



Prof. dr hab. inż. Małgorzata Darewicz
Wydział Nauki o Żywności
Katedra Biochemii Żywności
tel. +48 895245171
e-mail: darewicz@uwm.edu.pl

Olsztyn, 07.04.2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kłosowskiej
zatytułowanej

„The effect of phospholipids on the intestinal lipolysis and proteolysis”
wykonanej pod kierunkiem dr. hab. inż. Adama Macierzanki, prof. uczelni
oraz prof. dr. Jensa Brockmeyera
na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej

Recenzję wykonano na podstawie pisma Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki
Chemiczne Politechniki Gdańskiej dr. hab. inż. Marka Tobiszewskiego, prof. uczelni
z dnia 14.02.2025r., zgodnie z Uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne
Politechniki Gdańskiej z dnia 11.02.2025 roku.

Dobór i znaczenie tematyki

Żywność może być źródłem składników determinujących prawidłowy, fizjologiczny stan organizmu człowieka, a także regulujących jego zachowanie psychofizyczne. Jednym z takich składników są lipidy i białka żywności, a także pochodzące z nich kwasy tłuszczowe oraz peptydy o określonej aktywności biologicznej. Niektóre z nich znalazły już zastosowanie w profilaktyce a nawet terapii dietozależnych chorób niezakaźnych. Świadomość konsumentów dotycząca wpływu żywności na zdrowie jest silnym czynnikiem stymulującym w badaniach na temat molekularnych podstaw aktywności biomakromolekuł żywności.

Trawienie jest złożonym procesem, który dostarcza organizmowi składników odżywczych, a uwalniane w przewodzie pokarmowym cząsteczki mogą mieć korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Dlatego badania na temat molekularnych podstaw



procesów trawienia są sposobem na zwiększenie wiedzy na temat ich wpływu na zdrowie i zachowanie homeostazy. Trawienie *in vitro* może być przydatnym sposobem zdobycia wiedzy na temat wartości odżywczej żywności, ponieważ umożliwia kontrolę procesu i łatwe pobieranie próbek. Pomimo, że podejście *in vitro* w naśladowaniu procesów fizjologicznych nigdy nie jest doskonałe, to jednak można przez to uniknąć trudności związanych z badaniami *in vivo*, takimi jak koszty, względy etyczne lub złożoność techniczna i organizacyjna eksperymentu.

Zharmonizowany protokół trawienia INFOGEST, wykorzystany przez Panią mgr Kłosowską, można wykorzystać do oceny punktów końcowych wynikających z trawienia składników surowców i/lub produktów żywnościowych poprzez analizę produktów trawienia (np. peptydów/aminokwasów, kwasów tłuszczowych, monosacharydów) uwalnianych z matrycy żywnościowej. Główny wniosek z dotąd prowadzonych badań jest taki, że pomimo prostoty modeli *in vitro* odtwarzających warunki panujące w układzie pokarmowym człowieka, są one bardzo przydatne w przewidywaniu wyników trawienia *in vivo*. Jest to jednak uzależnione od parametrów modelu *in vitro* i jego dopasowania w odpowiedzi na konkretne pytania związane z fizjologią/molekularnymi podstawami procesu trawienia u człowieka, co pozostawia szerokie pole do kolejnych badań i modyfikacji/ulepszeń. Stąd podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza w aspekcie wpływu fosfolipidów (PL) i soli żółciowych (BS) oraz ich wzajemnych oddziaływań na symulowane w warunkach *in vitro* procesy lipolizy i proteolizy jest niezwykle aktualna, ważna i potrzebna.

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona przez mgr Katarzynę Kłosowską do recenzji dysertacja zatytułowana „The effect of phospholipids on the intestinal lipolysis and proteolysis„ spełnia wymagania formalne stawiane tego rodzaju opracowaniom przedkładanym w postępowaniu na stopień naukowy doktora, tzn. ma charakter eksperymentalny i zawiera wszystkie niezbędne rozdziały ułożone w typowej sekwencji. Przedmiotem recenzji jest 148 stronicowe opracowanie, wykonane w oparciu o wyniki badań Autorki. Rozprawa, rozpoczynająca się streszczeniem w języku polskim i angielskim ma strukturę typową dla tego rodzaju opracowań i zawiera 7 rozdziałów wraz z podrozdziałami: wstęp będący przeglądem literatury, opis celu pracy, charakterystykę użytych materiałów i metod, omówienie wyników i ich dyskusję (gdzie zawarto informację na temat opublikowania wyników z rozdziałów 4.1 i 4.2 w publikacji Kłosowska, K, Teresa Castillo-santaella, Julia Maldonado-valderrama, Adam Macierzanka. 2024. “The Bile Salt / Phospholipid Ratio Determines the Extent of in Vitro Intestinal Lipolysis of Triglycerides : Interfacial and Emulsion Studies” Food Research International, 187, 114421187; w publikacji znajdujemy oświadczenia o wkładzie pracy w publikację samej Kandydatki oraz oświadczenia o wkładzie pracy pozostałych współautorów tj. Teresy Castillo-Santaella, Julii Maldonado-Valderrama i Adama Macierzanki; z oświadczeń jednoznacznie wyłania

się wiodąca rola p. mgr Katarzyny Kłosowskiej która jako pierwszy autor odpowiadała za: pisanie - recenzja i edycja, pisanie - pierwotna wersja robocza, wizualizację, walidację, metodologię, badania, analizę formalną, zarządzanie danymi), wnioski, wykaz piśmiennictwa oraz załącznik obejmujący wykresy i tabele. Całość zawiera 76 rysunków, 17 tabel, oraz 300 pozycji literaturowych. Przedstawione ilustracje i tabele cechuje dobry poziom graficznego opracowania tzn. są przejrzyste i łatwe w interpretacji. Całość uzupełnia wykaz stosowanych skrótów, który umożliwia czytelnikowi sprawne poruszanie się po tekście rozprawy. Powyższy sposób prezentacji wyników pracy jest właściwy i spełnia formalne wymagania ustawowe dotyczące przedstawienia osiągnięcia w przewodzie doktorskim. Praca stanowi zwartą całość. Została napisana starannie, poprawnie pod względem formy językowej i dobrze zilustrowana.

Ocena merytoryczna rozprawy

Po zapoznaniu się z treścią pracy stwierdzam, że tytuł dysertacji został sformułowany w sposób prawidłowy, zwięźle choć nie w pełni adekwatnie do jej treści. Być może nie wybrzmiały w sposób wystarczający aspekty trawienia na wszystkich innych etapach niż jelitowy. Zastrzeżeń nie budzą streszczenia, zarówno wersja w j. polskim jak i wersja w j. angielskim, gdzie Doktorantka, wskazując na ograniczoną liczbę eksperymentów dotyczących trawienia w obecności fosfolipidów i soli żółciowych oraz ich wzajemnego oddziaływania w różnych stężeniach zwłaszcza w przypadku proteolizy ale także lipolizy, uzasadnia cel badań jakim było zbadanie wpływu fosfolipidów i soli żółciowych na trawienie triacylogliceroli oraz białek z WPI (izolatu białek serwatkowych) w tym β -laktoglobuliny.

W części pracy dotyczącej uzasadnienia podjętej tematyki badawczej Autorka dokonuje analizy zagadnienia w świetle literatury (30 stron) oraz w ciekawy sposób zapoznaje i wprowadza czytelnika w tematykę dysertacji.

Pani Magister w rzetelny sposób, korzystając z właściwie dobranych źródeł, wprowadza w przedmiot swoich badań ukazując ich zasadność. Ta część pracy została opracowana, na podstawie trafnie i wiarygodnie dobranej bibliografii, zacytowanej w sposób prawidłowy, wskazując na dużą wnikliwość p. mgr Kłosowskiej. Dobór poszczególnych pozycji jest odpowiedni i obejmuje spis najważniejszej literatury z zakresu przedmiotu badań z ostatnich lat, wskazując na rozeznanie tematyki, co potwierdza duży wkład pracy Doktorantki i przygotowanie się do pojęcia przedmiotowych badań. Dobór merytoryczny źródeł oraz sposób ich wykorzystania uważam za prawidłowy. Tak opracowana część pracy spełnia swoją funkcję w aspekcie nakreślenia stanu wiedzy i badań odnośnie problemów badawczych podejmowanych w rozprawie. Właściwie przeprowadzona analiza tekstów źródłowych pozwoliła na podsumowanie zawierające stwierdzenie o braku wyników badań na temat wpływu fosfolipidów i soli żółciowych na profil peptydów uwalnianych po trawieniu β -Lg przy różnych stosunkach BS/PL. Ponadto

stwierdzono brak istotnych informacji na temat wpływu BS i PL na trawienie lipidów. Co więcej, zidentyfikowano, że wzajemne oddziaływania BS i PL jako związków powierzchniowo czynnych na granicy faz olej-woda wymagają wyjaśnienia.

Tak zdefiniowane wnioski z podsumowania stanu wiedzy stały się bazą do sformułowania założeń badawczych w ocenianej pracy tj. celu i zakresu badań. Obejmował on: (i) zbadanie wpływu fosfolipidów i soli żółciowych na lipolizę w jelicie cienkim; zbadanie fizykochemicznych aspektów wzajemnego oddziaływania tych biosurfaktantów na granicy faz olej/woda podczas symulowanego procesu lipolizy jelitowej; wykazanie w jaki sposób zjawiska obserwowane na granicy faz mogą wpływać na stopień lipolizy *in vitro* w modelowych emulsjach; (ii) zbadanie wpływu fosfolipidów i soli żółciowych na proteolizę β -laktoglobuliny w symulowanych warunkach trawienia w przewodzie pokarmowym człowieka; zbadanie różnic w profilach peptydowych otrzymywanych po proteolizie *in vitro* wraz z różnicami w aktywności biologicznej. Należy podkreślić, że cel pracy został jednoznacznie uwypuklony i znajduje uzasadnienie we wcześniej przedstawionym przeglądzie piśmiennictwa. Postawione tezy badawcze są poznawcze oraz nowatorskie na świecie i w Polsce, co w pełni uzasadniało podjęcie badań. Mam jednak uwagę dotyczącą doprecyzowania hipotezy badawczej ze wskazaniem elementów nowości naukowej w kontekście prezentowanej dyscypliny naukowej.

Metodyka pracy jest (12 stron) dobrze przemyślana i właściwie merytorycznie dobrana. Wyróżnia się nowoczesnością szeregu metod jak np. metoda tensometryczna do badania napięcia międzyfazowego, identyfikacja peptydów metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas LC-MS, analiza bioinformatyczna bioaktywnych peptydów w aspekcie tzw. zintegrowanego podejścia czyli połączenia w strategii badawczej analizy *in silico* z analizą *in vitro* czy też logiczna kaskada metod i technik podczas otrzymywania modelowych emulsji z WPI, symulowania lipolizy jelitowej oraz proteolizy w przewodzie pokarmowym. Do pełnego opisu zabrakło informacji nt. metody Kyte'a oraz autorskiego sposobu wykorzystania baz danych MBPDP (Milk Bioactive Peptide Database) oraz IEDP (Immune Epitope Database) wraz z datami dostępu oraz datami aktualizacji baz podczas opracowywania wyników. Przeprowadzone przez Doktorantkę eksperymenty zostały zaplanowane w sposób logiczny a ich realizacja i przebieg przystępnie opisane. Prawidłowo dobrana metodyka zapewniała kompleksowe podejście do analizowanej problematyki badawczej zaś precyzyjnie ustawiony warsztat badawczy umożliwiał logiczny i konsekwentny sposób osiągania celów badawczych. W konsekwencji opracowanie warunków lipolizy emulsji stabilizowanych WPI oraz proteolizy WPI i β -Lg umożliwiło osiągnięcie celu badań jakim było zbadanie wpływu fosfolipidów i soli żółciowych na trawienie triacylogliceroli oraz białek z WPI w tym β -laktoglobuliny.

W najobszerniejszym (63 str.) rozdziale dysertacji Wyniki i dyskusja Doktorantka w przystępny i wyczerpujący sposób opisała rezultaty poszczególnych badań. Podział na podrozdziały nawiązujące do opisu etapów badań w rozdziale „Materiały i metody” oraz w publikacji ułatwił analizę wyników poszczególnych eksperymentów.

Wyniki eksperymentów dotyczących retrospektywnej analizy danych z literatury naukowej dotyczących stężeń surfaktantów w drogach żółciowych oraz lipolizy mgr Kłosowska zawarła w rozdziale 4.2. Lipoliza oraz w publikacji: Kłosowska, K, Teresa Castillo-Santaella, Julia Maldonado-Valderrama, Adam Macierzanka. 2024. “The Bile Salt / Phospholipid Ratio Determines the Extent of *in Vitro* Intestinal Lipolysis of Triglycerides : Interfacial and Emulsion Studies” *Food Research International*, 187, 114421187 a także w publikacji wystanej do recenzji: Kłosowska-Chomiczewska, Ilona E., Dorota Dulko, Mateusz Semborski, Mariia Yakoviv, Noel Si, Robert Staroń, Łukasz Krupa, Adam Macierzanka; “*In Vitro* Intestinal Lipolysis of Protein-Stabilised Emulsion: Simulating the Impact of Human Bile Using Individual Bile Salts and Phospholipids.”

Kandydatka wykazała, że otrzymane wyniki badań stanowią ważny element w zrozumieniu zjawisk koloidalnych i międzyfazowych kluczowych dla przedmiotu badań z zakresu nauk chemicznych a także nauk o żywności i żywieniu. W szczególności pogłębiają one wiedzę na temat trawienia zemulgowanych triacylogliceroli w kontekście różnych proporcji BS i PL. Kompleksowy charakter tych badań został podkreślony w szczegółowym badaniu interakcji między BS i PL na granicy faz olej-woda oraz ich wpływu na lipolizę. Mgr Kłosowska wykazała m.in., że BS i PL synergistycznie obniżają napięcie powierzchniowe na granicy faz olej-woda podczas lipolizy; BS znacznie łatwiej desorbują się z powierzchni międzyfazowej olej-woda w porównaniu do PL; stosunek molowy BS/PL-9:4 okazał się optymalny dla skutecznej lipolizy jelitowej triacylogliceroli; obecność/stężenie żółciowych PL powinna być uwzględniana w lipolizie *in vitro* symulującej warunki układu pokarmowego człowieka. Tutaj nasuwa się pytanie do dyskusji podczas publicznej obrony: w jakim obszarze można wskazać na możliwości praktycznego wykorzystania otrzymanych wyników.

Wyniki eksperymentów dotyczących proteolizy Kandydatka zawarła w rozdziale 4.3. W tym kolejnym etapie badań Doktorantka przeprowadziła badania izolatu białek serwatkowych w aspekcie wpływu stosunku BS/PL na jego proteolizę. Mgr Kłosowska wykazała, że szybkość trawienia WPI zależy od stosunku BS/PL. W przypadku WPI zakres trawienia β -Lg bez żadnych biosurfaktantów był porównywalny z trawieniem obserwowanym przy najniższej ilości dodatku PL (BS/PL-9:4). W przeciwieństwie do tego, wynik różnił się w przypadku trawienia wyizolowanej β -Lg, gdzie biosurfaktanty w stężeniach fizjologicznych (β -Lg-BS/PL-9:4) wykazywały wzmocniony efekt. Dodatkowo Doktorantka wskazuje, że konieczne są dalsze badania w celu wyjaśnienia interakcji

między cząsteczką β -Lg, jej fragmentami i powierzchniowo czynnymi składnikami soli żółciowych.

Tutaj nasuwa się kolejne pytanie do dyskusji podczas publicznej obrony: (i) gdzie znajdują się wykazy zidentyfikowanych sekwencji peptydów np. unikatowych sekwencji 85 peptydów uwolnionych po 2 godzinnym trawieniu WPI przy stosunku BS/PL 9:4 czy lista peptydów wykorzystanych do badań przy użyciu bazy MBPDB oraz końcowa lista zidentyfikowanych 39 peptydów; (ii) w jakich badaniach: *in vitro*, *in silico* czy *in vivo* wykazana była biologiczna aktywność dla 39 zidentyfikowanych peptydów;

Podsumowaniem pracy jest rozdział 5. Zawarte tam stwierdzenia mają odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach badań. Najważniejsze ustalenia dotyczą np.: określenia fizjologicznego stosunku biosurfaktantów żółciowych na poziomie 9 mM BS do 4 mM PL u zdrowych osób; wykazania synergistycznego efektu BS i PL (w stosunku 9:4), w aspekcie wydajności lipolizy triacylogliceroli, w porównaniu do innych proporcji środków powierzchniowo czynnych z żółci; wykazania korelacji między stopniem trawienia *in vitro* emulsji triacylogliceroli a zmianami napięcia powierzchniowego podczas lipolizy np. w aspekcie desorpcji w zależności od stężenia PL; wykazania wpływu PL na szybkość trawienia β -Lg; wykazania, że profil peptydowy uzyskany po trawieniu β -Lg w fizjologicznie istotnych stężeniach tj. przy stosunku BS/PL 9:4 różni się od profilu trawienia bez biosurfaktantów, z większą liczbą biologicznie aktywnych peptydów uwolnionych w fizjologicznie istotnych warunkach w porównaniu do próbki kontrolnej.

Wysoki poziom naukowy dysertacji Pani mgr Katarzyny Kłosowskiej sprawił, że dodatkowo chciałabym poprosić Doktorantkę o rozważenie następujących zagadnień podczas dyskusji: (i) jakie czynniki mogą mieć wpływ na obserwowane obecnie trendy w analizie składników bioaktywnych żywności; (ii) w jakim obszarze badania zainicjowane przez Doktorantkę mogą być kontynuowane ?

Wniosek końcowy

Moje uwagi/pytania zawarte w recenzji mają głównie charakter komentarzy i sugestii odnośnie ewentualnych dalszych analiz bogatego materiału zgromadzonego w ramach pracy. Reasumując dysertację oceniam wysoko, doceniam jej oryginalność, trud wniesionej pracy, dociekliwość, konsekwencję, prawidłowo zaplanowaną część metodyczną, merytoryczną dyskusję odniesioną do wyników innych autorów, prawidłowe wnioskowanie oraz walory estetyczne. Uwzględniając wymagania stawiane rozprawom doktorskim należy w przypadku dysertacji mgr Katarzyny Kłosowskiej stwierdzić, że: przedstawiona rozprawa doktorska prezentuje gruntowną wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie chemii lipidów i białek. Doktorantka posiada bardzo dobre rozeznanie w krajowej i światowej literaturze związanej z prowadzonymi badaniami. Doktorantka wykazała się umiejętnościami samodzielnego prowadzenia badań

naukowych. Dysertacja mgr K. Kłosowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu zdefiniowanego w tytule oraz w celu rozprawy.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej mgr K. Kłosowskiej stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja stanowi w pełni oryginalne i wartościowe rozwiązanie problemu badawczego, spełnia wymagania formalne stawiane pracom doktorskim, jak również stanowi osiągnięcie naukowe odpowiadające wymaganiom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm). Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kłosowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

H. Dąbrowski