

prof. dr hab. Waldemar Gustaw

Katedra Technologii Surowców Pochodzenia Roślinnego i Gastronomii

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr inż. Moniki Anny Pliszka**

### **pt. „Charakterystyka i identyfikacja biologicznie aktywnych produktów hydrolizy białek owsa (*Avena sativa* L.) w aspekcie profilaktycznego działania w chorobach zespołu metabolicznego”**

Owies siewny (*Avena sativa* L.), należy do rodziny wiechlinowatych (*Poaceae*), jest jednym z najpopularniejszych zbóż uprawianych na świecie. Do niedawna owies był zbożem typowo pastewnym, jednak w ostatnich latach wykorzystania ziarna na cele konsumpcyjne w krajach Unii Europejskiej znacznie wzrosło. Większe zainteresowanie ziarnami owsa wynika z powszechnego zainteresowania konsumentów racjonalnym żywieniem a co jest z tym związane poszukiwaniem produktów zawierających substancje o działaniu prozdrowotnym. W przypadku ziaren owsa największą uwagę zwracamy na zawarty w nich błonnik, a w szczególności jego frakcje rozpuszczalne np. beta glukany. Jednak owies jest również źródłem tłuszczów, witamin, minerałów i białka. Wysoka wartość odżywcza jak również obniżona alergenicność białek ziarniaków owsa sprawiają, że cieszą się one coraz większym zainteresowaniem świata naukowego. Jednym z kierunków badań naukowych jest otrzymywanie bioaktywnych peptydów z białek owsa, które mogą być wykorzystywane jako inhibitory enzymów przyczyniających się do powstania zespołu metabolicznego. Białka roślinne wprawdzie nie są tak dobrym źródłem bioaktywnych peptydów jak białka zwierzęce, jednak niższe koszty produkcji surowców roślinnych oraz większa ich dostępność sprawiają, że białka owsa mogą być atrakcyjne zarówno dla badań naukowych jak i ewentualnego

wykorzystania praktycznego. Tematyka podjęta przez Panią mgr inż. Monikę Pliszka w ocenianej pracy doktorskiej bardzo dobrze wpisuje się w ten nurt badań.

Przedstawiona do oceny rozprawa naukowa obejmuje 258 stron i składa się z 6 rozdziałów, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz załączników. Tytuł pracy został sformułowany poprawnie i został zrealizowany w zaplanowanych badaniach. W rozdziale liczącym 34 strony, zatytułowanym „Przegląd Literatury”, Autorka zawarła aktualne informacje o uprawie owsa na świecie, opisała poszczególne składniki ziarniaków owsa, białka jako prekursorzy bioaktywnych peptydów oraz potencjalne wykorzystanie biologicznie aktywnych peptydów w profilaktyce zespołu metabolicznego. W podrozdziale tym Doktorantka szczegółowo opisała, opierając się na najnowszej literaturze, peptydowe inhibitory: dipeptydylopeptydazy IV (DPP-IV),  $\alpha$ -glukozydazy, enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE) oraz peptydy przeciwutleniające. W drugiej części rozdziału Doktorantka scharakteryzowała metody komputerowe wykorzystywane w badaniach białek i peptydów żywności. Metody bioinformatyczne, coraz powszechniej stanowią podstawowy warsztat badawczy naukowców, ze względu na niskie koszty ich stosowania połączone z dużą skutecznością przewidywania obecności, profilowania i selekcji bioaktywnych peptydów. Ostatni podrozdział „Przeglądu literatury” Autorka poświęciła najnowszym metodom stymulowanego trawienia w organizmie człowieka w warunkach *in vitro*. Podsumowując tą część dysertacji doktorskiej, mogę stwierdzić, że rozdział przygotowano w oparciu o bardzo liczne pozycje literatury, w zdecydowanej większości opublikowane w ostatnich latach w indeksowanych czasopiśmie zagranicznych. Rozdział „Przegląd Literatury” jest dobrym wprowadzeniem w tematykę podjętą w części doświadczalnej pracy doktorskiej, jednak Autorka nie ustrzegła się w nim pewnych niedociągnięć:

- brak jednolitego systemu wstawiania odnośników do cytowanych prac które ukazały się w tym samym roku i mają tego samego pierwszego autora np. Udenigwe 2014a – str. 18, natomiast w spisie literatury nie ma takiej pozycji, natomiast Zhang i in. 2016 (str. 31) może być odnośnikiem do dwu pozycji w spisie literatury,

- brak roku przy cytowaniu pracy Sykut -Domańska – str. 19,

- brak pozycji Sharma i in. 2015, Soni i Soman, 2018 (str. 29); Sell i in. 2013 (str. 30), Kumar i in. 2011, Lee i in. 2002 (str. 33); Garcia i in. 2013 (str. 36); Tovar-Perez i in. 2017 (str. 39), Lipiński i in. 1997 (str. 40) – w spisie literatury;

- aktywność hamowania  $\alpha$ -glukozydazy zamiast „ $\alpha$ -glukozydazę” (str. 33),
- Kou i in. 2013 zamiast „Kou, Gao i in. 2013”,

Cel główny pracy został sformułowany poprawnie i klarownie sprecyzowany. W rozdziale „Cel pracy” Doktorantka szczegółowo opisała poszczególne etapy realizacji celu głównego a następnie sformułowała trzy hipotezy badawcze.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka opisała materiał badawczy oraz zastosowane metody analityczne. Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr inż. Monika Pliszka wykorzystwała w trakcie wykonywania pracy doktorskiej bardzo szerokie spektrum metod badawczych. Badania przeprowadzono w warunkach *ex vivo* oraz z wykorzystaniem modelu hybrydowego *in silico: in vitro*. Uzyskane wyniki Autorka poddała analizie statystycznej.

Podczas pisania tego rozdziału, Doktorantka nie ustrzegła się pewnych drobnych błędów:

- brak źródła pochodzenia niektórych odczynników wykorzystanych w badaniach w rozdziale „Etap badań wstępnych”,
- podanie parametrów wirowania w rpm (str. 53),
- niezrozumiały zapis „dodawano 0,05 białka s ml substratu pNPG” (str.64)
- brak następujących pozycji w spisie literatury, które wykorzystywano tym rozdziale, w: Ma 2013; Sanchez-Chiang i in. 1987, Minkiewicz i in. 2004; Zhang i in. 2017; Sulistiyani i in. 2016; Dawidowicz i Olszowy 2011; Kyte i Doolittle 1982; Krokhin 2006; Spicer i in. 2007 .

Główną część rozprawy doktorskiej, czyli rozdział „Omówienie i Dyskusja Wyników”, Autorka podzieliła na podrozdziały zgodnie z wcześniej zaproponowanym układem doświadczenia. To najdłuższy i jednocześnie najciekawszy rozdział rozprawy doktorskiej. Na 80 stronach Doktorantka szczegółowo opisała poszczególne etapy badań, uzyskane wyniki i udokumentowała je licznymi tabelami i wykresami. Niektóre podrozdziały Pani mgr inż. Monika Pliszka poprzedzała wstępem teoretycznym, który wprowadzał czytelnika w tematykę badań jednak w opinii recenzenta niektóre z tych informacji powinny znaleźć się w rozdziale Przegląd Literatury (podrozdział 4.2).

W pierwszej części tego rozdziału Doktorantka podjęła nowatorskie badania nad otrzymywaniem peptydów hamujących ACE z białek ziarniaków owsa podczas symulowanego trawienia *ex vivo* w układzie pokarmowym człowieka we współpracy z Norwegian University

of Life Sciences w Ås. Największy stopień hamowania aktywności konwertazy angiotensyny uzyskała w próbie poddanej trawieniu żołądkowo-jelitowemu.

Wykorzystując analizy *in silico* Doktorantka dokonała komputerowej symulacji umiejscowienia biologicznie aktywnych fragmentów w sekwencjach wybranych białek ziarniaków owsa oraz umiejscowienia wiązań peptydowych podatnych na działanie enzymów o określonej specyficzności. Wykorzystane przez Doktorantkę narzędzia bioinformatyczne wykazały, że wszystkie wybrane przez Doktorantkę białka ziarniaków owsa mogą być źródłem peptydów inhibitorów DPP-IV i ACE oraz peptydów przeciwutleniających, co potwierdziła symulowana hydroliza *in silico* w układach: „żołądkowym” i „żołądkowo-jelitowym”.

W ostatnim etapie pracy Doktorantka przeprowadziła badania hydrolizy białek ziarniaka owsa w układzie *in vitro*. Zastosowała w tym celu uznany w świecie naukowym model INFOGEST. Przebieg stymulowanego procesu trawienia w warunkach *in vitro* Doktorantka wielokierunkowo analizowała, oznaczając zawartość białka niezhydrolizowanego, stosując rozdziały elektroforetyczne oraz chromatograficzne RP-HPLC. Produkty otrzymane po hydrolizie poddała obszernej charakterystyce pod kątem ich aktywności biologicznej. W związku z tym etapem badań nasuwa się pytanie o fragmenty białek o masie cząsteczkowej powyżej 3 kDa. Jaka jest zależność pomiędzy masą cząsteczkową aktywnością biologiczną peptydów.

Przebadane fragmenty po hydrolizie enzymatycznej zidentyfikowano z wykorzystaniem nowoczesnych technik tj. chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami sprzężonej ze spektrometrią mas z pułapką jonową (LC-IT-MS/MS) oraz chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami sprzężonej ze spektrometrią mas z kwadrupelem i analizatorem czasu przelotu (LC-Q-TOF-MS/MS).

Podsumowując ocenę rozdziału pt. „Omówienie i Dyskusja Wyników”, należy zwrócić uwagę na dużą pracowitość przeprowadzonych badań przy wykorzystaniu nowoczesnych technik analitycznych oraz komplementarność wyników badań otrzymanych w warunkach *in silico* oraz *in vitro*. Wyniki badań zostały dobrze opisane, z dużą umiejętnością właściwej ich interpretacji. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Autorki do analizy rezultatów badań własnych. Doktorantka trafnie odnosi własne osiągnięcia do cytowanej literatury, co potwierdza dobrą orientację w analizowanych zagadnieniach badawczych. Za pewne niedociągnięcie można uznać brak wyraźnie oddzielonej dyskusji wyników.

Inne drobne niedociągnięcia to np.:

- brak kilku pozycji literatury, wykorzystywanych tym rozdziale, w spisie literatury m.in.: Dziuba i in. 2003 oraz Dziuba i in. 1999 (str. 76); Daliri i in. 2017 (str. 77); Piovesane i in. 2018 (str. 78).

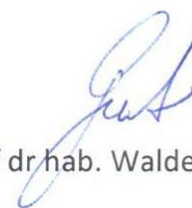
W końcowej części rozprawy Doktorantka przedstawiła 10 szczegółowych stwierdzeń i wniosków, dotyczących najważniejszych wyników uzyskanych w pracy. Stwierdzenia i wnioski uwypuklają najważniejsze wyniki uzyskane w pracy.

Ostatni rozdział to poprawnie przygotowany spis literatury, obejmujący ponad 400 pozycji. W zdecydowanej większości cytowane prace to artykuły anglojęzyczne z ostatnich lat, bezpośrednio powiązane z tematyką pracy doktorskiej. Tak ogromna baza literaturowa z jakiej korzystała Doktorantka potwierdza aktualność prowadzonych przez nią badań i duży nakład pracy włożony przez Panią mgr w przygotowanie dysertacji.

#### Podsumowanie

Oceniając merytorycznie przedłożoną do recenzji pracę doktorską mgr inż. Moniki Pliszka stwierdzam, że Autorka wykazała się dobrą znajomością podjętej tematyki badań. Odpowiednio zaplanowała i wykonała doświadczenia, wykazując się umiejętnością posługiwania bardzo szerokim spektrum nowoczesnych metod badawczych zarówno bioinformatycznych jak i analitycznych, uzyskując wartościowe wyniki. Bogate piśmiennictwo, kompletność wyników oraz ich właściwa interpretacja świadczą o pracowitości i dojrzałości naukowej Autorki pracy. Rozprawa napisana jest poprawnym językiem i została przejrzystie skomponowana. Wymienione w recenzji drobne uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej, a jedynie wskazują niedociągnięcia, które należałoby skorygować w przygotowywaniu pracy do druku. Uważam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa Pani mgr inż. Moniki Piszka pt. „Charakterystyka i identyfikacja biologicznie aktywnych produktów hydrolizy białek owsa (*Avena sativa* L.) w aspekcie profilaktycznego działania w chorobach zespołu metabolicznego”, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595, z późn. zm.). Dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Piszka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na duży potencjał publikacyjny ocenianych badań,

ich aktualność oraz zastosowanie przez Doktorantkę bogatego spektrum metod badawczych, wnioskuje o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Gust', written in a cursive style.

prof dr hab. Waldemar Gustaw