

Dr hab. inż. Małgorzata Szewczuk, prof. ZUT
Katedra Nauk o Zwierzętach Monogastrycznych
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Ul. Kl. Janickiego 29
71-270 Szczecin
e-mail: malgorzata.szewczuk@zut.edu.pl

Szczecin, dn. 20.12. 2023 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Stobieckiej

pt.: „Wpływ wybranych czynników na potencjał antyoksydacyjny mleka pozyskiwanego od krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej i produktów wytwarzanych na jego bazie”

wykonanej pod kierunkiem naukowym Pani **prof. dr hab. Jolanty Król**

w Zakładzie Bezpieczeństwa Żywności i Produktów Regionalnych, Katedrze Oceny Jakości i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych na Wydziale Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki

Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Mleko oraz produkty mleczne stanowią istotny składnik codziennej diety człowieka, będący źródłem bioaktywnych związków naturalnie występujących w produktach pochodzenia zwierzęcego, które korzystnie wpływają na organizm człowieka wykazując działanie przeciwutleniające. W przypadku, kiedy w organizmie dochodzi do zachwiania równowagi pomiędzy reakcjami wolnorodnikowymi, a przeciwutleniającymi prowadzi to do nagromadzenia się w komórkach nadmiernej ilości wolnych rodników i w konsekwencji do wystąpienia stresu oksydacyjnego, co może przyczynić się do zwiększenia prawdopodobieństwa pojawienia się powszechnie występujących chorób cywilizacyjnych, w tym m.in. miażdżycy, otyłości, cukrzycy typu 2, chorób neurodegeneracyjnych, reumatoidalnych i nowotworów.

Uwzględnienie w diecie mleka i jego przetworów, w których skład wchodzi m.in. przeciwutleniacze enzymatyczne i nieenzymatyczne, o zdolności neutralizowania reaktywnych form tlenu, może poprawić status antyoksydacyjny organizmu, a tym samym zmniejszyć ryzyko wystąpienia wymienionych wyżej chorób.

Jakość odżywcza mleka zależy zarówno od czynników genetycznych, jak i szeroko rozumianych warunków środowiskowych. Spośród czynników środowiskowych żywienie i utrzymanie zwierząt odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu się wydajności oraz jakości mleka pozyskiwanego od krów, co może mieć również wpływ na poziom bioaktywnych składników mleka

(BSM), określanych jako naturalne substancje występujące w żywności w niewielkich ilościach, oddziałujące na organizm człowieka na poziomie fizjologicznym, behawioralnym i odpowiedzi immunologicznej. Należy pamiętać, że wysokowartościowe BSM występują we wszystkich podstawowych frakcjach mleka- tłuszczowej (kwasy tłuszczowe, witaminy A, D₃, E, K₂, β-karoten, fosfolipidy, sfingomieliny) oraz wodno-białkowej (kazeina, białka serwatkowe, peptydy, aminokwasy, laktoza, witamina C, mikroelementy: Sn, Zn, Fe, Mn) i korzystnie oddziałują na organizm człowieka, wpływając jednocześnie na poprawę stanu zdrowia ludzi. Dodatkowo bioaktywne składniki mleka i produktów mlecznych mogą skutecznie zapobiegać utlenianiu tłuszczu, a tym samym zapewniać wyższą stabilność i jakość produktu. Z tego względu zasadne jest zatem, na co zwraca uwagę również Autorka pracy dążenie do zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w mleku surowym i przetworach mlecznych oraz możliwości modyfikacji ich poziomu już na etapie produkcji oraz przetwórstwa mleka, co wpisuje się doskonale w podjętą przez Autorkę dysertacji tematykę badawczą.

Podjęcie przez Panią mgr inż. Magdalenę Stobiecką badań dotyczących określenia wpływu wybranych czynników (kolejności laktacji, fazy laktacji, dodatku mieszanki ziołowej do dawki pokarmowej, czasu przechowywania jogurtów) na potencjał antyoksydacyjny mleka i produktów wytwarzanych na jego bazie oraz korelacji z zawartością związków o charakterze antyoksydacyjnym, należy uznać za zasadne i aktualne oraz znaczące z naukowego, a przede wszystkim praktycznego punktu widzenia. Wybór tematyki badawczej rozprawy doktorskiej jest bardzo ważny, a przedstawiona praca badawcza jest dowodem na możliwość skutecznego zastosowania dedykowanej mieszanki ziołowej bogatej w fitobiotyki w żywieniu krów mlecznych rasy holsztyńsko-fryzyjskiej w kierunku polepszenia wartości odżywczej mleka, w tym zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w mleku i produktach wytworzonych na jego bazie (jogurty), a w konsekwencji wzrostu ich potencjału antyoksydacyjnego.

Podstawę przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej stanowi powiązany tematycznie cykl publikacji, składający się z czterech prac, opublikowanych w okresie dwóch ostatnich lat:

1. **Stobiecka M.**, Król J., Brodziak A. Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals*, 2022, 12(3), 245. DOI: 10.3390/ani12030245. (MEiN 100pkt.; IF=3,000).
2. **Stobiecka M.**, Król J., Brodziak A. Antioxidant potential of milk obtained from Holstein-Friesian cows with regard to the subsequent lactations and stage of lactation. *Mljekarstvo*, 223, 73(2), 95-104. DOI: 10.15567/mljekarstvo.2023.0203. (MEiN 40pkt.; IF=1,200).

3. **Stobiecka M.**, Król J., Brodziak A., Klebaniuk R., Kowalczyk-Vasiliev E. Effects of Supplementation with an Herbal Mixture on the Antioxidant Capacity of Milk. *Animals*, 2023 13(12), 2013. DOI: 10.3390/ani13122013. (MEiN 100pkt.; IF=3,000).
4. **Stobiecka M.**, Król J., Brodziak A. Antioxidant Potential of Yogurts Produced from Milk of Cows Fed Fodder Supplemented with Herbal Mixture with Regard to Refrigerated Storage. *Applied Sciences*, 2023, 13(18): 10469. DOI: 10.3390/app131810469. (MEiN 100pkt.; IF=2,679).

Summary Impact Factor prac wchodzących w cykl publikacji powiązanych tematycznie wynosi 9,879 (cztery prace) i waha się w granicach od 1,200 do 3,000, zaś liczba punktów MEiN zgodnie z rokiem opublikowania prac wynosi 340. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, co świadczy o Jej wiodącej i istotnej roli w powstawaniu manuskryptów, obejmuje bowiem udział w przeprowadzeniu przeglądu danych literaturowych, w opracowywaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu układu doświadczalnego, gromadzeniu danych i opracowaniu uzyskanych wyników, jak również w przygotowaniu i wizualizacji wersji roboczej manuskryptu oraz czynnym udziale w procesie publikacyjnym.

Zbiór publikacji stanowi logiczną i spójną całość. Rozprawa, licząca 36 stron, została przygotowana w klasyczny sposób i spełnia wymagania formalne stawiane tego rodzaju opracowaniom. Prezentacja publikacji naukowych stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora została poprzedzona ich spisem, streszczeniem w języku polskim i angielskim, wstępem, prezentacją głównego celu i zakresu badań, rozdziałem „materiał i metody”, zwięzłym omówieniem uzyskanych w cyklu prac wyników badań i zakończona wnioskami oraz wykazem piśmiennictwa. Kolejność poszczególnych rozdziałów i podrozdziałów jest właściwa, co świadczy o przemyślanej koncepcji pracy. Uzupełnienie stanowią załączone publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów publikacji (str. 37 do 113).

W krótkim wstępie Autorka wprowadza czytelnika w problematykę pracy skupiając się na korzyściach wynikających z właściwego doboru produktów żywnościowych bogatych w naturalne antyoksydanty chroniące organizm przed wystąpieniem stresu oksydacyjnego, jednocześnie przyczyniające się do prewencji wystąpienia chorób cywilizacyjnych u ludzi. W sposób zwięzły, a zarazem bardzo precyzyjny opisuje możliwości ochrony organizmu przed zmianami wywołanymi przez reaktywne formy tlenu poprzez wykształcenie wielu mechanizmów (obejmujących zarówno związki pochodzenia egzogenne, jak również endogenne) chroniących przed nadmiernym generowaniem tych cząsteczek i uczestniczących w ich modyfikacji w nieaktywne pochodne.

Doktorantka w tej części pracy porusza niezmiernie ważny aspekt dotyczący potencjału antyoksydacyjnego mleka surowego i przetworów mlecznych (mleka, produktów fermentowanych, serów) oraz możliwości modyfikowania jego poziomu już na etapie hodowli zwierząt (poprzez żywienie zwierząt np. stosowanie naturalnych dodatków do diety, pełniących funkcje ochronne i regulujące metabolizm) oraz przetwórstwa pozyskanego surowca.

Po zapoznaniu się z treścią rozdziału można stwierdzić, że Pani mgr inż. Magdalena Stobiecka jest dobrze zorientowana w tematyce z zakresu prowadzonych badań i jest świadoma wartości i użyteczności badań, których się podjęła. Zdaje sobie bowiem sprawę z konieczności dążenia do zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w mleku, które decydują o jego potencjale antyoksydacyjnym poprzez podejmowanie świadomych i przemyślanych działań w kontekście hodowli zwierząt, uzyskaniu dobrego surowca, następnie produktu finalnego o optymalnym terminie przechowywania.

Za główny cel naukowy Pani mgr inż. Magdalena Stobiecka obrała określenie wpływu wybranych czynników na potencjał antyoksydacyjny mleka i produktów wytwarzanych na jego bazie oraz korelacji z zawartością związków o charakterze antyoksydacyjnym. Na jego podstawie Autorka określiła 6 zadań badawczych wyznaczających kierunki działań, które zostały przedstawione w sposób przemyślany i wynikają z pewnego następstwa zdarzeń, co świadczy o solidnym teoretycznym przygotowaniu do zaplanowania i przeprowadzenia trzech doświadczeń i szeregu analiz.

Część metodyczna dysertacji została podzielona na podrozdziały przez co stała się przejrzysta i chronologicznie wprowadzała czytelnika w dalszą część pracy. Układ doświadczenia podzielono na etapy uwzględniając zaplanowane wcześniej trzy doświadczenia, w których każde miało jasno wyznaczony cel badawczy. Doktorantka precyzyjnie opisała ilość i sposób doboru zwierząt do doświadczenia, system utrzymania oraz sposób żywienia (w przypadku doświadczenia 2.; w publikacji 3. podano dokładnie układ doświadczenia w tabeli 1., tj. okres doświadczalny, liczbę zwierząt i podział na grupy oraz skład komponentowy podstawowej dawki pokarmowej, tabela 2.), jak również część metodyczną dotyczącą terminu i sposobu pobrania próbek mleka, przechowywania i analiz surowca (schemat produkcji jogurtów). W tym miejscu należy zaznaczyć i podkreślić, że całość doświadczenia miała logiczną ciągłość i chronologiczne następstwo. Ostatnim celem badawczym wyznaczającym część doświadczalną była ocena możliwości wykorzystania mleka pozyskanego od krów żywionych paszą z dodatkiem mieszanki ziół do produkcji jogurtów o podwyższonym potencjale antyoksydacyjnym z uwzględnieniem 21-dniowego czasu przechowywania.

Warty podkreślenia jest szeroki zakres prowadzonych badań Autorki pracy opisany szczegółowo w sekcji Metody analityczne. Obejmuje ona wyszczególnienie wykonanych oznaczeń w mleku, paszach, jak również jogurtach oraz dobór właściwych metod analitycznych. Doktorantka skrupulatnie zaplanowała i wykonała część doświadczalną pracy. Godnym uznania jest dokładne przedstawienie analiz laboratoryjnych, dzięki czemu opisy stosowanych przez Autorkę metod pozwalają na ich wierne odtworzenie. Informacje zawarte w tym rozdziale, wskazują, że doświadczenie zostało zaplanowane i przeprowadzone właściwie, uwzględniając dobrze dobrane metody badawcze. Należy również zwrócić uwagę na dużą czasową i pracochłonność zastosowanych w pracy technik, a przede wszystkim umiejętność planowania i zorganizowania warsztatu pracy. Chciałabym zaznaczyć, że zarówno dobór materiału, zakres analizowanych parametrów oraz zastosowane w pracy metody badawcze są właściwe w kontekście przyjętych celów badawczych. Pozostałe elementy pracy obejmujące zakres analizy statystycznej zgromadzonego materiału, zostały przedstawione w sposób poprawny, przejrzysty i wystarczający.

Czytając część metodyczną pracy nasunęło się pewne pytanie dotyczące doświadczenia II (publikacji 3.). Autorka w dysertacji podała skład mieszanki ziołowej, formę podania suszonych ziół (w postaci pudru), jak również ilość w dawce/dzień/sztukę (str. 13-14). Zainteresowało mnie jednak na jakiej podstawie dokonano wyboru komponentów wchodzących w skład mieszanki ziół, a odpowiedź znalazłam w oryginalnej wersji publikacji. W związku z tym, że skład mieszanki ziołowej ustalono na podstawie analiz składu chemicznego i zawartości substancji biologicznie czynnych w ziołach z uwzględnieniem synergistycznego i antagonistycznego działania związków zawartych w surowcach zielarskich, a oprócz podstawowego składu w mieszance doświadczalnej oznaczono zawartość olejków eterycznych metodą destylacji parą wodną, nasuwają się pytania na które proszę o udzielenie odpowiedzi Panią mgr inż. Magdalenę Stobiecką.

1. Czy rozważała Pani możliwość zastosowania olejków eterycznych z wskazanych przez Panią roślin przyprawowych, jako alternatywy dla suszonych ziół? Ich wpływu na stabilność oksydacyjną przechowywanego jogurtu?
2. Czy Pani zdaniem zastosowanie olejków eterycznych do paszy lub wody z ekonomicznego i praktycznego punktu widzenia miałyby sens?
3. Jaką część morfologiczną rośliny uwzględniła Pani w mieszance ziołowej? Czy były to liście, kwiaty, nasiona, kora?

W kolejnej części pracy omówiono wyniki, które zaprezentowano w pracach wchodzących w skład powiązanego tematycznie cyklu publikacji. W związku z tym, że wskazane przez Doktorantkę prace zostały wcześniej dokładnie i rzeczowo ocenione przez specjalistów w danej dziedzinie wiedzy oraz

poddane ocenie komitetów redakcyjnych czasopism prezentujących odpowiedni poziom naukowy i opublikowane w uznanych czasopismach, jak *Animals* (2 publikacje), *Mljekarstvo*, *Applied Sciences*, a więc ich wartość naukowa została już potwierdzona i nie może być podważana.

Jako istotne w zakresie znaczenia naukowego, ale również możliwości ich praktycznego wykorzystania, należy wskazać:

1. stwierdzenie, że całkowity potencjał antyoksydacyjny mleka krów holsztyńsko-fryzyjskich zmieniał się znacząco w kolejnych laktacjach, jak również w ich przebiegu (odnotowano jego istotny spadek). Wraz z kolejną laktacją istotnie zmniejszała się zawartość składników wykazujących właściwości antyoksydacyjne, a mianowicie witamin A i E oraz albumin (β -LG i α -LA);
2. wykazanie, że uzyskane w wyniku przeprowadzenia analiz statystycznych wysokie wartości współczynników korelacji pomiędzy poziomem potencjału antyoksydacyjnego, a zawartością witaminy A ($r=0,687$) i E ($r=0,664$) oraz β -LG ($r=0,515$) w mleku wskazuje, że zawartość tych związków decyduje w dużym stopniu o potencjale przeciwutleniającym mleka;
3. stwierdzenie ujemnej korelacji pomiędzy wydajnością dobową mleka krów, a pojemnością antyoksydacyjną mleka ($r= - 0,317$);
4. wprowadzenie do diety krów standaryzowanej mieszanki ziołowej zawierającej: oregano, tymianek pospolity, jeżówkę purpurową, oraz korę cynamonu spowodowało w mleku istotnie wyższy poziom związków bioaktywnych o właściwościach przeciwutleniających ($p\leq 0,05$; $p\leq 0,01$), a mianowicie wybranych białek serwatkowych (β -LG, laktoferyny) i witamin lipofilnych (A,E), co przełożyło się na wzrost poziomu potencjału antyoksydacyjnego mleka;
5. niezależnie od zastosowanej metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej surowca (FRAP, DPPH, ABTS) stwierdzono, że mleko pozyskiwane od krów z grupy doświadczalnej oraz jogurty wytworzone na jego bazie charakteryzowały się istotnie wyższą wartością potencjału antyoksydacyjnego w porównaniu do mleka krów z grupy kontrolnej;
6. wykazano, że mleko krów, w których diecie uwzględniono dodatek mieszanki ziołowej wykazywało znacznie wyższy stopień ochrony antyoksydacyjnej (DAP);
7. stwierdzono, że fermentacja mlekowa ma pozytywny wpływ na aktywność antyoksydacyjną wytwarzanych jogurtów niezależnie od grupy doświadczalnej oraz użytej metody badawczej;

8. wykazano, że jogurty wytworzone na bazie mleka pochodzącego od krów, w których diecie uwzględniono zioła, odznaczały się wyższą aktywnością przeciwutleniającą w trakcie 21 dni przechowywania w porównaniu z jogurtami wytworzonymi na bazie mleka krów żywionych tradycyjnie;
9. zastosowanie standaryzowanej mieszanki ziołowej w dawce pokarmowej krów przyczyniło się do zwiększenia potencjału przeciwutleniającego mleka, jak również wytwarzanych na jego bazie jogurtów, co z punktu widzenia żywieniowego, wydaje się mieć szczególne znaczenie w kontekście ochrony organizmu przed szkodliwym działaniem stresu antyoksydacyjnego.

Uważam, że podjęte przez Panią mgr inż. Magdalenę Stobiecką badania są bardzo wartościowe i powinny być w dalszym ciągu kontynuowane.

W kończącym dysertację rozdziale „wnioski” (str. 27) uzyskane w trakcie badań rezultaty Doktorantka zebrała w postaci stwierdzeń, wniosków i uogólnień, które odzwierciedlają osiągnięcia naukowe wykonanej pracy i opisują realizację zadań zawartych w celu pracy. Wnioski napisane są poprawnie, tak w kontekście wyników, jak i w świetle dyskusji.

Wykaz piśmiennictwa wykorzystany w części wstępnej i dyskusji liczący 118 pozycji bibliograficznych został dobrany właściwie i obejmuje ważne najnowsze, w przewadze anglojęzyczne pozycje piśmiennictwa naukowego, w tym publikacje własne dotyczące omawianego zagadnienia.

Przedłożona do oceny dysertacja została napisana starannie i poprawnie pod względem formalnym, językowym i stylistycznym z zachowaniem właściwej sekwencji omawianych zagadnień, a poszczególne fragmenty tekstu zawierają informacje podane w sposób kompletny i bardzo uporządkowany. Wysoko i pozytywnie należy ocenić całość przedstawionej do oceny pracy, która ma spójny charakter i tworzy logiczną całość. Podkreślić należy godną uznania precyzję formułowania myśli oraz rzeczowość przekazywania treści.

Uzyskane rezultaty przesądzają o wartości merytorycznej pracy, dając jednocześnie możliwości wykorzystania ich w praktyce w kontekście modyfikacji zawartości składników o właściwościach antyoksydacyjnych w mleku i jogurtach wytwarzanych na jego bazie, poprzez ukierunkowane żywienie krów, co stanowi o ich aplikacyjnym charakterze.

Podsumowanie

Przedłożoną do recenzji dysertację oceniam wysoko i pozytywnie. Stanowi ona bowiem, przemyślaną, kompletną całość, w skład której wchodzi wszystkie badawcze i formalne elementy merytorycznie związane z przeglądem aktualnego piśmiennictwa, określeniem celów i zakresu

pracy, opisem metod badawczych i właściwą prezentacją uzyskanych wyników, dyskusją oraz sformułowaniem wniosków. Uzyskane przez Doktorantkę rezultaty badań są oryginalne i wartościowe, a przede wszystkim nowatorskie, stwarzają możliwość ich wykorzystania w opracowaniu technologii produkcji mleka oraz mlecznych produktów fermentowanych o podwyższonym potencjale antyoksydacyjnym, wchodzących w skład codziennej diety człowieka. Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Stobieckiej doskonale odpowiada na zapotrzebowanie rynku na produkty mleczarskie o podwyższonym potencjale antyoksydacyjnym, jak również oczekiwania hodowców bydła mlecznego, w kontekście produkcji surowca o właściwościach prozdrowotnych, zgodnego z oczekiwaniami współczesnego konsumenta.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty pracy opisane w recenzji stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Stobieckiej pt.: „Wpływ wybranych czynników na potencjał antyoksydacyjny mleka pozyskiwanego od krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej i produktów wytwarzanych na jego bazie”, spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora i w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (t.j. Dz.U.2022.574 z późn. zm.). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Stobieckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na założenia metodyczne oraz realizację przeprowadzonych badań i analiz, poziom naukowy pracy, jak również wysoką wartość praktyczną opisanych w pracy wyników wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Stobieckiej.

Szczecin, dn. 20 grudnia 2023 r.

dr hab. inż. Małgorzata Szewczuk, prof. ZUT

