Dr hab. inż. Anna Czubaszek, prof. uczelni
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 11.08.2021 r.

Recenzja
pracy doktorskiej Mgr inż. Marii Barbary Różańskiej
pt. **Badania nad możliwością regulacji poziomu potencjalnie szkodliwych produktów reakcji Maillarda w pieczywie bezglutenowym**
wykonanej pod kierunkiem:
prof. UPP dr hab. inż. Sylwii Mildner-Szkudlarz
w Katedrze Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

1. Celowość podjęcia problemu naukowego

Reakcja Maillarda jest procesem bardzo złożonym i choć opisana została w 1912 roku, a na przestrzeni lat wielu naukowców podejmowało badania w tym zakresie, to w dalszym ciągu pozostaje jeszcze wiele zagadnień niewyjaśnionych. Dowiedziono, że w wyniku reakcji Maillarda powstaje grupa związków uznanych za szkodliwe bądź toksyczne dla organizmów żywych, a spożywanie żywności bogatej w te związki może odgrywać ważną rolę w patogenezie wielu chorób w tym cukrzycy, choroby Alzheimera czy nowotworów.

W codziennej diecie ważną rolę spełniają produkty zbożowe, które są jednym z głównych źródeł związków reakcji Maillarda w pożywieniu. Ich producenci starają się o jak najszerszą i najciekawszą ofertę asortymentową więc w obrocie handlowym pojawiają się nowe produkty zbożowe o zmodyfikowanym składzie surowcowym, wytwarzane z wykorzystaniem nowych technologii. Wśród nowych produktów zbożowych pojawiło się wiele produktów bezglutenowych, w tym pieczywo, ponieważ znacznie wzrosła liczba osób dotkniętych nietolerancją lub alergią na gluten, a także pojawiła się swego rodzaju moda na ograniczanie produktów zawierających gluten w diecie. Podczas wytwarzania pieczywa bezglutenowego, podobnie jak podczas wypieku pieczywa tradycyjnego, występują warunki sprzyjające zachodzeniu reakcji Maillarda. W dostępnej literaturze brakuje informacji na temat powstawania i występowania szkodliwych związków reakcji Maillarda w pieczywie bezglutenowych i sposobów regulacji ich poziomu. W związku z tym wybór problemu badawczego recenzowanej pracy doktorskiej Pani mgr inż. Marii Różańskiej jest nowatorski i bardzo aktualny. Przeprowadzone kompleksowe badania pozwoliły Doktorantce uzyskać wyniki, które są niezwykle cennym osiągnięciem naukowym przyczyniającym się do rozwoju dyscypliny technologia żywności i żywienia. Wyniki te poza aspektem poznawczym mają również charakter aplikacyjny.

2. Formalna ocena pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest pracą o charakterze eksperymentalnym. W jej strukturze wyodrębniono następujące rozdziały: *Wstęp*, *Część literaturowa*, *Cel i zakres badań*, *Część doświadczalna (Materiał badany* i *Metody badań)*, *Wyniki badań i dyskusja*, *Wnioski*, *Streszczenie* (w języku polskim i angielskim), *Spisy* (ilustracji, tabel i załączników) oraz *Literatura* i *Załączniki*. Łącznie praca obejmuje 163 strony wydruku komputerowego, w tym 23 rysunki i 6 tabel w rozdziale *Wyniki badań i dyskusja* i 9 tabel w *Załącznikach*. Układ pracy jest typowy, a proporcje poszczególnych części prawidłowe. Podział rozdziałów na podrozdziały sprawia, że układ pracy jest bardzo przejrzysty. Dodatkowo na końcu manuskryptu zamieszczono *Wykaz dorobku naukowego* Doktorantki.

Autorka wykorzystała w pracy bardzo bogaty zbiór literatury (285 pozycji), od opublikowanej w 1912 roku pracy Maillarda po najnowsze pozycje z 2021 roku. Dobór literatury jest trafny, wszystkie publikacje są ściśle związane z tematyką dysertacji. Na wyróżnienie zasługuje fakt, że 98% pozycji zamieszczonych w spisie i cytowanych w pracy stanowią publikacje opublikowane czasopismach o zasięgu międzynarodowym (tylko 5 pozycji w języku polskim), a 49% to publikacje z ostatnich 10 lat.

Podsumowując ocenę strony formalnej rozprawy uważam, że została ona przygotowana z dużą starannością, jest napisana bardzo dobrym stylem i z przyjemnością się ją czyta.

3. Merytoryczna ocena rozprawy

Tytuł pracy koresponduje z jej treścią. We wstępie Doktorantka krótko wprowadziła czytelnika w tematykę pracy i uzasadniła podjęcie tematu. W *Części literaturowej* szczegółowo opisała mechanizm reakcji Maillarda oraz wpływ różnych czynników na przebieg tego złożonego procesu podczas wytwarzania różnych produktów żywnościowych. Przedstawiła żywieniowe i zdrowotne konsekwencje wynikające z powstawania różnych produktów reakcji Maillarda, w tym: endogenne i egzogenne produkty glikacji białek i ich wpływ na zdrowie człowieka oraz metabolizm tych produktów w organizmie. Wykazała konieczność ograniczania w diecie produktów spożywczych bogatych w zaawansowane produkty glikacji białek i opisała toksyczne markery reakcji Maillarda takie jak: furozyna, N-ε-karboksymetylolizyna (CML). Przedstawiła również różne metody oznaczania produktów reakcji Maillarda oraz sposoby ograniczania powstawania potencjalnie szkodliwych związków będących produktami tej reakcji, zwracając szczególną uwagę na produkty zbożowe. Treści zawarte w części teoretycznej, jak też dobór literatury naukowej świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Autorki do podjęcia wykonanych przez Nią badań.

W oparciu o dokonany przegląd piśmiennictwa Doktorantka sformułowała w pełni uzasadniony cel i zakres badań. Jako cel badań wskazała określenie wpływu poszczególnych składników wchodzących w skład receptury ciasta bezglutenowego (tj. mąki, oleju i substancji

słodzącej) na powstawanie produktów reakcji Maillarda w pieczywie. Realizacja tego celu miała zweryfikować cztery hipotezy badawcze, z których pierwsza zakładała, że kompozycja ciasta bezglutenowego determinuje zawartość potencjalnie szkodliwych produktów reakcji Maillarda w pieczywie i dzięki modyfikacjom recepturowym możliwe jest zapobieganie tworzeniu termicznie indukowanych zanieczyszczeń. Kolejne hipotezy zakładały redukcję szkodliwych związków reakcji Maillarda poprzez zastosowanie bezglutenowych mąk o wysokiej zawartości związków fenolowych, prażenie nasion przed tłoczeniem na zimno oleju wykorzystywanego w recepturze i zastosowanie alkoholi polihydroksylowych jako substancji słodzącej. Weryfikację hipotez realizowano poprzez przeprowadzenie 3 zadań badawczych z wyznaczonymi celami szczegółowymi dotyczącymi:

1) oceny wpływu stosowania mąk bezglutenowych o zróżnicowanym profilu związków fenolowych,
2) rodzaju oleju tłoczonego na zimno z nasion nieprażonych i prażonych na tworzenie produktów reakcji Maillarda,
3) wpływu rodzaju substancji słodzącej na kinetykę tworzenia produktów reakcji Maillarda w pieczywie bezglutenowym.

W rozdziale *Część doświadczalna* szczegółowo opisano materiał badawczy tj. sposób otrzymywania mąk bezglutenowych z 5 odmian ryżu i 2 odmian kukurydzy, przygotowania olejów tłoczonych na zimno z nieprażonych i prażonych nasion porzeczki czarnej, malin, aronii, truskawek i rzepaku oraz pochodzenie substancji słodzących (ksylitolu, maltitolu i sorbitolu). Zapomniano w tym rozdziale o sacharozie i nie podano jaka sacharoza była stosowana w badaniach.

Metodyka badań obejmuje schemat prowadzonych doświadczeń, recepturę pieczywa bezglutenowego, sposób wykonania wypieku i przygotowania próbek skórki i miękiszu do analiz oraz szczegółowy opis wielu analiz pozwalających na charakterystykę wybranych składników mąk bezglutenowych (4 metody), określenie właściwości chemicznych olejów (11 metod) oraz właściwości fizykochemicznych pieczywa (razem 5 metod). Zakres przeprowadzonych badań był bardzo duży ponieważ w sumie oceniano 93 próbki (mąki, oleje, chleby wypieczone z ich udziałem i z dodatkiem różnych substancji słodzących) i przeprowadzono 308 analiz, każda w 3 powtórzeniach. Większość wykorzystanych metod to nowoczesne techniki analityczne, w tym ultrawysokosprawną chromatografia cieczowa (RP-UHPLC-ESI-MS) i chromatografia gazowa. Wszystkie metody zostały wyczerpująco opisane w sposób pozwalający na odtworzenie eksperymentu. Układ doświadczenia jest przemyślany i logiczny. Uwagi dotyczące tego rozdziału są następujące:

– ze schematu zamieszczonego na rys. 5 można niesłusznie wywnioskować, że charakterystyka fizykochemiczna polegająca na określeniu zawartości związków redukujących i aktywności

wody dotyczy stosowanych substancji słodzących, a w rzeczywistości chodzi o charakterystykę uzyskanego pieczywa z ich udziałem;

- w podrozdziale 4.2.2. *Opracowanie receptury pieczywa bezglutenowego* zabrakło informacji, że w zadaniu 3 sacharozę zastępowano różnymi substancjami słodzącymi w ilości 50 i 100%. Nie zdefiniowano również jak grubą warstwę zewnętrzną bochenka uznano za skórkę przy przygotowaniu próbek skórki i miękiszu chleba do badań;
- w podrozdziale 4.2.4.7. opisano oznaczenia zawartości chlorofilu i β-karotenu w uzyskanych olejach roślinnych. Wyniki tych analiz zostały zamieszczone w załącznikach w tabeli Z5 niestety w treści pracy nie znalazłam omówienia tych wyników. Jaki był cel wykonania tych analiz?

Do statystycznego opracowania uzyskanych wyników zastosowano program *Statistica 13.0.* Wykonano obliczenia jednoczynnikowej analizy wariancji i testy post-hoc Tukey'a. Zależności pomiędzy określanymi parametrami określono na podstawie obliczeń współczynników korelacji Pearsona, a do klasyfikacji próbek zastosowano analizę głównych składowych - PCA. Wykorzystane metody statystyczne dają gwarancję obiektywnej interpretacji uzyskanych wyników. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach i na rysunkach w bardzo czytelny

Najobszerniejszą część pracy stanowi rozdział *Wyniki badań i dyskusja,* który został podzielony na 3 części odpowiadające zadaniom badawczym. Doktorantka szczegółowo omówiła w nim uzyskane wyniki i przeprowadziła ich dyskusję porównując je z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły badawcze oraz wyjaśniając obserwowane zależności w oparciu o cytowaną literaturę źródłową. Należy podkreślić, że dyskusja wyników została przeprowadzona na bardzo wysokim poziomie. Każda część tego rozdziału rozpoczyna się podrozdziałem krótko wprowadzającym w tematykę i zawierającym wyjaśnienie zasadności podjęcia badań zrealizowanych w ramach danego zadania. W części pierwszej przedstawiono wyniki dotyczące wpływu zastosowanej mąki bezglutenowej i jej właściwości na gromadzenie w skórce i miękiszu chleba produktów reakcji Maillarda wykazujących zdolność do fluorescencji, furozyny oraz N-ε-karboksymetylolizyny. W części drugiej scharakteryzowano właściwości uzyskanych olejów tłoczonych na zimno z nasion nieprażonych i prażonych i oceniono jak wpływają one na tworzenie się szkodliwych produktów reakcji Maillarda w pieczywie bezglutenowym. Część trzecia dotyczy oceny wpływu substancji słodzących na kinetykę tworzenia produktów reakcji Maillarda podczas wypieku chleba bezglutenowego. Ta część zasługuje na szczególną uwagę ze względu na to iż po raz pierwszy oceniano wpływ polioli na powstawanie produktów reakcji Maillarda zachodzącej podczas wypieku pieczywa bezglutenowego. W dostępnej literaturze brak jest informacji na ten temat.

W odniesieniu do tej części pracy mam następujące uwagi i pytania:

- W rozdziale 5.1.2 omówiony został profil związków fenolowych mąk i pieczywa bezglutenowego. Szkoda, że omawianych wyników nie zamieszczono w tym rozdziale a w

Załącznikach. Ponadto Autorka w tym podrozdziale podaje wartości, które są sumami ilości flawonoidów, kwasów fenolowych lub wszystkich związków fenolowych, a takich wartości nie zamieszczono w żadnej tabeli lub rysunku w pracy. Jest to pewnym utrudnieniem dla czytelnika.

- Jakie są możliwości wykorzystania oleju z nasion roślin jagodowych w przemysłowej produkcji pieczywa?
- Dlaczego tylko w zadaniu 3, w odniesieniu do wpływu rodzaju substancji słodzącej, badano kinetykę tworzenia się produktów reakcji Maillarda w czasie wypieku (po 10, 20 i 30 min), a w zadaniach 1 i 2 analizowano tylko gotowe pieczywo?

Na podstawie uzyskanych wyników Pani mgr inż. Maria Różańska wyciągnęła 8 uzasadnionych i w pełni udokumentowanych wynikami wniosków. Wskazują one, że założony przez Doktorantkę cel badań został osiągnięty, a przyjęte hipotezy zweryfikowane.

Zamieszczone w pracy streszczenie w języku polskim i angielskim zawiera syntetyczne wprowadzenie w tematykę pracy, cel podjętych badań, opis wyznaczonych zadań badawczych i metod analitycznych oraz główne wnioski. Spis literatury jest przygotowany bardzo starannie. Jedyna uwaga dotycząca tej części pracy dotyczy braku w spisie literatury norm PN, ISO, AOCS, na które powołuje się Autorka w podrozdziale 4.2 *Metodyka badań*. Wydaje się również, że dla czytelnika korzystniej byłoby, gdyby spisy ilustracji, tabel i załączników były zamieszczone po spisie literatury.

Uwagi edytorskie:

1) Na stronie 63 w drugim akapicie przedstawione są dane bez odsyłacza do tabeli czy rysunku.
2) W tekście zauważono kilka tzw. „literówek": na str. 78 - 6 wiersz od góry (powinno być próbę), str. 88 – 13 wiersz od dołu (powinno być - istnienia), str 89 – 12 wiersz od dołu (zbędna litera „w"), str. 94 – 8 wiersz od dołu (zbędny wyraz „są")
3) Na stronie 99 występuje błędne odwołanie się do tabeli Z6 zamiast tabeli Z7.

Przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości naukowej pracy i nie wpływają na jej ogólną pozytywną ocenę.

W swojej recenzji chcę również odnieść się do dorobku naukowego Doktorantki zamieszczonego w manuskrypcie, bo jest on niemały. Obejmuje 13 prac oryginalnych, w tym 8 opublikowanych w czasopismach z listy JCR (IF=28,024). Trzy prace swoją tematyką są związane z badaniami przedstawionymi w pracy doktorskiej. Dorobek ten świadczy o niezwykłej pracowitości mgr inż. Darii Pająk.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując swoją recenzję stwierdzam, że praca doktorska **mgr inż. Marii Barbary Różańskiej** pt. **Badania nad możliwością regulacji poziomu potencjalnie szkodliwych**

produktów reakcji Maillarda w pieczywie bezglutenowym spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom na stopień doktora. Od strony metodologicznej badania zostały wykonane poprawnie, przy wykorzystaniu odpowiednio dobranego materiału i metod badawczych. Praca charakteryzuje się oryginalnością naukową i istotnie rozszerza wiedzę w obszarze dyscypliny technologia żywności i żywienia na temat wpływu surowców takich jak mąki o zróżnicowanym profilu związków polifenolowych, oleje tłoczone na zimno z prażonych i nieprażonych nasion rzepaku i różnych roślin jagodowych oraz substancji słodzących (polioli) na tworzenie się szkodliwych produktów reakcji Maillarda w skórce i miękiszu modelowego chleba bezglutenowego. Sposób realizacji pracy wskazuje, że Doktorantka jest bardzo dobrze przygotowana do prowadzenia badań naukowych. Moim zdaniem oceniana rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 ust 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Mgr inż. Marii Barbary Różańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Czubaszek

Dr hab. Anna Czubaszek, prof. uczelni