

### Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Sylwii Sobolewskiej pt. „Antyoksydanty, nienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny omega -3 i ich wpływ na profil kwasów tłuszczowych oraz jakość jaj przepiórczych”  
wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Janusza Ordy  
w Katedrze Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa  
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Problematyka podjęta w rozprawie doktorskiej dotyczy oceny wpływu dodatku olejów bogatych w niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT) n-3 do mieszanek paszowych na profil kwasów tłuszczowych w żółtku jaj przepiórczych. Ponadto w pracy badano wpływ naturalnych przeciwutleniaczy (wytłoki z winogron) na profil kwasów tłuszczowych oraz cechy organoleptyczne, jakość jaj świeżych i przechowywanych.

Wpływ rodzaju tłuszczu, jego składu i jakości na funkcjonowanie układu immunologicznego jest rozległy. Dotyczy to w szczególności niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT). Są one prekursorami eikozanoidów (prostaglandyn, prostacyklin, tromboksanów, lipoksyn i leukotrienów). NNKT i związki pochodne odgrywają wiele ważnych funkcji biologicznych, w tym również mają znaczenie w procesach odporności. Niedobór NNKT m.in. zmniejsza proliferację limfocytów i produkcję interleukiny 2. Dotyczy to w szczególności roli kwasów tłuszczowych n-3 i n-6. Praktycznym sposobem wzbogacania mieszanek paszowych dla drobiu w kwasy tłuszczowe n-3 może być stosowanie oleju i mączki rybnej oraz oleju i materiałów paszowych z lnu.

Stosunek n-3/n-6 NNKT określa typ i wielkość produkcji eikozanoidów w leukocytach i komórkach pomocniczych oraz moduluje odpowiedź immunologiczną. Idealny stosunek kwasów tłuszczowych NNKT n-6 do n-3 nie jest ostatecznie poznany. Wykorzystanie wiedzy z tego zakresu pozwala na stosowanie zmodyfikowanych, pod względem składu kwasów tłuszczowych diet, w profilaktyce niektórych schorzeń u drobiu. Zauważono, że kwasy tłuszczowe n-3 zawarte w oleju

rybnym i lnianym zmniejszają śmiertelność i spadek masy ciała u kurcząt chorych na kokcydiozę. Korver i in. (1997) zaobserwowali, że dodatek oleju rybnego zmniejszał uszkodzenia jelit powodowane przez *E. tenella*. Autorzy cytowanych badań sugerują, że korzystny efekt kwasów tłuszczowych n-3 związany jest z stymulowaniem rozwoju odporności na infekcje kokcydiami

Zainteresowanie wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi z rodziny n-3 wynika również z faktu, iż poprzez żywienie można zwiększyć ich ilość w produktach pochodzenia zwierzęcego (mięso, jaja). Z uwagi na zainteresowanie żywnością funkcjonalną, zagadnienie wpływu mieszanek paszowych wzbogaconych w kwasy tłuszczowe n-3 na status zdrowotny ptaków jest stale aktualne.

Istotnym czynnikiem indukującym powstawanie reaktywnych form tlenu u zwierząt gospodarskich jest niewłaściwa jakość mieszanek paszowych. Obecność mikotoksyn, ksenobiotyków czy produktów peroksydacji lipidów wpływa na powstawanie stresu oksydacyjnego. Duży udział tłuszczu bogatego w wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) w mieszankach paszowych powoduje większą ich podatność na utlenianie. Wpływa to na pogorszenie jakości mieszanek paszowych, ale także nasila zmiany peroksydacyjne w produktach pochodzenia zwierzęcego, takich jak jaja i mięso.

Powstawanie w organizmie wolnych rodników jest w pewnym zakresie normalną funkcją organizmu. Problemem jest natomiast ich nadmiar i niekontrolowana produkcja. Z tego względu w organizmach istnieje system regulujący ich wytwarzanie oraz usuwający ich nadmiar. Bardzo ważnym składnikiem tego systemu są przeciwutleniacze, a skutkiem ich niedoboru jest stres oksydacyjny. Przeciwutleniacze należą do związków chemicznych wytwarzanych w reakcjach metabolizmu wtórnego i są odpowiedzią obronną na działanie pewnych bodźców, takich jak np. urazy mechaniczne, światło, czynniki infekcyjne, szkodniki. Funkcją przeciwutleniaczy w organizmie jest neutralizacja aktywnych rodników. Szereg związków wykazuje działanie antyoksydacyjne. Są to polifenole (kwas kawowy, ellagowy, ferulowy oraz flawonoidy i stilbeny), karotenoidy, (m.in.  $\alpha$  i  $\beta$ -karoten, likopen), kwas askorbinowy i tokoferole (witamina E). Jako składnik enzymu peroksydazy glutationowej (GSH-Px) selen ma działanie synergistycznie z witaminą E i uczestniczy jako przeciwutleniacz w ochronie komórkowych i subkomórkowych struktur przed uszkodzeniem nadtlenkami.

Wyniki badań wskazują, że mieszanki paszowe bogate w naturalne antyoksydanty: witaminy A, C i E, karotenoidy i związki polifenolowe, mogą w istotny sposób wpływać na wzrost reaktywnego potencjału antyoksydacyjnego organizmu i tym samym zmniejszać ryzyko niektórych chorób oraz wpływać korzystnie na wyniki produkcyjne.

Z uwagi na wzrastający koszt stosowania zwiększonych dawek witaminy E w mieszankach paszowych poszukuje się alternatywnych rozwiązań. Związki polifenolowe, z uwagi na to, iż są



obecne w wielu roślinach i szereg z nich wykazuje działanie antyoksydacyjne, mogą stanowić interesującą alternatywę. Bogatym źródłem związków polifenolowych są owoce winogron. Do związków polifenolowych obecnych w owocach winogron należą: kwasy fenolowe (kwas kumarynowy, kwas cytrynowy, kwas kofeowy), trihydroksystilbeny (resweratrol) i flawonoidy (katechiny, epikatechiny, kwercetyna) - Olas 2006. Wielu autorów podkreśla występowanie w produktach z winogron resweratrolu, który wykazuje m.in. właściwości przeciwutleniające, antynowotworowe, przeciwgrzybiczne, antywirusowe, antibakteryjne oraz silne przeciwzapalne. Mając na uwadze powyższe informacje w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie znaczeniem tych związków w żywieniu zwierząt.

Praca doktorska mgr inż. Sylwii Sobolewskiej liczy 170 stron tekstu oraz zawiera 43 tabele i 3 rysunki. Wykaz piśmiennictwa obejmuje 294 pozycje. Rozprawa napisana jest według układu typowego dla prac naukowych.

Koncepcja pracy jest interesująca i poprawna; umożliwia osiągnięcie zaplanowanego celu badawczego, tj. oceny wpływu dodatku olejów bogatych w NNKT n-3 na zmianę profilu kwasów tłuszczowych w żółtku jaj przepiórczych oraz wpływu naturalnych polifenoli na skład kwasów tłuszczowych oraz cechy sensoryczne, jakość jaj świeżych i przechowywanych. Obejmuje ocenę wpływu różnych źródeł tłuszczu i polifenoli na skład mieszanek i podstawowe wskaźniki produkcyjne oraz szczegółową ocenę jakości jaj.

Tytuł pracy „Antyoksydanty, nienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny omega -3 i ich wpływ na profil kwasów tłuszczowych oraz jakość jaj przepiórczych”, moim zdaniem, nie odzwierciedla w pełni treści pracy. W badaniach jako źródło naturalnych polifenoli wykorzystano wytloki z winogron, nie stosowano natomiast pojedynczych antyoksydantów. Ponadto w pracy oceniano również wpływ czynników doświadczalnych na parametry produkcyjne przepiórek nieśnych.

Pani mgr inż. Sylwia Sobolewska w przeglądzie piśmiennictwa, w oparciu o najnowsze publikacje naukowe, charakteryzuje dotychczasowe dokonania z zakresu podjętej problematyki badań. Doktorantka wskazała na znaczenie kwasów tłuszczowych w diecie ludzi, szczegółowo opisała budowę i syntezę kwasów tłuszczowych w organizmie. Następnie opisała rolę poszczególnych kwasów tłuszczowych w diecie oraz omówiła zalecenia żywieniowe w tym zakresie. Zwróciła uwagę na znaczenie kwasów tłuszczowych w profilaktyce schorzeń cywilizacyjnych oraz rolę żywności funkcjonalnej. Poświęcił również dużo uwagi istotnemu zagadnieniu jakim jest proces utleniania tłuszczów oraz jego konsekwencje. Opisała również rolę antyoksydantów. Po lekturze tego rozdziału należy stwierdzić, że Autorka bardzo dobrze wprowadza czytelnika w opisywane zagadnienia, a następnie jasno formułuje cel podjętych badań.

W omawianym rozdziale pojawiły się jedynie drobne nieścisłości. W streszczeniu i w całej pracy w języku polskim i angielskim na określenie pasza proponuję mieszanka paszowa (diet). Nazwy łacińskie proponuje pisać kursywą. Na stronie 14 w opisie składu jaj podano informacje o zawartości mikroelementów wymieniając również witaminy. Na stronie 15 i 23 w cytowanym piśmiennictwie (Drużyńska i Klepacka 205) i (Nakamura i in. 2004) podano nieprawidłowy rok publikacji, a w tytule tabeli 2.4.1. proszę podać piśmiennictwo zgodne z wykazem. Proponuję doprecyzować sformułowanie „Cyklooksigenaza 2 (COX-2) jest głównym źródłem prostanoidów” na bierze udział w ich powstawaniu. Informacja o tabeli 2.6.1. powinna znaleźć się w tekście poprzedzającym tabelę.

W rozdziale „Materiał i metody” scharakteryzowano doświadczenia żywieniowe (I i II). Następnie opisano metody analityczne wykorzystane do oceny podstawowego składu chemicznego mieszanek paszowych oraz analizy składu kwasów tłuszczowych. Scharakteryzowano postępowanie analityczne w zakresie oznaczania zawartości polifenoli oraz pojemności przeciwutleniającej. Szczegółowo opisane zostały czynności doświadczalne stosowane w ocenie jakości jaj.

Po lekturze tego rozdziału nasuwają się następujące uwagi. W tabelach opisujących skład kwasów tłuszczowych stosowanych olejów roślinnych (tab. 4.1.1.1 i 4.1.2.1) podano inną liczbę kwasów tłuszczowych. Skład oleju lnianego w pierwszym doświadczeniu odbiega od typowych wartości. Uwagę zwraca również prawie dwukrotnie większa zawartość włókna surowego w stosunku do typowych wartości w jęczmieniu (tab. 4.1.1.2.) oraz mała zawartość białka w poekstrakcyjnej śrucie sojowej w doświadczeniu II (tab. 4.1.2.2.). Proszę o podanie informacji w jaki sposób obliczono zawartość energii metabolicznej w wyciekach z winogron. W składzie premiksu podano tylko 3 witaminy? Nie podano informacji jakie oleje były stosowane - surowe czy rafinowane. Ponadto szkoda, że nie wykonano oznaczenia zawartości polifenoli w olejach. Proponuję w całej pracy stosować konsekwentnie oznaczenie EM<sub>N</sub>. Na stronie 57 w cytowanym piśmiennictwie (Drużyńska i Klepacka 2004) podano nieprawidłowy rok publikacji. Szkoda, że nie podano szczegółowego składu tłuszczu mieszanek paszowych, jak również takiej informacji o wyciekach z winogron. W tabeli 4.1.1.2. proponuję zamiast słowa komponentów paszowych użyć sformułowania materiałów paszowych.

W podrozdziale, w którym opisano analizę jakości jaj podano, że pomiar wytrzymałości jaj wykonano miernikiem wytrzymałości, a jako jednostki podano kgf, podczas gdy w rozdziale wyniki i dyskusja ten sam wskaźnik podano w dwóch jednostkach. Proszę o doprecyzowanie tej kwestii w rozdziale materiał i metody badań.



Podwyższona zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest pożądana w produktach żywnościowych. Jednak ich zwiększona ilość sprzyja peroksydacji lipidów w tkankach, w konsekwencji negatywnie wpływa na jakość produktu: smak, zapach, barwę. Wiąże się to z powstaniem szkodliwych produktów reakcji wolnorodnikowych, w tym MDA (dwualdehyd malonowy). Zwiększenie spektrum analiz o takie wskaźniki jak MDA czy TBARS (substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym) mogłoby niewątpliwie dać szerszą odpowiedź na pytania postawione w pracy. Ponadto bardzo szczegółowa charakterystyka składu kwasów tłuszczowych mogła być poszerzona o wprowadzenie pewnych wskaźników syntetycznych, takich jak suma kwasów o działaniu hipocholesterolemicznym i hipercholesterolemicznym.

Wyniki przedstawiono w 32 tabelach. Uzyskane rezultaty mają duży walor poznawczy i praktyczny i dają podstawę do sformułowania syntetycznych wniosków. Interpretacja uzyskanych wyników w ramach dyskusji została przeprowadzona bardzo szczegółowo, a Autorka odniosła się do rezultatów badań innych autorów. Na uwagę zasługuje fakt umiejętnego i przejrzystego opisywania bardzo dużej ilości danych tabelarycznych, co ułatwia analizę wyników własnych i innych autorów.

Ocena wpływu stosowania różnych źródeł tłuszczu i wyłoków z winogron na parametry produkcyjne przepiórek nieśnych nie wykazała wpływ badanych czynników doświadczalnych na oceniane wskaźniki. W trakcie badań zaobserwowano relatywnie duże upadki w niektórych grupach, aczkolwiek nie uwodniono wpływu czynników doświadczalnych w tym zakresie. Opis możliwych przyczyn zaistniałej sytuacji jest nieco inny w przypadku doświadczenia I i II. Moim zdaniem należy ujednoczyć opis możliwych przyczyn zarówno w pierwszym jak i w drugim doświadczeniu.

Wyniki badań wskazują, że wzbogacenie mieszanek paszowych w NNKT n-3 wpłynęło na zmianę profilu kwasów tłuszczowych zarówno w mieszankach paszowych jak i w jajach przepiórczych. Zastosowanie natomiast wyłoków z winogron w składzie mieszanek paszowych spowodowało wzrost zawartości polifenoli 1,6 – krotnie, a aktywności przeciwutleniającej 3-krotnie.

Rozdział 5.1.2. Zawartość polifenoli oraz aktywność przeciwutleniająca w paszy powinien być moim zdaniem przed wynikami produkcyjnymi, jako opis mieszanek paszowych i wyłoków z winogron. Na stronie 65 wymieniając zawartość polifenoli w różnych częściach roślin nie podano ich zawartości w liściach. W całej pracy sformułowanie „autorzy ukazali” proponuje zamienić na inne np. wykazali, „ukazanymi w tabeli” przedstawionymi w tabeli, a na stronie 72 „zaobserwowano wzrost kwasu” zamienić na wzrost zawartości kwasu. Na stronie 68 użyto

sformułowania „Pasza dla przepiórek nieśnych skład się głównie z kwasów tłuszczowych nienasyconych” proponuje zamienić na inne, bardziej precyzyjne.

Wyniki badań wskazują, że profil kwasów tłuszczowych w jajach był zgodny z profilem zaobserwowanym w mieszankach paszowych. W żółtkach jaj wraz ze zwiększającą się ilością NNKT n-3 w mieszankach paszowych zwiększał się poziom tych kwasów tłuszczowych (nawet 8-krotnie), natomiast poziom kwasów NNKT n-6 obniżał się (o 28%). Wzrósł także stosunek ALA : LA oraz obniżył się stosunek SFA : NNKT n-3 i NNKT n-6 : NNKT n-3 (nawet 10-krotnie) w jajach z grup otrzymujących mieszankę paszową wzbogaconą w NNKT n-3 w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatek oleju rzepakowego wpłynął korzystniej w porównaniu do oleju lnianego na spadek poziomu SFA oraz wzrost UFA, MUFA i stosunek UFA : SFA w żółtkach jaj. Dodatek oleju lnianego (4%) wpłynął na obniżenie oceny sensorycznej jaj powodując m.in. pogorszenie smaku, zapachu oraz wystąpienie obcych posmaków w ocenianych jajach.

Dodatek wyłoków z winogron (4%) wpłynął na poprawę niektórych wskaźników charakteryzujących jakość jaj. Miedzy innymi wyłoki z winogron wpłynęły na poprawę wyników oceny sensorycznej jaj, dzięki poprawie smaku o 7% i redukcji obcych posmaków o 5%.

Przechowywanie miało istotny wpływ na profil kwasów tłuszczowych zarówno w mieszankach paszowych jak i w żółtkach jaj. W mieszankach paszowych zaobserwowano spadek poziomu LA o ok. 1,5%, a dodatek 4% wyłoków z winogron miał wpływ na utrzymanie się wyższego poziomu kwasu  $\alpha$ -linolenowego w porównaniu do grup, które nie otrzymywały wyłoków z winogron w mieszankach paszowych. Przechowywanie jaj wpłynęło na spadek zawartości polifenoli oraz aktywności przeciwutleniającej w mieszankach paszowych, obniżenie masy białka oraz wzrost masy i pH żółtka i pogorszenie wyników oceny sensorycznej jaj.

W opisie wyników badań pojawiają się nieliczne nieścisłości. Na przykład na stronie 68 Autorka podaje, że najmniejszą zawartości MUFA cechowała się grupa A4 T28, podczas gdy była to grupa A4T0, a PUFA A4T0. Na stronie 89 sformułowanie „nie zaobserwowano wpływu zastosowanych dodatków paszowych” nie jest precyzyjne w odniesieniu do różnych źródeł tłuszczu. Na stronie 93 podano, że przechowywanie jaj miało wpływ także na obniżenie wysokości białka gęstego z 5,1 mm do 4,6 mm, co nie znajduje odzwierciedlenia w danych tabelarycznych.

W oparciu o uzyskane wyniki zostały sformułowane wnioski. Wskazują one, że postawione cele badawcze zostały w pełni zrealizowane. Moim zdaniem mają one jednak charakter podsumowania. Z uwagi na rozległy charakter pracy, bardzo dużą ilość uzyskanych wyników oraz ich duży walor praktyczny praca powinna zakończyć syntetycznymi wnioskami, dającymi odpowiedź na pytanie czy stosowanie różnych źródeł tłuszczu i naturalnych polifenoli (wyłoki z winogron) jest sensowne z punktu widzenia koncepcji żywności funkcjonalnej.



Rozdział piśmiennictwo wskazuje, że Doktorantka przeprowadził gruntowną analizę dotychczasowego stanu wiedzy z zakresu obejmującego tematykę badań. W omawianym rozdziale pojawiły się jedynie drobne nieścisłości. W przypadku wykazu piśmiennictwa w układzie alfabetycznym nie ma potrzeby numerowania publikacji źródłowych. Ponadto należy zweryfikować poprawność niektórych informacji bibliograficznych: Balevi, Coşkun 2000; Drużyńska i Klepacka 2005, Goni i in. 2007, Zalecenia i wartość pokarmowa pasz.....

W posumowaniu stwierdzam, że rozprawa została napisana poprawnie i starannie, a przedstawione w recenzji uwagi nie mają wpływu na końcową ocenę merytoryczną pracy. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością metod badawczych, co pozwoliło na szczegółową analizę wpływu czynników doświadczalnych na oceniane wskaźniki. Na uwagę zasługuje fakt dużej pracowitości podjętych badań oraz rzetelności przeprowadzonych analiz. Praca ma duży walor poznawczy i aplikacyjny, co pozwoli na wykorzystanie wyników badań w praktyce.

Biorąc pod uwagę powyższe walory ocenianej rozprawy uważam, że w pełni odpowiada ona wymogom określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595, ze zmianami w Dz. U. z 2005 r. nr. 164, poz. 1365). Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Sylwii Sobolewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Krzysztof Lipiński