

dr hab. Bożena Danyłuk
Katedra Technologii Mięsa
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 16 listopada 2018 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Kęski

**p.t.: „Białka polędwicy wieprzowej surowo dojrzewającej jako potencjalne źródło
bioaktywnych peptydów – badania *in silico* i *in vitro*”**

zrealizowanej pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Joanny Stadnik, prof. UP
w Katedrze Technologii Surowców Pochodzenia Zwierzęcego,
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzję wykonano na podstawie pisma Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii, prof. dr hab. Izabelli Jackowskiej, z dnia 17 października 2018 r., zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 21 grudnia 2016 roku.

Uwagi wstępne

Mięso należy do cennych artykułów żywnościowych, głównie z uwagi na zawartość pełnowartościowego białka. Pomimo popularności diet bezmięsnych spożycie mięsa w Polsce utrzymuje się na względnie stabilnym poziomie (wg danych GUS – 5,57 kg mięsa/osobę/miesiąc w 2010 r. i 5,32 kg mięsa/osobę/miesiąc w 2016 r.), przy czym najpopularniejszym rodzajem mięsa jest wieprzowina. Do poszukiwanych i wysoko cenionych wyrobów mięsnych zalicza się produkty fermentowane. Są one postrzegane jako żywność naturalna, w której składniki surowcowe podlegają w procesie technologicznym niewielkim zmianom a gwarancją wysokiej jakości sensorycznej podczas długiego okresu

przechowywania jest m. in. dodatek kultur startowych. Żywe mikroorganizmy i produkty ich przemiany materii przedostają się do organizmu człowieka, wspomagając jego prawidłowe funkcjonowanie. Szczególne znaczenie wśród drobnoustrojów celowo wprowadzanych do żywności mają bakterie probiotyczne. Zastosowanie ich w procesie technologicznym pozwala na zwiększenie wartości prozdrowotnej produktów mięsnych, ze względu na korzystny wpływ na organizm człowieka jak też właściwości proteolityczne, przyczyniające się do uwalniania fragmentów biologicznie aktywnych. Bioaktywne peptydy mogą regulować procesy fizjologiczne ustroju, w tym wszystkich układów organizmu (hormonalnego, immunologicznego, krążenia, nerwowego czy pokarmowego). Znanych jest wiele mikroorganizmów produkujących kwas mlekowy na drodze fermentacji cukrów, ale stosunkowo nieliczne gatunki można zaliczyć do probiotycznych. W produkcji surowych wyrobów dojrzewających drobnoustroje muszą być tak dobrane, aby kształtowały akceptowalne przez konsumentów właściwości organoleptyczne.

Coraz większe wymagania współczesnych konsumentów wymuszają, zarówno na producentach jak i pracownikach naukowych, prowadzenie prac ukierunkowanych na ciągłe polepszanie jakości gotowego wyrobu. Stąd też badania podjęte przez mgr inż. Paulinę Kęskę, których celem było określenie potencjału białek surowej polędwicy wieprzowej dojrzewającej jako prekursorów biologicznie aktywnych peptydów uważam za uzasadnione i wartościowe, tym bardziej że w przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano szczepy probiotyczne i potencjalnie probiotyczne. Uzyskane wyniki mogą być wykorzystane w praktyce.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Pauliny Kęski pt.: „Białka polędwicy wieprzowej surowo dojrzewającej jako potencjalne źródło bioaktywnych peptydów – badania *in silico* i *in vitro*” jest spójnym tematycznie zbiorem pięciu publikacji naukowych, które ukazały się drukiem w latach 2015 – 2018 w następujących czasopismach:

- Acta Scieniarum Polonorum Technologia Alimentaria (IF=0)
- Journal of Sensory Studies (IF=1,753)
- Food & Function (IF=3,247)
- Nutrients (IF=4,196)
- International Journal of Peptide Research and Therapeutics (IF=1,132)

Według punktacji czasopism MNiSW Pani mgr inż. Paulina Kęska za wyodrębniony jako jednotematyczny cykl publikacji uzyskała 125 punktów, łączny *impact factor* wymienionych

publikacji wynosi 10,328 (dane dotyczą roku opublikowania). Wszystkie prace opublikowano w języku angielskim. Pierwsza z nich stanowi przegląd dotychczasowego stanu wiedzy w zakresie biologicznie aktywnych peptydów, których źródło stanowi mięso i surowe wyroby mięsne dojrzewające, natomiast pozostałe cztery przedstawiają wyniki badań. Z wyjątkiem artykułu przeglądowego Doktorantka jest pierwszym autorem. Pani mgr inż. Paulina Kęska dołączyła wymagane oświadczenia, potwierdzające Jej znaczący indywidualny wkład (60-80%), polegający na zebraniu literatury, współudziale w tworzeniu koncepcji pracy, wykonywaniu doświadczeń, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu.

Praca doktorska mgr inż. Pauliny Kęski składa się ze 118 numerowanych stron, obejmujących wykaz 84 źródłowych materiałów bibliograficznych, 3 tabele i 10 rysunków. Praca zawiera stronę tytułową, podziękowania, spis treści oraz rozdziały: 1. *Wstęp* (1 strona), 2. *Wprowadzenie* (13 stron), 3. *Hipoteza badawcza i cel pracy* (1 strona), 4. *Materiał i metody badawcze* (2 strony), 5. *Opis wyników i osiągnięć badawczych* (16 stron), 6. *Podsumowanie i wnioski* (1 strona), 7. *Literatura* (8 stron), 8. *Spis tabel i rysunków* (1 strona), 9. *Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej* (1 strona), 10. *Streszczenie* (5 stron), 11. *Summary* (5 stron). Na dalszych stronach znajdują się publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, oświadczenia współautora publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, zestawienie dorobku naukowego. Od strony formalnej praca nie budzi zastrzeżeń.

Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi zbiór pięciu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Pierwszy z nich, p.t.: „Meat and fermented meat products as a source of bioactive peptides” ukazał się w *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* (IF=0, 15 pkt wg punktacji czasopism MNiSW). Jest to praca przeglądowa, której celem było zebranie i przedstawienie informacji naukowych na temat peptydów pochodzących z białek mięsa o aktywności przeciwtleniającej oraz inhibitujących działanie konwertazy angiotensyny. Rozważano także możliwości wykorzystania biologicznie aktywnych peptydów oraz mikroorganizmów probiotycznych w produkcji surowych wyrobów mięsnych dojrzewających, o charakterze żywności funkcjonalnej, z jednoczesnym uwzględnieniem cech sensorycznych gotowego wyrobu. Jak podkreśla Doktorantka usystematyzowanie wiedzy z tego zakresu pozwoliło na zaplanowanie badań metodą *in silico* i *in vitro*.

Drugi artykuł p.t.: „Taste-active peptides and amino acids of pork meat as components of dry-cured meat products: An *in-silico* study” opublikowano w Journal of Sensory Studies (IF=1,753; 30 pkt wg punktacji czasopism MNiSW). W pracy przedstawiono możliwość określenia typu i właściwości peptydów, pochodzących z białek mięsa wieprzowego, uwzględniając wpływ przemian proteolitycznych na cechy sensoryczne wyrobu. Do przeprowadzenia analiz *in silico* wykorzystano bazy danych BIOPEP-UWM. Doktorantka zwróciła uwagę, że proces hydrolizy, prowadzący do powstawania bioaktywnych peptydów ma bardzo duże znaczenie we wzmacnianiu odczucia smaku umami, kwaśnego i gorzkiego (ocenianego jako niepożądany). Wśród białek mięsa największym potencjałem, pod tym względem, charakteryzowały się białka miofibrylarne.

Trzecia publikacja, p.t.: “Porcine myofibrillar proteins as potential precursors of bioactive peptides – an *in silico* study” ukazała się w Food & Function (IF=3,247; 30 pkt wg punktacji czasopism MNiSW). Zaprezentowano w niej wyniki badań dotyczących wartości białek miofibrylarnych jako prekursorów bioaktywnych peptydów (z uwagi na wyniki otrzymane w ramach wcześniej przeprowadzonych analiz pominięto białka z grupy sarkoplazmatycznych). O dużym potencjale mięsa i wyrobów z niego wytworzonych, jako żywności prozdrowotnej, świadczy określenie 25 różnych aktywności biologicznych peptydów, w tym hamowanie działania dipeptydylo peptydazy IV, konwertazy angiotensyny I oraz aktywność przeciwutleniająca. W dalszej części pracy przedstawiono wyniki badań *in silico*, polegające na hydrolizie sekwencji białek enzymami: pepsyną, trypsyną i chymotrypsyną. Wykazano, że wprawdzie zachowana została aktywność biologiczna uwolnionych peptydów, ale tylko część potencjalnie aktywnych cząsteczek została uwolniona. Doktorantka podkreśliła różnice w prowadzeniu badań *in silico* i *in vivo* i wskazała na konieczność prowadzenia dalszych badań w tym zakresie.

Z uwagi na fakt, że źródłem bioaktywnych peptydów mają być białka surowej polędwicy dojrzewającej, której proces produkcyjny trwa wiele miesięcy, mgr inż. Paulina Kęska zaplanowała doświadczenie pozwalające na określenie wpływu czasu dojrzewania (28, 90, 180, 270, 360 dni) na aktywność biologiczną peptydów/białek obecnych w ekstraktach otrzymanych z tego produktu. Ponadto określiła wpływ enzymatycznej hydrolizy *in vitro* oraz szczepu bakterii kwasu mlekowego na aktywność biologiczną hydrolizatów białek. Wyniki opublikowała w kolejnych artykułach, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej: „Stability of antiradical activity of protein extracts and hydrolysates from dry-cured pork loins with probiotic strains of LAB” (Nutrients o wsp. IF=4,196; 35 pkt wg punktacji czasopism MNiSW) oraz „Ageing-time dependent changes of angiotensin I-converting enzyme-

inhibiting activity of protein hydrolysates obtained from dry-cured pork loins inoculated with probiotic lactic acid bacteria” (International Journal of Peptide Research and Therapeutics. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9765-y> o wsp. IF=1,132, 15 pkt wg punktacji czasopism MNiSW).

Uzyskane wyniki wykazały liniowy wzrost zawartości grup $-NH_2$ w miarę upływu czasu (intensywniejsze procesy degradacji stwierdzono w przypadku białek rozpuszczalnych). Natomiast potencjał antyrodnikowy ekstraktów wzrastał do 180 dnia, po czym malał aż do końca analizowanego okresu. Aktywność peptydów działających jako inhibitory konwertazy angiotensyny była względnie stabilna do 270 dnia w obrębie frakcji białek rozpuszczalnych w solach. Doktorantka wykazała także, że w przypadku hydrolizy białek *in vitro* pepsyną powstawało mniej peptydów o właściwościach antyrodnikowych niż podczas hydrolizy pankreatyną, natomiast poziom hamowania ACE był wyższy po hydrolizie pepsyną. Największą aktywność biologiczną peptydów stwierdzono po enzymatycznej hydrolizie i symulowanym wchłanianiu *in vitro* produktu po 180 dniach dojrzewania.

Wysoką aktywnością przeciwtleniającą i inhibitującą działanie ACE charakteryzowały się peptydy otrzymane z polędwicy surowej dojrzewającej, do produkcji której zastosowano szczep *L. acidophilus* Bauer Ł0938.

Przedstawione publikacje są spójne tematycznie. Autorka jasno określiła cel pracy, tj.: *„Określenie potencjału białek surowo dojrzewającej polędwicy wieprzowej jako prekursorów biologicznie aktywnych peptydów oraz ocena możliwości jego kształtowania poprzez zastosowanie probiotycznych i potencjalnie probiotycznych szczepów bakterii kwasu mlekowego jako kultur startowych”* oraz hipotezę badawczą. W sposób logiczny i prawidłowy zaplanowała i przeprowadziła część doświadczalną pracy, co pozwoliło na osiągnięcie zamierzonego celu. Eksperymenty wykonano przy pomocy nowoczesnych i właściwie dobranych metod analitycznych. Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki w sposób przejrzysty i właściwie je zinterpretowała. Analiza rezultatów została przeprowadzona starannie i wnikliwie. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka prawidłowo sformułowała 4 wnioski. Wyniki badań zaprezentowane w publikacjach są bardzo wartościowe i stanowią zwartą rozprawę. Publikacja wyników w bardzo dobrych czasopiśmie, gdzie przeszły szczegółową ocenę recenzentów, niewątpliwie dokumentuje ich jakość i wartość naukową.

W pracy Pani mgr inż. Paulina Kęska zacytowała 84 pozycje literaturowe, z których ok. 96% stanowią artykuły w języku angielskim. Prace z ostatniej dekady stanowią ponad 90%, co świadczy o bieżącym śledzeniu przez Doktorantkę omawianego zagadnienia

i aktualności podjętego tematu naukowego. Literatura została dobrana poprawnie, a spis przygotowany starannie.

Ocena edytorskiego przygotowania pracy oraz uwagi szczegółowe

Rozprawa wskazuje na dobrą orientację Pani mgr inż. Pauliny Kęski w zakresie poruszanych zagadnień. Praca napisana jest zwięźle, poprawnym językiem. Zauważyłam jedynie drobne błędy literowe (np.: str. 21⁴, 23¹⁷, 27¹, 27¹⁴, 30⁵). Edytorskie przygotowanie rozprawy świadczy o dobrym opanowaniu przez Autorkę techniki redakcji tekstu naukowego.

Uwagi szczegółowe:

- Dyskusyjne wydaje się określenie, stosowane w tytule i treści pracy: „połędwica surowo dojrzewająca”. Sugeruje ono, że mogą być także połędwice dojrzewające „niesurowo”. Chodzi chyba jednak o to, że wśród wyrobów surowych mogą być wyroby dojrzewające, dlatego uważam, że powinno się stosować określenie: „wyroby surowe dojrzewające”
- Autorka stwierdza, powołując się na dane literaturowe dotyczące aktywności biologicznej peptydów zawartych w szynce surowej dojrzewającej, że: *„spożycie nawet niewielkich ilości tych wyrobów (80 g/dzień przez okres jednego miesiąca) potencjalnie może wywołać efekt in vivo w postaci regulacji gospodarki węglowodanowej i poziomu cholesterolu, nie powodując przy tym wzrostu ilości sodu wydalanego z moczem ani wzrostu ciśnienia tętniczego...”* (str. 14¹⁴) i podkreśla, że spożycie takiej porcji wyrobu jest zgodne z wytycznymi WHO (w tym Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem). Agencja Badań nad Rakiem zaleca spożycia około pół kilograma przetworzonego mięsa tygodniowo, co daje ok. 70 g/dzień. Nie można wobec tego twierdzić, że 80 g/dzień, to są niewielkie ilości. Pojawia się pytanie czy można zalecać nadmierne spożycie mięsa w celu regulacji gospodarki węglowodanowej i poziomu cholesterolu, tym bardziej, że podczas suszenia zwiększa się stężenie soli w gotowym wyrobie.
- W procesie peklowania oprócz soli peklującej stosowano azotan (V) sodu. W przypadku stosowania tego związku duże znaczenie mają bakterie denitryfikujące, które redukują azotany do azotynów. Czy wprowadzenie szczepów probiotycznych w ilości 10⁶ – 10⁷ jtk/g nie hamowało rozwoju bakterii denitryfikujących obecnych w mięsie ? Czy do mieszanki peklującej nie należało wprowadzić cukru, stanowiącego

środek pomocniczy w procesie dojrzewania mięsa i pożywkę dla drobnoustrojów denitryfikujących ?

- w schemacie produkcji (s. 19) podano, że fermentacja i suszenie zachodziło przy wilgotności $75 \pm 5\%$ (70-80% ?), natomiast w metodyce publikacji 4 i 5: 75-80%
- W tytule tab. 2 (str. 31) podano, że liczba bakterii została wyrażona w jtk/g, natomiast w rzeczywistości wyniki przedstawiono w log jtk/g
- Proponuję nie stosować określenia: „najbardziej optymalny” a „optymalny” (318, wniosek 1)

Przedstawione uwagi nie umniejszają wartości pracy i oczywiście nie ze wszystkimi Autorka musi się zgodzić.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Pauliny Kęski stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dotyczącego modyfikacji wartości odżywczej i prozdrowotnej polędwicy surowej dojrzewającej, a wyniki uzyskane w pracy mogą mieć istotne znaczenie praktyczne. Rozprawa potwierdza dobre przygotowanie Doktorantki do pracy naukowo-badawczej oraz szeroką wiedzę teoretyczną w zakresie omawianych zagadnień.

Stwierdzam, że rozprawa 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. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). W związku z powyższym stawiam wniosek do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Pauliny Kęski do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na dużą wartość merytoryczną recenzowanej pracy, stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Kęski.

