

Dr hab. inż. Agata Znamiorska-Piotrowska prof. UR
Zakład Technologii Mleczarstwa
Instytut Technologii Żywności i Żywienia
Uniwersytet Rzeszowski w Rzeszowie
35-601 Rzeszów, ul. M. Ćwiklińskiej 2d
e-mail: aznamiorska@ur.edu.pl

Rzeszów, 11.11.2023

RECENAZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Jańczuk-Grabowskiej pod tytułem:
„Zastosowanie laktoferyny jako składnika o szczególnych właściwościach prozdrowotnych w żywności osób o określonym profilu genetycznym”
wykonanej w Katedrze Oceny Jakości i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz Firmie Vitagenum Sp.z o.o.
w ramach Programu MNiSW (MEiN) „Doktorat wdrożeniowy” (0029/DW/2018)
pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. inż. Anety Brodziać prof. Uczelni oraz opiekuna zakładowego Pana dr inż. Tomasza Czerneckiego

Podstawą wykonania recenzji jest Uchwała Rady Dyscypliny Technologii Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 27 września 2023 roku, powołująca mnie na recenzenta w/w rozprawy oraz pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Technologii Żywności i Żywienia Pana prof. dr hab. Waldemara Gustawa z 2 października 2023 roku.

Laktoferyna z mleka krowiego jest stosowana w przemyśle spożywczym w Japonii od ponad 20 lat. Laktoferyna jest obecnie składnikiem niektórych produktów z kategorii żywności funkcjonalnej. Jest dozwolona do stosowania na terytorium UE od 2018 roku i może stanowić składnik jogurtów, mleka, suplementów diety i suplementów dla zwierząt domowych, a także stosowana w produktach kosmetycznych i tabletkach do leczenia doustnego pacjentów. Laktoferyna wykazuje działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze wobec szerokiej gamy mikroorganizmów, w tym bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych. Główny mechanizm przeciwdrobnoustrojowy laktoferyny przypisuje się jej zdolności do sekwestracji żelaza, pozbawiając w ten sposób potencjalne patogeny tego niezbędnego składnika odżywczego. Laktoferyna może również wiązać się z lipopolisacharydem bakterii Gram-ujemnych, co powoduje destabilizację ściany komórkowej bakterii. Laktoferynie przypisuje się inne działania biologiczne, takie jak regulacja wchłaniania żelaza, modulacja układu odpornościowego, działanie promujące wzrost komórkowy i działanie przeciwnowotworowe.

Jednakże w niewielu opublikowanych badaniach analizowano wpływ procesów technologicznych na stabilność laktoferyny, gdy jest ona stosowana jako składnik funkcjonalny żywności. W przypadku suplementacji mleka fermentowanego laktoferyną należałoby wiedzieć, czy proces produkcyjny wpływa na integralność tego białka i czy dodatek laktoferyny

będzie miał wpływ na końcową jakość produktu. Zachowanie integralności laktoferyny jest niezbędne do wyprodukowania akceptowalnego jogurtu z tym dodatkiem, którego włączenie do żywienia osób z nadwagą i otyłością może przynieść określone korzyści zdrowotne. Aby zapobiec zespołowi metabolicznemu, ważne jest, aby poprawić nawyki stylu życia i utrzymać równowagę pomiędzy poborem a wydatkiem energii, obniżając kaloryczność diety i właściwie ją komponując pod względem zawartości i jakości białka. Spożycie niektórych białek może w szczególny sposób przyczynić się do walki z zespołem metabolicznym, jak ma to miejsce w przypadku laktoferyny.

Reasumując, wybór tematu uważam za trafny zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę wpisują się niezaprzeczalnie w dyscyplinę technologia żywności i żywienia, a także przyczyniają się do jej rozwoju. Podjęty temat uważam za bardzo istotny, a przeprowadzone badania pozwolą na urozmaicenie asortymentu produktów funkcjonalnych dedykowanych dla osób o określonym profilu genetycznym.

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi spójny tematycznie cykl trzech artykułów, w tym jednej pracy przeglądowej oraz dwóch oryginalnych prac naukowych, opublikowanych w 2023 roku w czasopismach naukowych wymienionych w wykazie Ministerstwa Edukacji i Nauki tj. *Foods* oraz *Animals*.

W skład cyklu rozprawy doktorskiej wchodzi publikacje:

1. Jańczuk, A.; Brodziak, A.; Czernecki, T.; Król, J. Lactoferrin—the health-promoting properties and contemporary application with genetic aspects. *Foods* **2023**, *12*, 70. <https://doi.org/10.3390/foods12010070>.

2. Jańczuk, A.; Brodziak, A.; Król, J.; Czernecki, T. Properties of yoghurt fortified in lactoferrin with effect of storage time. *Animals* **2023**, *13*, 1610. <https://doi.org/10.3390/ani13101610>

3. Jańczuk-Grabowska, A.; Czernecki, T.; Brodziak, A. Gene–diet interactions: viability of lactoferrin-fortified yoghurt as an element of diet therapy in patients predisposed to overweight and obesity. *Foods* **2023**, *12*, 2929. <https://doi.org/10.3390/foods12152929>

Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach przypisanych do dyscypliny technologia żywności i żywienia. łączna liczba punktów za publikacje to 380, a sumaryczna wartość IF wynosi 13,4, co jest dowodem ich odpowiedniego poziomu merytorycznego. Mimo,

że publikacje są wieloautorskie (3-4 autorów), to udział Doktorantki w ich powstaniu jest znaczący, ponieważ zadeklarowała współtworzenie koncepcji pracy, przeprowadzenie przeglądu i analizę danych literaturowych, wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie wyników badań, przygotowanie wstępnej i finalnej wersji manuskryptu oraz redagowanie odpowiedzi na recenzje. We wszystkich pracach wchodzących w skład cyklu, Doktorantka jest pierwszym autorem.

Dysertacja bez załączników obejmuje 93 strony, na które składają się: oświadczenia (1 str.), wykaz prac naukowych stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej (1 str.), spis treści (1 str.), streszczenie w języku polskim i angielskim (4 str.), wykaz skrótów (2 str.), uzasadnienie badań (3 str.), metody i materiały do badań (11 str.), wyniki i dyskusja (49 str.), wnioski (2 str.), literatura (13 str.). W załącznikach Doktorantka zamieściła: plan żywieniowy, kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów publikacji. W rozprawie zamieszczono 25 tabeli i 10 wykresów, a spisie literatury znalazło się 111 pozycji.

Wprowadzeniem do opisu zrealizowanych badań jest krótka „polska część literaturowa”, która dotyczy argumentów uzasadniających podjętą tematykę badawczą. Doktorantka opisuje w niej właściwości laktoferyny, przytacza wyniki badań prowadzonych na zwierzętach z udziałem laktoferyny oraz zwraca uwagę na potencjalne jej wykorzystanie w leczeniu otyłości. Z pewnością dopuszczenie laktoferyny w 2018 roku, jako substancji dozwolonej do stosowania w określonych kategoriach żywności stanowi dodatkowy atut do wykorzystania jej w dietoterapii nadwagi i otyłości. Ponadto szerokie teoretyczne wprowadzenie literaturowe do podjętych badań jest zawarte w publikacji 1.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że dostępna literatura jest bardzo uboga w prace dotyczące zastosowania mleka fermentowanego z laktoferyną w diecie osób z nadwagą/otyłością i nowością są publikacje Doktorantki opisujące efekty spożycia laktoferyny z takiej matrycy w grupach osób o określonym profilu genetycznym.

Doktorantka na podstawie potrzeb i problemu badawczego zgłoszonego przez firmę VITAGENUM Sp. z o.o. sformułowała cztery hipotezy badawcze:

1. Laktoferyna może być stosowana jako funkcjonalny składnik w produkcji jogurtów naturalnych.
2. Fortyfikacja laktoferyną jogurtów naturalnych nie powoduje znaczącej modyfikacji parametrów fizykochemicznych, mikrobiologicznych i organoleptycznych produktu gotowego.

3. Jogurty fortyfikowane laktoferyną mogą być wykorzystane jako element dietoterapii osób o określonym profilu genetycznym, cierpiących na nadwagę lub otyłość.
4. Wykorzystanie jogurtu fortyfikowanego laktoferyną w dietoterapii osób o określonym profilu genetycznym wpływa na poprawę parametrów masy ciała i gospodarki węglowodanowej organizmu.

Hipotezy postawione przez Doktorantkę są jednoznaczne, prawidłowo sformułowane i możliwe do zweryfikowania. Jednak w analizie wyników badań brak jest jednoznacznego stwierdzenia, które z hipotez zweryfikowano pozytywnie? A które odrzucono? Tabela 2 zatytułowana „metody weryfikacji hipotez badawczych” obejmuje tylko metody badań w poszczególnych etapach eksperymentu i nie zawiera informacji czy dana hipoteza została zweryfikowana pozytywnie czy negatywnie.

Głównym celem pracy było opracowanie i optymalizacja technologii produkcji jogurtu fortyfikowanego laktoferyną a następnie włączenie go do żywienia osób z nadwagą i otyłością o określonym obrazie funkcjonalnym organizmu na podstawie badań DNA oraz biochemicznych i antropometrycznych. Przytoczony cel badań wymaga, aby Doktorantka dokładniej uściśliła sformułowanie „obraz funkcjonalny organizmu człowieka”. Nie zmienia to jednak faktu, że podjęty cel badań doskonale wpisuje się w nurt naukowych poszukiwań nowych produktów do stosowania w leczeniu nadwagi i otyłości oraz badań genomu człowieka w kierunku oznaczenia miejsc markerowych predysponujących do tych chorób.

W dalszej części pracy Doktorantka postawiła sześć celów szczegółowych, które są jasno i prawidłowo sprecyzowane oraz ściśle odnoszą się do przeprowadzonych sześciu etapów badań.

Rozdział „Metody i materiały do badań” Doktorantka podzieliła na dwa podrozdziały. W podrozdziale „Materiały do badań” opisuje produkcję jogurtu naturalnego i fortyfikowanego w warunkach laboratoryjnych i na skalę przemysłową. W związku z zamieszczoną na stronie 19 informacją : „jogurty były przechowywane do pierwszej analizy przez około 16 godzin” a następnie „analizy były wykonywane co 7 dni (tj. w dniu 0, 7,....”, proszę uszczegółwić czy wynik uzyskany po 16 godzinach przedstawiono jako wykonany w dniu 0?

Mimo że publikacja 2 z sukcesem przeszła proces recenzji i została opublikowana w renomowanym czasopiśmie, mam wątpliwość czy określenie „jogurt” może być tu stosowane.

I w związku z tym pytanie: czy mleko do produkcji jogurtu było zagęszczone? Jeżeli nie, to powinno operować się określeniem „mleko jogurtowe”.

Do dalszych etapów badań wykorzystano komórki nabłonka policzka oraz krew.

W drugim podrozdziale Doktorantka opisuje metody badań mleka, jogurtów oraz plan żywieniowy, grupy badawcze ochotników, genotypowanie, pomiary antropometryczne i hemoglobiny oraz metody analizy statystycznej wyników badań. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania zostały dobrze zaplanowane i konsekwentnie zrealizowane, z zastosowaniem prawidłowych metod analitycznych. Również właściwie dobrała testy statystyczne i właściwie przeprowadziła wieloetapową analizę statystyczną wyników badań.

Rozdział „Wyniki i dyskusja” został podzielony na dwa podrozdziały. W pierwszym zamieszczono badania dotyczące laktoferyny jako funkcjonalnego dodatku w produkcji jogurtów naturalnych. W jogurtach zbadano: skład chemiczny, wartość energetyczną, kwasowość, zawartość laktoferyny, teksturę, aktywność wody, synerезę, barwę, cechy organoleptyczne i dokonano oceny mikrobiologicznej. Analizy wykonano w pięciu terminach, w odstępach siedmiodniowych (0, 7,14, 21,28 dni). Szkoda, że Doktorantka wykonując liczne badania mikrobiologiczne nie określiła liczby komórek *Streptococcus thermophilus*, które stanowią podstawową mikroflorę jogurtu.

Podsumowując wyniki tego etapu, Doktorantka stwierdza, że dodatek laktoferyny (80mg/100g) istotnie wpłynął na zawartość białka, suchej masy, ogólną liczbę bakterii i składowe barwy. Ponadto wskazuje istotny wpływ czasu przechowywania na większość analizowanych parametrów. Wyniki uzyskane w warunkach laboratoryjnych i przemysłowych okazały się zbliżone, co bardzo podnosi wartość poznawczą i praktyczną przeprowadzonych badań (etap II i III).

W drugim podrozdziale opisano wyniki dotyczące możliwości wykorzystania jogurtu fortyfikowanego laktoferyną w dietoterapii osób z genetyczną predyspozycją do nadwagi i otyłości. W etapie III, rozpoczynając od planu żywieniowego Doktorantka analizuje parametry antropometryczne uczestników badań, bilans jadłospisów i zalecenia dla pacjentów.

W celu doboru odpowiedniej grupy badawczej przeprowadziła przesiewowe genotypowanie w obrębie czterech polimorfizmów pojedynczego nukleotydu u 135 osób. W rezultacie czego, do udziału w 28 dniowym doświadczeniu zakwalifikowało się 19 osób. Doktorantka udowadnia, że bez względu na układ badania, tj. 7d/21d czy 21d/7d w grupach przyjmujących jogurt z laktoferyną następowała redukcja masy ciała o ok. 1 kg. Natomiast nie wykazała

istotnego wpływu na redukcję hemoglobiny glikowanej za pomocą której monitoruje się poziom glikemii. Uwaga: wykres 9 i 10 należy szczegółowo opisać, w obecnym układzie nie można rozróżnić danych: 7d/21d czy 21d/7d?

W końcowej części pracy Doktorantka formułuje 10 wniosków, w których dowodzi że główny cel pracy i cele szczegółowe zostały w pełni zrealizowane. Wnioski są logiczne i wynikają z przeprowadzonej analizy.

W rozdziale 9 Doktorantka przedstawiła spis literatury stanowiący spis 111 pozycji, z których tylko 16 stanowi polskie piśmiennictwo. Wszystkie pozycje są aktualne i dobrze dobrane do analizowanej problematyki. Ich dobór świadczy o umiejętności Doktorantki w korzystaniu z dostępnej literatury oraz o Jej dobrym rozeznaniu w badanej problematyce

Przyjęta forma przedstawienia wyników jest czytelna i ułatwia zrozumienie prezentowanych treści. Wyniki badań zamieszczonych w rozprawie dostarczają cennych informacji teoretycznych, a także dowodzą że Doktorantka przedstawiła skuteczne i oryginalne rozwiązanie problemu badawczego z zakresu zastosowania jogurtu z laktoferyną w dietoterapii osób z otyłością i nadwagą. Praca cechuje się dobrym poziomem naukowym i analitycznym, wnosi cenny wkład w dziedzinę nauk rolniczych, w dyscyplinę technologia żywności i żywienia.

Należy podkreślić, że te badania były bardzo pracochłonne i przeprowadzenie tylu analiz z wykorzystaniem aparatury badawczej wymagało opanowania przez Doktorantkę warsztatu badawczego.

Również przeprowadzona dyskusja z literaturą przedmiotu świadczy o pewnym poruszaniu się w tej tematyce i jednocześnie potwierdza ważność i celowość poruszanych zagadnień. Doktorantka potrafi formułować i rozwiązywać problemy badawcze, co pozwala na samodzielne prowadzenie badań naukowych, a dodatkowo wskazuje na szeroką wiedzę teoretyczną i praktyczną. Podkreślam, że rozprawa została zrealizowana w ramach programu Doktorat wdrożeniowy, którego celem jest nie tylko zrealizowanie badań zaplanowanych w indywidualnym planie badawczym ale przede wszystkim wskazanie potencjału wdrożeniowego wyników pracy, co zostało uczynione.

Sygnalizowane spostrzeżenia i uwagi nie zmniejszają wartości merytorycznej dysertacji i mają charakter dyskusyjny. Przedstawione w recenzji uwagi mają na celu doskonalenie warsztatu naukowo-badawczego Doktorantki i wynikają wyłącznie z obowiązków recenzenta.

WNIOSEK KOŃCOWY

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Jańczuk-Grabowskiej pod tytułem: „Zastosowanie laktoferyny jako składnika o szczególnych właściwościach prozdrowotnych w żywieniu osób o kreślonym profilu genetycznym” stanowi zarówno oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak i oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej. Przedstawione spójne opracowanie trzech artykułów naukowych uzupełnione o badania niepublikowane, potwierdza wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie badanego zagadnienia wpisującego się w dyscyplinę technologia żywności i żywienia oraz umiejętność prowadzenia zarówno samodzielnej, jak i zespołowej pracy naukowej. Podjęty problem badawczy ma duże znaczenie, zarówno w wymiarze poznawczym, jak i aplikacyjnym. Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Jańczuk-Grabowskiej prezentuje odpowiedni poziom merytoryczny, spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r.poz.1668 z późn.zm.).

W związku z powyższym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Technologii żywności i żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Jańczuk-Grabowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Nowicka-Protowska