

Kraków dnia, 13.07.2017 r.

Dr hab. inż. Aneta Kopeć
Katedra Żywienia Człowieka
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
ul. Balicka 122, 31-149 Kraków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. **Moniki Hrynkiewicz**

pt. „Peptydy o smaku gorzkim pochodzące z białek żywności-badania eksperymentalne w układzie *in silico* i *in vitro*”

wykonanej

w Katedrze Biochemii Żywności, Wydziału Nauk o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Anny Iwaniak, prof. UWM, i promotora pomocniczego dr inż. Justyny Bucholskiej

Podstawa prawna: pismo Dziekana Wydziału Nauk o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (z dnia 22 maja 2017 r.).

Ogólna charakterystyka ocenianej pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. **Moniki Hrynkiewicz**, zatytułowana „Peptydy o smaku gorzkim pochodzące z białek żywności-badania eksperymentalne w układzie *in silico* i *in vitro*”, została przedstawiona w postaci druku zwartego, liczącego ogółem 263. strony tekstu, w tym 42. strony załączników. Pracę podzielono na 9. głównych rozdziałów, poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wprowadzeniem. W rozprawie zamieszczono 31. tabel oraz 65. rysunków, przedstawiających wyniki badań. Dodatkowo w „Załącznikach” znajduje się 51. tabel i 30. wykresów. Właściwy dobór literatury, wskazujący na bardzo dobrą znajomość Doktorantki w obszarze poruszanych zagadnień, obejmuje 203. pozycje, głównie oryginalne, w większości obcojęzyczne (169.).

Rozprawa przygotowana jest bardzo starannie, napisana poprawnym językiem, posiada klasyczny układ, zgodny z zasadami przyjętymi dla tego typu opracowań naukowych.

Ocena merytoryczna pracy

Tytuł rozprawy adekwatnie koresponduje z jej celem i treścią. Z pełnym uznaniem stwierdzam, że zakres zrealizowanych badań jest rozbudowany i stanowi szerokie tło dla wymienionego powyżej tytułu.

Temat rozprawy jest nowatorski i bardzo ważny, dotyczy bowiem jednej z najistotniejszych grup składników pokarmowych, jakimi są białka. Jak dowodzą badania, konsumenci, wybierając produkty spożywcze, kierują się nie tylko ich składem i smakiem, ale coraz częściej zwracają uwagę na wartość odżywczą oraz walory prozdrowotne-funkcjonalne. Wynika to m.in. z rosnącej świadomości o roli prawidłowego żywienia, zgodnego z zaleceniami, skutkującego zmniejszeniem ryzyka przewlekłych chorób niezakaźnych bądź poprawą zdrowia. Składniki decydujące o smaku żywności to przede wszystkim, tłuszcze, węglowodany, kwasy zasady oraz alkohole. Za smak żywności mogą też odpowiadać peptydy. Od kilkunastu lat naukowcy badają tzw. biologicznie aktywne peptydy, które mogą wpływać m.in. na obniżanie ciśnienia krwi, działać antyoksydacyjnie i immunomodulacyjnie. Związki te mogą także kształtować pięć podstawowych wrażeń smakowych żywności, m.in. smak gorzki.

Nowatorskim aspektem rozprawy jest wykorzystanie bioinformatyki do zestawiania peptydów kształtujących wszystkie wrażenia smakowe, tj. smak gorzki, słodki, słony, kwaśny, umami oraz cierpki. Smak gorzki, w zależności od rodzaju produktu spożywczego, może być pożądanym bądź nie. Poprzez stosowanie metod bioinformatycznych (*in silico*) możliwe jest prognozowanie, czy podczas hydrolizy enzymatycznej białka smak ten ulegnie intensyfikacji czy też może zostanie zniwelowany. Zastosowanie innowacyjnych metod bioinformatycznych może umożliwić optymalne zaplanowanie warunków procesu technologicznego oraz dobranie odpowiednich parametrów fizykochemicznych do osiągnięcia zamierzonych efektów. Użycie metod *in silico* zmniejszy też koszty związane z projektowaniem nowych artykułów spożywczych, a w konsekwencji koszty produkcji.

Doktorantka w rozdziale „Przegląd piśmiennictwa” na 26. stronach tekstu jasno przedstawiła tło naukowe swojej rozprawy. W oparciu o najnowsze, światowe i polskie piśmiennictwo, scharakteryzowała wrażenia smakowe oraz fizjologiczne ich podstawy. Omówiła szczegółowo peptydy jako związki, które kształtują podstawowe wrażenia smakowe, dzieląc je na te, które naturalnie występują w roślinach czy żywności pochodzenia

zwierzęcego oraz na pozyskiwane na drodze syntezy chemicznej. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka scharakteryzowała zastosowanie analizy *in silico* w badaniach białek i peptydów pochodzących z żywności. Opisała szczegółowo dostępne bazy danych i programy komputerowe, które mogą być wykorzystane do badań *in silico*. Przedstawiła też liczne przykłady zastosowania analiz bioinformatycznych do badania właściwości białek i peptydów pochodzących z żywności. Podkreśliła także, że tego typu badania powinny być weryfikowane analizami *in vitro*, np. dotyczącymi stabilności i biodostępności, a także właściwości funkcjonalnych. W następnych podrozdziałach Doktorantka scharakteryzowała chemometrię i chemoinformatykę jako metody wykorzystywane do badania peptydów.

Podsumowując można stwierdzić, że przedstawiony w pracy, w sposób zwięzły i syntetyczny, rozdział dotyczący przeglądu piśmiennictwa na podstawie licznych danych literaturowych, świadczy o dobrej znajomości problematyki, uzasadnia cel prowadzonych badań oraz w sposób jasny wprowadza czytelnika w kolejne rozdziały pracy.

W rozdziale „**Cel pracy**” przejrzysto przedstawiono główny cel i cele szczegółowe, jakie zrealizowano w niniejszej pracy. Głównym celem było zbadanie zależności między strukturą (tj. sekwencją aminokwasową) peptydów pochodzących z żywności, a ich gorzkim smakiem za pomocą wybranych metod *in silico* oraz weryfikacja uzyskanych wyników w układzie *in vitro*. Cennym uzupełnieniem niniejszej pracy byłoby podanie hipotezy/hipotez badawczych.

W rozdziale „**Metodyka**” Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała poszczególne etapy pracy i parametry wykorzystywane w badaniach *in silico* i *in vitro*. Wymienione w niniejszej pracy analizy wykonano z zastosowaniem właściwych metod komputerowych bądź analitycznych, a ich opis jest bardzo dokładny. Zastosowano też prawidłowe metody statystyczne do wyników analiz w układzie *in silico*.

W odniesieniu do wymienionego rozdziału nasuwa się jednak kilka, wyszczególnionych poniżej uwag. Schemat przedmiotowych badań zamieszczono przed zamiast w rozdziale „Metodyka”. Cennym uzupełnieniem tej części rozprawy byłoby podanie, w podrozdziale 4.2.6 „Typowanie sekwencji białek”, informacji na jakiej podstawie wybrano produkty spożywcze (mleko, mięso, ryby, jaja, nasiona zbóż, roślin oleistych i strączkowych) do typowania sekwencji białek. Czy była to tylko baza danych UniProt, czy może inne źródło, np. Rocznik Statystyczny? W tym podrozdziale należało też wyjaśnić dlaczego profil potencjalnej aktywności sensorycznej wykonano w tylko wybranych białkach wytypowanych wcześniej grup produktów spożywczych.

Podsumowując, zakres zaplanowanych i wykonanych przez Doktorantkę analiz *in silico* i *in vitro* był wystarczająco szeroki i przemyślany, pozwolił na zrealizowanie założonego celu głównego oraz szczegółowych celów pracy. Należy także podkreślić duży wkład pracy w dobraniu i przygotowaniu materiału do badań *in silico*, a w konsekwencji również do badań *in vitro*.

W rozdziale „**Omówienie wyników**” Autorka w sposób staranny opisała rezultaty swoich analiz. Prezentacja wyników, zarówno tabelaryczna, jak i graficzna, konsekwentnie odzwierciedla realizację założonego celu pracy. Otrzymane rezultaty badań stanowią wartościową część dysertacji.

Poniżej przedstawiam najważniejsze, korespondujące z celem pracy, spostrzeżenia Doktorantki.

„Przy pomocy analizy składowych głównych (PCA) wykazano, iż istotny wpływ na gorzki smak miały następujące główne cechy w przypadku:

- dipeptydów: masa cząsteczkowa, tęgość, liczba atomów węgla oraz wodoru, polarność, hydrofobowość (aminokwas N- i C-końcowy);
- tripeptydów: masa cząsteczkowa, tęgość (aminokwas C-końcowy oraz środkowy) oraz masa cząsteczkowa, tęgość i skłonność reszty aminokwasowej do odsłonięcia dla rozpuszczalnika (aminokwas N-końcowy);
- tetrapeptydów: polarność oraz hydrofobowość (aminokwas N-końcowy), tęgość oraz hydrofobowość (aminokwas C-końcowy). O właściwościach aminokwasów usytuowanych w pozycjach środkowych, tj. 2-3 tetrapetydu, decydowały tęgość oraz masa cząsteczkowa.

Na podstawie liniowej regresji wielorakiej wytypowano peptydowe indykatory smaku gorzkiego. Spełniały one zaobserwowane prawidłowości typu „struktura a gorzki smak”, jakie otrzymano stosując PCA.

Spośród 77 sekwencji białek za potencjalnie najlepsze prekursory peptydów gorzkich uznano białka mleka oraz soi.

W układzie *in silico* enzymy, takie jak papaina, ficyna oraz proteinaza K uwalniały z białek mleka i soi potencjalnie więcej peptydów gorzkich niż endopeptydazy.

Liczba peptydów uwolnionych w wyniku komputerowej symulacji hydrolizy białek mleka oraz soi różniła się od liczby peptydów zidentyfikowanych za pomocą metod laboratoryjnych. Za pomocą chromatografii cieczowej, sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS), zidentyfikowano 28 peptydów w próbkach hydrolizatów białek mleka oraz 10 w próbkach hydrolizatów białek soi (łącznie 38). Stopień zgodności wyników uzyskanych metodami *in silico* oraz *in vitro* wynosił 11%.

Niektóre ze zidentyfikowanych peptydów gorzkich wykazywały również dodatkową aktywność, np. peptyd sekwencji TTMLPW pełnił funkcję inhibitora enzymu konwertującego angiotensynę, immunomodulacyjną oraz opioidową”.

Niektóre fragmenty tej części pracy powinny być zamieszczone w rozdziale „Metody” (np.: str. 63, pierwszy akapit od dołu, „Przedmiotem analizy były...z rotacją Varimax znormalizowaną (rozdział 4.2.4).”; str. 67, pierwszy akapit od góry, „Procedura tworzenia macierzy danych...dla peptydów gorzkich [Stanisz, 2007b].”; str. 69, pierwszy akapit od góry, „Macierz danych...(rozdział 4.2.2 i 4.2.3).” i „Dyskusja” (np.: str. 91, drugi akapit od góry, „Podobne rezultaty...kształtujących smak gorzki.”; str. 103-104; „Obecność krótkich – aktywnych motywów we fragmencie...przez Zamyatina [2009].”; str. 104 „Według Sun [2011] peptydy charakteryzujące się wartością Qlub sekwencji bez tego statusu”).

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka umiejętnie przedyskutowała otrzymane wyniki analiz własnych z odpowiednimi danymi literaturowymi. Wskazała na możliwe przyczyny i skutki stwierdzanych zależności. Świadczy to o dużej wiedzy, dotyczącej omawianych zagadnień.

Uzyskane rezultaty badań Autorka przedstawiła w dwunastu „**Wnioskach i stwierdzeniach końcowych**”, bezpośrednio wynikających z rozdziału dotyczącego omówienia wyników. Stanowią one syntetyczne i trafne podsumowanie wyników własnych badań.

Cennym uzupełnieniem badań, wykonanych w niniejszej pracy, byłoby wykonanie, w przyszłości badań na liniach komórkowych, a następnie na zwierzętach laboratoryjnych. Proszę Doktorantkę o odpowiedź na następujące pytanie: Czy możliwe jest podanie ilości bioaktywnych peptydów, jaka powinna być zastosowana w badaniach na zwierzętach laboratoryjnych np. szczurach, by wykazać ich aktywność antyoksydacyjną?

Zamieszczone w niniejszej ocenie uwagi nie umniejszają wartości wykonanej pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska pt. „Peptydy o smaku gorzkim pochodzące z białek żywności-badania eksperymentalne w układzie *in silico* i *in vitro*”, wykonana przez Panią mgr inż. **Monikę Hrynkiewicz**, spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U.03. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. **Moniki Hrynkiewicz** do dalszych

etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie, biorąc pod uwagę cenne wyniki o możliwym charakterze aplikacyjnym, uzyskane za pomocą właściwie dobranych i zastosowanych metod, wnoszę o wyróżnienie niniejszej pracy.

Amela Kupa'