

**Recenzja**  
**pracy doktorskiej Mgr inż. Aleksandry Barbary Sadowskiej**  
**pt. Wpływ transglutaminazy na kształtowanie cech jakościowych bezglutenowego**  
**pieczywa gryczanego**

w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie technologia żywności i żywienia  
wykonanej pod kierunkiem:

dr hab. inż. Anny Diowks, prof. uczelni  
na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechniki Łódzkiej

Podstawę opracowania recenzji stanowiło pismo Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, dr hab. inż. Anny Diowks, prof. uczelni z dnia 6.06.2023 r.

**1. Celowość podjęcia problemu naukowego**

Produkty zbożowe pełnią bardzo ważną rolę w naszej codziennej diecie. Wśród nich głównym produktem jest pieczywo dostarczające wiele cennych składników odżywczych takich jak węglowodany (w tym skrobia i błonnik pokarmowy), białko, witaminy z grupy B i składniki mineralne. W tradycyjnym pieczywie pszennym, żytnim czy mieszanym znajdują się białka glutenowe uczestniczące w tworzeniu struktury ciasta. Z powodu nietolerancji glutenu coraz więcej osób musi rezygnować ze spożywania takiego pieczywa. Szacuje się, że obecnie dotyczy to około 1% społeczeństwa. Dodatkowo mody żywieniowe powodują, że wiele osób rezygnuje ze spożycia produktów zawierających gluten. Wobec powyższego stale rośnie zapotrzebowanie na pieczywo bezglutenowe, lecz jego jakość nie w pełni satysfakcjonuje konsumentów. Z tego względu prowadzi się wiele badań dotyczących składu recepturowego i technologii wytwarzania pieczywa bezglutenowego mających na celu poprawę jego jakości i wartości odżywczej. W nurt takich badań wpisują się te podjęte przez Mgr inż. Aleksandrę Sadowską. Wybór problemu badawczego jest nowatorski i bardzo aktualny. Przeprowadzone kompleksowe badania pozwoliły Doktorantce uzyskać wyniki, które są cennym osiągnięciem naukowym przyczyniającym się do rozwoju dyscypliny technologia żywności i żywienia. Wyniki te poza aspektem poznawczym mają również charakter aplikacyjny i są ważne ze względów społecznych.

**2. Formalna ocena pracy**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest pracą o charakterze eksperymentalnym. W jej strukturze wyodrębniono następujące rozdziały: *Wstęp, Przegląd literatury, Geneza i cel*

pracy, *Hipotezy badawcze*, *Część doświadczalna* (podrozdziały: *Materiał i odczynniki*, *Metody badawcze*, *Metody analityczne* i *Statystyczna analiza wyników*), *Wyniki badań i dyskusja*, *Wnioski*, *Streszczenie* (w języku polskim i angielskim), *Bibliografia*, *Spisy* (rysunków, tabel i wykresów). Łącznie praca obejmuje 115 stron wydruku komputerowego, w tym 27 rysunków, 20 tabel i 21 wykresów (wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono w 15 tabelach, na 16 rysunkach i 21 wykresach). Układ pracy jest typowy, a proporcje poszczególnych części właściwe. Podział rozdziałów na podrozdziały sprawia, że układ pracy jest bardzo przejrzysty.

Oceniając dobór literatury należy zwrócić uwagę, że w pracy wykorzystano bogaty zbiór literatury liczący 157 pozycji. Z tego 59% stanowią oryginalne prace z ostatnich 10 lat, a 73% to prace w języku angielskim. Dobór literatury jest trafny, wszystkie publikacje są ściśle związane z tematyką dysertacji.

Na końcu manuskryptu na dwóch stronach dodatkowo zamieszczono *Osiągnięcia naukowe* Doktorantki.

### **Merytoryczna ocena rozprawy**

Tytuł pracy koresponduje z jej treścią. We wstępie Doktorantka krótko wprowadziła czytelnika w tematykę pracy. W kolejnym rozdziale, *Przeglądzie literatury*, wyjaśnione zostało pojęcie żywności funkcjonalnej oraz na czym polega celiakia, szczegółowo opisano problemy występujące w produkcji pieczywa bezglutenowego w odniesieniu do pieczywa tradycyjnego. Opisano też zalety gryki i jej przetworów jako cennego surowca do produkcji pieczywa bezglutenowego ze względu na bogaty skład chemiczny. W cieście bezglutenowym konieczny jest składnik, którego właściwości pozwolą na otrzymanie struktury zdolnej do zatrzymywania CO<sub>2</sub> do takich składników zalicza się hydrokoloidy. Ich właściwości i znaczenie w technologii piekarstwa, ze szczególnym uwzględnieniem gumy guar, zostało przez Autorkę pracy wyjaśnione. W przeglądzie literatury dużo miejsca zajmuje opis właściwości transglutaminazy (TG), różnych sposobów jej działania w sieciowaniu białek, wpływu tego enzymu na białka w cieście przeznaczonym do wypieku pieczywa, a co za tym idzie na strukturę tego ciasta i właściwości pieczywa z niego wypieczonego. Bardzo ważnym aspektem jest jakość i świeżość pieczywa, na które konsumenci zwracają dużą uwagę. Cechy te zależą zarówno od receptury jak i sposobu otrzymywania ciasta i pieczywa, z tego względu Doktorantka w przeglądzie literatury wykazała jakie składniki i jakie parametry procesu technologicznego są szczególnie ważne w technologii wytwarzania pieczywa bezglutenowego oraz przedstawiła możliwości wykorzystania zakwasu bezglutenowego w produkcji pieczywa specjalnego przeznaczenia żywieniowego. 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 3 hipotezy badawcze. Jako cel badań wskazała ocenę efektywności transglutaminazy w poprawie cech jakościowych gryczanego pieczywa bezglutenowego, ze szczególnym uwzględnieniem struktury miękiszu chleba oraz określenie wpływu zakwasu piekarskiego i suplementów białkowych na skuteczność działania tego enzymu. Postawione hipotezy badawcze są spójne z celem pracy. Do weryfikacji hipotez Doktorantka zaplanowała zakres prac obejmujący kilka etapów. Układ badawczy jest przemyślany i dobrze zaplanowany. W pierwszym etapie ustalano recepturę gryczanego chleba bezglutenowego, w tym optymalną wielkość dodatku hydrokoloиду (gumy guar). Po opracowaniu receptury chleba dobierano parametry technologiczne takie jak czas mieszania ciasta, czas rozrostu ciasta w masie i rozrostu końcowego oraz czas wypieku w taki sposób by uzyskać pieczywo jak najbardziej wyrośnięte o równomiernej porowatości. W kolejnym etapie określano wpływ różnych dodatków transglutaminazy na cechy jakościowe pieczywa w celu ustalenia optymalnej dawki tego enzymu do gryczanego pieczywa bezglutenowego. Określono też dynamikę starzenia się tego pieczywa. Kolejne zadania badawcze realizowane w pracy to określenie wpływu wprowadzenia zakwasu i wpływu dodatku białka serwatkowego na efektywność sieciowania białek w cieście przy użyciu transglutaminazy.

Rozdział *Część doświadczalna* został podzielony na 4 podrozdziały *Materiały i odczynniki*, *Metody badawcze*, *Metody analityczne* i *Statystyczna analiza wyników*. W pierwszym z nich wymieniono surowce użyte do wypieku chleba oraz materiał biologiczny wykorzystany do przygotowania kultury starterowej do wytworzenia zakwasu. Proszę o wyjaśnienie - co oznacza, że kultura starterowa zawierała po 2% *L. plantarum* i *L. brevis*? W podrozdziale *Metody badawcze* przedstawiono sposób wypieku chlebów i próby przechowalnicze. Zabrakło w nim dokładnego opisu procedury ustalania optymalnych parametrów procesu technologicznego. Autorka informuje, że dane te będą przedstawione w dalszej części pracy, lecz nie znalazłam ich w tekście. Moim zdaniem schemat procesu technologicznego zamieszczony na rysunku 9 jest zbyt uproszczony. Powinien on zawierać informacje dotyczące temperatury i czasu trwania operacji na poszczególnych etapach oraz uwzględniać wszystkie realizowane warianty. Wtedy sposób przedstawienia procesu technologicznego i jego wariantów byłby jasny i czytelny.

Wśród metod analitycznych wykorzystanych w badaniach znajdują się typowe metody oceny jakości pieczywa, ale posłużono się też nowoczesnymi metodami takimi jak: laserowy pomiar objętości bochenków przy użyciu urządzenia Volscan profiler 300, wykorzystanie programu komputerowego do analizy tekstury miękiszu chleba umożliwiającego wykrywanie liczby porów w cieście i pomiar ich powierzchni, użycie metody epifluorescencyjnej mikroskopi optycznej (EELM) do obserwacji mikrostruktury miękiszu. W celu sprawdzenia

stopnia sieciowania białek przy udziale transglutaminazy w wypieczonych chlebach przeprowadzono elektroforetyczny rozdział białek wyizolowanych z poszczególnych wariantów pieczywa bezglutenowego. Wszystkie zastosowane metody są właściwe i pozwalają na sprawdzenie postawionych hipotez badawczych. Można zatem twierdzić, że Doktorantka dobrze opanowała warsztat badawczy niezbędny do realizacji badań.

Do statystycznego opracowania uzyskanych wyników zastosowano program *Statistica 12.5*, StatSoft. Wykonano obliczenia jednoczynnikowej analizy wariancji, a do wyceny różnicowania wartości średnich użyto test post-hoc Tukey'a. Wykorzystane metody statystyczne dają gwarancję obiektywnej interpretacji wyników.

Najobszerniejszy rozdział *Wyniki badań i dyskusja* (str. 38-95) stanowi zasadniczą część pracy i jest oryginalnym osiągnięciem Doktorantki. Rozdział ten został podzielony na 5 części, które odpowiadają zadaniom badawczym realizowanym w kolejnych etapach pracy. 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. Wnikliwa dyskusja świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do realizacji badań. Bardzo dobrym rozwiązaniem w pracy jest zamieszczenie na końcu każdego podrozdziału krótkiego podsumowania etapu badań i przedstawienie w nim najważniejszych osiągnięć.

Lektura kolejnych podrozdziałów rozdziału *Wyniki badań i dyskusja* pozwala stwierdzić, że Doktorantka dokonała właściwego doboru składników recepturowych na bezglutenowy chleb gryczany, a następnie parametrów czasu mieszenia, czasu i temperatury rozrostu w masie ciasta i końcowego oraz czasu wypieku. Stwierdziła, że ciasto bezglutenowe dla uzyskania piankowej struktury zdolnej zatrzymać wydzielający się podczas fermentacji CO<sub>2</sub> wymaga dłuższego czasu mieszenia niż podawany w dostępnej literaturze. W tym względzie nasuwa się pytanie czy ten wydłużony czas nie był spowodowany zastosowaniem w badaniach konkretnego typu miesiarki, gdyż wiadomym jest, że konstrukcja miesiarki, kształt miesidła i energia włożona w mieszenie mają wpływ na czas zarabiania ciasta. Kolejny podrozdział poświęcony jest określeniu wielkości dawki transglutaminazy. Spośród trzech stosowanych dawek, w tym jednej zalecanej przez producenta, na podstawie szeregu analiz cech jakościowych pieczywa, oceny organoleptycznej, badań struktury miększu, rozdziału elektroforetycznego białek wyizolowanych z poszczególnych wariantów pieczywa, a także oceny zmian parametrów testu TPA i wilgotności pieczywa podczas przechowywania, Doktorantka do dalszych badań wytypowała jeden, najmniejszy ze stosowanych dodatek transglutaminazy czyli 5U/100g mieszanki. Podobne zakresy analiz wykonywano na etapach określenia wpływu zakwasu gryczanego lub dodatku białek serwatkowych na efektywność działania sieciującego transglutaminazy.

W swoich badaniach Autorka stosowała 3 dawki zakwasu 15, 30 i 50% do bezglutenowego ciasta gryczanego. Przy czym takie określenie dodatku zakwasu nie jest precyzyjne ponieważ nie podano w odniesieniu do czego dawka stanowiła określony udział procentowy. Porównanie wyników pieczywa kontrolnego z pieczywem z dodatkiem zakwasu oraz z pieczywem z zakwasem i preparatem transglutaminazy pozwoliło stwierdzić, że zakwasy powodują zmniejszenie objętości bochenka i poprawę cech organoleptycznych, a połączenie zakwasu i transglutaminazy w recepturze korzystnie wpływa na efektywność działania transglutaminazy, co powoduje poprawę struktury miękiszu, mniejsze zmiany wilgotności i parametrów tekstury określanej w teście TPA podczas przechowywania. Poprawie uległ też smak i aromat pieczywa. Szczególnie korzystnymi cechami charakteryzował się chleb z 30% udziałem zakwasu i dawką transglutaminazy wynoszącą 5U TG/100g mieszanki.

Oceniając wpływ dodatku białek zastosowano trzy dodatki białek serwatkowych WPC 80 (1, 2 i 3%) i wykazano, że sieć białkowa pieczywa bezglutenowego z dodatkiem białek i transglutaminazy ulegała znacznemu wzmocnieniu w porównaniu z próbą kontrolną i chlebami z białkami serwatkowymi bez preparatu enzymatycznego. Im większy był dodatek białek tym porowatość miękiszu stawała się drobniejsza, a struktura miękiszu bardziej przypominała chleb tradycyjny. Warianty pieczywa z 3% dodatkiem WPC80 cechowały się najlepszym smakiem i zapachem spośród ocenianych próbek. Synergistyczne działanie białek serwatkowych i transglutaminazy powodowało zwiększenie wiązania wody i dłuższe jej zatrzymywanie w miękiszu chleba niemniej jednak spoistość i żujność pieczywa wzbogaconego o białka serwatkowe ulegała obniżeniu co skutkowało kruszeniem się miękiszu chleba podczas krojenia. Wzmocnienie siatki białkowej w cieście poprzez dodatek białek i transglutaminazy powodowało zmniejszenie objętości właściwej pieczywa.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wyciągnęła 6 uzasadnionych i w pełni udokumentowanych wyników wniosków, które trafnie uogólniają osiągnięcia przedstawione w rozprawie doktorskiej. Dodatkowo sformułowano wniosek aplikacyjny, w którym rekomendowane do zastosowania w produkcji są trzy warianty pieczywa gryczanego: z dodatkiem 5U TG/100g mieszanki, z dodatkiem 30% zakwasu i 5U TG/ 100 g oraz z 3% dodatkiem białka serwatkowego i 5U TG/100g mieszanki. Wnioski te wskazują, że założony przez Doktorantkę cel badań został osiągnięty, a przyjęte hipotezy badawcze zweryfikowane.

Zamieszczone w pracy streszczenie w języku polskim i angielskim zawiera syntetyczne wprowadzenie w tematykę pracy, cel podjętych badań oraz główne wnioski. Pozwala na szybkie zaznajomienie się z najważniejszymi aspektami i wynikami pracy.

Praca przygotowana jest starannie, mimo to Autorka nie ustrzegła się pewnych błędów, które powinny zostać usunięte w trakcie przygotowania wyników pracy do publikacji. Podczas lektury dysertacji nasunęły mi się następujące uwagi i pytania:

- Na str. 12 niewłaściwie sformułowano tytuł tabeli 1. Powinien on brzmieć np. Porównanie wartości odżywczej wybranych asortymentów pieczywa tradycyjnego i bezglutenowego.
- Na str. 20 niewłaściwie sformułowano tytuł rysunku 7, gdyż guma guar to związek organiczny uzyskiwany z nasion rośliny *Cyamopsis tetragonolobus* o nazwie zwyczajowej guar, a na rysunku przedstawiono roślinę, nasiona, bielmo i proszek.
- Proszę o wyjaśnienie następującej kwestii. W rozdziale *Metody analityczne* str. 31 wymieniono oznaczenie liczby opadania i powołano się na normę PN-EN ISO 3093:2010, natomiast w tabeli 6 str. 38 zamieszczono wartość liczby diastatycznej (LD) wynoszącą 20 s. W cytowanej normie nie występuje taka cecha jak liczba diastatyczna jest tylko liczba opadania i LU liczba upłynniania wyliczana z odpowiedniego wzoru uwzględniającego wartość liczby opadania. Najmniejszą wartością jaką może przyjąć liczba opadania jest 60 s. Wobec tego jak definiowany jest podany w tabeli 6 parametr Liczba diastatyczna?;
- Opis oceny punktowej pieczywa jest niepełny. Na str. 33 Autorka napisała, że ocena obejmowała analizę organoleptyczną i fizykochemiczną po czym kolejno przedstawiła tylko metody oceny fizykochemicznej. Nie podała jakie wyróżniki były brane pod uwagę w ocenie organoleptycznej.
- W podrozdziale 5.3.4 *Analiza obrazu miękiszu pieczywa* przedstawiono dokładny opis sposobu przygotowania próbek do analiz, lecz nie podano jakie parametry były określane w tej analizie. Dopiero w tabeli 9 na str. 48 w rozdziale *Omówienie wyników* można stwierdzić, że określonymi cechami były: „całkowita ilość porów [szt./10 cm<sup>2</sup>]” i „średnia wielkość wykrytych porów [cm<sup>2</sup>]” (choć prawidłowo byłoby - całkowita liczba porów i średnia powierzchnia wykrytych porów).
- Na str. 39 do określenia rodzaju mąki użyto skrótu myślowego „mąka gryczana łuskana” poprawnie jest - mąka gryczana z ziarna obłuskanego.
- Podczas ustalania optymalnej ilości gumy guar w recepturze chlebów stosowano 3 poziomy dodatku, a na rysunku 12 ilustrującym uzyskane wyniki przedstawiono tylko najgorszy wariant pieczywa. Dlaczego nie pokazano pozostałych wariantów o lepszych właściwościach?
- W podrozdziale 6.2 dotyczącym wyników na etapie doboru parametrów technologicznych procesu produkcji pieczywa bezglutenowego Autorka napisała, że pieczywo „wypieczono w trzech partiach każdy wariant technologiczny”. Jakie warianty stosowano? Nie opisano tego w metodyce pracy, a na stronie 42 w podsumowaniu tego etapu przedstawiono tylko wariant najlepszy.

- Szkoda, że na wykresach przedstawiających wyniki różnych analiz badanych próbek pieczywa nie podano osiąganych wartości cech. Słupki przedstawiane na wykresie pozwalają tylko szacować wartości, nie można określić ich dokładnie. Ponadto na wykresach nie zaznaczono grup jednorodnych a w omówieniu wyników jest mowa o istotności różnic. Czy były obliczane analizy wariancji wyników przedstawianych na wykresach?
- Stosując różne wielkości dodatku transglutaminazy badano właściwości miękiszu testem TPA (str. 49, tab. 10). Autorka w omówieniu tych wyników bardzo szczegółowo opisuje stwierdzone statystycznie istotne różnice wartości twardości i sprężystości. Patrząc na rząd wielkości i różnic pomiędzy wartościami nasuwa się pytanie - Czy różnice te będą wyczuwalne przez konsumentów jeżeli stanowią one tylko około 1% uzyskiwanych wartości?
- W tekście pracy zdarzają się niewłaściwe sformułowania, jak np.: na str. 45 „Tu, podobnie jak w przytoczonych badaniach, ...” – lepiej byłoby – w badaniach własnych podobnie jak w badaniach innych autorów...; na str. 47 napisano ”Pozytywny wpływ dodatku transglutaminazy (Rys. 15) zaobserwowali również Gallagher i in. (2003) oraz Dłużewska i Marciniak- Łukasiak (2014) – jak rozumieć to zdanie? Bo można też tak, że cytowani autorzy zaobserwowali pozytywny wpływ transglutaminazy na podstawie wyników zamieszczonych na rys. 15, a chyba nie o to chodziło; na str. 61 zamieszczono niewłaściwe sformułowanie „fermentacja bakterii mlekowych” zamiast fermentacja prowadzona przez bakterie kwasu mlekowego lub fermentacja mlekowa. Takich przykładów niejednoznacznych i niewłaściwie sformułowanych wyrażen i zdań w pracy można znaleźć więcej.
- Pierwsze zdanie we wniosku II „Obserwowano poprawę wyglądu zewnętrznego bochenka i struktury porowatej miękiszu dla 5 i 10 U TG/ 100 g mieszanki.” jest sformułowane niepoprawnie stylistycznie. Powinno być np.: Obserwowano poprawę wyglądu zewnętrznego bochenka i struktury miękiszu przy dodatku transglutaminazy w ilości 5 i 10U TG/100g mieszanki użytej do wypieku.
- W moim odczuciu wnioski II i IV powinny być połączone gdyż dotyczą tego samego aspektu pracy.
- Na str. 107 w ostatniej pozycji literatury nie ma podanego roku wydania.
- W pracy występują tzw. literówki utrudniające niekiedy zrozumienie czytanego tekstu.

Przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości naukowej pracy i nie wpływają na jej ogólną pozytywną ocenę. Językowa kompozycja pracy mimo istnienia pewnych niedoskonałości spełnia wymagania stawiane pracom dyplomowym.

W swojej recenzji chcę również odnieść się do dorobku naukowego mgr inż. Aleksandry Sadowskiej. Obejmuje on jedną pracę popularno-naukową opublikowaną w branżowym czasopiśmie Przegląd Zbożowo-Młynarski oraz 3 prace oryginalne, w tym 1 opublikowana w czasopiśmie z listy JCR (Food Bioscience IF=5,15). Wszystkie prace swoją tematyką są związane z badaniami przedstawionymi w pracy doktorskiej. Ponadto doktorantka prezentowała wyniki swoich badań na konferencjach krajowych i międzynarodowych (również za granicą: Leuven – Belgia i Galati – Rumunia) wygłosiła na nich 3 referaty i prezentowała 6 posterów. Dorobek ten świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym i praktycznym do pracy naukowej.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Mgr inż. Aleksandry Barbary Sadowskiej pt. **„Wpływ transglutaminazy na kształtowanie cech jakościowych bezglutenowego pieczywa gryczanego”** spełnia warunek oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom na stopień doktora określone w art. 13 ust 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595). Sposób realizacji badań wskazuje, że Doktorantka jest dobrze przygotowana do prowadzenia badań naukowych, wykazała się dojrzałością w projektowaniu i wykonaniu eksperymentu. Uzyskane przez Nią wyniki dostarczają cennych informacji naukowych jak i praktycznych, które uzupełniają wiedzę w zakresie dyscypliny technologia żywności i żywienia. Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Mgr inż. Aleksandry Barbary Sadowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Anna Czubaszek, prof. uczelni