

Prof. dr hab. Stanisław Mleko
Zakład Technologii Mleka i Hydrokoloidów
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 2 kwietnia 2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana 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 Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. Anny Iwaniak

Rozprawę przedstawiono w postaci nieopublikowanego wydruku komputerowego. Przegląd piśmiennictwa został zawarty na 27 stronach tekstu. Zawiera on większość zagadnień, które zostały poruszone w rozprawie. Uważam, że do wstępu i przeglądu literatury należało włączyć pierwszych 9 stron dyskusji. Zawierają one bowiem albo informacje, które należało podać we wstępie, albo jest to dość obszerne uzasadnienie zastosowanej metodyki pracy badawczej. Przegląd literatury zakończono sformułowaniem celu pracy. W tym miejscu Autor stwierdzając, że beta-kazeina jest potencjalnie najbogatszym źródłem peptydów o różnorodnych aktywnościach, powołuje się na pracę Iwaniak i Dziuby (2009). Jest to rozdział w monografii naukowej. W przypadku tej rozprawy naukowej jest to najważniejsza publikacja, która wskazuje na kierunek badawczy, dlatego należało powołać się na oryginalną pracę naukową. **Proszę Autora o podanie jaka to praca i jakimi metodami *in silico* zostało stwierdzone, iż to właśnie beta-kazeina jest potencjalnie najbogatszym źródłem peptydów o różnorodnych aktywnościach.**

W pracy podano, iż mleko do produkcji sera poddano procesom membranowym celem uzyskania sera: o zmniejszonej oraz zwiększonej zawartości beta-kazeiny. Wyprodukowano 3 rodzaje sera typu Gouda (o zmniejszonej, zwiększonej i normatywnej zawartości

beta-kazeiny). Z uwagi na fakt, że technologia modyfikacji mleka przeznaczonego do produkcji sera o zmodyfikowanej zawartości beta-kazeiny jest przedmiotem zgłoszenia patentowego, w rozprawie nie podano informacji na temat szczegółów dotyczących przygotowania surowca oraz zawartości beta-kazeiny w serze. **O ile w tej sytuacji niepodawanie szczegółów technologicznych jest w pełni zrozumiałe, to czy jednak nie należało podać zawartości kazeiny-beta w serze. Zawartość ta nie będzie przecież w żaden sposób sugerować potencjalnego procesu technologicznego. Proszę Autora o ustosunkowanie się do tego stwierdzenia.** Dodatkowo, w literaturze są znane metody modyfikacji zawartości różnych frakcji kazeinowych w mleku. Wydaje się, że w przeglądzie literatury należało o tym wspomnieć. Autor podaje tylko przykład wzbogacania mleka poprzez dodatek sproszkowanej beta-kazeiny. Tymczasem zagadnienie jest dość ważne, a poszczególne frakcje kazeiny cieszą się coraz większym zainteresowaniem ze względu na swoje wielofunkcyjne zastosowania. Różne frakcje kazeiny posiadają szeroki zakres właściwości bio- i techno-funkcjonalnych.

W literaturze światowej opisano różne metody izolacji i oczyszczania w celu uzyskania frakcji kazeiny, co nie wyklucza, iż stosowane metody nie wymagają ulepszeń, zwłaszcza w skali technicznej. Istnieją metody w których otrzymuje się różne frakcje kazeiny przy użyciu selektywnego strącania. Proces rozdzielania przeprowadza się w kontrolowanej temperaturze z użyciem wirówki dekantacyjnej. Otrzymuje się w ten sposób preparaty beta-kazeiny o czystości do 90%. Frakcjonowanie miceli kazeinowych z odtłuszczonego mleka przeprowadza się również metodą chromatografii na granulowanym szkle. Kilka metod wykorzystuje zjawisko mikrofiltracji. Metody te są oparte na zróżnicowanym udziale różnych frakcji kazeiny w zależności od wielkości miceli. Generalnie, wraz ze spadkiem wielkości miceli kazeinowych obserwuje się wzrost udziału frakcji beta-kazeiny. W małych micelach względna zawartość beta-kazeiny wynosi około

50%, a alfa-kazeiny około 33%. Wynika to prawdopodobnie z tego, iż beta-kazeina odgrywa szczególną rolę jako inicjator tworzenia miceli a alfa-kazeina stabilizuje większe struktury. Autor wspomniał o procesie patentowania, a więc można było też podać, iż znane są dwa patenty dotyczące pozyskiwania beta-kazeiny z odtłuszczonego mleka. Otrzymywanie beta-kazeiny z mleka przeprowadza się przez zastosowanie kontrolowanej mikrofiltracji: najpierw w temperaturze wyższej niż 20 °C, a następnie po ochłodzeniu retentatu do 0-15 °C przeprowadza się drugą mikrofiltrację. Dalsza filtracja i demineralizacja mikrofiltrowanego permeatu powoduje jeszcze większe wzbogacenie permeatu w beta-kazeinę. Ostatnio prowadzi się również ciekawe badania dotyczące kriokoncentracji mleka. Kriokoncentrowane odtłuszczone mleko otrzymane po trzech cyklach kriokoncentracji charakteryzowało się monomodalnym rozkładem miceli z tendencją do mniejszych miceli kazeiny. Około 60% całkowitej objętości micelarnej zajmowały micide kazeiny o wielkości 100–200 nm, mniej niż 18% objętości o wielkości 50–100 nm i tylko mniej niż 1% zajmowały micide z rozmiarem większym niż 350 nm. Kriokoncentracja zmienia rozkład średniej wielkości miceli na mniejsze jednostki. Do tej pory nie przeprowadzono badań, jak taka kriokoncentracja wpływa na udziały poszczególnych frakcji kazeinowych i czy zależność pomiędzy zawartością beta-kazeiny i wielkością miceli zostaje przy tym zachowana.

Na szczególną uwagę zasługuje w pracy zaproponowana metodyka badań będąca tzw. badaniami zintegrowanymi. Obejmuje ona połączone badania *in silico* oraz weryfikację uzyskanych wyników *in vitro*. W ramach badań *in silico* zastosowano analizy bio- oraz chemoinformatyczne przeznaczone do oceny sekwencji poszczególnych frakcji kazein, ze szczególnym uwzględnieniem beta-kazeiny jako potencjalnego źródła peptydów działających prewencyjnie w profilaktyce syndromu metabolicznego. Następnie zbadano zależności między strukturą a aktywnością dipeptydów - inhibitorów dipeptydylopeptydazy

IV oraz antyoksydacyjnych. Etap *in vitro* polegał na pozyskaniu wodnych ekstraktów peptydowych z trzech rodzajów sera Gouda (o normatywnej, zmniejszonej i zwiększonej zawartości kazeiny- β): po 1-szym oraz 60-tym dniu dojrzewania i oznaczeniu ich bioaktywności szeregu enzymów. Dokonano identyfikacji peptydów w próbkach wodnych ekstraktów peptydowych sera, bazując na uzyskanych wcześniej wynikach badań *in silico*. W ramach badań *in vitro* uzyskano łącznie 6 układów doświadczalnych. Takie podejście do metodyki badań należy uznać za nowoczesne i stosunkowo rzadko spotykane w rozprawach doktorskich. Autor bardzo sprawnie stosuje różnorodne metody informatyczne oraz statystyczne. Na szczególną uwagę zasługuje analiza głównych składowych oraz regresja wieloraka. W badaniach *in vitro* bardzo skrupulatnie został przeprowadzony rozdział chromatograficzny próbek wodnych ekstraktów peptydowych sera o zmodyfikowanej zawartości beta-kazeiny. Najintensywniejsze zmiany w profilu peptydowym wodnych ekstraktów analizowanych próbek zaobserwowano dla sera o zwiększonej zawartości beta-kazeiny. Bardzo ciekawe były badania polegające na identyfikacji peptydów w próbkach wodnych ekstraktów peptydowych sera za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Rezultatem tych badań było przeprowadzenie łącznie 1560 rozdziałów chromatograficznych. W pracy omówiono kilka przykładów identyfikacji peptydów w analizowanych próbkach. Dla każdego identyfikowanego peptydu obliczano jego masę cząsteczkową, masę peptydu zjonizowanego oraz jonów potomnych. Identyfikacja polegała na odnajdywaniu charakterystycznych jonów potomnych dla poszczególnych jonów prekursorowych.

W najważniejszym wniosku ze swojej pracy Autor stwierdził, iż analiza identyfikacyjna peptydów oraz pomiary aktywności biologicznej wodnych ekstraktów peptydowych, nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie, że ser Gouda o zwiększonej zawartości beta-kazeiny jest lepszym źródłem peptydów wspomagających profilaktykę

chorób syndromu metabolicznego, niż sery o obniżonej oraz normatywnej zawartości wyżej wymienionej frakcji białkowej. Autor wskazał następnie kierunek dalszych badań naukowych obejmujących symulację procesów hydrolizy sera za pomocą enzymów trawiennych oraz ocenę bioaktywności powstałych hydrolizatów. Autor mógł również dodać, iż wstępne wyniki badań różnych naukowców sugerują, iż różne warianty genetyczne beta-kazeiny charakteryzują się zróżnicowanym poziomem różnych bioaktywnych peptydów podczas trawienia.

Generalnie zaprezentowane w rozprawie podejście Autora do badanego zagadnienia wskazuje na dojrzałość naukową Autora, który przedstawiając rzetelnie wyniki swoich badań, które niekoniecznie udowadniają hipotezę badawczą, równocześnie wskazuje na dalsze możliwości pogłębiania swoich badań. Autor wykazał się w swojej pracy biegłą znajomością szeregu dość skomplikowanych metod analitycznych *in silico* i *in vitro*. Otrzymanie przedstawionych wyników wymagało dużego nakładu pracy. Przedstawione one zostały i omówione w rozprawie w sposób rzetelny i profesjonalny, co również świadczy o dużej dojrzałości naukowej Autora.

Zaprezentowana rozprawa doktorska z jednej strony wzbogaciła stan naszej wiedzy na temat ważnego zagadnienia biologicznie aktywnych peptydów, a z drugiej przygotowała Autora do dalszej pracy naukowej. Dogłębne poznanie tematyki badawczej oraz solidnie przeprowadzone badania naukowe przy dużym zróżnicowaniu warsztatu laboratoryjnego, jak najbardziej klasyfikują przedstawioną do recenzji pracę jako rozprawę na stopień doktora. Tak więc przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowiąc rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego oraz wykazując ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata, jak również umiejętność prowadzenia pracy naukowej, spełnia tym samym wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13. p.1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.

U. Nr 65, poz. 595). Wnoszę zatem o dopuszczenie Pana mgr. inż. Damira Mogut do dalszych etapów publicznej obrony tej swojej pracy. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie Jego rozprawy doktorskiej nagrodą Jego Magnificencji Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Kierownik Zakładu
Prof. dr hab. Stanisław Mleko
Stanisław Mleko