



Wrocław, dn. 10.12.2024 r.

dr hab. inż. Aleksandra Zambrowicz, prof. UPWr

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Michała Jacka Czeleja

pt.: „Optymalizacja metody wytwarzania w skali przemysłowej oraz ocena właściwości prozdrowotnych uzyskanych peptydów z białek jaja kurzego i serwatki”

wykonanej w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka oraz w firmie Biolive Innovation Sp. z o.o. w ramach Programu MNiSW (MEiN) „Doktorat Wdrożeniowy” (DWD/487/2020)

pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Waśko oraz opiekuna zakładowego dr inż. Tomasza Czerneckiego

Recenzję wykonano w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 30.10.2024 r., w związku z postępowaniem wszczętym w dniu 16.10.2024 r. celem nadania panu mgr Michałowi Jackowi Czelejowi stopnia naukowego w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia na podstawie ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1688 z późn. zmianami).

Dobór i znaczenie tematu

Szeroko prowadzone w ostatnich dwóch dekadach lat badania naukowe na całym świecie potwierdziły zdolność regulowania określonych funkcji fizjologicznych w organizmie przez nie-



które peptydy uwalniane z białek żywnościowych zarówno podczas procesu trawienia, w którym uczestniczą proteazy wydzielane przez żołądek i trzustkę, jak i w reakcjach prowadzonych *in vitro* np. kontrolowanych hydrolizach z użyciem dostępnych w handlu jak i niekomercyjnych preparatów proteolitycznych różnego pochodzenia i odmiennej specyficzności substratowej. Peptydy te określane mianem bioaktywnych mogą wykazywać na przykład aktywność przeciwutleniającą, przeciwdrobnoustrojową, przeciwnadciśnieniową, opioidową, immunoregulatorką czy przeciwcukrzycową.

Badania nad biopeptydami pochodzącymi z żywności mają ogromne znaczenie, ponieważ mogą one znaleźć wykorzystanie w produkcji żywności funkcjonalnej oraz jako naturalne preparaty farmakologiczne, które w odróżnieniu do syntetycznych leków nie wywierają efektów ubocznych i mogą być stosowane długotrwale zarówno w leczeniu jak i w zapobieganiu wielu chorobom w tym cywilizacyjnym. Wiele z nich jak np. peptydy przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe mogą być także naturalnymi konserwantami żywności.

Rozprawa dotyczy badań nad peptydami pochodzącymi z białek jaja i mleka. W literaturze szeroko opisane są zarówno metody otrzymywania biopeptydów z białka jaja i mleka, jaki i ich sekwencje oraz wykazywane aktywności biologiczne. Jednakże w odróżnieniu od bardzo dobrze scharakteryzowanych peptydów z białka jaja, dostępne są niedostateczne informacje odnośnie biopeptydów generowanych z białek żółtka. Jeżeli rozważymy, że niezależnie od noski rozwijający się zarodek w jajku do prawidłowego wzrostu potrzebuje nie tylko substancji odżywczych jak m.in. aminokwasy i związki tłuszczowe, ale i także szeregu związków ochronnych i związków o charakterze regulatorów procesów fizjologicznych, to okaże się, że wybrane przez Doktoranta żółtko jako źródło biopeptydów, po za tym, że jest tematem bardzo aktualnym staje się bardzo frapującym pod względem poznawczym. Ponieważ niewiele wiadomo o powstających w czasie rozwoju zarodka produktach proteolizy, które regulują jego prawidłowy rozwój, jak i tego czy tak jak dla zarodka peptydy te będą wykazywały efekt terapeutyczny u człowieka.

Atutem podjętych przez Doktoranta badań jest także to, że jako substraty do otrzymywania biologicznych peptydów wykorzystał białka serwatkowe, pozostające po produkcji serów oraz odtłuszczone żółtko, które też jest surowcem odpadowym otrzymywania fosfolipidów z jaja. Wskazał tym samym, niezwykle atrakcyjny i ekonomicznie opłacalny kierunek zagospodarowania tych produktów jednocześnie zgodnie z aktualnym trendem w technologii żywności jakim jest produkcja bezodpadowa.

Jednakże największe wg mnie znaczenie ma to, że Autor podjął badania mające na celu przeskalowanie procesów wytwarzania biologicznie aktywnych peptydów na drodze hydrolizy enzymatycznej z poziomu laboratorium do skali produkcyjnej. Jak wiadomo, bardzo trudnym jest



przeprowadzić dane technologie w wielkości produkcyjnej z takim samym wynikiem jaki uzyskujemy w badaniach laboratoryjnych.

Ocena strony formalnej pracy

Osiągnięcie naukowe przedstawione do oceny przez mgra Michała Czeleja w postępowaniu o nadanie stopnia doktora pt.: „Optymalizacja metody wytwarzania w skali przemysłowej oraz ocena właściwości prozdrowotnych uzyskanych peptydów z białek jaja kurzego i serwatki” to jednotematyczny cykl opracowań, składający się z dwóch opublikowanych prac: przeglądowej pt.: „Protein hydrolysates derived from animals and plants – a review of production methods and antioxidant activity.”

i eksperymentalnej pt.: “Egg yolk as a new source of peptides with antioxidant and antimicrobial properties.”

oraz opracowania przedstawiającego wyniki badań przeprowadzonych nad peptydami z serwatki pt.: „Whey protein hydrolysates: Production, properties, and biological activities”, które w formie mauskryptu złożono do recenzji w czasopiśmie Foods,

i dwóch procedur produkcji biologicznie aktywnych peptydów z żółtka jaja i peptydów z białek serwatkowych, stanowiących część wdrożeniową.

Rozprawa (159 stron tekstu) składa się ze skondensowanego opisu przeprowadzonych badań (72 strony) i załączników, w postaci dwóch odrębnych prac opublikowanych w czasopiśmie Foods znajdującym się na liście Ministerstwa Edukacji i Nauki, jednej pracy złożonej do recenzji w tym samym czasopiśmie oraz dwóch procedur produkcyjnych. Stanowi ona zwartą całość i odpowiada podjętemu przez Autora tematowi. We wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, dodatkowo w pracy przeglądowej jest autorem do korespondencji. Sumaryczna liczba punktów według komunikatu MEiN za publikacje wynosi: 280 pkt, a Współczynnik Wpływu (Impact Factor) zgodnie z listą Journal Citation Reports wynosi 9,900.

Pewne wątpliwości budzi przedstawienie wyników badań w formie publikacji nr III, która aktualnie jest na etapie recenzji, według Mnie odpowiednim byłoby zamieścić te nieopublikowane jeszcze wyniki badań w rozprawie w rozdziale 7. pt. Wyniki.

Analizując oświadczenia autorów publikacji odnośnie ich wkładu pracy w powstanie publikacji można stwierdzić, że mgr Michał Czelej miał wiodącą rolę w ich powstaniu.

Ocena merytoryczna pracy



Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Michała Jacka Czeleja zawiera zwięzłe uzasadnienie podjętej tematyki badawczej, hipotezy i cel pracy, opis użytych materiałów i zastosowanych metod, omówienie wraz z dyskusją wyników, wnioski, bibliografię, załączniki. Ponadto zamieszczono w niej streszczenie, strukturę przeprowadzonych badań, etapy weryfikacji hipotez badawczych i objaśnienie używanych w tekście rozprawy skrótów i symboli.

Uzyskane w toku realizacji badań wyniki przedstawione w 7. rozdziale pracy pt. Wyniki oraz w 10. rozdziale pt. Załączniki stanowiące opublikowaną część badań tj. artykuły naukowe oraz procedury technologiczne pozwoliły na osiągnięcie założonego przez Autora celu i na potwierdzenie sformułowanych hipotez badawczych.

Mam uwagę dotyczącą języka, którym się posłużono pisząc rozprawę. Niektóre fragmenty pracy zawierają błędy stylistyczne, gramatyczne i niefortunne sformułowania. Przykładem jest str. 31 rozprawy. Właściwie cały fragment dotyczący omówienia aktywności przeciwutleniającej hydrolizatów żółtka wymaga przerehabilitacji. Podobnie w przypadku omówienia tej aktywności dla hydrolizatów serwatki (r. 7.2.2) Autor omawiając tabelę 11 nie podaje, że omawia poziomy aktywności ABTS, a następnie myli omówienie aktywności FRAP z DPPH.

Przykłady dyskusyjnych sformułowań to: „izolaty bakteryjne” (str. 38); „aktywność zbierająca DPPH” (str. 31); Ich aromatyczne pozostałości stabilizują rodniki podczas reakcji wymiatańa.....”(str. 31) zapewne chodziło o to, że Aminokwasy aromatyczne obecne w peptydach uczestniczą w przekształcaniu wolnych rodników w ich nie rodnikową formę. Lub w tab. 13. Zamiast „Histamina-N-metylotransferaza” powinno być N- metylotransferaza histaminy.

Mam także uwagi odnośnie tytułów tabel czy podrozdziałów w kilku przypadkach są one niefortunnie sformułowane. Na przykład tytuł tabeli nr 5 (str. 25 rozprawy) to Zawartość lipidów w suchej masie żółtka (%). A powinno być: Efektywność ekstrakcji etanolem tłuszczu z żółtka jaja. W tej tabeli najprawdopodobniej przez pomyłkę przedstawione jest Białko żółtka jaja po hydrolizie, a chodziło o Białko żółtka jaja po ekstrakcji. Czy na przykład tytuł podrozdziału 7.5.1 to: Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej, lepszym byłoby Ocena aktywności przeciwutleniającej enzymatycznych hydrolizatów białek żółtka, lub po prostu Aktywność przeciwutleniająca.

Treść pracy

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej. Autor bardzo zwięzłe przedstawia problem stosowania w przetwórstwie żywności syntetycznych substancji usprawniających procesy technologiczne, uczestniczących w kształtowaniu pożądanych cech organoleptycznych czy przedłuże-



niu trwałości. Wskazuje na konieczność poszukiwania równie efektywnych naturalnych zamienników, którymi mogą być bioaktywne peptydy pochodzące z białek pokarmowych. Kolejno przedstawia zalety stosowania enzymatycznej hydrolizy białek do otrzymywania biopeptydów. Ponadto wskazuje, że podjęta przez Niego tematyka badawcza odpowiada zainteresowaniom i potrzebom firmy Biolive Innovation Sp. z o. o., która w odpowiedzi na aktualne trendy w technologii żywności i potrzeby rynku zaangażowana jest w opracowanie i wdrożenie technologii otrzymywania preparatów peptydów o aktywności biologicznej, szczególnie przeciwtleniającej i przeciwdrobnoustrojowej.

Odnosnie uzasadnienia tematyki mam pytanie:

Czy znaczenie otrzymanych przez Doktoranta preparatów peptydów, ogranicza się tylko do tego, że mogą być naturalnymi substancjami przedłużającymi trwałość żywności?

Pytanie to także dotyczy publikacji I, w której, we wstępie Autor ogranicza znaczenie peptydów- przeciwtleniaczy do naturalnych substancji konserwujących.

Cel pracy i hipotezy badawcze. Celem pracy mgr Michała Czeleja było opracowanie i optymalizacja metody wytwarzania bioaktywnych peptydów w skali przemysłowej oraz ocena właściwości prozdrowotnych uzyskanych peptydów z białek żółtka jaja i serwatki.

Cel pracy jest sformułowany krótko i klarownie. Zakres badań przedstawiono jasno. Badania przeprowadzono w siedmiu etapach. Na wstępie wykonano przegląd literatury dotyczący otrzymywania peptydów na drodze hydrolizy enzymatycznej białek różnego pochodzenia czego efektem jest publikacja przeglądowa (I). Następnie opracowano warunki hydrolizy enzymatycznej wytwarzania bioaktywnych peptydów z białek żółtka jaja i oceniono ich aktywność biologiczną (II, III), kolejno badano możliwości otrzymywania bioaktywnych peptydów z białek serwatkowych z zastosowaniem enzymów proteolitycznych (IV i V), a dwa ostatnie etapy dotyczyły badań przeskalowania procesów wytwarzania biopeptydów z żółtka jaja i białek serwatkowych do wielkości przemysłowej.

W pracy sformułowano trzy hipotezy badawcze zakładające możliwość otrzymywania biologicznie aktywnych peptydów z białek różnego pochodzenia metodą hydrolizy enzymatycznej, kształtowania biologicznych aktywności peptydów doбором odpowiednich warunków hydrolizy oraz możliwość wykorzystania białek żółtka jaja i serwatki do otrzymywania peptydów wykazujących aktywność przeciwtleniającą i przeciwdrobnoustrojową.



Materiały i metody. W części metodycznej Autor przedstawia na wstępie wykorzystywane w badaniach materiały, a następnie omawia zastosowane metody analityczne i preparatywne, aparaturę, mikroorganizmy i programy komputerowe. Wachlarz wykorzystywanych przez Doktora metod jest bardzo zróżnicowany (od prowadzenia procesów enzymatycznych, zastosowania techniki spektrometrii mas po badania w zakresie mikrobiologii włączając selekcję i identyfikację bakterii oraz analizę aktywności przeciwbakteryjnej), co dowodzi Jego dużych umiejętności.

Oceniając część metodyczną pracy stwierdzam, że warsztat badawczy został przygotowany poprawnie i umożliwił osiągnięcie celu pracy. Jednak odnośnie metod mam kilka pytań i uwag:

Pierwsza dotyczy warunków procesu sekwencyjnej hydrolizy białek żółtka jaja. Najpierw prowadzona była hydroliza papainą przez 2 godziny w warunkach optymalnych dla działania tego enzymu czyli pH 6,0 i temperatury 70°C. Kolejno reakcję hamowano poprzez gotowanie hydrolizatu przez 15 minut w temperaturze 100°C, a po ochłodzeniu doprowadzono pH mieszaniny do wartości 3,0 i hydrolizę kontynuowano przez kolejne 2 godziny pepsyną w temperaturze 37°C (str. 19).

Czy koniecznym był etap inkubacji hydrolizatu przez 15 minut w temperaturze 100°C celem inaktywacji papainy? Czy samo obniżenie pH do wartości 3,0 i ochłodzenie do temperatury 37°C, czyli warunków dalekich od optymalnych dla działania papainy, nie wystarczyłoby na zahamowanie tego enzymu? Przecież procesy cieplne znacząco podnoszą koszt produkcji hydrolizatów.

Kolejne pytanie dotyczy oznaczenia zawartości białka ogólnego. Autor wybrał metodę spektrofotometryczną. Co prawda pomiar absorbancji w ultrafiolecie jest prostą, szybką i nieniszczącą białek metodą określenia ich stężenia. Głównie obecność w białku aminokwasów aromatycznych tj tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny jest przyczyną absorbowania przez nie światła w zakresie ultrafioletu. Jednakże metoda ta pracuje dla białek bardzo dobrze rozpuszczalnych tworzących bezbarwne i klarowne roztwory. Natomiast według mnie do oznaczania stężenia białka całkowitego służy metoda Kjeldhala mierząca zawartość azotu.

Zatem czy nie bardziej odpowiednim byłoby zamiast białko całkowite określenie białko rozpuszczalne?

Proszę wyjaśnić czy stężenie białka metodą spektrofotometryczną oznaczano dla wszystkich prób? tj. substratów i produktów (hydrolizatów)? Jak wyglądały badane roztwory?

Potencjał prozdrowotny enzymatycznych hydrolizatów Autor badał zarówno *in vitro* jak i *in silico* wykorzystując bazę danych BIOPEP Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Informacje odnośnie metody *in silico* powinny być zamieszczone oddzielnie, a nie w opisie identyfikacji peptydów metodą spektrometrii mas.



Kolejne pytanie dotyczy oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej. W przypadku hydrolizatów odtuszczonego żółtka jaja do oceny tej aktywności wyselekcjonowano i użyto bakterie G⁺ i G⁻ odpowiedzialne za psucie się owoców i warzyw takie jak: *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *Kocuria rhizophila*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Hafnia alvei*, *Acinetobacter radioresistans* i *Stenotrophomonas maltophila*. Podczas gdy do oceny aktywności przeciwbakteryjnej enzymatycznych hydrolizatów z białek serwatki użyto *B. Cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *Staphylococcus capitis*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Brevundimonas diminuta* i *Rhizobium radiobacter*. Co było przyczyną tego, że dla obu hydrolizatów zastosowano inne mikroorganizmy?

Analiza potencjału przeciwbakteryjnego zarówno hydrolizatów z białek żółtka jaja jak i serwatki wobec tych samych szczepów bakterii dostarczyłoby więcej informacji np. na temat wpływu rodzaju substratu na badaną aktywność.

Dodatkowo chciałabym zapytać czy Autor rozważał zastosowanie w tym teście kontrolnej próby pozytywnej? tj. znanej substancji o działaniu przeciwbakteryjnym jak np. lizozym, nizyna itp.? Pozwoliłoby to na uzyskanie dodatkowych informacji odnośnie znaczenia otrzymanych w tej pracy hydrolizatów/peptydów.

Wyniki i dyskusja. Autor wyniki swoich badań opublikował w dwóch publikacjach załączonych w załącznikach oraz opisał w przygotowanym do publikacji materiale określonym jako publikacja III, w postaci dwóch procedur produkcji oraz w formie skondensowanej w treści rozdziału 7 rozprawy. Opis wyników jest zwięzły, a materiał graficzny w postaci tabel i wykresów pokrywa się z danymi opublikowanymi w czasopismach naukowych (Załączniki).

Przed rozpoczęciem badań Doktorant wykonał przegląd literatury, którego wynikiem jest praca przeglądowa (I). Jest to obszerny manuskrypt będący zastawieniem szczegółowych informacji odnośnie źródeł aktywnych przeciwutleniająco peptydów, metod ich otrzymywania, oraz mechanizmów działania. Do stworzenia tego opracowania Doktorant wykorzystał bogatą literaturę źródłową, co niewątpliwie wymagało od Niego dużego nakładu pracy.

W ramach przeprowadzonych badań Autor scharakteryzował wybrane przez Niego substraty do otrzymywania biopeptydów na drodze hydrolizy enzymatycznej (rozprawa rozdz. 7, PII, PIII). Hydrolizę enzymatyczną białek prowadził jedno- lub dwuetapowo wykorzystując enzymy oddzielnie lub w sekwencji, wykorzystując najpierw jeden, a później po jego inaktywacji drugi. Były to papaina, pepsyna oraz wykorzystana do hydrolizy białek serwatki –trypsyna. Ich dobór uważam za słuszny i uzasadniony ekonomicznie.



Mam pytanie odnośnie substratów (Tab.1 publikacja II). Autor podał, że w ogólnym składzie chemicznym żółtka jest 25% tłuszczu, podczas gdy średnio jego udział wynosi 30-32% co mogło być powodem obniżonego udziału związków tłuszczowych w tym surowcu?

We wstępie publikacji II (Załączniki, strona 102 rozprawy) Autor pisze, że żółtko jaja dostarcza lizozymu, cystatyny, awidyny, foswityny i fosfolipidów, czy aby na pewno wszystkie te związki występują w żółtku?

W wyniku dokonanej oceny poziomu degradacji białka poprzez pomiar jej produktów tj. peptydów rozpuszczalnych w 5% kwasie trichlorooctowym Doktorant potwierdził zróżnicowany, w zależności od rodzaju enzymu i jego ilości przebieg hydrolizy białek żółtka i serwatki. Otrzymane hydrolizaty analizował w dalszych badaniach pod kątem ujawnionych aktywności biologicznych, w tym szczególnie przeciwutleniającej i przeciwbakteryjnej. Moim zdaniem szczególnie ważne i interesujące są wyniki badań nad peptydami przeciwbakteryjnymi, ponieważ w literaturze niewiele jest dostępnych informacji na temat przeciwbakteryjnych peptydów pochodzących z białek żółtka i serwatki.

Dobór przez Autora warunków hydrolizy substratów pozwalający na otrzymanie hydrolizatów o stopniu degradacji w zakresie od 15 do 34,71% uważam za duże osiągnięcie z uwagi na obecność zarówno w składzie serwatki jak i żółtka białek stosunkowo opornych na działanie proteaz takich jak β -laktoglobulina i foswityna, odpowiednio.

Mam pytania związane z tą częścią badań:

Proszę o wyjaśnienie czy wagowy stosunek użytego enzymu do substratu odnosi się do masy całych preparatów określanych jako „białka lub białko żółtka i serwatki” czy do udziału białka w składzie tych preparatów/substratów?

Autor pisze: „Hydroliza enzymatyczna jest najczęściej stosowaną metodą ekstrakcji peptydów. Właściwości produktu zależą w dużym stopniu od: specyficzności i selektywności enzymu....”

Czym się różni selektywność od specyficzności enzymu?

Autor uzasadnia wysoki stopień (DH 34,71%) rozkładu białek żółtka jako efekt sekwencyjnego zastosowania papainy przez pierwsze dwie godziny reakcji, a potem pepsyny przez kolejne dwie godziny (str. 63 rozprawy). Na jakiej podstawie został sformułowany ten wniosek, czy wykonano dla porównania 4- godzinne hydrolizy oddzielnie z papainą i z pepsyną?

W ramach dyskusji uzyskanych wyników z badań nad hydrolizatami białek żółtka Autor sporządził tabelę nr 7 (rozprawa) odpowiadającą tabeli nr 5 w publikacji II, przedstawiającą stopnie hydrolizy jakie inni Autorzy otrzymali stosując różne proteazy. Zestawienie to przygotowano niedbale, ponieważ Autor napisał, że Pokora i inni (2013), Eckert i inni (2013) oraz Zambro-



wicz i inni (2015) nie podali danych odnośnie warunków hydroliz, które przeprowadzili w swoich badaniach, podczas gdy informacje te są zawarte w publikacjach. Proszę także o doprecyzowanie, dla którego z czterech enzymów tj. Neutrazy, Pronazy Termolizyny czy Proteazy z *A. melleus* oraz którego z substratów Eckert ze współpracownikami (2013) otrzymali DH wynoszący 27% po 3. godzinach hydrolizy. Dodatkowo przedstawione w tej tabeli wyniki badań opisanych przez Graszkiwicz i wsp., (2007) dotyczą enzymatycznej hydrolizy białka jaja, a nie żółtka, więc są raczej niepotrzebne.

Do jednych z najciekawszych wyników badań otrzymanych przez pana Czeleja zaliczam te, w których podjął próbę identyfikacji otrzymanych peptydów metodą spektrometrii mas i ich charakterystyki pod kątem wykazywanej aktywności (metoda *in silico*). Udało się Jemu zidentyfikować 107 peptydów obecnych w hydrolizacie serwatki oraz 11 peptydów pochodzących z żółtka jaja o potencjalnych aktywnościach: opioidowej, inhibitorowej wobec ACE, przeciwnowotworowej, przeciwutleniającej przeciwbakteryjnej i innych. Dalej w omówieniu na stronach od nr 58 do 61 wskazał, które z zidentyfikowanych peptydów mogą mieć największe znaczenie w profilaktyce i leczeniu wielu chorób.

Mam pytanie, znając sekwencje peptydów zidentyfikowanych w hydrolizacie żółtka czy można dopasować do nich prekursorzy? Tak jak to Autor zrobił dla peptydów obecnych w hydrolizacie serwatki?

Wiadomo, że metoda spektrometrii mas dostarcza informacji odnośnie składu jakościowego próby. Jest to bardzo czuła metoda pozwalająca na identyfikację związku obecnego w próbce nawet w śladowych ilościach. Autor przedstawił obszerną tabelę (nr. 13) zawierającą sekwencje zidentyfikowanych przez Niego peptydów oraz prekursorzy. Biorąc pod uwagę to, że głównymi białkami serwatki są: β-laktoglobulina stanowiąca średnio połowę ilości białek serwatkowych i α-laktoalbumina mająca 20% udziału tych białek, czy można było ograniczyć się tylko do przedstawienia peptydów pochodzących od tych głównych białek serwatki? Wiadomo bowiem, że inne białka jak np. dyneina aksonemalna 17- czy np. Białko palca cynkowego 574 występującego w białkach wiążących DNA i wiele innych, są to białka uczestniczące w procesach metabolicznych krwi, nie są charakterystyczne dla białek mleka i raczej występują w śladowych ilościach w mleku. W związku z tym peptydy wygenerowane z nich nie będą determinowały aktywności biologicznej hydrolizatów serwatki.

Po przeprowadzeniu testów *in vitro* Doktorant wykazał, że otrzymane przez Niego hydrolizaty posiadają wysoką aktywność przeciwutleniającą mierzoną jako zdolność do wymiatania wolnych rodników DPPH i ABTS i redukcji stopnia utlenienia jonów metali (FRAP) oraz przeciwbakteryjną wobec szeregu bakterii g(-) i g(+). Poziomy aktywności przeciwdrobnoustrojowej były zależne od rodzaju bakterii oraz od ilości zastosowanego hydrolizatu. Bakterie g(+) były bardziej wrażliwe na działanie hydrolizatu białek żółtka niż bakterie g(-). Szkoda, że do analizy



aktywności przeciwbakteryjnej hydrolizatu białek serwatkowych, spośród ośmiu szczepów bakterii Doktorant zastosował tylko jeden należący do bakterii g(-), dostarczyłoby to więcej wyników pozwalających na określenie czy hydrolizat ten w ogóle nie działa na bakterie g(-) czy tylko wobec użytej bakterii *Brevundimonas diminuta*.

Brakuje wyników dotyczących aktywności niezhydrolizowanych substratów tj. żółtka jaja i białek serwatki, więc tak naprawdę nie wiadomo jaki wpływ miała reakcja hydrolizy enzymatycznej na poziomy tych aktywności. Uwaga ta dotyczy też wniosku nr 6, w którym stwierdzono, że zastosowanie papainy prowadzi do istotnego wzrostu aktywności przeciwutleniającej. Proszę o uzupełnienie wyników o te informacje.

W rozdziale 7.2.2. rozprawy Autor stwierdza, że do oceny aktywności przeciwutleniającej stosuje się metody bazujące na dwóch mechanizmach działania czyli redukcji stopnia utlenienia jonów metali i zdolności do wymiatania wolnych rodników. Czy znane są inne mechanizmy działania peptydów- przeciwutleniaczy?

Przedstawioną do oceny pracę zrealizowano w ramach programu MNiSW (MEiN) „Doktorat Wdrożeniowy”. Częścią praktyczną są procedury produkcji peptydów z białek żółtka i serwatki. Informacje w nich zwarte w pełni umożliwiają przeprowadzenie tych procesów w zakładzie produkcyjnym.

Mam pytania: Czy Autor opracował procedury uwzględniające kontrolę produktu gotowego czyli pomiar DH oraz aktywności przeciwutleniającej i przeciwdrobnoustrojowej? Oraz czy Autor przeprowadził produkcję biopeptydów w skali przemysłowej?

Procedura produkcji biopeptydów z białek serwatkowych dotyczy hydrolizy materiału po uprzednim usunięciu laktozy. Czy były prowadzone badania laboratoryjne nad odcukrzoną serwatką?

Podsumowanie, stwierdzenia i wnioski. Rezultaty swoich badań Doktorant podsumował formułując na koniec 12. wniosków. Wniosek nr 2 dotyczący wpływu warunków hydrolizy na stopień rozkładu białka (DH) powinien być przeredagowany i jasno sformułowany. Właściwie na jakiej podstawie stwierdzono, że efekt hydrolizy zależy od temperatury czy wartości pH? Skoro hydrolizy były prowadzone tylko w warunkach optymalnych dla każdego z zastosowanych enzymów, a nie w danych zakresach temperatur i pH, niezmiennych dla wszystkich enzymów?

Niestety nie znajduję w przedstawionym do recenzji dokumencie uzasadnienia w postaci wyników badań, które pozwoliłyby na otrzymanie wniosków nr 3, 4 i 12. A wniosek 11 jest podsumowaniem a nie wnioskiem z przeprowadzonych badań.



Mam pytanie odnośnie wniosku nr 10, w którym stwierdzono, że udało się przeskalować do wielkości produkcyjnej proces hydrolizy z zachowaniem aktywności biologicznej. Czy wyprodukowano na skalę przemysłową hydrolizaty i oceniono ich aktywność?

Ostatnie strony rozprawy to Bibliografia składająca z 75 zacytowanych publikacji naukowych, większość z nich to anglojęzyczne publikacje wydane w latach od 2010 do 2024. W rozprawie wykorzystano także dwa rozporządzenia oraz informacje zawarte na jednej stronie internetowej.

Wniosek końcowy

Podsumowując swoją ocenę rozprawy doktorskiej pana mgra Michała Jacka Czeleja pt.: „Optymalizacja metody wytwarzania w skali przemysłowej oraz ocena właściwości prozdrowotnych uzyskanych peptydów z białek jaja kurzego i serwatki ” stwierdzam, że mimo poczynionych przeze mnie wcześniej wielu uwag, jest ona pozytywna. Oceniana praca doktorska ma charakter zarówno poznawczy jak i aplikacyjny, spełnia ona wszystkie wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r poz. 1668 z późn. zmianami). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie pana mgra Michała Jacka Czeleja do dalszych etapów postępowania doktorskiego prowadzonego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

dr hab. inż. Aleksandra Zambrowicz, prof. UPWr