling (WS), sugar-reduced (WC), fat-reduced (WT), and fat-reduced with the addition of citrus fruit extract (WTE). A fruit extract (Flavomix BC, Polypan) was added at a concentration of 0.1 % (w/w). The WS cream formulation comprised the following ingredients: 36 % (w/w) refined palm oil, 38 % (w/w) sucrose, fat-reduced cocoa powder, skimmed milk powder, and whey powder (Table 1). In the WC cream, 16 % (w/w) rice starch was incorporated, and the sugar content was lowered to 27 % (w/w), with the remaining ingredients unchanged comparing to the WS cream. Both the WT and WTE creams were produced using the same ingredients as for WC sugar (fat-reduced cocoa powder, skimmed milk powder, whey powder, rice starch as a filler, and sunflower lecithins as an emulsifier), but the fat content in both samples was reduced to 24 % (w/w). Considering all cream samples, total fat content was 37, 33, 24, 24 g/100 g and total sugar content was 42, 27, 40, 40 g/100 g for WS, WC, WT and WTE cream, respectively.

Finally, cream was smeared onto wafer sheets, then cooled, cut, and immediately sealed in polypropylene foil with the following specifications: water vapor permeability less than 0.5 g/m²/24 h and oxygen permeability less than 50 cm³/m² x 24h x 0,1MPa. Prior to analysis, the samples were stored in boxes within a storage room for a period of 13 months at 18 ± 2 °C and a relative humidity of 60-65 %. One package of the product was selected for testing after each of the following storage intervals: 0, 3, 6, 8, 10, 12, and 13 months.

2.1.2 Lipid fraction extraction from the cream

The lipid fraction was extracted from the cream using n-hexane, which was separated from the wafer sheets. Approximately 50 g of each cream type was mixed with n-hexane in a 1:1 (w/w) ratio and homogenized at 20.000 rpm for 3 minutes (Zauberstab 2011-8, Unold AG Hockenheim, Switzerland). The mixture was then preheated to 35 °C and stirred continuously on a stirrer (FC6S, VelScientifica Srl, Usmate Velate, Italy) at 112×g for 1 hour. Subsequently, the samples were centrifuged (MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland) at 2382×g for 15 minutes. The centrifuged supernatants were filtered (filter paper MN 640 W, Macherey-Nagel, Dueren, Germany), and the n-hexane was evaporated using a rotary vacuum evaporator (The Rotavapor® R-300, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) under the following conditions: pressure of 264 mbar, rotation at 30 rpm, bath temperature of 50 °C, and a duration of 30 minutes. The lipid fraction obtained was transferred into a test tube, and the remaining n-hexane was removed by aerating with nitrogen for 1 hour. The lipid samples were sealed and stored under nitrogen at -80 °C until analysis.

2.2 Colour determination

Colour measurement of the wafers with creams (CIE LAB L^* , a^* , b^*) was performed using the Konica Minolta CM-5 spectrophotometer (SCI mode – Specular Component Included, D65 as the light source, and a standard 10° observer) in conjunction with SpectraMagic NX software. The instrument was calibrated against a reference white plate before conducting sample measurements. Zero calibration (0 % transmittance) was performed manually prior to each analysis. To determine the colour, the products were measured directly using the Hunter Lab scale. The parameter L^* indicates lightness, with values ranging from 0 (black) to 100 (white). The parameters a^* and b^* represent the chromatic components of colour: a^* is established by green ($a^* < 0$) and red ($a^* > 0$), while b^* is determined by blue ($b^* < 0$) and yellow ($b^* > 0$). Each sample was prepared in four replicates. For each repetition, three automatic measurements were taken on the 8 mm diameter surface of the wafer.

The colour parameters of the analysed samples – chroma (C), hue angle (h°), colour difference (ΔE), and whiteness index (WI) – were calculated using the following formulas:

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (1)$$

$$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad (2)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Habekost, 2013}) \quad (3)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Briones \& Aguilera, 2005}) \quad (4)$$

2.3 Water activity measurement

Water activity (a_w) analysis was performed with AwTherm Rotronic HP23-AW-A meter, (Rotronic, Bassersdorf, Switzerland) equipment. Prior to measurement, samples were placed in dedicated sealed containers, filling them up to about 3/4 of their height. The container with sample was then placed in the meter, where it remained until the measurement of a_w ended. The measurement time was around 4 to 5 minutes. For each sample, the measurement was replicated three times.

2.4 Texture measurements

The texture of wafers with cream was analysed with a TA-XT2i texture analyser with the three-point bend rig type HDP/3PB (Stable Micro Systems, LTD., Surrey, UK). Force-time deformation curves were obtained with a 25 kg load cell applied. Each time, a sample of wafer with cream with an area of 25 x 96 mm was placed on base beams with a distance of 50 mm between the two beams. The analyser was set with the following parameters: pre-test speed 2.0 mm/sec; test speed 1.7 mm/s; post-test speed 2.0 mm/s; trigger force 3 g; distance 6 mm, and the data acquisition rate (PPS) 200. The breaking force (N) (hardness) of the sample was taken as the maximum stress value of the curve. The gradient of the slope (N/s) indicated sample toughness, and the higher the gradient, the tougher the sample. Each result was obtained from 18 wafer samples.

2.5 Melting Phase transition analysis of creams by differential scanning calorimetry (DSC)

Melting phase transition profiles were analysed according to the method developed for milkfat with some modifications (Tomaszewska-Gras, 2016). A Perkin Elmer differential scanning calorimeter DSC 8500 PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA), equipped with an Intracooler II and Pyris software (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA), was used. Nitrogen (99.999% purity) was the purge gas. Samples of ca. 6-7 mg were weighed into aluminium pans of 20 μ L (Perkin Elmer, No. 0219-0062, Waltham, Massachusetts, USA) and hermetically sealed, and an empty, hermetically sealed aluminium pan was used as reference.

Prior to analysis cream samples were cooled to a temperature of -10 °C. The analysis started by heating the sample at a scanning rate of 5 °C/min from a temperature of -30 °C to 55 °C (First cycle of heating), after which it was held for 1 min at 55 °C and then cooled at a scanning rate of 5 °C/min from 55 °C to -30 °C. After holding the sample isothermally at -30 °C for 1 min, the sample was heated again at a scanning rate of 5 °C/min to a temperature of 55 °C (Second cycle of heating). Different DSC temperature parameters from melting curves were determined, i.e., onset temperature (T_{on}), which is related to the starting point of melting; peak temperature (T), and end temperature (T_{end}), which is related to the temperature at which the whole sample is melted. Peak temperature (T) was determined on the temperature axis (X) by locating the maximum point of heat flow (J/s) for each peak. From the area under the melting curve, the partial and total melting enthalpy values (ΔH (J/g)) were calculated. The measurements for each sample were carried out in duplicate. Solid fat index (SFI) was calculated for room temperature (25 °C), based on the partial (ΔH_p) and total enthalpy (ΔH) according to the formula:

$$SFI (\%) = \frac{\Delta H_p}{\Delta H} \cdot 100 \quad (5)$$

where ΔH_p is the enthalpy (J/g) calculated from the area of melting curve in the temperature range from 25 °C to end temperature (T_{end}) and ΔH is the total enthalpy (J/g), calculated from the area under the entire melting curve in the temperature range from the T_{on} to T_{end} .

2.6 Sensory analysis

A sensory evaluation of cream-filled wafers was conducted by 30 trained panellists in seven different sessions using the quantitative descriptive analysis (QDA) to describe the sensory properties of the product using a hedonic scale (0-undetectable, absent; 10-extremely strong sensation). The sensory team identified and defined the descriptors, with particular emphasis on attributes related to texture (crispness and hardness) and tastiness (sweetness, cocoainess and rancidity). The sensory evaluations were performed in a designated sensory analysis room. Every time, the wafers with cream samples of equal size were coded, each in a separate plastic box, and presented to each assessor in a random order. Average values, variance and standard deviation of sensory analysis ratings were computed separately for each attribute of every sample and session.

2.7 Microbiological examination

Cream-filled wafer samples were analysed both in their freshly prepared state and after being stored for durations of 6, 10 and 13 months. The sample preparation for microbiological analysis was conducted in accordance with the guidelines outlined in the ISO standard (PN-EN ISO6887-1:2017-05, 2017). All microbiological media and substrates used were purchased from Biomaxima, Poland. Concisely, each sample was weighed using an analytical balance, suspended in a sterile saline solution at a mass ratio of 1:10 (w/v) in a separate stomacher bag and mechanically homogenized in a stomacher (Interscience, France). The initial suspensions were diluted using the decimal dilution method. The samples were then inoculated in duplicate onto Petri dishes, each containing the appropriate microbiological media: PCA agar, DG18 agar, VRBL agar. In the procedure of moulds and yeasts, coliforms and total plate count (TPC) detection, incubation of the samples was carried out at 25 °C for 5 days, 30 °C for 24 h and 30 °C for 72 h, respectively (PN-EN-ISO4833-1:2013, 2013; PN-ISO21527-2:2009, 2009; PN-ISO4832:2007, 2007). To identify *Salmonella* spp., 25 g of the sample was pre-enriched in 225 mL of buffered peptone water and incubated at 30 °C for 20 hours. Following preincubation, the samples were transferred onto selective enrichment media, including Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth and Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin (MKTTn) broth and incubated at 30 °C for an additional 24 hours. For the differentiation of presumptive *Salmonella* colonies, selective agar media such as Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) and Brilliant Green Agar (BGA) were employed (PN-EN-ISO6579-1:2017, 2017).

2.8 Statistical analysis

The data were analysed using Statistica 14.1 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). ANOVA was performed to check the significance of the effects (time and sample type). The uniformity of variance was tested using the Cochran–Bartley test. The *Post hoc* Tukey’s test was applied to create statistically homogeneous groups. To visualize the data in a reduced dimension, principal component analysis (PCA) was used. PCA is an exploratory and unsupervised pattern recognition technique, which enables more insight into the dataset. Since the whole data matrix (mean values) was poorly conditioned (24x28), the variables were chosen based on their importance for discriminating the samples, using a data mining tool in Statistica. Nine variables (Force, Hardness, Sweetness, delta H I, Ton I, delta H2 II, Tend II, Tend I, L) were chosen with $p < 0.05$. Before PCA, the Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) measure

of sampling adequacy and Bartlett's test of sphericity were performed. KMO examined the strength of the partial correlation (how the factors explain each other) between the variables. Since KMO = 0.793, the value indicates that the degree of information among the variables' overlap greatly/the presence of a strong partial correlation. The Bartlett's test examined the null hypothesis that the correlation matrix is an identity matrix. An identity correlation matrix means the variables are unrelated and not ideal for factor analysis. The Bartlett's test gave the $p = 0.00$, the null hypothesis was rejected, which means that the correlation matrix is indeed not an identity matrix. In turn, cluster analysis (CA), another unsupervised recognition technique, was used as preliminary evaluation of the information in the whole dataset. CA was used to group the samples based on the similarities without any preliminary assumption of class membership. CA was applied with Ward's method as the agglomeration rule and Euclidean distance as a metric. Data for CA were standardized. A general regression model (GRM) was applied to check the effect of reformulation, using time as covariate variable, and quality parameters (type of samples = reformulation), which enables the precision of sample comparison to be increased. Desirability functions were applied to show the optimal sample (the best) based on the chosen variables (sensory characteristics, SFI indices and aw).

3. Results and discussion

3.1 The colour changes in wafers during storage

The values of colour parameters shown in Table 2 i.e. L^* , a^* , b^* , chroma (C), hue angle (h°) and colour difference (ΔE) in Fig. 1. Parameters of L^* , a^* , b^* refer to lightness, redness and yellowness in CIE Lab colour space, respectively. Additionally, colour measurements were investigated in CIE LCh colour space, which uses polar (cylindrical) coordinates, including chroma (C) and hue angle (h°). Chroma indicates the relative saturation and the difference in the colour of an item from the grey colour with the same lightness. The higher the chroma values, the higher the colour intensity of the samples perceived by humans (Rajagukguk et al., 2024). Angle hue indicates the gradation of colour based on the colour wheel's angle, while ΔE quantifies the difference between the initial colour of fresh sample (0 month) and in subsequent months (3, 6, 8, 10, 12 and 13 months) of storage. A significant effect of reformulation and storage time on the wafers was observed ($p \leq 0.05$), and the fat-reduced sample with fruits extract addition (WTE), in particular, differed significantly from the others (Table 2). The total mean value of the L^* parameter for the WTE sample was

significantly lower (66.99) than the total L^* values of WS, WC and WT samples (67.9, 68.5 and 68.2, respectively). The effect of lightness modification after adding natural extract to the cookies was also observed by others (Bhat et al., 2018; Kozłowska et al., 2019). A similar tendency was reported for hue angle (h°) values. In contrast, the total mean values for redness (a^*), yellowness (b^*) and saturation (C) of WTE sample were significantly higher than the corresponding values of colour parameters for the rest of the samples tested. There was no significant difference between colour parameters (L^* , a^* , b^* , chroma, hue angle) of WS and WT samples when considering the total mean from the whole storage period (Table 2). The lightness (L^*) of the standard sample (WS) increased during the first six months from the value 64.1 to 69.0, after which it remained at a stable level until the end of the storage period. A similar trend was reported for the sugar-reduced sample (WC), as the value of L^* increased during the first eight months (from 65.7 to 69.2) and then remained stable up to the end of the storage period. With regard to the WT sample, the lightness increased, reaching the maximum level in the 10th month (70.7), after which a decrease was observed, followed by an increase in the 13th month to the same level as in the 8th month of storage. The lightness of the WTE sample increased until the 12th month, reaching a value of 71.2, then decreased to the same level as at the beginning of the storage (64.4). In conclusion, all samples became lighter with the time of storage. The most pronounced L^* changes over time were in the WTE sample, whereas in WC and WS there was only a slight change. The effect of increased colour lightening was previously reported by (Aksoylu et al., 2015), where the significant effect of time and functional additives on the surface colour of cookies during 5 months of storage was shown. Giuffrè et al. also found a temporal trend toward increased clarity in cantuccini biscuits formulated with 70 % extra virgin olive oil during 12 months of storage (Giuffrè et al., 2022). The values of a^* and b^* parameters were positive for all samples, which correspond to the red and yellow colour, respectively. At the beginning of storage (0 month), the highest a^* and b^* values were obtained for the WTE sample (6.24 and 26.91, respectively). The sample order in decreasing a^* values was then as follows: WTE>WS>WC>WT, and for b^* as follows: WTE>WC>WS>WT. For the WS and WC samples, the a^* and b^* values dropped after three months of storage and then increased. This increase was observed up to the 12th month of storage in WS samples, whereas in the WC sample after an increase until the 6th month, the redness decreased and remained stable until the end of storage period. A steady decrease in a^* values was observed in the WT and WTE samples, reaching a minimum in the 10th and 12th months, respectively, followed by a sharp increase. Similar changes as those observed for a^* values were reported for the b^* parameter

over time in the WS, WC and WTE samples. For WT samples, the yellowness increased during the first three months, then decreased, reaching a minimum in the 10th month, after which it increased sharply to a maximum of 25.7 in the 12th month.

The values of chroma (C) ranged between 18.1 and 29.8 for all samples and all storage periods, which indicates that the colour intensity was rather poor, close to a grey colour, taking into account the maximum value of 100. In turn, the values of angle hues (h°) were located on the colour wheel between the yellow and red colours in values close to the yellow colour and ranging from 75.7 to 88.2. The values of ΔE (Fig. 1) decreased with storage time in the WS sample, reaching a minimum in the 12th month, followed by a slight increase at the end of storage to the same level as in the 8th month. For the WC and WT samples, a slight rising trend thorough the whole storage period was noticed. As described above, the values of ΔE increased sharply, peaking in the 12th month, then the values dropped to the same level as in the 3rd month. This means that the WS samples became darker, whereas WC, WT and WTE sample became brighter during storage. The highest colour difference (ΔE) value was observed for the WTE sample, for which the ΔE parameters were 9.5 after 12 months of storage. This means that the WTE sample brightened most over time. Generally, the values of ΔE varied from 5.1 to 7.9 for the WS sample, from 3.8 to 6.5 for the WC sample, from 4.0 to 6.9 for the WT sample, and finally from 3.1 to 9.5 for the WTE sample. Colour differences ΔE can be categorized as imperceptible differences (0–0.5), slight differences (0.5–1.5), just noticeable differences (1.5–3.0), marked differences (3.0–6.0), extremely marked differences (6.0–12.0) and colours of different shades (above 12.0) (Kim et al., 2002; Young & Whittle, 1985). In our study, all samples showed marked or extremely marked differences during the whole storage time.

3.2 Changes in water activity of wafers during storage

One of the most important quality attributes of the wafers is water activity (a_w), primarily influenced by moisture absorption and migration during storage and affecting the product's texture. Water activity (a_w) is parameter often used to describe microbial stability and texture (Gunes et al., 2022). Regarding the a_w values obtained (Fig. 2), it can be observed that across all samples and storage periods the water activity values ranged from 0.07 - 0.26, which is much lower than the critical level for microbial growth (0.6). Additionally, all obtained a_w values were below the 0.3 value, above which wafers quickly absorb moisture and the wafer's crispiness shifts to a harder one, arising in a mechanically stronger texture

(Tiefenbacher, 2017c). Considering water activity changes throughout the whole storage period (Fig. 2), it can be observed (by comparing the lowercase letters a-b) that a_w values varied significantly ($p \leq 0.05$) from time 0 to the end of storage (13th month). It is worth noting that there were two groups of samples in time 0: WT&WTE and WS&WC, for which a_w was in the range of 0.09-0.10 and 0.12-0.13, respectively. For all the samples tested from beginning till 3rd month, the a_w values increased significantly ($p \leq 0.05$), after which there was a significant decrease in water activity till the 10th month. However, different behaviour of water activity was observed for the sample WC (characterized by a reduced amount of sugar in cream i.e. 27%) compared to the other samples with 40-42% sugar (WS, WTE, WTE). For the WC sample, significantly higher a_w values were observed from the 3rd month until the end of storage than for the other samples. In Fig. 2, it can also be seen that after 10 months, a_w increased faster in the WC sample than in the other three, which proves that sugar reduction in the recipe plays a significant role in water activity. It is well documented that sugar decreases water activity, reducing the likelihood of microorganism growth (Plotnikova et al., 2021). The significantly lower a_w values for the remaining three samples (WS, WTE, WTE) throughout the whole storage period confirm this statement. The results in Fig. 2 also show that the storage time had a significant impact on the increase in water activity. Two main sources of moisture uptake in the wafer can be identified: the migration between wafer sheet and cream, and the sorption of moisture from the surrounding humid air. In the former case, conditioning (or maturing) of the wafer sheets until they reach equilibrium with the water activity of the cream can effectively minimize moisture migration. The increase in a_w during the first three months of storage can be explained by the sorption of moisture from the surrounding atmosphere in the package. After this time, there was the decline in a_w values and it was more pronounced in the samples with higher sugar content (WS, WTE, WTE), which can indicate that there was migration of water from the wafer sheets to cream forced by sugar presence. After reaching the minimum in the 10th month, there was the second increase in water activity. Finally, a_w values rose, reaching values of 0.26 (WCE) and 0.14-0.16 (WS, WT, WTE) after 13 months of storage. Higher a_w values (0.42-0.47) were observed in cream-filled wafers coated with chocolate that were stored for 8 months (Cevoli et al., 2023). There may be various explanations for the upward trend in water activity changes during storage. As other researchers reported, moisture migration from the air during storage occurs when the moisture barrier properties of the packaging film are inadequate, or when the sealing of the packages is compromised (Tiefenbacher, 2017a). However, the cause of the increase may also lie in another phenomenon related to phase transition occurring in the sugar. Sugars such as

sucrose, fructose, glucose, and lactose are found in an amorphous state, which are capable of crystallization. The transition from the amorphous to the crystalline state involves the release of water, leading to increased water activity. This can potentially reflect in the data obtained in our study. The issue of water migration between product layers (cream and wafer) during storage may also be important in terms of changes in the visco-elastic properties of cream and changes in the wafers' texture.

3.3 Texture changes in wafers during storage

Texture plays a crucial role in the perception and enjoyment of food, thereby serving as a key element in food technology. The instrumental brittleness of cream-layered, wafer-type products is the result of their mechanical resistance to an acting force, such as breaking. Fig. 3A shows the changes of the breaking force (hardness) of the sample measured as the maximum stress value of the curve, while in Fig. 3B the gradient of the slope is related to sample toughness - the steeper the gradient, the tougher the sample. The mechanical properties of cream-layered wafers are largely created by the properties of the wafer sheets and the cream between them. As illustrated in Fig. 3A, as in the case of water activity, two groups of samples can be distinguished i.e. WS&WC, for which the breaking force for fresh samples was 5.9 and 6.6 N and WT&WTE, with values of 3.62 and 2.98 N, respectively. It can also be observed that throughout the whole storage period, samples WS and WC showed significantly ($p \leq 0.05$) higher values of breaking force (about 2 times) in all tested storage periods compared to those with fat-reduced creams (WT, WTE). This difference between the two groups remained until the end of the storage period. The explanation for this difference can be sought in the different composition of the creams. In preparing the WC and WS cream samples only palm oil was used, which consisted of approx. 53 % saturated fatty acids (SFA) and 47 % unsaturated fatty acid (UFA). In the case of WT and WTE cream samples, a mixture of shea butter and high oleic rapeseed oil (1.5:1 w/w) was used, for which approx. 37 % SFA and 63 % UFA was determined. It should be taken into account that the presence of a higher amount of SFAs in WS and WC creams makes palm oil more solid at room temperature than creams with shea butter and HORO, and this fact may have a more decisive influence on the higher values of the breaking force for WC and WS wafers than for WT and WTE wafers. This can indicate that the type of oils used in the cream could be responsible for the difference in the hardness occurring between two groups of wafers. It should be also taken into account that a predominant content of UFA in shea fat and HORO could influence the lower

emulsification capacity compared to palm oil with a higher SFA content. Microscopic analysis (Fig. S1, supplementary material) confirmed better homogeneity of the emulsion in the WS and WC creams compared to the WT and WTE creams, where larger particles were observed.

In the case of WS, WC and WT samples at the beginning of storage, a significant ($p \leq 0.05$) increase occurred during the first three months to the values 8.2, 8.0, and 6.2 N, respectively. After this time, the hardness level fluctuated rather than changing with any trend. The rise in breaking force during the first three months can be attributed to the retrogradation of starch (more amylose than amylopectin) or to the polymorphic transitions of triacylglycerols in lipid phase, which can contribute to an increase in hardness, especially of cream. It is worth noting that for the WTE sample this phenomenon of the hardness increase was not observed, since there was no sharp rise in the breaking force value during the first 3 months. The WTE sample was also very stable from the beginning until the 10th month, which was expressed by the slight changes (not significant, $p < 0.05$) in the breaking force from 3.62 to 4.5 N. This can indicate that the addition of fruit extract stabilized the structure of the cream and could inhibit the formation of lipid-starch complexes or starch retrogradation.

Analysing the changes in breaking force from the 3rd to the 13th month of storage for WS, WC and WT samples reveals that there were more slight fluctuations of hardness for all samples than any trend. However, the most stable was the WC sample, for which breaking force values were not significantly different from the 3rd until the 13th month ($p > 0.05$), comparing lowercase letters in Fig. 3A. These were significantly higher than for the WTE sample in each storage period. This means that the WS sample was harder than the WTE sample throughout the whole storage period. The WCE sample contained the lowest content of sugar (27 %), moderate fat content (33 %), with the rest being starch, which can indicate that the highest content of starch in these samples had a stabilizing effect. Through its thickening, stabilizing, gelling and water-binding properties, the starch strengthened the structure of the cream, and thus of the whole wafers. At the end of storage (13th month), the aforementioned wafers reached the highest hardness of 7.73 N, while the lowest was observed for the WT sample at a level of 3.7 N. A number of factors affect viscosity and mechanical properties, such as particle size and their distribution in the sample, crystallization of fat, the amount of protein, sugars and their crystallization, and fibre from ingredients added in the process. The presence of the aforementioned complexes could contribute to an increase in the elastic properties of the cream, and consequently, to an increase in its hardness.

In the analysis of the second parameter under investigation shown in Fig. 3B, the gradient of the slope confirmed the results obtained above. These changes and the course of the force-time dependence curves coincided with the analysis of the hardness of the wafers as determined in the individual test periods. This implies the significant ($p \leq 0.05$) dependence between the gradient of the measurement curve and the hardness of the test sample (the greater the angle, the harder the sample). The highest values of the gradient determined in the periods from the 6th to the 13th month were found for wafers with WC cream (average value of 13.12 N/s). This results from reducing the amount of sugar and replacing it with starch, which created a strong and stable cream in terms of mechanical characteristics. On the other hand, the lowest gradient values of 5.38 N/s on average, determined in the 13th month of storage, were established for the WT and WTE samples. This value is approximately 3 times lower than the gradient determined for standard wafers (WS) and for the WC sample, in which the sugar content was reduced, and rice starch was added. The peak area and number of fractures were also examined (data not shown). Changes in the mechanical properties of the wafers may result from the occurrence of phase transition of the ingredients contained in the cream. The degree of these transitions depends on the sugar and fat content and the addition of starch, which affect the viscosity and mechanical properties of the systems being tested. As a result, the creams added to the wafers differ in their fat content and profile of fatty acids, sugars, protein and fibre. Cevoli et al. examined cream-filled wafers covered with chocolate and stored 8 months at 18 °C and reported that during storage the mechanical properties of wafer cookies were mainly affected by moisture migration from the cream or chocolate and moisture absorption from air, which was confirmed by a good linear relationship (R^2 up to 0.84) between water activity and mechanical parameters (Cevoli et al., 2023). Other studies also reported that the increase in moisture content during storage adversely influenced the textural properties of the biscuits (Romani et al., 2016) or breadsticks (Alamprese et al., 2017) leading to reduced hardness and a loss of crispness. Using an emulsion-filled gel (EFG) based on inulin and extra virgin olive oil, shortbread cookies with up to 50 % fat replacement demonstrated good structural and sensory stability over a 60-day storage period (Paciulli et al., 2020). While fat reduction influenced cookie texture, volume, and colour (leading to harder, taller cookies and darker tones), storage primarily caused minor texture softening, which is likely to have been due to moisture redistribution.

3.4. Melting phase transition of creams measured by DSC

The DSC technique was used in this study to monitor changes in the melting profiles of the lipid fractions of the creams (WS, WC, WT, WTE) during 13 months of storing the wafers. The melting profile measurement procedure included two heating cycles. The profiles from the first heating cycle are shown in Fig. 4, while those from the second heating cycle are presented in Fig. 5. The DSC curves obtained during the first heating reflect the current state of polymorphic forms present in the creams. Therefore, it was essential to study heating curves first, due to polymorphic transitions occurring in fats during storage. As shown in Fig. 4 and Table S1 (Supplementary material), the melting profiles for four samples (WS, WC, WT, WTE) are divided into two fractions with many peaks identified: a lower melting fraction (T1 I, T2 I, T3 I, T4 I, T5 I) and a higher melting fraction (T6 I, T7 I, T8 I, T9 I). In the case of samples WS and WC, the melting profiles corresponded to that of pure refined palm oil (Islam et al., 2022). Moreover, Che Man et al. also identified two fractions (low- and high-melting peak group) in the profile of refined palm oil with a similar shape of melting profile, for which different polymorphic forms such as α , β , β' were identified (Che Man et al., 1999).

Generally, for all cream samples (WS, WC, WT, WTE), the melting profiles changed throughout the storage period, with some peaks disappearing (T5 I, T7 I, T8 I) or shifting in position (T1 I, T2 I, T3 I, T4 I). This indicates that polymorphic transitions occurred throughout storage. For the fresh cream samples containing palm oil in the lipid fraction (WS, WC), the melting temperature in the first heating DSC profiles ranged from -27 to 50 °C, whereas for the reformulated cream samples with shea fat and HORO, the range was from -27 to 46 °C (Table S1, Supplementary material). In all samples, a narrowing of the phase transition temperature range was observed, caused by an increase in the onset temperature (T_{on} I), which corresponded to the beginning of the phase transition, and a decrease in the end temperature (T_{end} I). The most pronounced changes occurred for all samples after 10 months of storage, particularly in the onset temperature (T_{on}), which increased from -27 °C (in the 0 month) to approx. -11 °C (in the 12th month). Table S1 also shows that the peak temperatures of T1 I, T3 I, and T4 I decreased over the storage period, while the peak temperature of T2 I increased. Significant changes in onset temperature (T_{on} I) corresponded to the results of total enthalpy (ΔH I) (Fig. 6A) and partial enthalpies of the lower melting fraction ($\Delta H1$ I) (Fig. 6B) and the higher melting fraction ($\Delta H2$ I) (Fig. 6C). At the beginning of storage, an increase in both total and partial enthalpies was observed for all cream samples, which may indicate polymorphic changes towards more stable forms. However, after 10 months, a sharp

decrease in total enthalpy (ΔH I) was recorded, mainly due to a reduction in the partial enthalpy of the lower melting fraction (ΔH_1 I).

In order to explain these phenomena, it was necessary to analyse the second heating cycle. The DSC profiles for this cycle are shown in Fig. 5, and the corresponding temperature values are presented in Table S2 (Supplementary Material). In general, the profiles for all cream samples (WS, WC, WT, WTE) after the second heating cycle displayed five peaks, namely, T1 II, T2 II, and T3 II in the lower melting fraction, and T4 II and T5 II in the higher melting fraction. As with the profiles from the first heating cycle, the onset temperature (T_{on} II) was around -27 °C for all fresh cream samples, increasing to approximately -11 °C after 10 months of storage. To better understand this phenomenon, the enthalpy results must be examined, and these are shown in the graphs of total enthalpy (ΔH II) (Fig. 6D), and the partial enthalpies of the lower melting fraction (ΔH_1 II) (Fig. 6E) and the higher melting fraction (ΔH_2 II) (Fig. 6F). From 0 to 10 months, the enthalpy values (ΔH II, ΔH_1 II, ΔH_2 II) did not change significantly ($p > 0.05$). However, after 10 months, all enthalpy values dropped sharply with a significant change ($p \leq 0.05$). Since all samples were subjected to the same crystallization conditions by rapid cooling at 5 °C/min after the first heating, the DSC profiles in the second heating cycle cannot be considered in the terms of polymorphic transitions. Thus, we can observe the relatively stable values of the enthalpy values (ΔH II, ΔH_1 II, ΔH_2 II) throughout 10 months as the result of erasing all thermal history with all polymorphic forms. However, after 10 months there was a significant reduction in enthalpy values for all samples, as in the first heating cycle. Therefore, a question arises regarding the cause of this phenomenon. Taking into account the shift in the onset temperature towards higher values, there is an assumption that the observed enthalpy decrease after 10 months can likely be attributed to the migration of low-melting triacylglycerols - liquid at room temperature - into the wafer sheets.

Comparing the profiles and enthalpy values (ΔH II, ΔH_1 II, ΔH_2 II) between various samples i.e. WS, WC, WT, WTE from the second heating (Fig. 6), it can be seen that the enthalpy values for WS and WC changed according to the same pattern and at the same level, confirming the presence of the same amount of refined palm oil (36 % w/w), while the enthalpy values for the WT and WTE samples were lower and changed differently during storage due to the lowered and altered lipid fraction (14 % shea fat and 9% HORO w/w). The values of total melting enthalpy (ΔH II) of samples WS and WC determined from 0 to the 10th month were similar to those measured in another study (84.8 J/g) for pure refined palm oil (Noor Lida et al., 2006). Taking into account the fact that our cream samples (WS, WC)

644 contained 36% refined palm oil, the values of enthalpy were at a comparable level. It should
645 be also noted that for the samples with reformulated lipid fraction (WT, WTE), lower
646 enthalpy was determined than for the samples with an unchanged lipid fraction (WS, WC).
647 Similar differences were observed for partial enthalpies. However, the values are reasonable,
648 since there was a lower amount of fat in the lipid fraction of WT and WTE (14 % shea fat and
649 9 % HORO w/w).

650 Based on the partial and total enthalpy values from the first and second heating cycle,
651 the solid fat index (SFI) at temperature 25 °C was calculated, according to the equation (5).
652 SFI is measured as a percentage, which expresses how much of a fat is solid at specific
653 temperatures. The higher the SFI at a given temperature, the more solid the fat is at that
654 temperature. This parameter gives insight into the spreadability, mouthfeel and stability of the
655 product, which are important for spreadable fats or confectionery products. Fig. 7A presents
656 the changes in the SFI, calculated from the first heating melting curves (SFI I) and in Fig. 7B,
657 the changes in the SFI, calculated from the second heating melting curves (SFI II). Generally,
658 it can be seen that for both SFI I and SFI II the values were relatively stable from time 0 to the
659 10th month of storage for each of four samples (WS, WC, WT, WTE). After this time, a
660 drastic, approx. 1.5-2-fold increase in both parameters was noted. Comparing the four
661 samples reveals similar behaviour as in the case of texture, namely, that samples WS and WC
662 differed significantly from the samples WT and WTE during the 10 month of storage. During
663 this period, WS and WC samples were characterized by higher SFI values than samples WT
664 and WTE. However, in month 10, the SFI II values equalized for all four samples to 34-36%.
665 The differences in SFI level between those groups can be explained by the various fatty acid
666 compositions of the cream samples. WC&WS cream samples were prepared from palm oil
667 consisting of approx. 53 % SFA and 47 % UFA, while WT &WTE cream samples were made
668 from the mixture of shea butter and HORO, containing 37 % SFA and 63 % UFA. This means
669 that the samples with palm oil are more solid at room temperature than cream with shea butter
670 and HORO. Taking this into account, it is justified that SFI for WS and WC was higher than
671 for WT and WTE during the 10 months of storage. However, after this time, the situation was
672 reversed, i.e. first in the 10th month, the SFI II values equalized and then in the last month
673 they reached significantly higher values for WT and WTE (63-64) than WS and WC (48-49
674 %).

675 3.5 Sensory analysis

For sensory analysis, five attributes were assessed, two related to texture (crispness and hardness) and three to tastiness (sweetness, cocoainess and rancidity), as demonstrated in spider graphs for various storage periods (0, 3, 6, 8, 10, 12, 13) in Fig. 8. A general declining trend in crispness was observed across all samples, which is indicative of texture deterioration over time – a common phenomenon in stored food products. Evidence presented by Popov-Raljić et al. suggested that extended storage, particularly up to 180 days, had a substantial effect on the texture of the analyzed dietary cookies (Popov-Raljić et al., 2013). Among the tested formulations, WC wafers exhibited the steepest decline in crispness, which is in line with the results of the higher water activity and higher breaking force and gradient of slope throughout the storage compared to rest of samples. A statistically significant reduction was already noticeable by the 6th month of storage, with the lowest crispness values recorded at the end of the observation period. Conversely, WS wafers maintained relatively higher crispness values throughout the storage period, with a more gradual decline. WT wafers exhibited a similar trend to WS but with slightly lower crispness levels. The WTE sample demonstrated the best crispness stability, consistently maintaining the highest values up to approximately the tenth month. Hardness measurements revealed two distinct groups: WT&WTE and WS&WC. At the beginning of the storage period, the reduced-sugar wafers (WC) exhibited a moderate initial hardness (4.2). This parameter increased noticeably within the first three months, reaching 5.2, and then stabilized around 5.3 for the remainder of the storage period. Similarly, WS wafers began with the highest initial hardness (5.0), which also increased to 5.2 within the first three months and remained relatively stable thereafter. In contrast, WT and WTE wafers were significantly less hard throughout the entire storage period, which is in line with the instrumentally measured texture (breaking force and gradient of slope). Initially, both samples showed similarly low hardness values (3.1). The hardness of WT increased to approximately 3.3 within the first three months and then plateaued, with a slight downward trend after the tenth month. WTE wafers, in particular, showed a gradual and continuous increase in hardness over time – from 3.1 to approximately 3.6 after 13 months. Although the changes were relatively minor, the trend direction was clearly upward. A positive correlation between storage duration and hardness was observed in all samples, though the rate of change varied. While temporal stability in hardness is generally desirable from a consumer perspective, excessive hardness, as observed in the WC formulation, may negatively affect sensory acceptability. Throughout the 13-month storage period, "cocoainess" and sweetness remained stable across all samples. All formulations, regardless of composition, exhibited similar cocoainess scores (7.8), suggesting that neither reformulation

nor storage time had a meaningful impact on this attribute. In contrast, sweetness ratings varied notably: the WC sample had the lowest sweetness score (6.3). The reduction in sugar content in WC directly corresponded with a lower sweetness perception, which aligns with expectations based on its altered composition. These findings underscore the impact of sugar content on key sensory attributes, particularly sweetness, which is a critical factor in consumer acceptance. The sweetness of WT and WTE wafers showed the highest level (7.6), while the standard WS wafers had an intermediate sweetness level of 7.5. Rancidity remained undetectable (score = 0) in all samples for the first 10 months of storage. Initial signs of rancidity were recorded in the 12th month, with the most pronounced development in the WT sample, followed by WC and WS. Notably, the WTE sample exhibited virtually no detectable rancidity throughout the storage period, likely due to the presence of antioxidant additives in its formulation. In order to lower the high calorie content of confectionery fillings, Hadnadev et al. investigated the use of potato and waxy maize maltodextrin gels as partial fat substitutes (Hadnadev et al., 2014). The textural and color properties were changed when maltodextrin was substituted for fat; a higher gel content produced a firmer and darker filling. However, sensory evaluations showed that fillings with a 5 % (w/w) fat reduction had the highest and most reliable acceptability scores. The control sample retained its superior texture, even though reduced-fat formulations had a generally acceptable taste and odor; however, the fat-reduced filling received the highest overall ratings.

3.6 Microbiological analysis

In order to monitor the level of safety of wafers during storage, *Salmonella* sp., Coliforms and total plate count (TPC) as well as moulds and yeasts were tested. In the results for all tested samples and periods, *Salmonella* sp. was absent in 25 g, yeast and moulds and Coliforms < 10 cfu/g. In Table S3 (Supplementary material) results of microbiological analysis of wafers samples (WS, WC, WT, WTE) stored during 13 months are presented. All evaluated products adhered to stringent microbiological quality standards. The TPC average value for all samples (WS, WC, WT, WTE) in all tested periods (0, 6, 10 and 13 months) was in the range 2.15-2.26 log cfu/g and did not change significantly ($p \leq 0.05$) based upon storage time. The TPC values were low and also affirmed a strict sanitary regime. Kumari et al. reported TPC in the range from 3.16-4.25 log cfu/g during 75 days of storing cookies enriched with pumpkin seed flour (Kumari et al., 2021). As Podolak et al. established, foods with a low moisture content can facilitate the growth of pathogenic bacteria, primarily due to the failure

to adhere to proper hygiene practices and inadequate control of raw materials (Podolak et al., 2010). Pathogenic bacteria can survive for extended periods in finished products with low water activity. However, over time, a gradual reduction in their viability occurs. Beuchat and Mann tested cookies with low-water activity fillings and confirmed *Salmonella sp.* viability up to 6 months (Beuchat & Mann, 2015).

3.7 Multivariate analysis of quality parametrs of reformulated and stored wafers

In the tested wafers differing in their formulations, for which various quality parameters were tested as a function of storage time, it was important to learn about the relationships between the test parameters characterizing colour, texture, water activity, the melting behaviour of cream, sensory parameters. For this purpose, the principal component analysis (PCA) was used first, which revealed the structure of the obtained data. PCA enables to transform the data to a few principal components (PCs), which are uncorrelated, without any preliminary assumptions about their distribution and almost without any loss of information. Each principle component (PC) represents the linear combination of all variables, which maximally explain the variance. In this study, the PCA was performed on mean values due to the diverse number of samples for each parameter'. However, when using the whole data, the matrix was incorrect (size 28x24) and did not fulfil the requirements (Bartlett's test and KMO measure). Thus, the variables were chosen by data mining tools in Statistica software, using the importance criterion in sample discrimination. Nine variables, including breaking force (texture measurement), hardness, sweetness (sensory analysis), ΔH I, T_{on} I, T_{end} I, ΔH 2 II, T_{end} II (melting behaviour by DSC) and L (colour) were chosen (all with $p < 0.05$). Then, using the eigenvalue criterion, the first three PCs were extracted (eigenvalues > 1), which explained 89.98 % of the total variance with PC1 explaining 60.61 % of variance, and the PC2 18.03 % of the variance. The results (loadings and scores) are shown in a PCA biplot (Fig. 9). Based on the factor loadings (PCs-variables correlations), it could be stated that PC1 was the most, positively correlated with breaking force (0.86), hardness (0.93), T_{end} I (0.93), ΔH 2 II (0.96) and T_{end} II (0.94) ΔH I (0.72), and negatively with sweetness (-0.71), PC2 with T_{on} I (0.94) and PC3 with L (0.89). Based on the plot for scores of samples (Fig. 9), four groups of samples could be distinguished. The first group with high, positive PC1 included WS and WC samples stored for between 0 and 10 months. The second group included WT and WTE samples stored between 0 and 10 months with a positive PC2 (high sweetness values) and a negative PC1 (low values of breaking force, hardness and ΔH

values). The third group was composed of the WT and WTE samples stored for 12 and 13 months with a high, positive PC 2 (high T_{on} I values) and negative PC1 values (high sweetness and low breaking force, hardness and ΔH values). The fourth group consisted of WS and WC samples stored for 12 and 13 months, also with a high, positive PC2 and a relatively high PC1.

The next multivariate analysis used to characterize the data matrix was the cluster analysis (CA), applied to group samples on the basis of similarities in clusters. In this study, the similarities are inversely related to the Euclidean distance chosen as a metric. Based on the CA dendrogram, three distinct clusters at the Distance of $D_{link}/D_{max} = 45\%$ were determined (Fig. 10). To show the levels of the parameters in each sample, a heatmap was prepared (Fig. 10). The first cluster included samples WS and WC stored during the first 10 months, and for those samples high T_{end} I, T_{end} II, ΔH I and ΔH II (including partial enthalpies $\Delta H1$ and $\Delta H2$) as well as breaking force values and hardness marks. The second cluster included WT and WTE samples stored during the first 10 months with moderate values of DSC parameters. The third cluster includes samples stored for 12 and 13 months. Based on the heatmap, we can observe that in these cluster samples WT and WTE (in the 12th and 13th months) show low T_{end} I, T_{end} II, ΔH I and ΔH II (including $\Delta H1$ and $\Delta H2$) and high SFI values.

Finally, general regression model (GRM) analysis was performed to show the global effect of reformulation by analysing the difference between samples with time as covariate variables. The results are presented in Fig. S2 (Supplementary material). Using the desirability functions for chosen parameters i.e. sensory characteristics (important for consumers), SFI values as calculated from enthalpy values, related to melting properties of cream and water activity a_w , related to the microbiological and textural stability, the best sample was WTE at the beginning of storage.

4. Conclusions

This study's results indicate that reformulation as well as a storage time of 13 months significantly affected the quality of all cream-layered wafers. Considering the changes in the color of the wafers over the entire 13-month storage period, it was found that the addition of fruit extract (WTE) significantly influenced color parameters towards a darker color (lower L value) and higher a^* and b^* values related to redness and yellowness. All samples became lighter with a longer storage time. The most pronounced L^* changes over time were in the

WTE sample. Moreover, for this sample significantly higher chroma values meant more a vivid and saturated color, while the highest colour difference (ΔE) value was also observed after 12 months of storage. The one-third reduction in fat content in cream samples of the WT and WTE wafers, as well as replacing palm oil with shea fat and HORO, led to better mechanical characteristics compared to WS and WC wafers, which were harder throughout the entire storage period. This was caused by the main component of cream in the WC and WS wafers, which was palm oil, consisting of 53 % SFA. Thus, those samples were more solid at room temperature, which was confirmed by a higher SFI index at room temperature than for the WT and WTE samples.

The range of changes in water activity during storage was too small (0.07 - 0.26) to affect the changes in texture, although a_w values changed significantly during storage. Sugar reduction in the recipe played a significant role for water activity, since the a_w values for WC were higher than for other samples, doubling in the 10th month, after which the a_w values increased more rapidly in the WC sample than in the other samples.

The observed melting enthalpy and onset temperature values dropped sharply after 10 months, which is likely to be due to the migration of the liquid at room temperature low-melting triacylglycerols into the wafer sheets. These findings were corroborated by the sensory analysis, which indicated a noticeable change in cream consistency over time, evolving toward a more compact, heavier, and thicker texture, with diminished airiness and increased density. Additionally, sensory evaluation revealed that among all the formulations tested, the most pronounced loss of crispness was established for WC wafers. This observation was consistent with their higher water activity, as well as increased breaking force and slope gradient during storage compared to the other samples.

Multivariate analyses (PCA, CA) of the quality parameters of reformulated and stored wafers revealed significant changes after 10 months of storage. A distinct cluster for the samples analysed in the 12th and 13th months was identified based on the dendrogram and heatmap. However, GRM analysis indicated that fresh wafers with reduced fat content and the addition of fruit extract (WTE) were the most favourable, showing the best overall characteristics in terms of the global effect of reformulation over time.

Ethics statement

The sensory panelists provided informed consent by affirming the following statement before participating in the survey: "I have carefully read the information and fully understand

my rights as a potential subject in a research experiment. I am aware that my responses are confidential, and I agree to participate in this study.” They had the option to withdraw from the survey at any time without providing a reason. The applied wafers samples were safe for consumption.

References

- Aidoo, R. P., Afoakwa, E. O., & Dewettinck, K. (2014). Optimization of inulin and polydextrose mixtures as sucrose replacers during sugar-free chocolate manufacture - Rheological, microstructure and physical quality characteristics. *Journal of Food Engineering*, 126, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.036>
- Aksoylu, Z., Çağindi, Ö., & Köse, E. (2015). Effects of blueberry, grape seed powder and poppy seed incorporation on physicochemical and sensory properties of biscuit. *Journal of Food Quality*, 38(3), 164–174. <https://doi.org/10.1111/jfq.12133>
- Alam, M., Dar, B. N., & Nanda, V. (2024). Development and characterisation of nutritionally enriched honey filling as novel alternative to commercial fat-based filling for bakery applications. *Food and Humanity*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100361>
- Alamprese, C., Cappa, C., Ratti, S., Limbo, S., Signorelli, M., Fessas, D., & Lucisano, M. (2017). Shelf life extension of whole-wheat breadsticks: Formulation and packaging strategies. *Food Chemistry*, 230, 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.092>
- Bełkowska, L., Muzolf-Panek, M., Islam, M., & Tomaszewska-Gras, J. (2023). Increasing the oxidative stability of the wafer lipid fraction with fruit extract during storage. *Applied Sciences (Switzerland)*, 13, 103. <https://doi.org/10.3390/app13010103>
- Bełkowska, L., Muzolf-Panek, M., Waśkiewicz, A., Rudzinska, M., & Tomaszewska-Gras, J. (2025). Oxidative stability and colour changes of fat- and sugar-reduced wafer creams during the storage. *Journal of Stored Products Research*, 112(April). <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2025.102653>
- Beuchat, L. R., & Mann, D. A. (2015). Survival of Salmonella in cookie and cracker sandwiches containing inoculated, low-water activity fillings. *Journal of Food Protection*, 78(10), 1828–1834. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-142>
- Bhat, N. A., Hamdani, A. M., & Masoodi, F. A. (2018). Development of functional cookies using saffron extract. *Journal of Food Science and Technology*, 55(12), 4918–4927. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3426-1>
- Briones, V., & Aguilera, J. M. (2005). Image analysis of changes in surface color of

- chocolate. *Food Research International*, 38(1), 87–94.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.09.002>
- Cevoli, C., Evangelisti, A., Gradari, P., & Fabbri, A. (2023). Storage of wafer cookies: Assessment by destructive techniques, and non-destructive spectral detection methods. *Journal of Food Engineering*, 336. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2022.111209>
- Che Man, Y. B., Haryati, T., Ghazali, H. M., & Asbi, B. A. (1999). Composition and thermal profile of crude palm oil and its products. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76(2), 237–242.
- Chugh, B., Singh, G., & Kumbhar, B. K. (2015). Studies on the optimization and stability of low-fat biscuit using carbohydrate-based fat replacers. *International Journal of Food Properties*, 18(7), 1446–1459. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.833218>
- Colla, K., Costanzo, A., & Gamlath, S. (2018). Fat replacers in baked food products. *Foods*, 7(192). <https://doi.org/10.3390/foods7120192>
- Dana, H., & Sonia, A. (2024). Substituting Sugar in Pastry and Bakery Products with Functional Ingredients. *Applied Sciences*, 14(18). <https://doi.org/10.3390/app14188563>
- Di Monaco, R., Miele, N. A., Cabisidan, E. K., & Cavella, S. (2018). Strategies to reduce sugars in food. *Current Opinion in Food Science*, 19, 92–97.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.008>
- Fatah-Jahromi, S., Varidi, M. J., Varidi, M., & Nooshkam, M. (2024). Reduced fat and sugar cakes developed by protein/polysaccharide/licorice extract ternary gel-like foams. *LWT*, 194. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115790>
- Gallagher-Squires, C., Isaacs, A., Reynolds, C., & Coleman, P. C. (2023). Snacking practices from infancy to adolescence: parental perspectives from longitudinal lived experience research in England. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 1–9.
<https://doi.org/10.1017/S0029665123003592>
- Ghazani, S. M., Boroujeni, Y. S., Shaw, N., & Marangoni, A. G. (2024). Chapter 15 - Scientific issues and challenges with production and refining edible oils and fats. In E. D. G. Fraser, D. L. Kaplan, L. Newman, & R. Y. Yada (Eds.), *Cellular Agriculture. Technology, Society, Sustainability and Science* (pp. 215–232). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18767-4.00005-6>
- Gibson, E. L., Androutsos, O., Moreno, L., Flores-Barrantes, P., Socha, P., Iotova, V., Cardon, G., De Bourdeaudhuij, I., Koletzko, B., Skripkauskaitė, S., & Manios, Y. (2020). Influences of parental snacking-related attitudes, behaviours and nutritional knowledge on young children’s healthy and unhealthy snacking: The ToyBox study.

- Nutrients*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/nu12020432>
- Giuffrè, A. M., Caracciolo, M., Capocasale, M., Zappia, C., & Poiana, M. (2022). Effects of Shortening Replacement with Extra Virgin Olive Oil on the Physical–Chemical–Sensory Properties of Italian Cantuccini Biscuits. *Foods*, 11, 299. <https://doi.org/10.3390/foods11030299>
- Grzelczyk, J., Drożdżyński, P., Budryn, G., Czarnecki, A., Paprocka, Z., & Gałązka-Czarnecka, I. (2025). High-fiber cookies with bamboo flour and edible flowers: Evaluation of structural properties, phenolic content, antioxidant activity and nutritional value. *LWT*, 216. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.117321>
- Gunes, R., Palabiyik, I., Konar, N., & Said Toker, O. (2022). Soft confectionery products: Quality parameters, interactions with processing and ingredients. *Food Chemistry*, 385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132735>
- Gutiérrez-Luna, K., Astiasaran, I., & Ansorena, D. (2023). Fat reduced cookies using an olive oil-alginate gelled emulsion: Sensory properties, storage stability and in vitro digestion. *Food Research International*, 167. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112714>
- Habekost, M. (2013). Which color differencing equation should be used? *International Circular of Graphic Education and Research*, 6(6), 20–33.
- Hadnadev, M., Dapčević Hadnadev, T., Dokić, L., Pajin, B., Torbica, A., Šarić, L., & Ikonić, P. (2014). Physical and sensory aspects of maltodextrin gel addition used as fat replacers in confectionery filling systems. *LWT*, 59(1), 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.044>
- Islam, M., Bełkowska, L., Konieczny, P., Fornal, E., & Tomaszewska-Gras, J. (2022). Differential scanning calorimetry for authentication of edible fats and oils - What can we learn from the past to face the current challenges? *Journal of Food and Drug Analysis*, 30(2). <https://doi.org/doi.org/10.38212/2224-6614.3402>
- Kim, S., Park, J.-B., & Hwang, I.-K. (2002). Quality Attributes of Various Varieties of Korean Red Pepper Powders (*Capsicum annuum* L.) and Color Stability During Sunlight Exposure. *Journal of Food Science*, 67(8), 2957–2961. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08845.x>
- Konar, N., Gunes, R., Palabiyik, I., & Toker, O. S. (2022). Health conscious consumers and sugar confectionery: Present aspects and projections. *Trends in Food Science and Technology*, 123, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.001>
- Kozłowska, M., Zbikowska, A., Marciniak-Lukasiak, K., & Kowalska, M. (2019). Herbal extracts incorporated into shortbread cookies: Impact on color and fat quality of the

- cookies. *Biomolecules*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/biom9120858>
- Kumari, N., Sindhu, S. C., Rani, V., & Kumari, V. (2021). Shelf Life Evaluation of Biscuits and Cookies Incorporating Germinated Pumpkin Seed Flour. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10(01), 1436–1443. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1001.170>
- Marangoni, F., Daniela, M., Silvia, S., Michele, S., Lorenzo Maria, D., Francesco, L., Carlo, A., Gianluca, C., Nicola, F., Andrea, G., Michelangelo, G., Claudio, M., Marisa, P., Bianca, B., & Poli, A. (2019). Snacking in nutrition and health. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(8), 909–923. <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1595543>
- Meijaard, E., Abrams, J. F., Juffe-Bignoli, D., Voigt, M., & Sheil, D. (2020). Coconut oil, conservation and the conscientious consumer. *Current Biology*, 30(13), R757–R758. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.059>
- Meijaard, E., & Sheil, D. (2019). The Moral Minefield of Ethical Oil Palm and Sustainable Development. *Frontiers in Forests and Global Change*, 2. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2019.00022>
- Noor Lida, H. M. D., Mat, H., Sundram, K., & Idris, N. A. (2006). DSC Study on the Melting Properties of Palm Oil , Sunflower Oil , and Palm Kernel Olein Blends Before and After Chemical Interesterification. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 83(8), 739–745.
- Paciulli, M., Littardi, P., Carini, E., Paradiso, V. M., Castellino, M., & Chiavaro, E. (2020). Inulin-based emulsion filled gel as fat replacer in shortbread cookies: Effects during storage. *LWT*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109888>
- Plotnikova, I. V., Zharkova, I. M., Magomedov, G. O., Magomedov, M. G., Khvostov, A. A., & Miroshnichenko, E. N. (2021). Forecasting and quality control of confectionery products with the use of “water activity” indicator. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 640. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/640/6/062003>
- PN-EN-ISO4833-1:2013. (2013). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique*. Polish Committee for Standardization.
- PN-EN-ISO6579-1:2017. (2017). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella Part 1: Detection of Salmonella spp.* Polish Committee for Standardization.
- PN-EN ISO6887-1:2017-05. (2017). *Microbiology of the food chain — Preparation of test*

- samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. PN-ISO21527-2:2009. (2009). *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95*. Polish Committee for Standardization.
- PN-ISO4832:2007. (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique*. Polish Committee for Standardization.
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. G., & Elliott, P. H. (2010). Sources and Risk Factors for Contamination, Survival, Persistence, and Heat Resistance of Salmonella in Low-Moisture Foods. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1919–1936. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.10.1919>
- Popov-Raljić, J. V., Mastilović, J. S., Laličić-Petronijević, J. G., Kevrešan, Ž. S., & Demin, M. A. (2013). Sensory and color properties of dietary cookies with different fiber sources during 180 days of storage. *Hemjska Industrija*, 67(1), 123–134. <https://doi.org/10.2298/HEMIND120327047P>
- Rajagukguk, Y. V., Islam, M., Grygier, A., Siger, A., Rudzińska, M., & Tomaszewska-Gras, J. (2024). Physicochemical characteristics of cold-pressed blackcurrant-, strawberry-, and raspberry seed oils during storage and its influence on thermo-oxidative stability. *NFS Journal*, 37(September). <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2024.100195>
- Romani, S., Rocculi, P., Tappi, S., & Dalla Rosa, M. (2016). Moisture adsorption behaviour of biscuit during storage investigated by using a new Dynamic Dewpoint method. *Food Chemistry*, 195, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.114>
- Souza, A. M., Bezerra, I. W. L., Pereira, G. S., Torres, K. G., Costa, R. M., & Oliveira, A. G. (2020). Relationships between motivations for food choices and consumption of food groups: A prospective cross-sectional survey in manufacturing workers in Brazil. *Nutrients*, 12. <https://doi.org/10.3390/nu12051490>
- Sundara, R. (2012). The Science Behind The Flat Wafer Baking Process. *New Food Magazine*, 15(4), 56–61.
- Suo, X., Tagliasco, M., Bonfini, M., Bonfili, L., Moreno Araiza, O., Baggio, A., Eleuteri, A. M., Pellegrini, N., & Vittadini, E. (2025). Development of sugar- and fat-reduced pulse cookies with improved predicted glycemic behavior. *Applied Food Research*, 5(1). <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.100761>

- Tiefenbacher, K. F. (2017a). Adjuncts-Filling Creams, Inclusions, Cacao and Chocolate. In *The Technology Of Wafers and Waffles I. Operational Aspects* (pp. 313–404). Elsevier Inc. Academic Press.
- Tiefenbacher, K. F. (2017b). Chapter Six - Wafer Sheet Manufacturing: Technology and Products. In K. F. Tiefenbacher (Ed.), *The Technology Of Wafers and Waffles I. Operational Aspects* (pp. 405–486). Academic Press.
<https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809438-9.00006-5>
- Tiefenbacher, K. F. (2017c). Chapter Eight - After-Bake Technology of Crisp Wafers and of Soft Waffles. In *The Technology Of Wafers and Waffles I. Operational Aspects* (pp. 539–586). Academic Press. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809438-9.00008-9>
- Tomaszewska-Gras, J. (2016). DSC coupled with PCA as a tool for butter authenticity assessment. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 126(1), 61–68.
<https://doi.org/10.1007/s10973-016-5346-5>
- Verma, A. (2019). *Process engineering analysis of confectionery wafer manufacture*.
- Young, K. W., & Whittle, K. J. (1985). Colour measurement of fish minces using hunter L, a, b values. *Science of Food and Agriculture*, 36, 383–392.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.2740360511>
- Zoulias, E., Oreopoulou, V., & Kounalaki, E. (2002). Effect of fat and sugar replacement on cookie properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(14), 1637–1644.

Figures

Fig. 1. Color difference (ΔE) of reformulated wafer samples during 13 months storage at ambient temperature. WS – standard, WC – sugar-reduced, WT – fat-reduced and WTE – fat-reduced with fruits extract.

Fig. 2. Water activity of reformulated wafers (WS – standard, WC – sugar-reduced, WT – fat-reduced and WTE – fat-reduced with fruits extract) during 13 months storage at ambient temperature. Values given as mean $\pm$ SD. Capital letters (A-D) indices significant differences ($p \leq 0.05$) between samples in a given time; lowercase letters (a-e) indices significant differences ($p \leq 0.05$) between values for each sample during whole storage time

Fig. 3. Texture analysis: A. breaking force, B. gradient of the slope of reformulated wafers samples: WS-standard, WC-sugar-reduced, WT-fat-reduced and WTE-fat-reduced with fruits extract during 13 months of storage. Values are given as mean with standard deviation. Capital letters (A-D) indices significant differences ($p \leq 0.05$) between samples in a given time; lowercase letters (a-d) indices significant differences ($p \leq 0.05$) between values for each sample during whole storage time

Fig. 4. DSC melting profiles obtained during first heating at 5 /min of wafers cream for samples: A. WS-standard, B. WC-sugar-reduced, C. WT-fat-reduced and D. WTE-fat-reduced with fruits extract during 13 months of storage

Fig. 5. DSC melting profiles obtained during first second heating at 5 /min of wafers cream for samples: A. WS-standard, B. WC-sugar-reduced, C. WT-fat-reduced and D. WTE-fat-reduced with fruits extract during 13 months of storage

Fig. 6. Changes of melting enthalpy measured by DSC of wafers cream, obtained from the first cycle of heating: A. total enthalpy (ΔH I), B. partial enthalpy of lower melting fraction (ΔH_1 I), C. partial enthalpy of higher melting fraction (ΔH_2 I) and from the second cycle of heating: D. total enthalpy (ΔH II), E. partial enthalpy of lower melting fraction (ΔH_1 II), F. partial enthalpy of higher melting fraction (ΔH_2 II).

Capital letters (A-D) indices significant differences ($p \leq 0.05$) between samples in a given time and lowercase letters (a-d) indices significant differences ($p \leq 0.05$) between values for sample during whole storage time

Fig. 7. Solid fat index (SFI) calculated based on melting DSC profile obtained from A. first heating cycle and B. second heating cycle of four tested samples: WS – standard, WC – sugar-reduced, WT – fat-reduced, WTE – fat-reduced with fruits extract. Values given as mean $\pm$ SD. Capital letters (A-C) indices significant differences ($p \leq 0.05$) between samples in a given time; lowercase letters (a-e) indices significant differences ($p \leq 0.05$) between values for each sample during whole storage time

Fig. 8. Spider plots of sensory analysis of wafers stored during 13 months at ambient temperature: WS – standard, WC – sugar-reduced, WT – fat-reduced, WTE – fat-reduced with fruits extract.

Fig. 9. PCA biplot showing the scores of wafers samples (WS, WC, WT and WTE) and loadings of variables (vectors). The number after the sample name indicate the month of storage (e.g.WS0 – standard sample at 0 month)

Fig. 10. Heat map with the dendrogram of wafers samples (WS, WC, WT and WTE) stored during 13 months, classified using cluster analysis of similarities.

Tables

Table 1

Composition of samples (WS, WC, WT, WTE)

Ingredients (% w/w)	WS	WC	WT	WTE
Sucrose	38	22	34	34
Rice starch	-	16	10	10
Refined palm oil	36	32	-	-
High oleic rapeseed oil	-	-	9	9
Shea fat	-	-	14	14
Citrus fruits extract	-	-	-	0,1
Other components	26	30	33	33
Total sugar	42	27	40	40
Total fat	37	33	24	24

WS – standard fat-based filling, WC – sugar-reduced filling, WT – fat-reduced filling and
WTE – fat-reduced filling with citrus fruits extract

Table 2

Colour parameters (L^* , a^* , b^* , C, h°) of reformulated wafer samples during storage 13 months at ambient temperature.

Time (months)	L^*	a^*	b^*	C	h°
WS					
0	64.08 ^a ±0.25	5.29 ^e ±0.05	24.02 ^d ±0.09	24.59 ^d ±0.08	77.61 ^a ±0.16
3	67.87 ^b ±0.59	0.69 ^a ±0.08	19.01 ^a ±0.02	19.02 ^a ±0.02	87.97 ^e ±0.25
6	69.00 ^b ±1.99	1.64 ^b ±0.17	19.94 ^{ab} ±0.34	20.01 ^{ab} ±0.33	85.35 ^d ±0.56
8	69.23 ^b ±2.05	2.82 ^c ±0.57	21.05 ^{bc} ±1.14	21.24 ^{bc} ±1.20	82.46 ^c ±1.20
10	68.94 ^b ±1.57	3.93 ^d ±0.39	22.00 ^c ±1.06	22.35 ^c ±1.09	79.92 ^b ±0.72
12	68.88 ^b ±1.49	4.12 ^d ±0.09	25.12 ^d ±0.36	25.46 ^d ±0.36	80.73 ^b ±0.18
13	67.53 ^b ±0.72	1.61 ^b ±0.21	19.47 ^a ±0.26	19.54 ^a ±0.26	85.32 ^d ±0.58
Total mean	67.93 ^A ±2.11	2.87 ^C ±1.58	21.52 ^{BC} ±2.67	21.74 ^C ±2.43	82.76 ^A ±3.47
WC					
0	65.73 ^a ±0.43	4.50 ^c ±0.25	25.61 ^c ±0.27	26.00 ^d ±0.30	80.07 ^a ±0.46
3	68.02 ^{ab} ±1.03	2.59 ^{ab} ±0.18	21.90 ^{ab} ±0.43	22.06 ^{abc} ±0.40	83.30 ^{bc} ±0.59
6	67.57 ^{ab} ±1.83	4.18 ^c ±0.22	22.52 ^{ab} ±0.55	22.91 ^{bc} ±0.52	79.52 ^a ±0.75
8	69.51 ^b ±1.52	1.96 ^a ±0.58	21.01 ^a ±1.38	21.11 ^a ±1.43	84.77 ^d ±1.19
10	69.46 ^b ±1.44	2.27 ^a ±0.23	21.70 ^a ±1.00	21.81 ^{ab} ±1.02	84.09 ^{cd} ±0.35
12	69.36 ^b ±1.55	3.00 ^b ±0.09	23.49 ^b ±0.35	23.68 ^c ±0.36	82.76 ^{bc} ±0.19
13	69.74 ^b ±1.60	3.09 ^b ±0.06	21.57 ^a ±0.28	21.79 ^{ab} ±0.28	81.90 ^b ±0.16
Total mean	68.48 ^A ±1.86	3.08 ^B ±0.93	22.54 ^B ±1.61	22.76 ^B ±1.69	82.34 ^A ±1.94
WT					
0	65.33 ^a ±0.68	3.32 ^c ±0.65	19.92 ^{ab} ±0.47	20.06 ^{ab} ±0.49	83.23 ^{bc} ±0.53
3	68.32 ^b ±0.79	2.38 ^b ±0.23	23.75 ^c ±1.24	23.98 ^c ±1.32	82.13 ^b ±1.14
6	69.33 ^{bc} ±0.64	1.98 ^{ab} ±0.12	20.96 ^b ±0.33	21.05 ^b ±0.33	84.65 ^{cd} ±0.28
8	69.22 ^{bc} ±0.68	1.86 ^{ab} ±0.37	20.47 ^b ±0.75	20.55 ^b ±0.76	84.85 ^d ±0.92
10	70.73 ^c ±1.49	1.45 ^a ±0.10	18.45 ^a ±0.26	18.51 ^a ±0.25	85.56 ^d ±0.35
12	64.72 ^a ±0.40	6.21 ^d ±0.20	25.65 ^d ±0.06	26.39 ^d ±0.11	76.44 ^a ±0.38
13	69.41 ^{bc} ±1.00	3.31 ^c ±0.37	23.35 ^c ±1.35	23.58 ^c ±1.37	81.99 ^b ±0.72
Total mean	68.15 ^A ±2.26	2.93 ^{BC} ±1.55	21.79 ^C ±2.48	22.02 ^C ±2.67	82.69 ^A ±2.97
WTE					
0	63.98 ^a ±1.6	6.24 ^d ±0.10	26.91 ^{de} ±0.67	27.39 ^{cd} ±0.68	79.29 ^b ±0.29
3	65.48 ^a ±0.52	5.11 ^c ±0.18	26.17 ^d ±0.7	26.91 ^c ±0.67	76.62 ^a ±0.46
6	67.77 ^b ±0.33	4.54 ^c ±0.53	25.48 ^{cd} ±0.89	25.89 ^c ±0.96	79.96 ^b ±0.83
8	68.05 ^b ±0.55	3.25 ^b ±0.17	23.53 ^b ±0.15	23.75 ^b ±0.15	82.18 ^c ±0.42
10	67.96 ^b ±0.82	3.23 ^b ±0.36	23.99 ^{bc} ±0.56	24.21 ^b ±0.6	82.38 ^c ±0.69
12	71.19 ^c ±1.30	2.42 ^a ±0.05	21.42 ^a ±0.38	21.56 ^a ±0.38	83.60 ^d ±0.13
13	64.43 ^a ±1.09	6.91 ^d ±0.35	27.75 ^e ±0.95	28.60 ^d ±1.00	76.07 ^a ±0.33
Total mean	66.99 ^B ±2.53	4.53 ^A ±1.59	25.04 ^A ±2.15	25.47 ^A ±2.38	80.02 ^B ±2.78

Values are given as mean ± standard deviation (n=4). Different letters (a – e) in the same column indicate significant difference ($p \leq 0.05$). Different capital letters (A – C) in the same column indicate significant difference ($p \leq 0.05$). WS – standard. WC – sugar-reduced. WT – fat-reduced and WTE – fat-reduced with fruit extract.

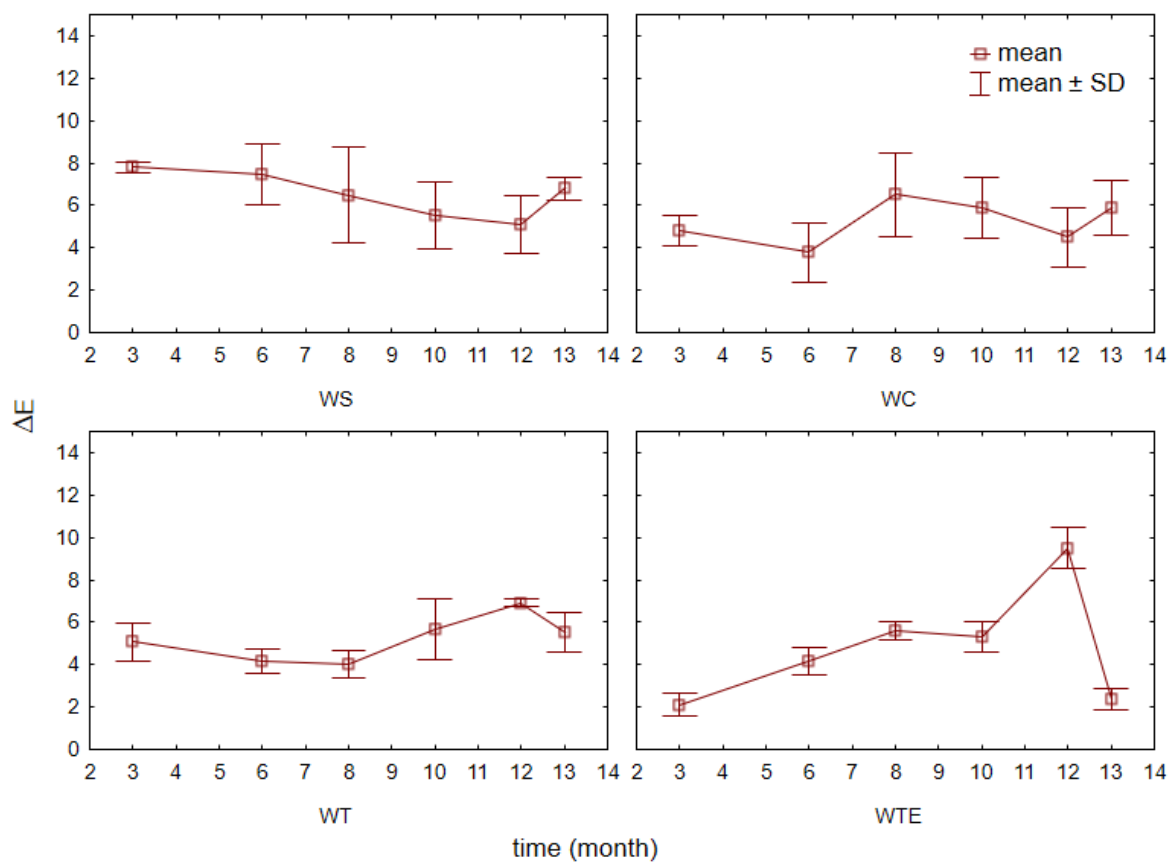
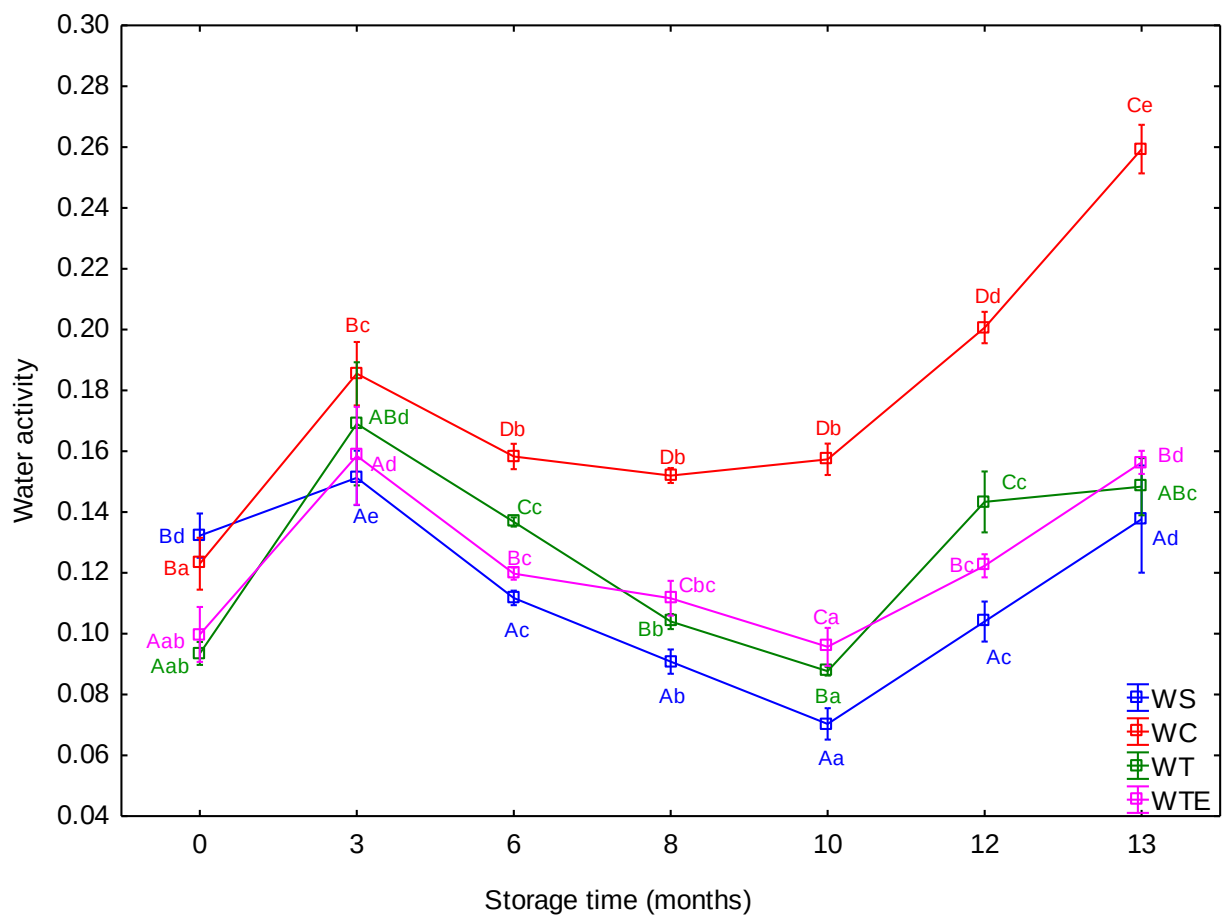
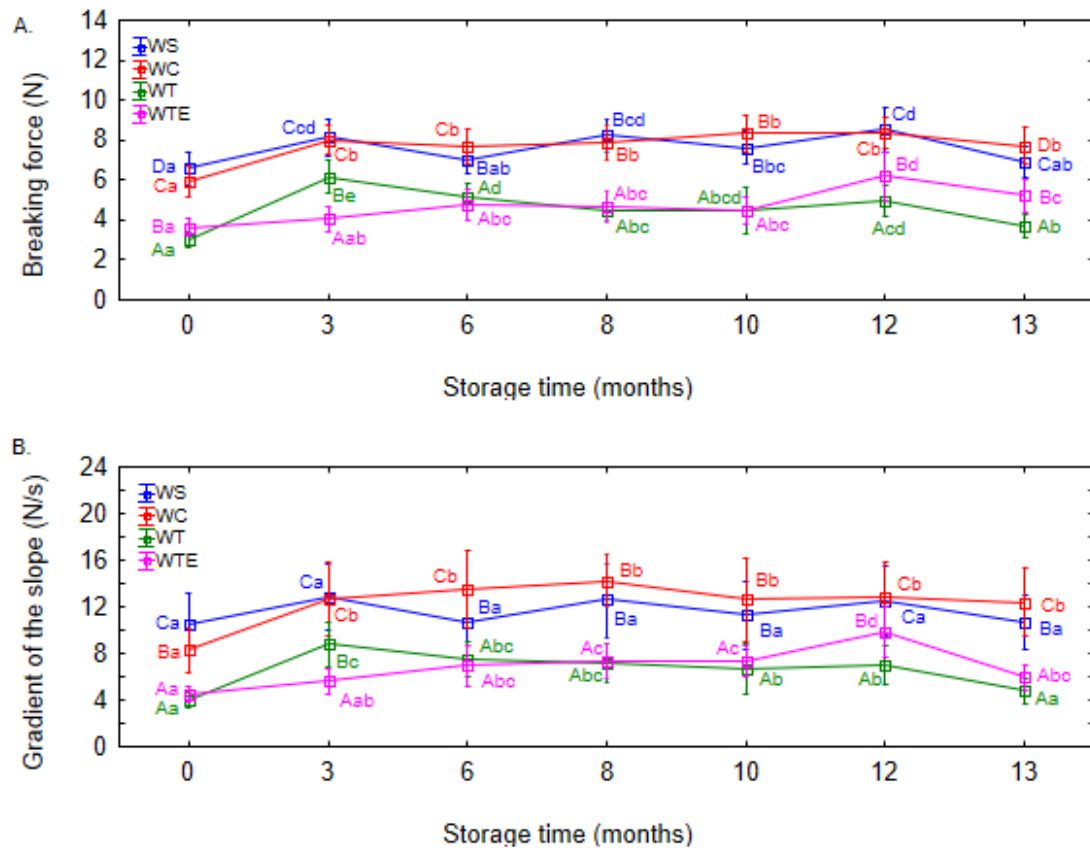
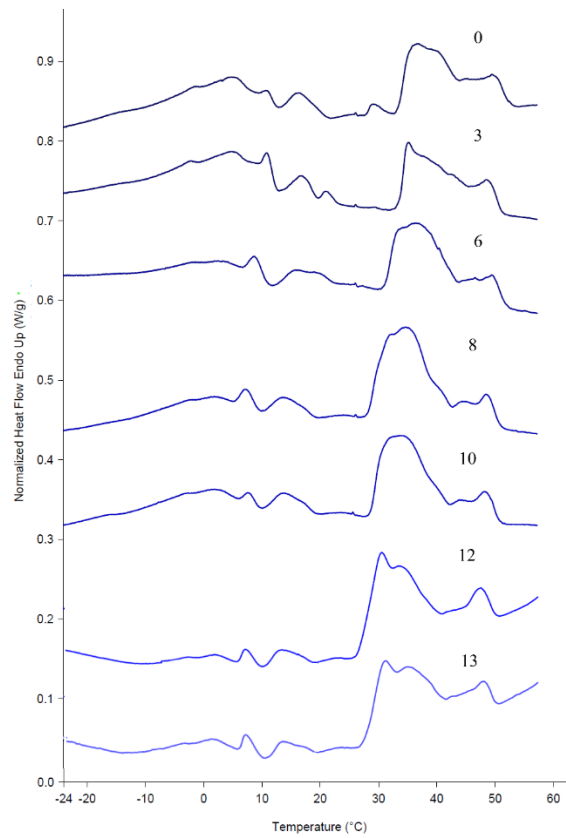


Figure 2

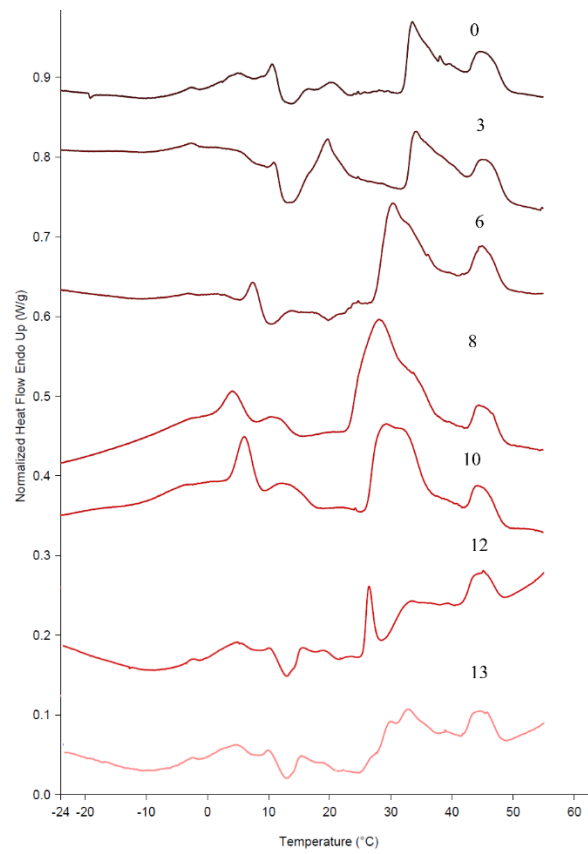




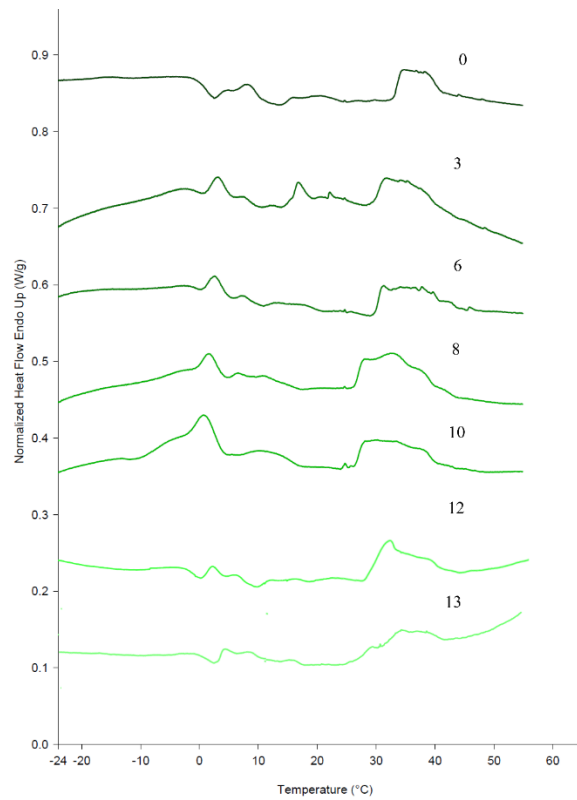
A



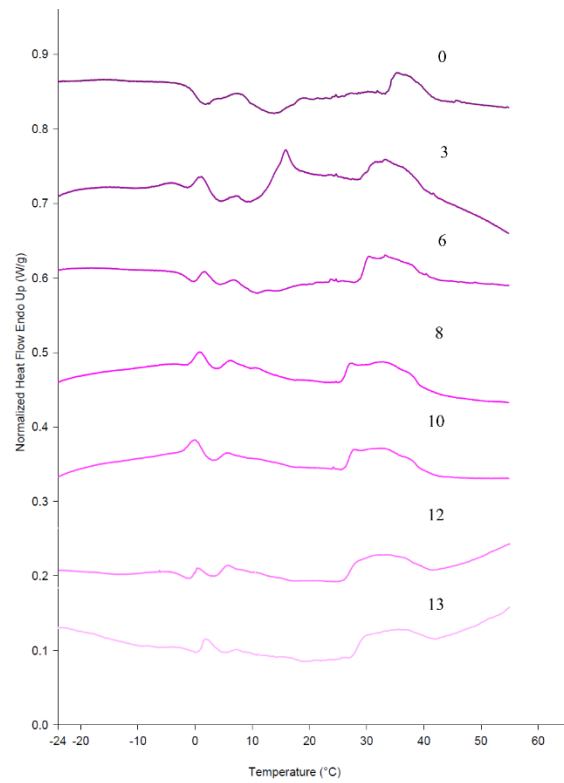
B

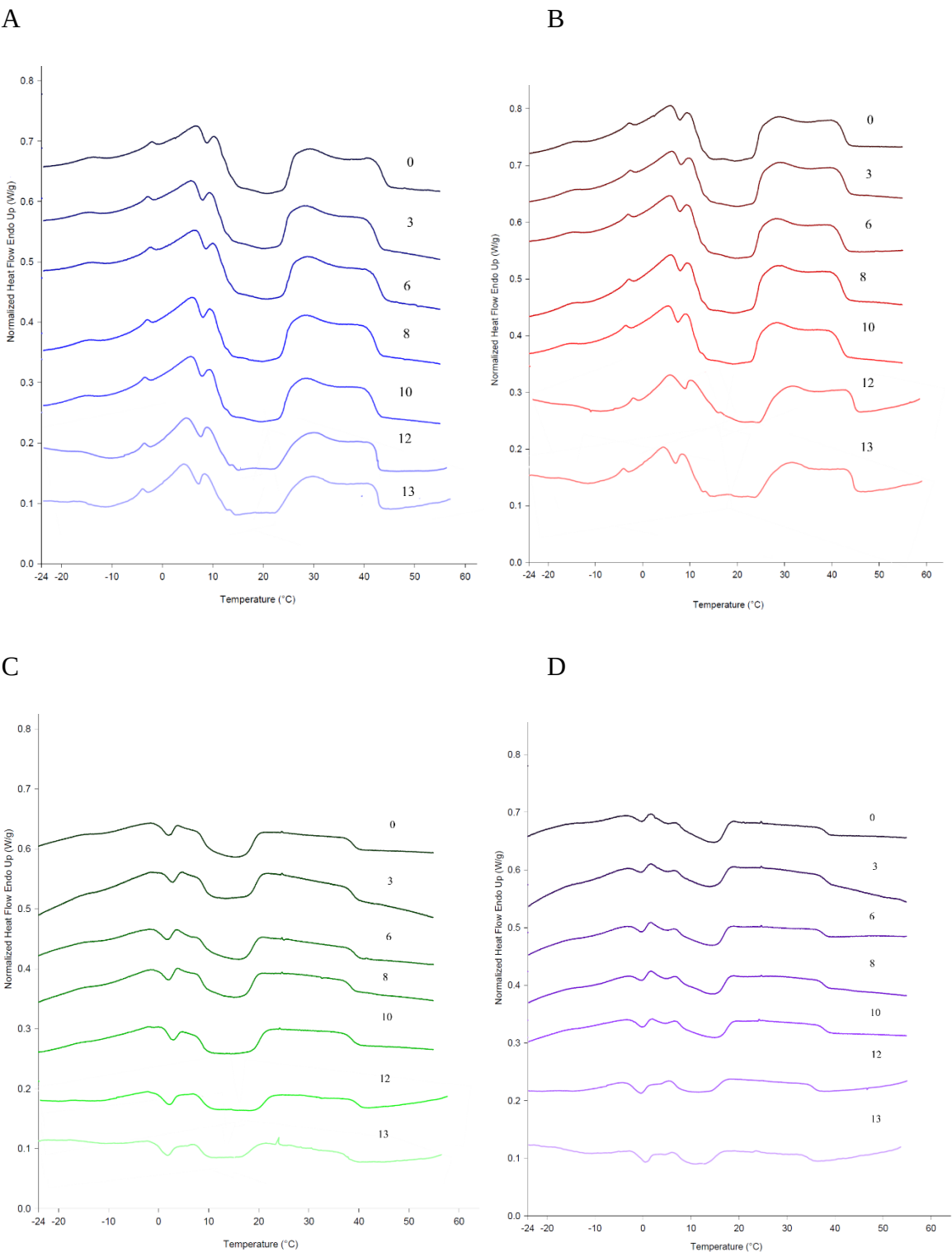


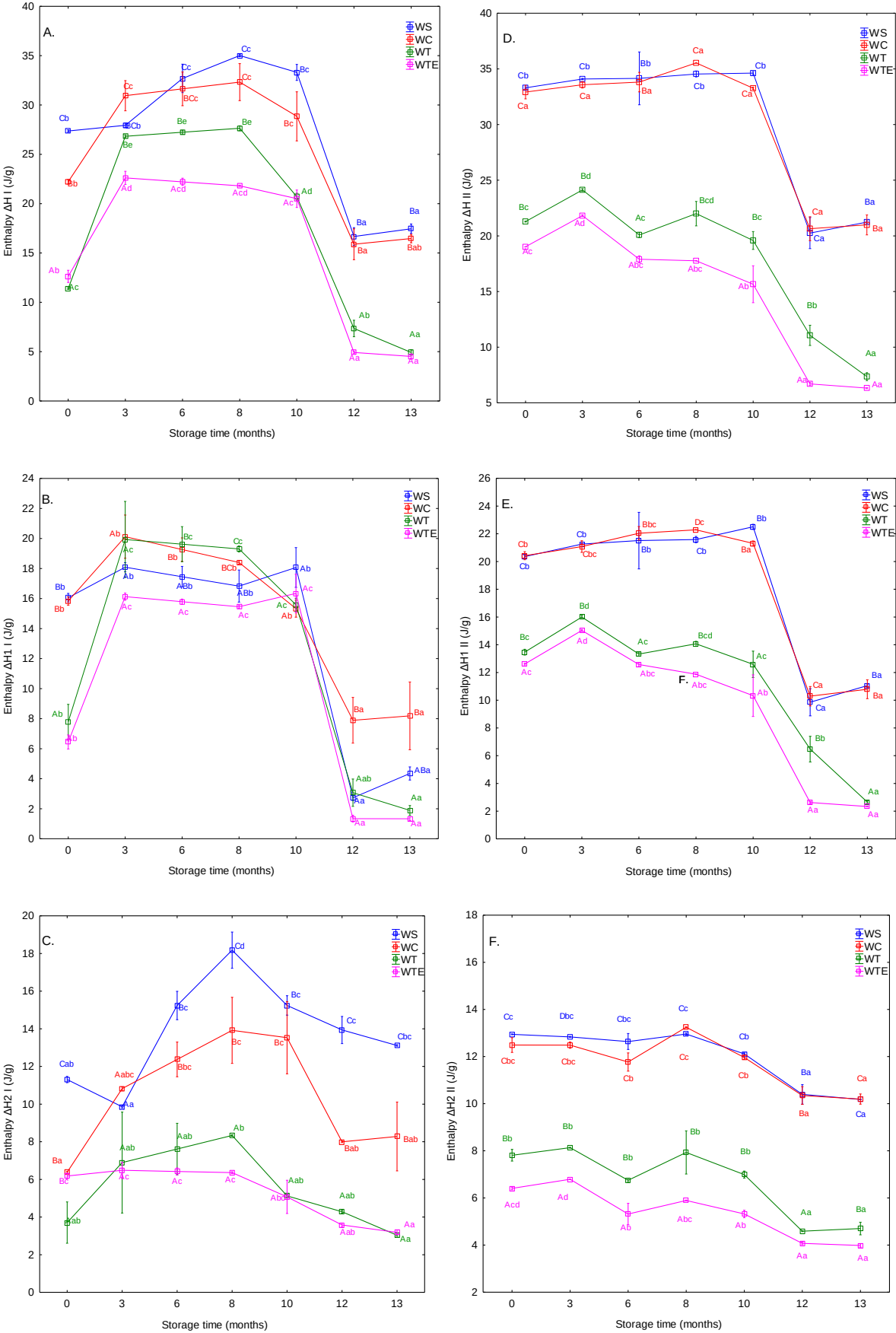
C



D







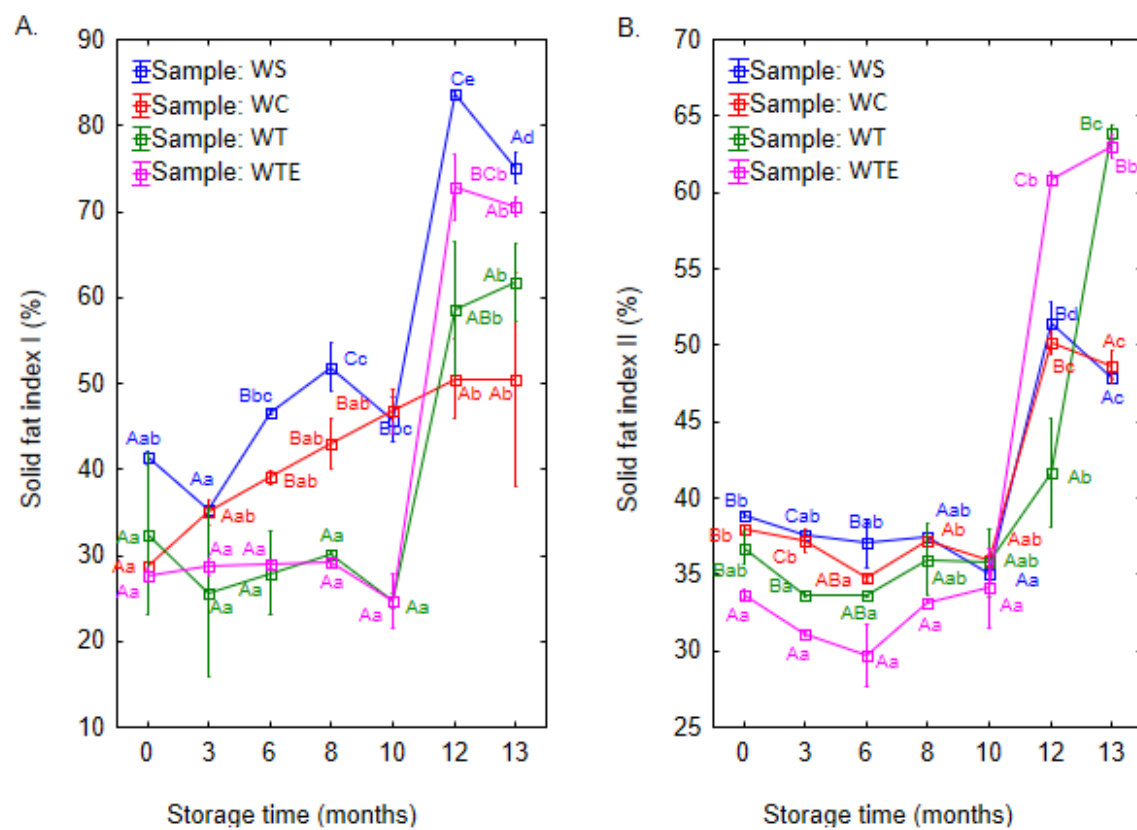
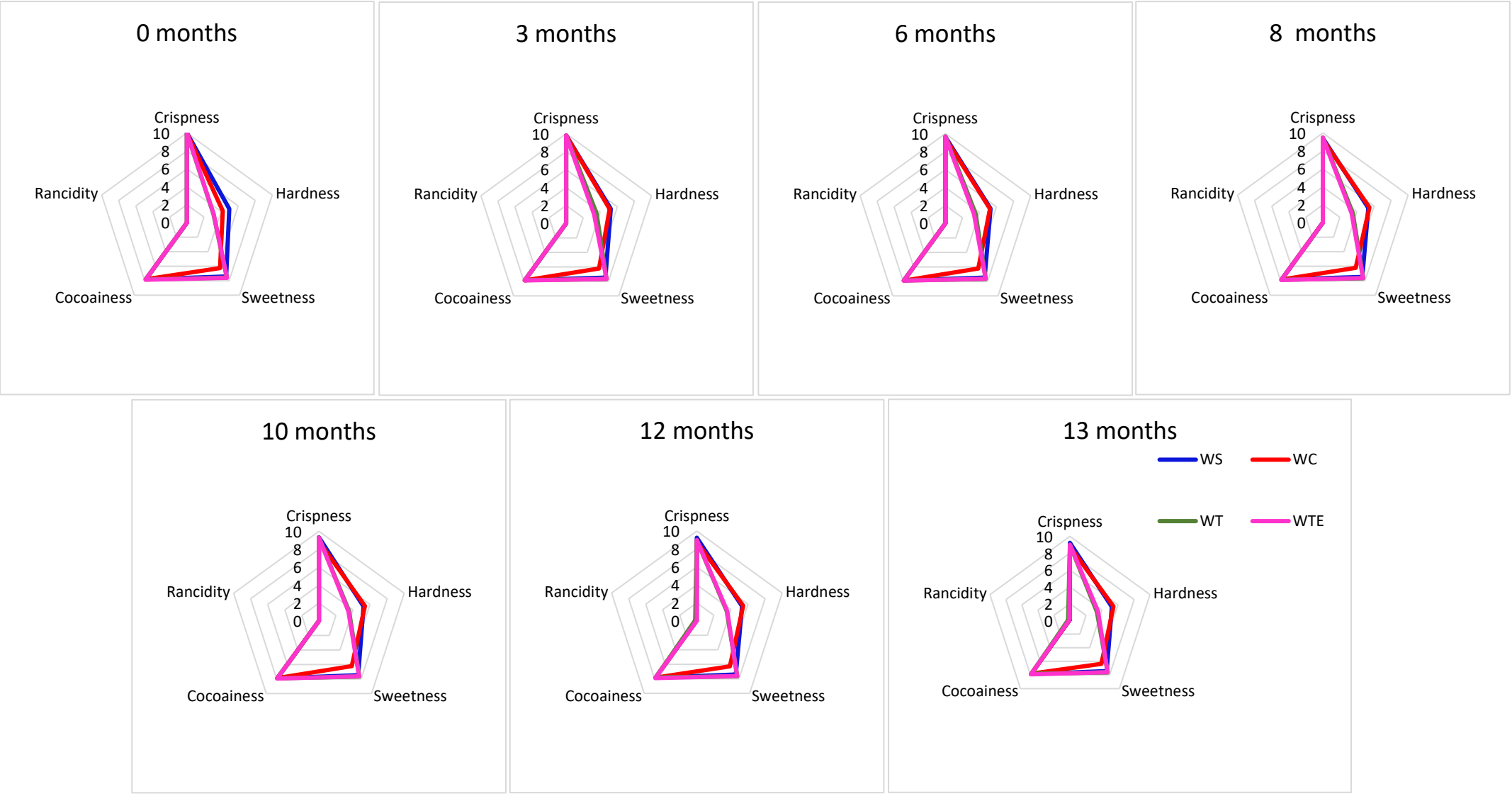
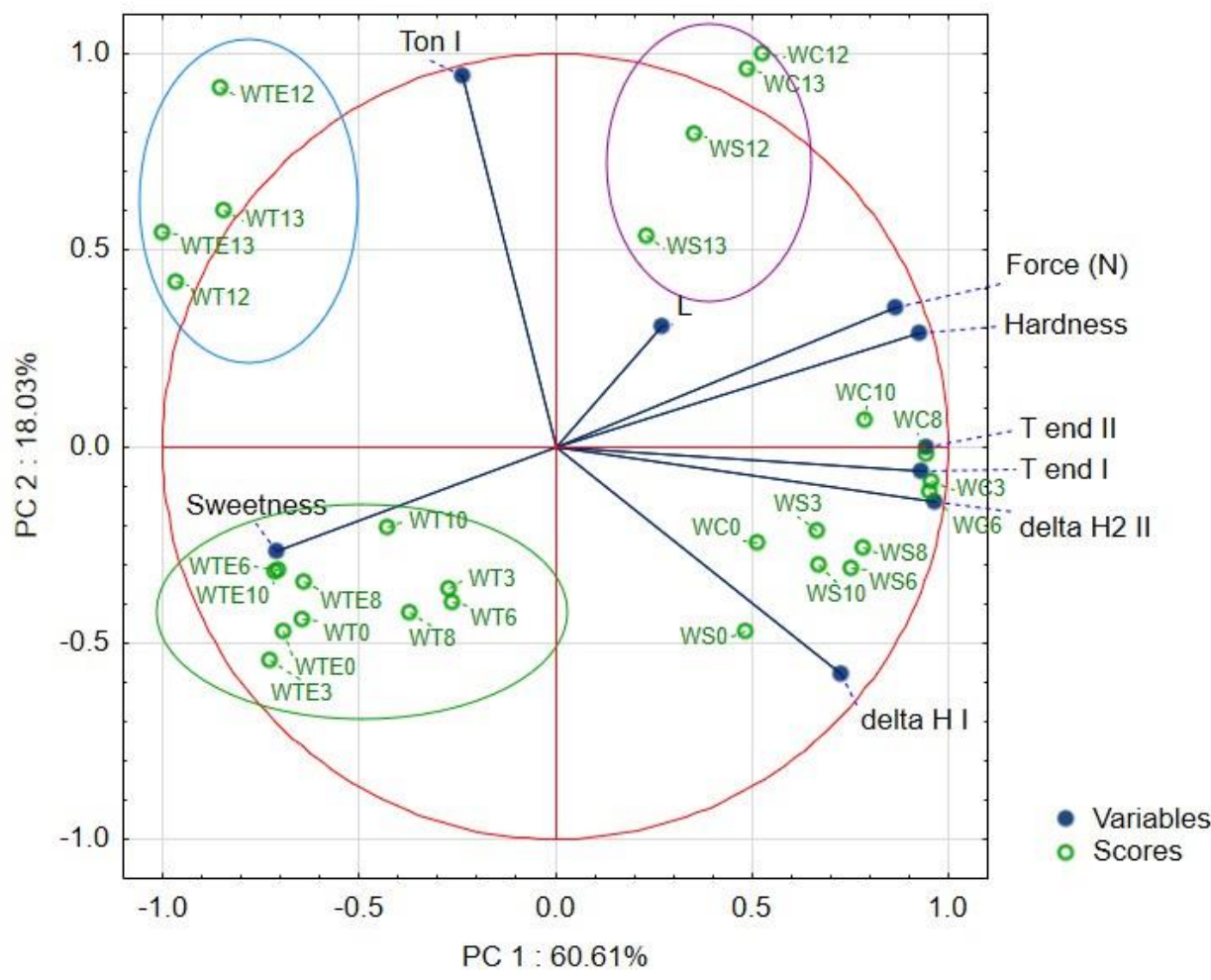
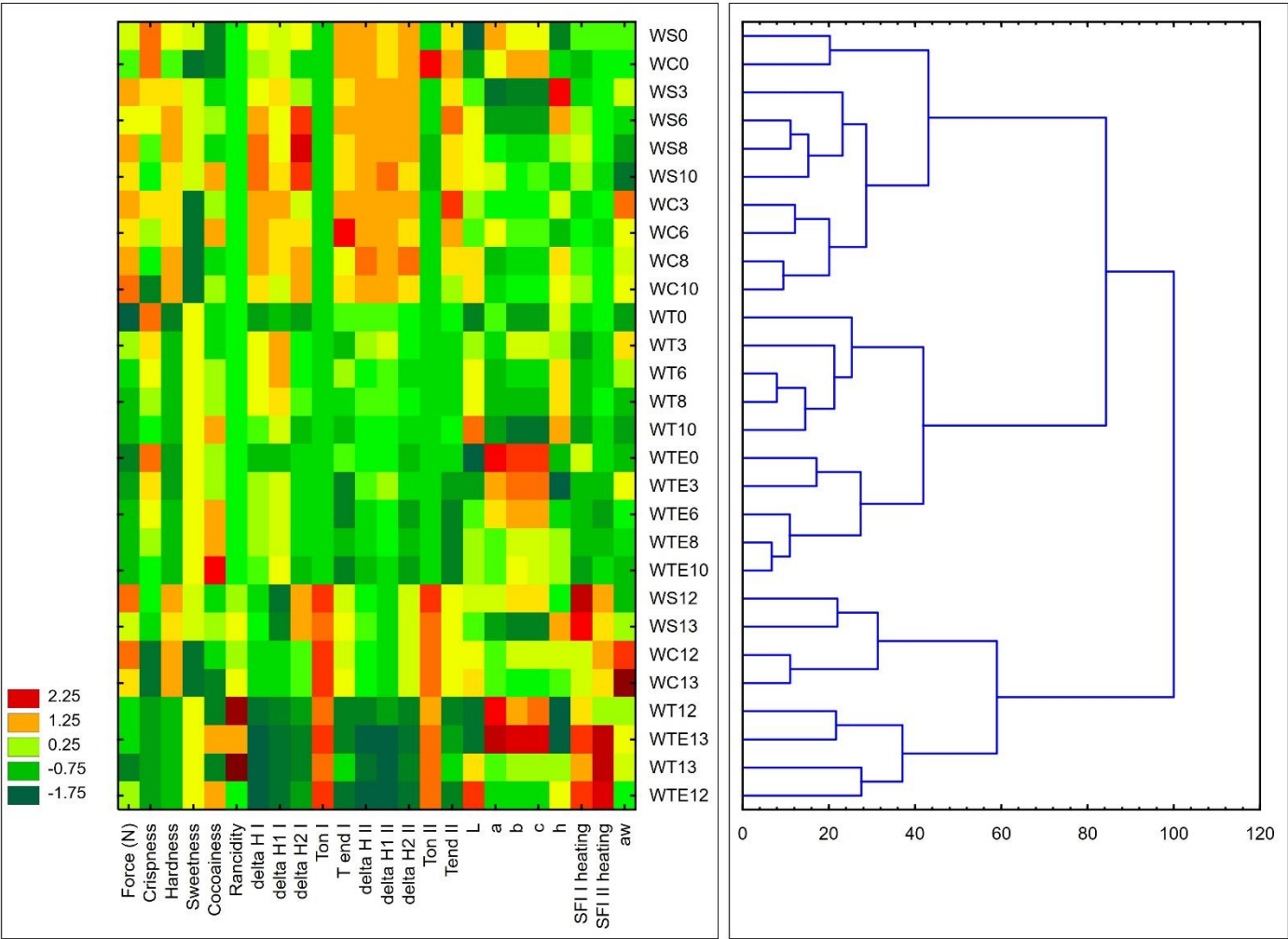
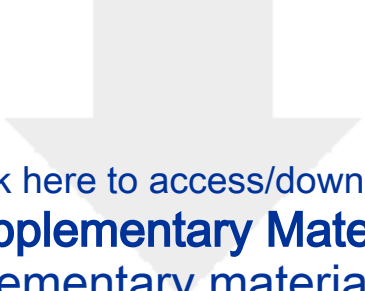


Figure 8

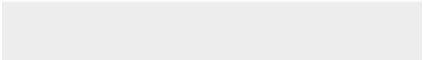








Click here to access/download
Supplementary Material
Supplementary material.docx



Declaration of interests

☒The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☐The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

13. Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie opublikowanych artykułów naukowych

mgr inż. Liliana Bełkowska

Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Islam, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2023). Increasing the Oxidative Stability of the Wafer Lipid Fraction with Fruit Extract during Storage. *Applied Sciences*, 13(1), 103 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pozyskaniu finansowania, autorstwie koncepcji, opracowaniu krytycznego przeglądu literatury, przygotowaniu projektu badań, zapewnieniu zasobów niezbędnych do przeprowadzenia badań, przeprowadzeniu badań, walidacji danych, formalnej analizie wyników oraz przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, interpretacji otrzymanych danych, graficznej prezentacji danych i opracowaniu manuskryptu.

Data 12.09.2025

Podpis

Bełkowska

dr inż. Małgorzata Muzolf-Panek
Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Islam, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2023). Increasing the Oxidative Stability of the Wafer Lipid Fraction with Fruit Extract during Storage. *Applied Sciences*, 13(1), 103 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przygotowaniu projektu badań, opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, walidacji danych, formalnej analizie wyników, przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, graficznej prezentacji danych, opracowaniu manuskryptu, redagowaniu i wprowadzaniu zmian po recenzjach.

Data 22.09.2025

Podpis

..... Muzolf-Panek Małgorzata

dr Mahbuba Islam

Department of Food Quality and Safety Management

Faculty of Food Science and Nutrition

Poznań University of Life Sciences

Declaration on co-authorship

I hereby declare that in the publication Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Islam, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2023). Increasing the Oxidative Stability of the Wafer Lipid Fraction with Fruit Extract during Storage. *Applied Sciences*, 13(1), 103, my individual contribution to its preparation consisted of conducting the research and interpreting the obtained results.

Date 15/09/2025

Signature

Mahbuba Islam


.....

prof. dr hab. Jolanta Tomaszewska-Gras
Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Islam, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2023). Increasing the Oxidative Stability of the Wafer Lipid Fraction with Fruit Extract during Storage. *Applied Sciences*, 13(1), 103 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pozyskaniu funduszy, zarządzaniu projektem, zapewnieniu zasobów niezbędnych do przeprowadzenia badań, opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, formalnej analizie wyników, opracowaniu manuskryptu, redagowaniu i wprowadzaniu zmian po recenzjach.

Data

Podpis



Signed by /
Podpisano przez:

Jolanta
Tomaszewska-Gras

Date / Data: 2025-
09-16 20:52

.....

mgr inż. Liliana Bełkowska

Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Waśkiewicz, A.; Rudzińska, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2025). Oxidative stability and colour changes of fat- and sugar-reduced wafer creams during the storage. *Journal of Stored Products Research*, 112 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pozyskaniu finansowania, autorstwie koncepcji, opracowaniu krytycznego przeglądu literatury, przygotowaniu projektu badań, zapewnieniu zasobów niezbędnych do przeprowadzenia badań, przeprowadzeniu badań, walidacji danych, formalnej analizie wyników oraz przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, graficznej prezentacji danych i opracowaniu manuskryptu.

Data 12.09.2025

Podpis

Bełkowska

dr inż. Małgorzata Muzolf-Panek

Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Waśkiewicz, A.; Rudzińska, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2025). Oxidative stability and colour changes of fat- and sugar-reduced wafer creams during the storage. *Journal of Stored Products Research*, 112 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, walidacji danych, formalnej analizie wyników, przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, graficznej prezentacji danych, opracowaniu manuskryptu, redagowaniu i wprowadzaniu zmian po recenzjach.

Data 22.09.2025

Podpis

Muzolf-Panek Małgorzata

prof. dr hab. Agnieszka Waśkiewicz
Katedra Chemii
Wydział Leśny i Technologii Drewna
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Waśkiewicz, A.; Rudzińska, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2025). Oxidative stability and colour changes of fat- and sugar-reduced wafer creams during the storage. *Journal of Stored Products Research*, 112 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu badań (zbieraniu danych).

Data 20/09/2025.....

Podpis

.....Agnieszka Waśkiewicz.....

prof. dr hab. Magdalena Rudzińska
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Waśkiewicz, A.; Rudzińska, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2025). Oxidative stability and colour changes of fat- and sugar-reduced wafer creams during the storage. *Journal of Stored Products Research*, 112 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu badań (zbieraniu danych).

Data 18/09/2025

Podpis

M. Rudzińska

prof. dr hab. Jolanta Tomaszewska-Gras
Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Waśkiewicz, A.; Rudzińska, M.; Tomaszewska-Gras, J. (2025). Oxidative stability and colour changes of fat- and sugar-reduced wafer creams during the storage. *Journal of Stored Products Research*, 112 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pozyskaniu funduszy, zarządzaniu projektem, zapewnieniu zasobów niezbędnych do przeprowadzenia badań, opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, formalnej analizie wyników, opracowaniu manuskryptu, redagowaniu i wprowadzaniu zmian po recenzjach.

Data

Podpis



Signed by /
Podpisano przez:

Jolanta
Tomaszewska-Gras

Date / Data: 2025-
09-16 20:53

.....

mgr inż. Liliana Bełkowska

Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Stangierski, J.; Tomaszewska-Gras, J. The effect of reformulation on quality changes in cream-filled wafers during storage (publikacja dołączona jako manuskrypt wysłany do publikacji w czasopiśmie *LWT*) mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pozyskaniu finansowania, autorstwie koncepcji, opracowaniu krytycznego przeglądu literatury, przygotowaniu projektu badań, opracowaniu założeń i metod, zapewnieniu zasobów niezbędnych do przeprowadzenia badań, przeprowadzeniu badań, walidacji danych, formalnej analizie wyników oraz przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, graficznej prezentacji danych i opracowaniu manuskryptu.

Data 12.09.2025

Podpis

Bełkowska

dr inż. Małgorzata Muzolf-Panek
Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Stangierski, J.; Tomaszewska-Gras, J. The effect of reformulation on quality changes in cream-filled wafers during storage (publikacja dołączona jako manuskrypt wysłany do publikacji w czasopiśmie *LWT*) mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, walidacji danych, formalnej analizie wyników, przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, graficznej prezentacji danych, opracowaniu manuskryptu, redagowaniu i wprowadzaniu zmian po recenzjach.

Data 22.09.2015

Podpis

Małgorzata Muzolf-Panek

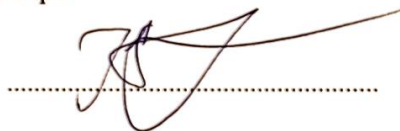
prof. dr hab. Jerzy Stangierski
Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Belkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Stangierski, J.; Tomaszewska-Gras, J. The effect of reformulation on quality changes in cream-filled wafers during storage (publikacja dołączona jako manuskrypt wysłany do publikacji w czasopiśmie *LWT*) mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu badań (zbieraniu danych).

Data 12.09.25.r.

Podpis



prof. dr hab. Jolanta Tomaszewska-Gras

Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bełkowska, L.; Muzolf-Panek, M.; Stangierski, J.; Tomaszewska-Gras, J. The effect of reformulation on quality changes in cream-filled wafers during storage (publikacja dołączona jako manuskrypt wysłany do publikacji w czasopiśmie *LWT*) mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pozyskaniu funduszy, zarządzaniu projektem, zapewnieniu zasobów niezbędnych do przeprowadzenia badań, opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, formalnej analizie wyników i graficznej prezentacji danych, opracowaniu manuskryptu, redagowaniu i wprowadzaniu zmian po recenzjach.

Data

Podpis



Signed by /
Podpisano przez:

Jolanta
Tomaszewska-Gras

Date / Data: 2025-
09-16 20:53

.....

Załącznik 1b

prof. dr hab. Jolanta Tomaszewska-Gras

dr inż. Małgorzata Muzolf-Panek

imię i nazwisko promotora / promotora pomocniczego

Oświadczenie promotora(-ów) rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt.: „Doskonalenie cech jakościowych wafli przekładanych kremem w oparciu o badania przechowalnicze” została przygotowana pod moim/naszym kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 26.09.2025

Podpis promotora rozprawy

Jolanta Gras

Podpis promotora pomocniczego rozprawy

Małgorzata Muzolf-Panek

mgr inż. Liliana Belkowska
imię i nazwisko doktoranta

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Niniejszym oświadczam, że przedłożoną rozprawę doktorską pt.: „Doskonalenie cech jakościowych wafli przekładanych kremem w oparciu o badania przechowalnicze” napisałem samodzielnie, tj.:

- nie zleciłem opracowania rozprawy lub jej części innym osobom,
- nie przepisałem rozprawy lub jej części z innych opracowań i prac związanych tematycznie z moją pracą,
- korzystałem jedynie z niezbędnych konsultacji,
- wszystkie elementy rozprawy, które zostały wykorzystane do jej realizacji (cytaty, ryciny, tabele, programy itp.), a nie będące mojego autorstwa, zostały odpowiednio zaznaczone wraz z podaniem źródła ich pochodzenia,
- rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

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

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego.

Data 26.09.2025

.....*Belkowska Liliana*.....

podpis autora rozprawy