

Prof. dr hab. Józefa Chrzanowska  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

### Recenzja

**rozprawy doktorskiej Moniki Anny Pliszki pt. „Charakterystyka i identyfikacja biologicznie aktywnych produktów hydrolizy białek owsa (*Avena sativa* L.) w aspekcie profilaktycznego działania w chorobach zespołu metabolicznego” wykonanej w Katedrze Biochemii Żywności Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Darewicz i dr inż. Justyna Borawska-Dziadkiewicz, jako promotora pomocniczego**

### Dobór i znaczenie tematu

Dynamiczny wzrost wśród społeczeństw wielu krajów zachorowalności na różnego typu schorzenia dieto zależne, jak otyłość, cukrzyca typu 2, choroby układu naczyniowo-sercowego czy nowotwory wymusza podjęcie intensywnych działań profilaktycznych, polegających głównie na propagowaniu zmiany trybu życia oraz diety. W profilaktyce tych chorób istotną rolę mogą odgrywać składniki żywności lub produkty jej degradacji w przewodzie pokarmowym, które przejawiają zdolność oddziaływania na procesy fizjologiczne naszego organizmu. Do takich składników żywności można zaliczyć aktywne biologicznie peptydy uwalniane z białek w wyniku enzymatycznej ich hydrolizy, która ma miejsce zarówno w warunkach *in vivo* w przewodzie pokarmowym, jak również w warunkach *in vitro* w procesach prowadzonych w skali przemysłowej. Peptydy te mogą przejawiać różną aktywność biologiczną, w tym antyoksydacyjną, antymikrobiologiczną, opioidową czy antynowotworową. Ich bioaktywność związana może być też ze zdolnością hamowania niektórych enzymów uczestniczących w ważnych procesach fizjologicznych, jak konwertaza angiotensyny I,  $\alpha$ -glukozydaza, amylaza, peptydaza dipeptydylowa DPP-4 czy

endopeptydaza prolilowa. Enzymy te mogą przyczyniać się do rozwoju nadciśnienia, cukrzycy czy też schorzeń neurodegeneracyjnych.

Potencjał białek żywnościowych jako prekursorów takich peptydów jest bardzo zróżnicowany, a jego ocena wymaga eksperymentalnej weryfikacji.

Podjęta więc przez Doktorantkę tematyka badawcza dotycząca oceny możliwości pozyskiwania z białek, pochodzących z mało jeszcze wykorzystywanego pod tym kątem źródła, jakim są ziarniaki owsa, bioaktywnych peptydów, w tym szczególnie ważnych z punktu widzenia profilaktyki zespołu metabolicznego, jest niezwykle aktualna, ważna i potrzebna.

### **Ocena strony formalnej rozprawy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Anny Pliszki obejmuje 258 strony tekstu, z których 26 przypada na spis literatury przedstawionej w porządku alfabetycznym, ale bez numeracji. Jest to literatura niezwykle bogata, która w większości pochodzi z ostatniej dekady lat. Układ pracy jest klasyczny, składa się ona z siedmiu głównych rozdziałów (przegląd piśmiennictwa, cel pracy, materiały i metody, omówienie i dyskusja wyników, oraz podsumowanie, stwierdzenia i wnioski końcowe, a także literatura i załączniki zawarte na 76 stronach w postaci 7 bardzo rozbudowanych tabel zawierających szczegółowe wyniki badań. Ponadto, w pracy zamieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim oraz objaśnienie używanych w tekście rozprawy skrótów i symboli. Uzyskane w toku realizacji badań wyniki zostały przedstawione w formie 17 tabel i 15 rysunków. Szkoda jednak, że w pracy nie podano ich spisu, co ułatwiłoby czytelnikowi szybsze odnajdywanie w pracy określonego dokumentu. Wyciągnięte na podstawie badań wnioski zawarto w podsumowaniu pracy. Tytuł rozprawy dobrze oddaje treść i zakres wykonanych badań. Od strony edytorskiej praca jest bardzo dobrze przygotowana.

### **Ocena merytoryczna rozprawy**

Pierwszy rozdział pracy zatytułowany „Przegląd piśmiennictwa” liczy 34 strony. Rozdział ten jest złożony z siedmiu podrozdziałów, zatytułowanych: 1. Wstęp, 2. Owies- informacje wstępne, 3. Charakterystyka ziarniaków owsa, 4. Białka żywności jako prekursorzy

biologicznie aktywnych peptydów, 5. Peptydy pochodzące z białek żywności w profilaktyce zespołu metabolicznego, 6. Metody komputerowe w badaniu białek i peptydów żywności 7. Metody trawienia INFOGEST. W mojej opinii liczba tych podrozdziałów jest dość duża, można by było ją ograniczyć do czterech zasadniczych, łącząc trzy pierwsze z nich pod hasłem charakterystyki surowca i jego białek i przenosząc 7. podrozdział częściowo do rozdziału zawierającego opisy metod badawczych, a częściowo do dyskusji. Moja uwaga ma *de facto* charakter techniczny i nie wpływa na odbiór treści merytorycznej tego rozdziału, co do której nie mam zastrzeżeń. Rozdział ten stanowi znakomity przegląd literatury dotyczącej zagadnień związanych z podjętą w pracy tematyką badawczą. Doktorantka na wstępie opisała w nim znaczenie owsa jako zboża ważnego dla gospodarki wielu krajów na świecie oraz dokonała w nim pełnej charakterystyki jego białek. Szczególną uwagę poświęciła bioaktywnym peptydom pochodzącym z białek żywności, które są od lat wiodącym tematem badawczym jednostki, w której realizowała ona swoje badania. Omówiła biopeptydy przejawiające różne aktywności, a szczególnie te, które mogą mieć istotne znaczenie w prewencji syndromu metabolicznego. Przedstawiła również wykorzystanie metod komputerowych w analizie biopeptydów, a także sposób ich pozyskiwania metodą hydrolizy prowadzonej wg protokołu INFOGEST.

Do napisania tej części rozprawy Doktorantka wykorzystwała bogatą i bardzo aktualną literaturę źródłową, co potwierdza duży wkład jej pracy i znakomite przygotowanie się do podjęcia przedmiotowych badań.

W tak obszernym opracowaniu nie sposób jednak uniknąć pewnych niedociągnięć czy też pomyłek, jak np. na stronie 32, gdzie stwierdzono, że peptydy z dyni figolistnej wykazują zdolność hamowania  $\alpha$ -glukozydazy, gdy tymczasem chodzi o peptydy uwolnione z białek serwatkowych pod wpływem proteazy pozyskanej z tej dyni (cyt. Babij i in.2014). Inne niefortunne określenia to na stronie 33: „W hydrolizatach pochodzenia zwierzęcego...” lub „w hydrolizacie produktu ubocznego powstałego z żółtka jaja”, na stronie 48: „Otrzymane wyniki analizowano za pomocą metod elektroforetycznych, chromatograficznych...”.

W kolejnym rozdziale został przedstawiony cel badań, którym było scharakteryzowanie hydrolizatów i peptydów białek ziarniaków owsa, uwolnionych z nich w warunkach *ex vivo* i z wykorzystaniem układu hybrydowego *in silico* : *in vitro*, pod kątem ich właściwości fizykochemicznych i biochemicznych oraz aktywności biologicznych, szczególnie tych, które są istotne w hamowaniu enzymów sprzyjających rozwojowi zespołu metabolicznego.

Na podstawie przedstawionego celu Doktorantka postawiła 3 hipotezy badawcze, w których generalnie założyła, że wśród produktów prowadzonych procesów hydrolizy białek owsa ujawnią się peptydy o przewidywanych aktywnościach biologicznych o potencjalnym działaniu profilaktycznym w zespole metabolicznym, w tym peptydów hamujących DPP-IV, ACE i  $\alpha$ -glukozydazę oraz peptydów przeciwutleniających. Moim zdaniem można było sformułować jedną hipotezę ujmującą treści zawarte w 3 punktach/hipotezach.

W następnym rozdziale, pt. „Materiały i metody” Doktorantka wychodząc od przedstawienia schematu całego doświadczenia opisała stosowane w pracy metody badawcze. Na uznanie zasługuje bardzo szeroki program badań zaprojektowanych w sposób niezwykle kompleksowy, obejmujący prowadzenie hydrolizy pozyskanego z ziarniaków owsa substratu białkowego zarówno w warunkach *ex vivo*, jak i *in vitro*, a także włączający analizę *in silico*, dzięki której możliwa była ocena na podstawie struktury pierwszorzędowej białek ich potencjału jako prekursorów biopeptydów, jak również w warunkach symulowanej hydrolizy z wykorzystaniem najważniejszych enzymów trawiennych wskazanie na możliwość uwalniania z ich sekwencji takich produktów.

W programie swoich badań Doktorantka konsekwentnie wydzieliła 3 etapy, które zatytułowała: etap badań wstępnych, etap badań *in silico* i etap badań *in vitro*. Dlatego też przyjęła konwencję opisu zadań badawczych, a nie grupowania wykorzystywanych w całej pracy metod badawczych. Niewątpliwie taka forma może być bardziej dogodna przy przygotowywaniu na podstawie rozprawy publikacji naukowych. Dla czytelnika jest jednak czasami trudniejsza, gdyż wymaga szukania opisu określonej metody w innych podrozdziałach tej części pracy doktorskiej. Niemniej ilość jak i różnorodność metod stosowanych przez Doktorantkę jest imponująca. W toku badań wykorzystywała metody preparatywne, analityczne, bioinformatyczne oraz bardzo nowoczesne techniki analizy instrumentalnej, jak wysokosprawna chromatografia cieczowa z odwróconymi fazami sprzężona z spektrometrią mas (LC-MS/MS) z dwoma detektorami tj. z pułapką jonową LC-IT-MS/MS oraz z kwadrupolowym analizatorem czasu przelotu (LC-Q-TOF-MS/MS). Potwierdza to, że znakomicie opanowała ona bardzo szeroki warsztat badawczy. Świadczy to też o jej wielkim zaangażowaniu i pracowitości.

Do tej części rozprawy mam tylko jedną uwagę, która dotyczy nie najtrafniejszego sformułowanie podtytułu 3. 5 Metody laboratoryjne, lepiej byłoby użyć określenia metody analityczne .

Rezultaty przeprowadzonych badań zostały przez Doktorantkę wnikliwie omówione w kolejnym, liczącym 66 stron, rozdziale zatytułowanym „Omówienie i dyskusja wyników”. Dokumentacja badań została bardzo starannie przedstawiona w formie 17 tabel oraz 15 rysunków. We wstępnym etapie badań Autorka przeprowadziła hydrolizę białek owsa w warunkach symulowanego układu trawiennego z wykorzystaniem ludzkich soków trawiennych. Badania te realizowane w warunkach *ex vivo* mają bardzo nowatorski charakter, a ich rezultaty są najbardziej zbliżone do stanu mającego miejsce w warunkach przewodu pokarmowego człowieka *in vivo*. W ich wyniku Doktorantka stwierdziła w otrzymanych hydrolizatach tak po etapie trawienia określonego jako „żołądkowy” jak i „żołądkowo - jelitowy” aktywność inhibitorową wobec konwertazy angiotensyny I. W drugim etapie badań prowadzonych *in silico* z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych dostępnych w bazie BIOPEP -UWM (stworzonej przez zespół pracowników macierzystej jednostki Doktorantki i szeroko wykorzystywanej przez naukowców w całym świecie) i korzystając z dostępnych programów komputerowych Autorka wykazała w strukturze pierwszorzędowej 115. białek owsa sekwencje potencjalnych biopeptydów zarówno przeciwutleniających, jak i hamujących aktywność enzymów DPP-IV i ACE i określiła częstość ich występowania. Stwierdziła przy tym zróżnicowaną liczbę takich sekwencji wśród poszczególnych białek. Przeprowadzona następnie hydroliza *in silico* globulin i innych białek ziarniaków owsa pod wpływem samej pepsyny oraz następczego działania trzech proteaz: pepsyny, trypsyny i chymotrypsyny potwierdziła zmienną wśród tych białek zdolność do uwalniania aktywnych biologicznie peptydów o określonej bioaktywności.

Doktorantka prowadząc dalej badania nad hydrolizą białek owsa zastosowała protokół INFOGEST zaproponowany w ramach programu COST FA 105. Proces ten prowadziła w warunkach *in vitro*, ale symulujących procesy trawienne zachodzące w przewodzie pokarmowym człowieka, stosując w nim dwa komercyjne preparaty enzymatyczne pepsynę i Corolase PP (stanowiący mieszaninę enzymów trzustkowych świni). Ten etap badań stanowi dopełnienie dwóch pierwszych etapów, ale też weryfikuje uzyskane w nich rezultaty. W toku jego realizacji monitorowała przebieg hydrolizy wykorzystując w analizie hydrolizatów frakcjonowanie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie odwróconych faz RP-HPLC oraz rozdziały elektroforetyczne, w tym elektroforezę dwukierunkową, a także oznaczając w nich lub w ich frakcjach uzyskanych w wyniku frakcjonowania na membranach aktywność przeciwutleniającą oraz inhibitorową wobec enzymów: ACE, DPP-IV i  $\alpha$ -

glukozydazy. Badania te potwierdziły uwalnianie z białek ziarniaków owsa produktów o wymienionych aktywnościach na wszystkich etapach trawienia *in vitro*.

Finalnym etapem badań Doktorantki była identyfikacja w otrzymanych hydrolizatach wybranych na podstawie analizy *in silico* bioaktywnych peptydów. Prowadziła ją z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami sprzężonej spektrometrią mas z pułapką jonową (LC-IT-MS/MS) oraz z kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu (LC-Q-TOF-MS/MS). Pozwoliła ona zidentyfikować przy zastosowaniu tych technik odpowiednio 9 i 12 peptydów o aktywności hamującej DPP-IV i ACE i/lub aktywności przeciwutleniającej. Przeprowadzone badania potwierdzają istotne różnice w ocenie możliwości pozyskiwania biopeptydów z białek na drodze hydrolizy symulowanej i rzeczywistej.

Podsumowując część eksperymentalną pracy stwierdzam, że zakres wykonanych badań nad hydrolizą białek ziarniaków owsa prowadzoną w warunkach *ex vivo* oraz z wykorzystaniem układu hybrydowego obejmującego procesy *in silico* i *in vitro* był ambitny i bardzo szeroki. Uzyskane w trakcie ich realizacji wyniki potwierdzają, że Doktorantka całkowicie osiągnęła postawiony na wstępie pracy cel. Wyniki jej badań są bardzo cenne i stanowią ważne uzupełnienie zgromadzonej dotychczas wiedzy na temat biopeptydów uwalnianych z białek owsa.

Jednocześnie z omawianiem wyników badań Doktorantka prowadziła ich dyskusję na tle literatury światowej. W mojej ocenie korzystniej by było wydzielenie jej jako osobnego rozdziału. Niemniej jej poziom jest bardzo dobry, co jeszcze raz potwierdza znakomite jej rozeznanie w literaturze przedmiotu. Ta część pracy jak i pozostałe rozdziały napisane są bardzo dobrym językiem. W teście tego rozdziału zdarzają się tylko nieliczne niedociągnięcia jak np. w cytowaniu literatury (str.78 zamiast: Iwaniak i in. 2018; Iwaniak i in. 2018 – powinno być Iwaniak i in. 2018 a,b) lub pominięcie w wykazie literatury cytowanej na str. 114 pozycji – Bidasolo i in.2012 , czy też niepoprawne sformułowania jak na stronie 122 : „Preferencyjnie rozszczepia ona C-koniec po Phe i Leu” – lepiej: enzym preferencyjnie rozszczepia wiązanie peptydowe -utworzone od strony grupy karbonylowej przez Phe j Leu lub -po C-końcowej stronie Phe i Leu.

Rozdział 5. rozprawy stanowi jej podsumowanie. Nosi on złożony tytuł „Podsumowanie, stwierdzenia i wnioski końcowe”. Zawarte są w nim fragmenty o charakterze streszczenia pracy, dyskusji (z cytowaniem literatury) oraz właściwych wniosków przedstawionych w 10



punktach. Uważam, że w podsumowaniu rozprawy wystarczające jest wypunktowanie konkretnych wniosków. Niektóre z nich jak np. wniosek 7 jest mało precyzyjny. Niemniej pozostałe wnioski są jednoznacznie sformułowane i w pełni znajdują uzasadnienie w wynikach uzyskanych w toku badań. Potwierdzają one też wysoką wartość poznawczą pracy, a także wskazują na możliwość ich praktycznego wykorzystania.

### **Wniosek końcowy**

W podsumowaniu przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Anny Pliszki pt. „Charakterystyka i identyfikacja biologicznie aktywnych produktów hydrolizy białek owsa (*Avena sativa* L.) w aspekcie profilaktycznego działania w chorobach zespołu metabolicznego” stwierdzam, że moja ocena jest w pełni pozytywna. Wartość naukowa tej rozprawy jest bardzo wysoka. Stanowi ona oryginalne i bardzo wartościowe dzieło, którego wyniki przyczyniają się do istotnego poszerzenia wiedzy na temat aktywnych biologicznie peptydów pochodzących z białek żywnościowych. Rozprawa ta w całej rozciągłości spełnia wymogi stawiane dysertacjom doktorskim określone w art.13 ust.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U., Nr 65, poz.595, z p.zm.).

Zwracam się zatem z wnioskiem do Wysokiej Rady Dyscypliny Technologii Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Moniki Anny Pliszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, uwzględniając wysoką wartość naukową dysertacji, jej nowatorski charakter oraz niezwykle zaangażowanie i samodzielność badawczą Doktorantki, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Technologii Żywności i Żywnienia z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Anny Pliszki.

Wrocław, 17.12. 2019 r.

