

Prof. dr hab. inż. Jacek Domagała
Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Kraków, 15.04.2019 r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Damira Mogut pt. „Ser typu Gouda o zmodyfikowanej zawartości kazeiny- β jako źródło peptydów odgrywających rolę w profilaktyce zespołu metabolicznego – badania *in silico* oraz *in vitro*” wykonanej w Katedrze Biochemii Żywności, Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Anny Iwaniak

Podstawa wykonania recenzji:

Pismo Dziekana Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie Nr WNoŻ-DZ.6350.83.2019 z dnia 26.02.2019 r.

1. Wybór tematu pracy

Pod pojęciem zespołu metabolicznego rozumie się szereg czynników ryzyka, które skojarzone ze sobą zwiększają prawdopodobieństwo zachorowania na cukrzycę typu 2, miażdżycę i chorobę niedokrwienną serca, ale mogą również doprowadzić do niealkoholowego stłuszczenia wątroby, niepłodności i wielu innych zaburzeń. Rozpowszechnienie zespołu metabolicznego wynika bezpośrednio ze współczesnego trybu życia i odżywiania. Nadmierna konsumpcja wysokoenergetycznych posiłków oraz niewielka aktywność fizyczna są jego główną przyczyną. Niepokojące jest, że kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego spełnia coraz więcej osób i to w coraz młodszym wieku. Sojusznikiem w działaniach wspomagających profilaktykę zespołu metabolicznego mogą być aktywne peptydy, których działanie związane jest z regulacją stężenia glukozy we krwi, ciśnienia tętniczego, równowagi pro- i antyoksydacyjnej oraz stężenia cholesterolu we krwi. Bogatym źródłem wielu bioaktywnych peptydów są białka mleka, a wśród nich kazeina- β jest uważana za potencjalnie najbogatsze ich źródło. Spośród produktów mleczarskich sery podpuszczkowe dojrzewające uważane są za bogate źródła biopeptydów.

W nawiązaniu do tego badania podjęte przez pana mgr inż. Damira Mogut, których obiektem był ser dojrzewający typu Gouda o zmodyfikowanej zawartości kazeiny- β jako źródło bioaktywnych peptydów uważam za bardzo ciekawe i w pełni uzasadnione, zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia, dające możliwość wykrycia i zidentyfikowania biologicznie aktywnych peptydów mogących mieć zastosowanie w profilaktyce zespołu metabolicznego.

2. Ocena formalnej strony pracy

Przedstawiona do recenzji praca zawiera 201 stron tekstu z czego 144 strony stanowi zasadniczy tekst pracy, zawierający 34 tabele i 24 rysunki, podzielony na następujące rozdziały: „Wstęp” (2 strony), „Przegląd piśmiennictwa” (26 stron), „Cel pracy” (1 strona), „Schemat doświadczenia i metodyka” (14 stron), „Omówienie wyników” (50 stron), „Dyskusja” (20 stron), „Wnioski” (2 strony), „Literatura” (14 stron) obejmująca 168 pozycji piśmiennictwa oraz „Załączniki”(53 strony) obejmujące 55 załączników w postaci tabel, chromatogramów i widm masowych. Praca zawiera ponadto spis treści, słowa kluczowe, wykaz ważniejszych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis rysunków i tabel. Układ pracy jest więc typowy dla przyrodniczych prac doświadczalnych, a proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami pracy są właściwe.

3. Ocena merytoryczna pracy

Głównym celem pracy była analiza sera typu Gouda o zmodyfikowanej zawartości kazeiny- β jako źródła peptydów odgrywających rolę w profilaktyce zespołu metabolicznego. Autor sformułował hipotezę badawczą zakładającą, że ser typu Gouda o zmodyfikowanej zawartości kazeiny- β , ze szczególnym uwzględnieniem zwiększonej zawartości tej frakcji będzie bogatym źródłem peptydów działających prewencyjnie względem chorób zespołu metabolicznego. Weryfikacji tej hipotezy Autor podjął się prowadząc tzw. badania zintegrowane, tzn. badania laboratoryjne *in vitro* poprzedził dogłębnymi badaniami *in silico* z wykorzystaniem metod bio- i chemoinformatycznych. Bardziej dokładnie badania podjęte przez Doktoranta podzielić można na 3 etapy: badania *in silico*, część technologiczna obejmująca wyprodukowanie serów modelowych o zróżnicowanej zawartości kazeiny- β oraz analizy *in vitro* obejmujące badania wyprodukowanych serów.

We wstępie oraz przeglądzie piśmiennictwa Autor przybliżył pojęcie zespołu metabolicznego, opisał krótko mechanizm działania inhibitorów dipeptydylopeptydazy IV, α -glukozydazy, α -amylazy, enzymu i inhibitora enzymu konwertującego angiotensynę oraz scharakteryzował peptydy pochodzące z białek żywności, wykazujące istotne aktywności, wspomagające profilaktykę zespołu metabolicznego, w tym będące inhibitorami w/w enzymów, a także wykazujące działanie przeciwutleniające oraz obniżające poziom cholesterolu we krwi. Rozdział ten zawiera także podstawowe informacje na temat sera typu Gouda oraz serów dojrzewających będących źródłem peptydów mających znaczenie w terapii chorób zespołu metabolicznego. Bardzo ciekawy jest rozdział traktujący o wykorzystaniu metod bioinformatycznych, chemometrycznych i chemoinformatycznych w badaniu składników

żywności, w tym bioaktywnych peptydów, z przywołaniem odpowiednich narzędzi informatycznych i metod stosowanych w tych badaniach. Informacje zawarte w tej części pracy świadczą o dobrym rozeznaniu Doktoranta w tematyce opisywanych zagadnień. Zaletą tej części pracy są też staranne rysunki poglądowe, będące własnymi opracowaniami Autora.

Cel główny pracy sformułowany jest jasno z wyszczególnieniem celów cząstkowych prowadzących do realizacji celu głównego. W nawiązaniu do celu pracy właściwie sformułowano też hipotezę badawczą.

Rozdział 4 zawiera schemat doświadczenia, a rozdział 5 opis zastosowanych metod badawczych w podziale na badania *in silico* oraz *in vitro*. Opis zastosowanych metod jest jasny. W pracy oprócz metod analizy bioinformatycznej i chemometrycznej, standardowych metod badania inhibicji enzymów oraz aktywności przeciwutleniającej, zastosowano nowoczesne metody badawcze jak wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z detektorem fotodiodowym oraz z analizatorem mas. Zakres zastosowanych w pracy analiz jest szeroki, a metody analityczne – adekwatne do realizacji postawionego celu. Oprócz analizy bioinformatycznej i chemometrycznej, szczególnie należy podkreślić oznaczenia służące identyfikacji peptydów w ekstraktach serów o zmodyfikowanej zawartości kazeiny- β . Do tej części pracy mam następujące pytania:

- jak należy interpretować pojęcie „tęgość” – jedną ze zmiennych wybranych do analizy chemometrycznej aminokwasów i dipeptydów;
- ile razy wyprodukowano sery modelowe, które następnie poddano badaniu?

Na podstawie analiz *in silico* Doktorant wykazał, że wszystkie analizowane sekwencje kazein (różnych frakcji i różnych wariantów genetycznych) są potencjalnym źródłem peptydowych inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę i dipeptydylopeptydazy IV oraz peptydów przeciwutleniających, przy czym kazeina- β była potencjalnie najbogatszym źródłem inhibitorów ACE oraz dipeptydylopeptydazy IV, a kazeina α_{s1} najlepszym źródłem peptydów przeciwutleniających. Frakcja ta okazała się też najlepszym źródłem dipeptydów wielofunkcyjnych, wykazujących hamujące działanie zarówno wobec ACE jak i DPP4. Za pomocą programu ProtParam obliczono skład aminokwasowy sekwencji kazein i wskazano dominujące aminokwasy N-końcowe i C-końcowe dla inhibitorów ACE, DPP4 i peptydów przeciwutleniających. Ze względu na fakt, że w literaturze znajduje się stosunkowo dużo publikacji na temat zależności struktury i funkcji inhibitorów ACE, natomiast brak jest takich prac w odniesieniu do inhibitorów DPP4 w dalszej części badań przeprowadzono analizę chemometryczną polegającą na wykazaniu zależności między strukturą a aktywnością dipeptydów o aktywności inhibitorów DPP4 oraz antyoksydacyjnych. Na podstawie analizy

składowych głównych oraz regresji wielorakiej Autor określił reszty aminokwasowe, które powinien zawierać „idealny” dipeptydowy inhibitor DPP4 oraz dipeptyd przeciwutleniający. Wytypowano też 14 dipeptydów o aktywności inhibitora DPP4 oraz 11 dipeptydów o aktywności przeciwutleniającej, którym nadano status wzorcowych, czyli takich które zidentyfikowane w serze typu Gouda mogłyby potencjalnie decydować o jego aktywności biologicznej. Dyskusja wyników tej części badań jest obszerna i przeprowadzona w sposób bardzo kompetentny. Autor zwraca w niej uwagę na zalety, wady i trudności prowadzenia badań *in silico* oraz *in vitro*. Uzasadnia też założenia prowadzonych analiz np. rezygnację z hydrolizy kazein *in silico* oraz pominięcie badań wpływu struktury na aktywność inhibitorową wobec ACE.

W wyniku badań *in vitro* Doktorant wykazał, że wodne ekstrakty peptydowe uzyskane ze wszystkich wariantów sera typu Gouda charakteryzowały się zdolnością inhibicji ACE oraz DPP4 oraz aktywnością przeciwutleniającą, natomiast żaden nie hamował aktywności α -glukozydazy. W tej części omówienia wyników Autor posługuje się jednak mało precyzyjnymi określeniami typu: „Zaobserwowano nieznaczny wzrost stopnia inhibicji...”, „...Nieznaczny spadek aktywności próbek...”, „nie ma większej różnicy w aktywności przeciwutleniającej...”. Z drugiej strony Doktorant stwierdza, że najwyższą aktywność hamowania ACE stwierdzono w próbkach sera Gouda o normatywnej zawartości kazeiny- β , a próbki sera o zwiększonej zawartości kazeiny- β wykazywały najwyższą aktywność względem hamowania DPP4 oraz największą aktywność przeciwutleniającą. Powstaje więc pytanie czy różnice wykazane i omówione w tej części pracy były statystycznie istotne? Czy przeprowadzono analizę istotności różnic? Wyniki pomiaru absorbancji przedstawiono tu podwójnie w postaci tabelarycznej i na wykresach. Pewien niedosyt pozostawia też dyskusja wyników uzyskanych w tej części pracy, która *de facto* jest powtórzeniem ich omówienia.

Bardzo wysoko oceniam tę część analiz *in vitro*, która była poświęcona identyfikacji peptydów w próbkach wodnych ekstraktów serów metodą HPLC-MS. Doktorant przeprowadził łącznie 1560 rozdziałów chromatograficznych, w pracy opisał natomiast kilka przykładów jednoznacznej i niejednoznacznej identyfikacji peptydów, jak również peptydu niezidentyfikowanego. W wyniku tych obszernych badań na 405 peptydów wytypowanych metodami *in silico* Doktorantowi udało się jednoznacznie zidentyfikować 146 peptydów, z czego 38 występowało we wszystkich wariantach sera typu Gouda. Z kolei 222 peptydy uzyskały status niejednoznacznie zidentyfikowanych, a 37 sekwencji nie zidentyfikowano w ogóle. Spośród jednoznacznie i niejednoznacznie zidentyfikowanych sekwencji wiele było peptydami wielofunkcyjnymi, wykazującymi równocześnie dwie lub trzy bioaktywności. W

nawiązaniu do tego rodzi się pytanie czy uzyskane wyniki identyfikacji mogą być wykorzystane lub czy zostały wykorzystane do uaktualnienia bazy danych bioaktywnych peptydów?

Każda z większych części omówienia wyników kończy się podsumowaniem uzyskanych w danej części badań rezultatów. Czyni to pracę bardziej przejrzystą i ułatwia znacznie przejście do analizy kolejnych wyników.

Praca zawiera 14 wniosków i stwierdzeń końcowych, które wynikają z uzyskanych rezultatów, a częściowo są ich powtórzeniem. Niektóre z nich mogłyby być – moim zdaniem - połączone ze sobą. I chociaż w końcowych wnioskach Autor przyznaje, iż na podstawie uzyskanych rezultatów nie można jednoznacznie stwierdzić, że ser typu Gouda o zwiększonej zawartości kazeiny- β jest lepszym źródłem peptydów wspomagających profilaktykę chorób zespołu metabolicznego niż sery o obniżonej oraz normalnej zawartości tej frakcji, to jednak wykazują one potencjał w przeciwdziałaniu schorzeniom zespołu metabolicznego. Co więcej Doktorant zdaje sobie sprawę z konieczności dalszych badań w tym zakresie i wyznacza kierunki tych badań.

Spis literatury zawiera 168 pozycji. Zdecydowaną większość stanowią pozycje anglojęzyczne, pochodzące z okresu ostatnich 15 lat. Literatura jest więc dobrze dobrana, a spis literatury przygotowany jest starannie. Autor nie ustrzegł się jednak pewnych błędów w jej cytowaniu. I tak 6 pozycji umieszczonych w spisie literatury (poz. 4, 24, 51, 115, 125 i 164) nie zostało zacytowanych w pracy. W tekście pracy znalazłem natomiast 3 pozycje literaturowe, które nie zostały uwzględnione w spisie literatury. Są to pozycje: Iwaniak i in., 2017 (str. 29), Dziuba i in., 2001 (str. 57) i Pissurlenkar i in., 2017 (str. 71). Być może wynikają one z pomyłonych lat publikacji.

Pod względem redakcyjnym pracy przygotowana jest starannie. Oprócz wskazanych błędów w cytowaniu literatury, w tekście pracy znajdują się tylko nieliczne błędy literowe. Pewnym potknięciem językowym jest natomiast nadużywanie przez Autora słowa „posiada”. Autor używa go np. w stosunku do cech sera: „ser posiada regularne, nieliczne oczka”, „ser posiada nieliczne okrągłe oczka”, „posiada on suchą skórkę” (str. 36), lub też „oktapeptyd posiadał w swojej strukturze...” (str. 61), „kazeina- α_{s1} posiada w swoim łańcuchu...” (str.62), „wyższą aktywność (...) posiadały próbki” (str. 92), itp. Według Słownika Poprawnej Polszczyzny zastosowanie słowa „posiada” jest niepoprawne i razi w odniesieniu do podmiotów nieżywotnych”.

Przedstawione uwagi krytyczne dotyczą zatem drobnych spraw i nie wpływają na całościową ocenę pracy, która jest wysoce pozytywna. Uważam iż pan mgr inż. Damir Mogut wykonał obszerne, dobrze zaplanowane, konsekwentnie zrealizowane i żmudne badania,

posługując się technikami bioinformatycznymi, chemometrycznymi, a także specjalistyczną aparaturą naukową i nowoczesnymi metodami badawczymi uzyskał wiele ciekawych i wartościowych pod względem naukowym wyników. Praca Kandydata wnosi nowe wartości i stanowi Jego oryginalny wkład w rozwój dyscypliny technologia żywności i żywienia. Osiągnięciem Doktoranta jest wykazanie, że ser dojrzewający typu Gouda, niezależnie od zawartości w nim kazeiny- β może stanowić potencjalne źródło bioaktywnych peptydów przeciwdziałających schorzeniom zespołu metabolicznego oraz jednoznaczne zidentyfikowanie peptydów w nim występujących o ściśle zdefiniowanych aktywnościach, w tym peptydów wielofunkcyjnych.

4. Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr inż. Damira Mogut pt. „Ser typu Gouda o zmodyfikowanej zawartości kazeiny- β jako źródło peptydów odgrywających rolę w profilaktyce zespołu metabolicznego – badania *in silico* oraz *in vitro*” jest oryginalnym opracowaniem naukowym spełniającym warunki określone w art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz U. 2003, Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). **Wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie pana mgr inż. Damira Mogut do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie mając na uwadze wysoki poziom naukowy rozprawy, zakres przeprowadzonych badań, zastosowane metody badawcze oraz uzyskane rezultaty składam wniosek o wyróżnienie pracy.

