

Olsztyn, dnia 9 listopada 2018

dr hab. inż. Anna Iwaniak, prof. UWM  
Katedra Biochemii Żywności  
Wydział Nauki o Żywności  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
ul. Pl. Cieszyński 1  
10-726 Olsztyn

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

pt.: „*Białka polędwicy wieprzowej surowo dojrzewającej jako potencjalne źródło bioaktywnych peptydów - badania in silico i in vitro*” wykonanej przez mgr inż. Paulinę Kęskę w Katedrze Technologii Surowców Pochodzenia Zwierzęcego, Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem:  
dr hab. inż. Joanny Stadnik, prof. UP (promotora)

**Podstawa prawna:** pismo Pani prof. dr hab. Izabelli Jackowskiej (VDz. 534/os/18-19 z dnia 17 października 2018 roku) - Dziekan Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, w którym zwraca się do mnie z prośbą o wykonanie recenzji dysertacji na podstawie uchwały Rady Wydziału podjętej w dniu 21 grudnia 2016 roku.

### **Uzasadnienie podjęcia tematu**

Mięso różnych gatunków zwierząt jest źródłem wartościowego białka, a wędliny od wieków były obecne na polskich stołach, stanowiąc specjał kuchni staropolskiej, mieszczańskiej i ludowej. Według danych z roku 2016, w Polsce około 43 % przypada na spożycie mięsa oraz jego produktów w diecie i jest to jeden z najwyższych wskaźników na świecie. Biorąc pod uwagę tak znaczący udział mięsa oraz jego produktów w diecie Polaków, coraz lepszą sytuację ekonomiczną społeczeństwa, celowym wydaje się analiza potencjału białek mięsa w kontekście poszukiwania związków bioaktywnych (np. peptydów) działających prewencyjnie względem chorób dietozależnych. Odzwierciedlają to także badania prowadzone na całym świecie wykazujące, że białka pochodzenia zwierzęcego, w tym mięsa i ryb, są źródłem peptydów o udokumentowanej w układach *in vitro* oraz *in vivo* aktywności biologicznej.

Obecnie sporo uwagi poświęca się produktom regionalnym. Trend ten obserwowany jest na świecie oraz w Polsce. Przykładowo w Europie do produktów regionalnych jest zaliczana surowa szynka hiszpańska. Badania na temat białkowych ekstraktów ww. produktu wykazały, że one zawierały krótkołańcuchowe peptydy, które podawane doustnie szczerom

obciążonym nadciśnieniem tętniczym powodowały jego spadek. W Polsce surowe wędliny dojrzewające, zwłaszcza produkowane z mięsa wieprzowego stanowią ważny segment żywności regionalnej, szczególnie Podlasia i Suwalszczyzny, które ze względu na sąsiedztwo m. in. Litwy, czy Białorusi korzystały z wpływów wielokulturowych „dopracowując” receptury. Zatem badania prowadzone przez Panią mgr inż. Paulinę Kęskę dotyczące: 1) potencjału białek surowo dojrzewającej polędwicy jako źródła biopeptydów oraz 2) kształtowania potencjału ww. białek do generowania peptydowych inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę (ACE; EC 3.4.15.1) oraz peptydów przeciwutleniających poprzez zastosowanie różnych probiotycznych szczepów bakterii kwasu mlekowego jako kultur starterowych, wpisują się w kierunek poszukiwania żywności wysokiej jakości, minimalnie przetworzonej oraz wywierającej pozytywny efekt fizjologiczny. Postawiona zatem przez mgr inż. Paulinę Kęskę hipoteza badawcza oraz uzyskane wyniki mają charakter popularyzujący połączone działania naukowców w obszarze „*food, nutrition, and health*”.

### **Ocena formalna pracy**

W skład rozprawy doktorskiej pod spójnym tytułem „*Białka polędwicy wieprzowej surowo dojrzewającej jako potencjalne źródło bioaktywnych peptydów - badania in silico i in vitro*” wchodzi 5 opracowań w formie: **jednego przeglądu** opublikowanego w *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* (lista B MNiSW, nr **I**: przegląd; 2015, 14(3), 181-190) oraz **czterech oryginalnych** artykułów opublikowanych w czasopismach z listy A MNiSW (nr **II**: *Journal of Sensory Studies*, 32(6), 1-9, 2017; nr **III**: *Food&Function*, 7(6), 2878-2885, 2016; nr **IV**: *Nutrients*, 10(4), 1-15, 2018; nr **V**: *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, doi:10.107s10989-018-9765-y, 2018). Prace te zostały opublikowane w latach 2015-2018. Na dzień składania dysertacji do recenzji, sumaryczny współczynnik wpływu (impact factor; IF) ww. prac wynosił 10,328, łączna liczba punktów 125, zaś cytowań 23 (wg Web of Science). Pełne teksty publikacji stanowiących rozprawę doktorską wraz z oświadczeniami współautorek (tj. Doktoranki i Promotora pracy) są zamieszczone do dodatkowego opracowania w formie komputeropisu, będącego autorskim komentarzem wprowadzającym w problematykę pracy doktorskiej. Opracowanie to liczy 54 strony i składa się z następujących części: wstępu, wprowadzenia, hipotezy badawczej i celu pracy, opisu metodycznego, opisu wyników, półstronicowego podsumowania z wnioskami (łącznie 4), wykazu piśmiennictwa (łącznie 84 pozycji, w tym 4 o zasięgu krajowym), spisu tabel i rysunków oraz streszczenia w języku polskim oraz angielskim. Układ opracowania jest logiczny i typowy dla tego rodzaju prac.

W pracach nr **II-V** stanowiących rozprawę doktorską, mgr inż. Paulina Kęska była pierwszą autorką. Wyjątek stanowiła praca nr **I**, będąca przeglądem na temat bioaktywnych

peptydów występujących białkach mięsa oraz wyrobach mięsnych. Wszystkie publikacje to prace dwóch autorów (Doktorantki i Promotora, będącego autorem korespondencyjnym wszystkich prac), w których udział Pani mgr inż. Pauliny Kęski wyrażony procentowo wynosił od 60 do 80% i dotyczył: wykonania eksperymentów, analizy, opracowania, interpretacji wyników oraz przygotowania manuskryptu według wytycznych wydawnictw. Wymienione czynności świadczą o przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowej, ale także o umiejętnościach ścisłej współpracy z promotorem.

### **Ocena merytoryczna pracy**

Znaczną część rozprawy doktorskiej (tj. 4 na 5 publikacji) opublikowano w recenzowanych czasopismach wyszczególnionych na liście A MNiSW oraz Journal Citation Reports. Zatem trudno doszukiwać się w analizowanych artykułach znaczących uchybień i niedoskonałości. Ponadto, jak na dość krótki okres od ukazania się publikacji w obiegu, niektóre z nich mają dość wysoką liczbę cytowań (np. publikacja nr **I**; *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 18 cytowań na 23 ogółem), świadcząca o zainteresowaniu naukowców wymienioną problematyką.

Publikacja oznaczona jako nr **I** to przegląd stanu wiedzy na temat białek mięsa i wyrobów mięsnych jako źródła peptydów biologicznie aktywnych. Praca ta w szczegółowy sposób wprowadza czytelnika w temat, jak również uzasadnia zainteresowanie Doktorantki białkami mięsa (zwłaszcza wieprzowego) w dalszej pracy eksperymentalnej.

Prace **II-V** są publikacjami oryginalnymi. Ich metodyka nie budzi większych zastrzeżeń, jest starannie przemyślana oraz właściwie dobrana, bazując na odpowiedniej literaturze. Pewnym uchybieniem jest niedoprecyzowanie związane z nazewnictwem, wyróżnika A oraz interpretacji uzyskanych wyników (publikacja nr **V**). Wyróżnik „A” to częstość występowania fragmentów o danej aktywności biologicznej w sekwencji białka. Jest on zdefiniowany wzorem i jego wartość (z pewnymi wyjątkami) powinna mieścić się w przedziale 0-1. Doktorantka w pracy nr **V** uzyskała wyniki A powyżej jedności. Jednocześnie, omawiając wyniki, parametr A zdefiniowała jako cyt: „...*abundance of ACE inhibitory fragments (based on A parameter)*...” (praca nr **V**, strona 6). W metodyce natomiast pojawia się informacja, że dokonano obliczenia częstości występowania bioaktywnych fragmentów w sekwencji konkretnego białka (A). Chciałabym, by Autorka dysertacji wyjaśniła, na jakiej podstawie uzyskała wyniki obliczeń zastosowanego wyróżnika powyżej jedności. Jeżeli Doktorantka bazowała na matematycznych podstawach obliczenia wyróżnika A do zaproponowania „swojego” (czyt. „nowego”) parametru, powinna użyć innej nazwy oraz innej symboliki. Pozwoliłoby to na odróżnienie wprowadzonego parametru/wyróżnika od powszechnie znanych i publikowanych wcześniej przez innych autorów. Takie odróżnienie

parametrów matematycznych pojawiło się w pracy nr I, gdzie zastosowany wyróżnik oznaczono symbolem  $A_R$  (cyt. „*relative abundance of taste-active peptides/amino acids in a protein sequence*”) i podano jego opis matematyczny (równanie).

Analizując publikacje stanowiące dysertację Pani mgr inż. Pauliny Kęski, nie znalazłam większych uchybień. W pracach dotyczących badań *in silico* sekwencji białek mięsa wieprzowego jako źródła bioaktywnych peptydów stwierdzono, że mogą być one potencjalnym prekursorem m. in. inhibitorów dipeptydylopeptydazy IV, peptydów przeciwkrzepliwych, immunomodulacyjnych etc. (Tabela 2, praca nr III) czy smakowych (Tabela 2, praca nr II). Chciałabym, by Autorka dysertacji wyjaśniła ewentualne dodatkowe przyczyny (poza ekonomicznymi), dla których dalszą część eksperymentu (tj. badania *in vitro*) poświęciła peptydowym inhibitorom ACE i peptydom antyoksydacyjnym.

Kilka uchybień znalazłam w polskojęzycznym komentarzu przedstawiającym wyniki i osiągnięcia, będące podstawą do ubiegania się przez mgr inż. Paulinę Kęskę o stopień doktora nauk rolniczych. Jednym z nich ich zamienne używanie pojęć „cząstka” i „cząsteczka” w odniesieniu do białek. Wprawdzie „cząstka” jest pojęciem ogólniejszym, w którym niejako „zawiera się” termin „cząsteczka”, niemniej przyjęto, że jako cząstkę definiujemy „atom, jon, rodnik, cząstkę elementarną” (wg Słownika Chemicznego). W opracowanym komentarzu zamiennie pojawia się nazwa parametru A definiowana jako „częstość” oraz „częstotliwość” występowania bioaktywnych fragmentów w sekwencji białka. W polskojęzycznych publikacjach, w których ww. parametr stosowano, używano nazwy „częstość występowania bioaktywnych fragmentów w sekwencji białka”. Znalazłam również kilka sformułowań niefortunnie użytych przez Doktorantkę. Przykładowo „*określono łącznie 25 różnych aktywności biologicznych peptydów...*” (strona 23), co może sugerować eksperymentalną analizę bioaktywności peptydów. Na stronie 24 pojawia się zdanie: „*Lepsza wiedza na temat stężenia bioaktywnych peptydów...*”. W moim odczuciu Doktorantka miała na myśli obecność peptydów w produktach, gdyż nie oznaczała ich stężeń. Przypuszczam także, że przygotowując próbki hydrolizatów do badania ich aktywności biologicznej, Doktorantka starała się uzyskać stężenie 1 mg hydrolizatu/1ml, a nie konkretnego peptydu. Ponadto w opracowaniu pojawia się często sformułowanie „zawartość peptydów” w sekwencjach białek, co sugeruje „analityczne” oznaczanie poziomu peptydów w próbce. Przypuszczam, że Doktorantka miała na myśli obecność zidentyfikowanych peptydów w sekwencjach białek wyrażoną ich liczebnością przed oraz po hydrolizie. W pracy znajdują się sformułowania żargonowe (przykład: „*miejsce cięcia*”), a ponadto brakuje konsekwencji w numeracji niektórych rysunków (następujący po rysunku nr 9 jest opatrzony numerem 8-ym). W streszczeniach w obu językach są podane wnioski i stwierdzenia końcowe, co uważam za

zbędne powtórzenie zawartości rozdziału 6-go. W wielu miejscach opracowania, będącego opisem wyników zawartych w publikacjach, stanowiących dysertację, występuje sformułowanie „*inhibitować, inhibituje* itd.”. Jest ono dosłownym tłumaczeniem tego słowa z języka angielskiego. Wprawdzie wyrażenie „*inhibitować*” pojawia się w pracach polskojęzycznych, to prościej byłoby stosować wyrażenie „*inhibować*”, „*zmniejszać aktywność*”, czy „*hamować*”. Ponadto, w opracowaniu znalazłam błędy edytorskie, głównie tzw. „literówki” (dotyczy to zwłaszcza wykazu literatury).

Wskazane przeze mnie uwagi oraz komentarze nie umniejszają wysokiej wartości naukowej dysertacji. Przypuszczam, że badania w obszarze białek zwierzęcych jako źródła bioaktywnych peptydów będą przez Doktorantkę kontynuowane i moje sugestie mogą być przydatne w opracowaniu kolejnych artykułów.

Badania prowadzone przez mgr inż. Paulinę Kęskę charakteryzują się wielostronnym podejściem do analizowanego zagadnienia. Wynika ono z: 1) postępu wiedzy na temat peptydów bioaktywnych pochodzących z żywności, 2) rozwoju metod badawczych o zastosowanie m. in. narzędzi analizy bioinformatycznej (*in silico*). Obecnie techniki oraz metody *in silico* stanowią integralne narzędzie badawcze, które w połączeniu z metodami analitycznymi mogą być stosowane m. in. w badaniach dotyczących peptydów bioaktywnych pozyskiwanych z białek mięsa. Doktorantka jest jedną z nielicznych osób w kraju i prawdopodobnie na świecie, która stosuje metody bioinformatyczne w analizie sekwencji białek mięsa. Dotychczas na świecie opublikowano niewiele prac *stricte in silico* na temat biopeptydów pochodzących z mięsa.

Na szczególną uwagę zasługuje szeroki przekrój badań prowadzony przez Doktorantkę, obejmujący ocenę potencjału białek mięsa wieprzowego jako źródła biopeptydów, przewidywanie możliwości uwalniania biopeptydów z białek, weryfikację badań bioinformatycznych z zastosowaniem symulowanego trawienia i wchłaniania *in vitro*, ocenę potencjału polędwic wieprzowych jako źródła peptydów poprzez poddanie wyrobów mięsnych różnym okresom dojrzewania i dodatkowi różnych preparatów kultur bakteryjnych. Autorka pracy wykazała m. in., że: a) najlepsze wyniki dotyczące obecności peptydów bioaktywnych uzyskała po 6-miesięcznym okresie dojrzewania; b) zależnie od zastosowanego enzymu w hydrolizatach przeważają inhibitory ACE (hydrolizat pepsynowy) lub peptydy antyoksydacyjne (hydrolizat pankreatynowy); c) w celu uzyskania surowo dojrzewającej polędwicy wieprzowej o jak najefektywniejszym potencjale wynikającym z obecności peptydów bioaktywnych, zaleca się stosowanie szczepu *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł08938. Dwa ostatnie wnioski, ze względu na aspekt praktyczny, uznaję za szczególnie istotne w projektowaniu żywności o ukierunkowanym działaniu.

## Podsumowanie

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu dotyczącego charakterystyki wieprzowej polędwicy surowo dojrzewającej jako źródła peptydów o wybranej aktywności biologicznej. Na podstawie dysertacji wyrażam pogląd, że Doktorantka jest osobą przygotowaną do prowadzenia badań, dysponuje wieloaspektową wiedzą w obszarze przedstawianego zagadnienia oraz umie w jasny sposób prezentować wyniki swoich obserwacji oraz formułować wnioski. Ponadto, Pani mgr inż. Paulina Kęska wykazała się umiejętnością analitycznego oraz krytycznego podejścia do swoich wyników w odniesieniu do prac innych autorów.

Wysoki poziom naukowy pracy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Kęski stał się przesłanką, skłaniającą mnie do zadania Jej następujących pytań:

*Czy wśród peptydów zidentyfikowanych w białkowych hydrolizatach surowo dojrzewającej polędwicy wieprzowej znajdowały się peptydy wielofunkcyjne - jakie?*

*Jak ocenia Pani poziom zgodności wyników badań *in silico* oraz *in vitro*?*

*Jaka jest Pani opinia na temat zalet i wad stosowania tzw. zintegrowanego podejścia badawczego?*

### Ocena kwalifikacyjna i wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Kęski pt.: „*Białka polędwicy wieprzowej surowo dojrzewającej jako potencjalne źródło bioaktywnych peptydów - badania *in silico* i *in vitro**” spełnia wymagania zawarte w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. W związku z powyższym, zwracam się do Pani Dziekan oraz Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Pauliny Kęski do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem nadania Jej stopnia doktora nauk rolniczych.

Biorąc pod uwagę oryginalność rozwiązania problemu oraz popularyzację procedur *in silico:in vitro* w badaniach białek mięsa wieprzowego jako źródła biopeptydów wyrażone wysokim poziomem merytorycznym prac opublikowanych w czasopiśmie o wysokiej randze naukowej, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Anna Twaniak