

dr hab. inż. Joanna Stadnik

Lublin, 11.07.2017

Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Skromna 8

20-704 Lublin

RECENZJA

rozprawy doktorskiej 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 Nauki o Żywności

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Iwaniak, prof. UWM jako promotora

oraz dr inż. Justyny Bucholskiej jako promotora pomocniczego

Podstawa wykonania recenzji

Podstawą wykonania recenzji jest pismo Dziekana Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie prof. dr hab. Małgorzaty Darewicz z dnia 22 maja 2017 r. o numerze WNoŻ-DZ.6350.177.2017.

Przedmiotem recenzji jest ocena czy rozprawa spełnia warunki 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 z późn. zm.).

Uzasadnienie podjęcia tematu

Białka stanowiące niezbędny składniki diety człowieka jako źródło aminokwasów coraz częściej stają się obiektem badań w kontekście pozyskiwania z nich biologicznie aktywnych peptydów, które po uwolnieniu z białek macierzystych mogą oddziaływać jako modulatory wielu procesów zachodzących w organizmie. W badaniach tych coraz powszechniej wykorzystuje się komputerowe techniki obliczeniowe umożliwiające fizykochemiczną charakterystykę biopeptydów oraz symulację ich uwalniania z białek prekursorowych pod wpływem enzymów proteolitycznych. Oprócz wykazywania aktywności biologicznej peptydy wpływają także na cechy sensoryczne produktów spożywczych, gdyż wiele białek jest prekursorami peptydów o smaku gorzkim. Smak ten jest szczególnie niepożądany zwłaszcza w przypadku serów dojrzewających lub odżywek, których składnikiem są hydrolizaty białkowe.

Recenzowana praca wpisuje się w tę tematykę, bowiem jej podstawowym celem było zbadanie zależności pomiędzy strukturą (tj. sekwencją aminokwasową) peptydów pochodzących z białek żywności, a ich gorzkim smakiem za pomocą wybranych metod *in silico* oraz weryfikacja uzyskanych wyników w układzie *in vitro*.

Problematyka rozprawy mieści się w obszarze nauk o żywności i żywieniu, a jej wybór uważam za trafny i aktualny z naukowego punktu widzenia. Możliwość wykorzystania uzyskanych wyników do projektowania żywności funkcjonalnej i nutraceutyków zawierających bioaktywne peptydy o pożądanym cechach sensorycznych świadczy o wysokim potencjale aplikacyjnym pracy.

Tę interesującą tematykę badawczą Autorka podjęła w znakomitym zespole naukowym od lat zaangażowanym, z dużymi sukcesami, w badania nad biologicznie aktywnymi peptydami.

Ocena formalna pracy

Recenzowana rozprawa obejmuje 263 numerowane strony maszynopisu, zamieszczono w niej 65 rysunków i 32 tabele oraz wykaz 215 pozycji cytowanej literatury (w tym 12 źródeł internetowych). Jej struktura jest typowa dla prac o charakterze eksperymentalnym i zawiera: *Przegląd piśmiennictwa* (26 stron) poprzedzony *Wprowadzeniem* oraz *Streszczeniem* w języku polskim i angielskim. Kolejne rozdziały to: *Cel pracy* (2 strony), *Schemat postępowania* (2 strony), *Metodyka* (19 stron), *Omówienie wyników* (122 strony), *Dyskusja* (17 stron), *Wnioski i stwierdzenia końcowe* (3 strony) oraz *Wykaz literatury* (16 stron). Uzupełnienie stanowi *Wykaz najważniejszych skrótów zastosowanych w pracy* oraz rozdział *Załączniki*, w którym na 43 stronach w formie graficznej i tabelarycznej (łącznie 79 obiektów) Autorka zamieściła wyniki badań nieuwjęte w zasadniczej części pracy.

Zdaniem recenzenta w pracy należało ponadto zamieścić spis tabel i rysunków, co ułatwiłoby czytelnikowi analizowanie obszernego tekstu rozprawy, zaś bardziej adekwatnym tytułem dla rozdziału *Schemat postępowania* jest powszechnie używany w pracach eksperymentalnych *Układ doświadczenia*.

Układ pracy jest logiczny i przejrzysty, a proporcje objętości poszczególnych rozdziałów właściwe. Dzięki temu praca, pomimo swej obszerności, jest spójna i czytelna. Przegląd piśmiennictwa oraz część doświadczenia Doktorantka podzieliła na podrozdziały, których kolejność i tytuły wynikają z logicznego podziału treści tych części pracy. Rozprawa została przygotowana z dużą starannością i wskazuje na doskonałą orientację Doktorantki w obszarze poruszanych zagadnień.

Ocena merytoryczna pracy

Tytuł rozprawy jest trafnie sformułowany i w pełni odzwierciedla zawarte w niej treści. Pracę rozpoczyna *Streszczenie* w języku polskim i angielskim oraz *Wprowadzenie*, które w zwięzły aczkolwiek treściwy sposób wprowadzają czytelnika w tematykę badawczą rozprawy i nakreślają jej cel. Zawarte w *Streszczeniu* podsumowanie najważniejszych wyników zachęca do głębszej analizy treści kolejnych rozdziałów.

Przegląd piśmiennictwa Autorka rozpoczęła od omówienia fizjologicznych podstaw percepcji smaku. Następnie scharakteryzowała wrażenia smakowe oraz rolę peptydów jako związków je kształtujących. Peptydom gorzkim, jako najliczniej reprezentowanym i najszerzej omówionym w literaturze, Doktorantka poświęciła odrębny rozdział w którym zaprezentowała przykłady sekwencji peptydów o potwierdzonym smaku gorzkim oraz aktualne kierunki badań nad tą grupą związków. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż rozważania te mają nie tylko charakter teoretyczny, Autorka odnosi je bowiem zarówno do możliwości wykorzystania peptydów jako naturalnych dodatków smakowych jak i substancji biologicznie aktywnych. W trakcie obrony rozprawy, proszę Doktorantkę o bardziej szczegółowe wyjaśnienie metod maskowania smaku gorzkiego uwarunkowanego obecnością peptydów gorzkich w żywności. Drugą część *Przeglądu piśmiennictwa* Autorka poświęciła charakterystyce bioinformatycznych baz danych i możliwości ich wykorzystania do symulacji proteolitycznego uwalniania biologicznie aktywnych peptydów z żywności. Najwięcej przykładów dotyczy możliwości wykorzystania bazy danych sekwencji bioaktywnych peptydów BIOPEP, z której Autorka korzystała w badaniach własnych. W ostatnim podrozdziale przeglądu literatury Doktorantka scharakteryzowała metody chemometryczne i chemoinformatyczne stosowane do poszukiwania zależności między strukturą związku chemicznego a jego przewidywaną aktywnością biologiczną. Stanowi on doskonałe wprowadzenie do części eksperymentalnej pracy, gdyż podane przykłady świadczą o różnorodności i rosnącej popularności tej grupy metod w badaniach nad peptydami i białkami żywności.

Reasumując, *Przegląd piśmiennictwa* został opracowany w oparciu o prace źródłowe ściśle związane z tematyką rozprawy i stanowi bardzo dobre uzasadnienie podjętego problemu naukowego. Treści w nim zawarte świadczą o znakomitym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do realizacji badań i wprowadzają czytelnika w zagadnienia związane z częścią eksperymentalną rozprawy.

Z obowiązku recenzenta wskazuje fragmenty *Przeglądu piśmiennictwa*, które wymagają korekty w oparciu o podane poniżej uwagi:

- cierpkość oraz ostrość/pikantność nie są zaliczane do smaków podstawowych (str. 14);

- teoria dotycząca odczuwania poszczególnych smaków przez różne obszary języka została uznana za błędną gdyż wszystkie typy wrażeń smakowych mogą, z różną intensywnością, powstać w wyniku działania bodźców na dowolny fragment języka, który zawiera kubki smakowe (str. 14);
- na Rysunku 2 należy zaznaczyć, iż sód jest jonem z sumarycznym ładunkiem dodatnim (str. 15);
- na stronie 22 znajduje się błędne odwołanie do Tabeli 3 (rozdział 4.2.3). W tabeli tej zawarte są bowiem zmienne zastosowane do przeprowadzenia analizy chemometrycznej peptydów gorzkich, a nie przykłady ich sekwencji.

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawiła cel główny pracy, którym było badanie 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*. Dla jego realizacji Autorka sformułowała siedem celów szczegółowych, z których pierwsze cztery obejmowały badania *in silico* peptydów przy użyciu wybranych programów komputerowych, a kolejne trzy dotyczyły weryfikacji uzyskanych wyników w układzie *in vitro*. Zarówno cel główny jak i cele szczegółowe pracy zostały jasno sformułowane, są ściśle związane z tytułem pracy i znajdują pełne uzasadnienie we wcześniej przedstawionym *Przeglądzie piśmiennictwa* co potwierdza ich adekwatność do aktualnego stanu wiedzy. Stanowią one również logiczną konsekwencję wcześniejszych prac realizowanych w Katedrze Biochemii Żywności UWM w Olsztynie. Zdaniem Recenzenta Autorka niepotrzebnie poprzedziła je jednostronicowym wstępem teoretycznym, gdyż treści w nim zawarte powinny znaleźć się we wcześniejszym rozdziale. W mojej ocenie w tej części rozprawy zabrakło natomiast hipotezy badawczej, jakkolwiek wynika ona z treści pracy jednak nie została sformułowana.

Układ doświadczenia zaplanowanego dla realizacji celu pracy Autorka przedstawiła w rozdziale trzecim w formie schematu obrazującego kolejne etapy postępowania. Schemat jest bardzo czytelny i ułatwia zrozumienie przebiegu poszczególnych analiz. Wymaga jedynie uzupełnienia o informację, iż dane na temat miar aktywności peptydów gorzkich zgromadzono również w oparciu o bazę danych BIOPEP (parametr R_{caf}), zaś do wyznaczenia zmiennych do tworzenia macierzy danych posłużono się również programem Custom Peptide.

Rozdział *Metodyka* Autorka rozpoczęła od charakterystyki materiału do badań *in vitro*, który stanowiły koncentraty białek mleka (TMP 80) i soi (Isomil F), oraz enzymów użytych do uzyskania hydrolizatów z wyżej wymienionych białek. Na kolejnych dziewiętnastu stronach Autorka w wyczerpujący i klarowny sposób opisuje zastosowane metody badawcze

w układzie *in silico* (podrozdział 4.2) i *in vitro* (podrozdział 4.3). Lektura tych podrozdziałów daje podstawę do stwierdzenia, iż metodyka pracy została właściwie dobrana i oparta na odpowiednich rekomendacjach literaturowych. Umożliwiło to kompleksowe podejście do podjętej problematyki badawczej oraz logiczną i konsekwentną realizację głównego i szczegółowych celów pracy. Zakres wykonanych analiz i ich różnorodność jest imponująca. Na szczególne podkreślenie zasługuje nowoczesność i oryginalność zastosowanych metod, co świadczy o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i umiejętnościach analitycznych Doktorantki w zakresie posługiwania się metodami analizy chemometrycznej i chromatograficznej. Drobnym uchybieniem w tej części pracy jest niezgodność opisu na stronie 44 z danymi zamieszczonymi w Tabeli 1.

W kolejnym rozdziale, na 122 stronach wzbogaconych 62 wykresami i 23 tabelami mgr inż. Monika Hrynkiewicz przedstawiła wyczerpujące omówienie oraz pełną dokumentację uzyskanych wyników. Rozdział *Omówienie wyników* został podzielony na podrozdziały korespondujące z opisem etapów badań w rozdziale *Metodyka*, co ułatwia analizę wyników uzyskanych w poszczególnych etapach doświadczenia i ich konfrontację z dyskusją przedstawioną w kolejnym rozdziale. Przyjęta przez Doktorantkę systematyka, tj. prezentacja wyników w postaci tabel i rysunków, ich omówienie oraz podsumowanie w danym podrozdziale znacznie ułatwia lekturę opisu ogromu uzyskanych wyników. Natomiast pewnym mankamentem tego rozdziału jest zamieszczenie w nim opisów procedur analitycznych. Opisy te są jak najbardziej interesujące i potrzebne ale powinny być zamieszczone w części metodycznej pracy. Lekturę tej części pracy utrudnia również zamieszczanie tabel i rysunków często dopiero na trzeciej z kolei stronie od zacytowania jej w tekście, co jest konsekwencją bardzo szerokiego zakresu badań i ilości uzyskanych wyników. Pomocny w tym zakresie byłby spis tabel i rysunków, o którym wspominałam w części dotyczącej oceny formalnej pracy.

Rezultaty uzyskane w pierwszym etapie badań (analiza *in silico*) pozwoliły Doktorantce na wskazanie głównych właściwości fizykochemicznych wpływających na smak gorzkich di-, tri- i tetrapeptydów. Analizując wyniki liniowej regresji wielorakiej za najbardziej miarodajne uznano te uzyskane dla modeli, w których miarę aktywności peptydów stanowił parametr R_{caf} . Ta metoda analizy chemometrycznej pozwoliła również na wytypowanie di-, tri- i tetrapeptydowych indykatorów smaku gorzkiego w liczbie odpowiednio 17, 12 oraz 7. Na podstawie profili potencjalnej aktywności sensorycznej i wartości wyróżnika A spośród 77 sekwencji białek żywności do hydrolizy *in silico* wytypowano białka mleka i soi. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę do przeprowadzenia hydrolizy *in vitro* tych białek i przeprowadzenia identyfikacji peptydów w próbkach hydrolizatów za pomocą chromatografii

cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Technika LC-MS zidentyfikowano łącznie 38 peptydów gorzkich, w tym 28 w próbkach hydrolizatów białek mleka, a 10 w próbkach hydrolizatów białek soi. Otrzymane wyniki zostały bardzo dobrze i ostrożnie zinterpretowane z uwzględnieniem stanowiska krytycznego wynikającego z pewnego rodzaju niedoskonałości skonstruowanych modeli liniowej regresji wielorakiej oraz ze stosunkowo niskiego stopnia porównywalności wyników uzyskanych metodami *in silico* i *in vitro*.

Dyskusja wyników zamieszczona w szóstym rozdziale pracy jest obszerna (17 stron) i merytorycznie wyczerpująca. Autorka poddaje krytycznej analizie wyniki badań własnych konfrontując je z danymi z literatury, co pozwala jej na uwypuklenie wielu spójności z wynikami badań innych autorów stosujących różne metody chemometryczne w badaniach zależności między strukturą peptydów a ich gorzkim smakiem. Na tym tle niekwestionowanym osiągnięciem, Autorki jest zastosowanie po raz pierwszy analizy składowych głównych do badania peptydów gorzkich pochodzących z białek żywności oraz wytypowanie na podstawie liniowej regresji wielorakiej modelowych peptydowych indykatorów smaku gorzkiego. Potwierdza to nowatorski charakter rozprawy i jej znaczący wkład w reprezentowaną dziedzinę nauki.

Autorka sformułowała dwanaście wniosków, których treść jest merytorycznie poprawna i wynika z przeprowadzonych badań, a zwięzły sposób ich opracowania pozwala na szybkie zapoznanie się z najważniejszymi rezultatami recenzowanej rozprawy. Wnioski stanowią podsumowanie naukowych i praktycznych osiągnięć rozprawy i wskazują, iż Autorka zrealizowała wyznaczony cel pracy.

Wykorzystana w pracy literatura obejmuje 203 pozycje bibliograficzne, z których zdecydowana większość (~85%) to oryginalne prace twórcze w języku angielskim, co wskazuje na jak obszernym materiałem literaturowym Doktorantka musiała się zapoznać. Trafny dobór publikacji potwierdza umiejętność posługiwania się piśmiennictwem związanym z tematem rozprawy. O aktualności podjętego problemu naukowego świadczy fakt, iż prace z ostatniej dekady stanowią ponad 65% cytowanych publikacji. *Wykaz literatury* zawiera również dwanaście prawidłowo zacytowanych (z podaniem całości adresu internetowego oraz daty dostępu) źródeł internetowych. Spis literatury został przygotowany starannie, bez istotnych uchybień.

Ocena formy językowej i technicznej strony opracowania

Edytorskie przygotowanie rozprawy jest właściwe, zarówno pod względem językowym, jak i w zakresie materiałów ilustracyjnych, czytelnych i dobrze opisanych legendami.

Świadczy to o bardzo dobrym opanowaniu przez Autorkę techniki redakcji tekstu naukowego. W kontekście przygotowania materiału do publikacji zwracam uwagę na brak konsekwencji w stosowaniu skrótów nazw aminokwasów. Autorka używa naprzemiennie kodu jedno- lub trzyliterowego.

Wniosek końcowy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego zależności pomiędzy strukturą peptydów pochodzących z białek żywności a ich gorzkim smakiem. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobry wybór tematu, zaproponowanie ambitnej koncepcji pracy w wyróżniająco zaplanowanej części metodologicznej i późniejsza bardzo rzetelna realizacja kolejnych etapów badawczych z wykorzystaniem zaawansowanych metod analitycznych. Na moją bardzo wysoką ocenę pracy wpłynęła również merytoryczna dyskusja i prawidłowe wnioskowanie. Przedłożona do recenzji rozprawa świadczy o znakomitym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowo-badawczej, obszernej wiedzy teoretycznej związanej z podjętym zagadnieniem oraz znajomości nowoczesnych metod analitycznych. Imponujący zakres przeprowadzonych przez Doktorantkę analiz i ich różnorodność oraz krytyczna analiza uzyskanych wyników dowodzą jej pracowitości i rzetelności badawczej. Przedstawione w rozprawie wyniki zintegrowanych badań w układzie *in silico/in vitro* dotyczące specyficznego składu i właściwości fizykochemicznych aminokwasów wchodzących w skład peptydów, jak również zastosowanych proteaz, powodujących generowanie sekwencji o smaku gorzkim poszerzają wiedzę dotyczącą peptydów jako składników żywności. Oprócz aspektu poznawczego uzyskane wyniki badań mogą mieć również istotne znaczenie dla ukierunkowania dalszych badań w tej dziedzinie z wykorzystaniem metod chemometrycznych. Nieliczne uwagi krytyczne nie umniejszają wartości poznawczej rozprawy, znaczenia podjętego problemu naukowego i sposobu jego realizacji.

Praca ma dużą wartość poznawczą w zakresie wpływu właściwości fizykochemicznych aminokwasów na gorzki smak di-, tri- i tetrapeptydów. Wpływ ten Autorka wykazała stosując po raz pierwszy analizę składowych głównych do badania peptydów gorzkich pochodzących z białek żywności. Wykorzystując kolejną metodę analizy chemometrycznej - liniową regresję wieloraką, wytypowała modelowe peptydowe indykatory smaku gorzkiego. Zawarte w pracy wyniki dotyczące wpływu doboru enzymu oraz substratu na generowanie sekwencji o smaku gorzkim mogą być bardzo pomocne w otrzymywaniu hydrolizatów białek roślinnych i zwierzęcych pozbawionych niepożądanego smaku.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową i potencjał aplikacyjny rozprawy oraz zawarte w niej elementy nowości naukowej dające perspektywę postępu w nauce o żywności i żywieniu, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Moniki Hrynkiewicz pt. „Peptydy o smaku gorzkim pochodzące z białek żywności - badania eksperymentalne w układzie *in silico* i *in vitro*” spełnia wymagania zawarte 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 z późn. zm.).

Stawiam zatem wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Hrynkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Stadnik