

Lublin, 16.10.2023 r.

prof. dr hab. Michał Świeca
Katedra Biochemii i Chemii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Iwony Majewskiej ”Związki fenolowe wchmielin jako inhibitory enzymów glikolitycznych”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Anny Podśątek prof. uczelni

Podstawa prawna: Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z póź. zm.), Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. (Dz.U. 2018 poz. 261) oraz przepisami wprowadzającymi ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018 poz. 1669 z póź. zm.).

Podstawą opinii jest pismo dr hab. inż. Edyty Kordialik-Bogackiej Prodziekan ds. Kształcenia Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej z dnia 27-07-2023.

Ocena formalna pracy i uzasadnienie podjęcia badań w temacie

Podstawę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Iwony Majewskiej ”Związki fenolowe wchmielin jako inhibitory enzymów glikolitycznych” stanowi opracowanie monograficzne o strukturze typowej dla rozpraw doktorskich. Dysertacja rozpoczyna się spisem treści, który z pewnością ułatwia nawigację po obszernej 143 stronicowej pracy. Kolejne jej części to streszczenie w języku polskim oraz angielskim, które w syntetyczny sposób wprowadzają w problematykę badawczą oraz podsumowują najważniejsze osiągnięcia projektu doktorskiego. W rozdziale Wstęp teoretyczny Doktorantka dokonuje szczegółowej charakterystyki procesu

trawienia węglowodanów z uwzględnieniem roli poszczególnych enzymów. Kolejno omawiane są zagadnienia związane z farmakologicznym wykorzystaniem inhibitorów α -amylazy i α -glukozydazy, potencjalnych aplikacji polifenoli jako substancji modyfikujących biodostępność węglowodanów oraz finalnie przedstawiona jest wnikliwa ocena szyszek chmielu i wchmielin będących źródłem substancji bioaktywnych. Część doświadczalną poprzedza jasno postawiona hipoteza badawcza oraz cele projektu mające pozwolić na jej weryfikację. Następnie Aplikantka kolejno wprowadza w metodologię badań przedstawioną w sposób szczegółowy i pozwalający na odtworzenie eksperymentów. W kolejnych dwóch rozdziałach (Wyniki oraz Dyskusja) Doktorantka przedstawia wyniki badań (24 wykresy i 13 tabel) i dokonuje ich oceny oraz konfrontuje je z danymi literaturowymi. Ta część dysertacji jest bardzo rozległa i obejmuje ponad 65 stron maszynopisu. W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę, że ryciny 18-23 przedstawiające rozdziały chromatograficzne mogłyby zostać umieszczone w Aneksie nie zaś w głównej części pracy, biorąc pod uwagę, że analiza ilościowo-jakościowa została następnie przedstawiona w tabelach. Całość projektu doktorskiego została podsumowana w formie 8 wniosków. Kolejne części dysertacji stanowią rozdziały Bibliografia (335 pozycji), Spis Tabel, Spis Rysunków, Wykaz skrótów oraz załączniki widm absorpcji i widm masowych wybranych związków polifenolowych. Na szczególne podkreślenie zasługuje syntetyczny, a jednocześnie wyczerpujący i wnikliwy sposób przedstawienia danych literaturowych w Przeglądzie teoretycznym. Generalnie, dysertacja została napisana w sposób przemyślany, drobne błędy interpunkcyjne i edytorskie nie wpływają na wartość merytoryczną opracowania.

Zagadnienia związane z metabolizmem i biodostępnością węglowodanów wpisują się w nurt naukowy poszukujących nowych możliwości prewencji i/lub leczenia cukrzycy i otyłości. Jedną ze strategii pozwalających na obniżania glikemii poposiłkowej jest zmniejszenie poziomu hydrolizy skrobi poprzez hamowanie aktywności enzymów trawiennych, w tym α -glukozydazy i α -amylazy. Doktorantka, waliduje w tym celu wchmieliny będące surowcem odpadowym, co idealnie wpisuje się w założenia gospodarki bezodpadowej. Krytyczne podejście do tematu, zaprezentowane w tej dysertacji, jest niezwykle istotne i nie tylko dostarcza nowej wiedzy, ale także pozwala na zweryfikowanie/porównanie dotychczasowych wyników badań w zakresie tematu. Tym samym, w mojej ocenie, projekt doktorski wnosi istotny wkład do rozwoju technologii żywności i żywienia oraz badań nad prewencją tzw. chorób cywilizacyjnych.

Ocena merytoryczna pracy wraz z odniesieniem się do wymagań Ustawy stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora

Hipoteza badań zakładała, że właściwości inhibicyjne związków fenolowych pochodzących z wychmielin są zależne od źródła pochodzenia enzymów glikolitycznych oraz od rodzaju użytych substratów. Zgodnie z przyjętymi zasadami, w rozdziale Wstęp teoretyczny Pani Majewska wprowadza w tematykę badań, uzasadnia potrzebę podjęcia tematu oraz wskazuje potencjalne problemy metodyczne w badaniach inhibicji enzymów glikolitycznych. Ta część dysertacji rozpoczyna się od wnikliwej charakterystyki skrobi, będącej głównym źródłem węglowodanów w diecie. Doktorantka podkreśla, że właściwości odżywcze skrobi powiązane są z szybkością uwalniania glukozy, która to jest determinowana strukturą polisacharydu oraz obecności czynników mogących modyfikować aktywność układu enzymatycznego (polifenole, białkowe inhibitory hydrolaz). Przedstawia w tym miejscu również, istotny z punktu widzenia dietytyki, podział skrobi na frakcje szybko i wolno dostępne (RDS i SDS) oraz skrobię oporną (RS). W tym miejscu pewne wątpliwości budzi opis skrobi odpornej, która jest definiowana jako frakcja nieulegająca rozkładowi po 120 min trawienia (strona 12). Stanowi to pewne uproszczenie, wynikające prawdopodobnie z protokołu zaproponowanego przez Englyst i współpracowników, gdyż obecnie rekomendowane procedury definiują skrobię oporną jako frakcje nie ulegające hydrolizie w obecności α -amylazy trzustkowej i amyloglukozydazy (AMG) przez 16 h w 37°C. Kolejne dwa podrozdziały obejmują klasyfikację i charakterystykę enzymów rozkładających węglowodany oraz studium literaturowe dotyczące inhibicji procesu trawienia skrobi. Doktorantka kolejno omawia poszczególne grupy enzymów, analizuje mechanizmy ich działania na poziomie molekularnym oraz wskazuje potencjalnych „kandydatów” do terapii przeciwożyłościowej. Na uwagę zasługują tu informacje dotyczące fizjologicznej aktywności α -amylazy ślinowej w obrębie żołądka, która to zwykle jest pomijana w uproszczonych modelach trawienia *in vitro* m.in. tych zaproponowanych przez Infogest (strona 14). Z drugiej strony nie jest jasnym, w jaki sposób rodzaj diety może wpłynąć na ilość kopi genów AMY1 - prawdopodobnie ma tu miejsce niefortunne uproszczenie (strona 14). Drugi ze wspomnianych rozdziałów systematyzuje wiedzę z zakresu substancji stosownych farmakologicznie w inhibicji α -amylaz j i amyloglukozydaz, roślinnych inhibitorów

enzymów glikolitycznych oraz potencjalnego zastosowania polifenoli. Chciałbym tu podkreślić, że jest to kompleksowe opracowanie, które systematyzuje i w sposób krytyczny analizuje dotychczasowe badania w tym zakresie. W mojej ocenie, tak przygotowany przegląd literaturowy powinien stać się podstawą publikacji przeglądowej. Autorka analizuje aktywności antyamylazowe i antyamyloglukozydowe ekstraktów roślinnych w różnych układach enzym-substrat podkreślając rolę jaką odgrywa dobór źródła enzymu i substratów w rzetelnej ocenie bioaktywności. Na podkreślanie zasługuje również część opisująca wpływ struktury flawonoidów na zdolność do wiązania się z cząsteczkami białek enzymatycznych (kolejne opracowanie przeglądowe). Finalna część przeglądu literatury obejmuje charakterystykę szyszek chmielu i wychmielin stanowiących strumień boczny w technologii przetwórstwa szyszek chmielowych. Część ta dokonuje analizy składu, z szczególnym naciskiem na frakcję polifenolową oraz dotychczasowe aplikacje tego surowca odpadowego (istotne w erze „zero waste”) w rolnictwie, żywieniu człowieka i zwierząt. Reasumując, już na tym etapie (pomimo, że zagadnienia te są jeszcze poruszane w rozdziale Dyskusja) mogę stwierdzić, że Doktorantka wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej technologii żywności i żywienia, a tym samym spełnia pierwsze z wymagań Ustawy stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Kolejna część dysertacji stanowi rozdział Część doświadczalna, w której przedstawiono materiał badawczy oraz metodologię badań. Jak już wspomniałem we wcześniejszej części recenzji opisy są wyczerpujące, jasne i pozwalają na powtórzenie prowadzonych doświadczeń. Być może nawet zbyt dokładnie, gdyż w mojej ocenie szczegółowe opisy przygotowania roztworów np. roztworów substratów, na tym etapie pracy naukowej są zbędne. Pragnę podkreślić, że zastosowana metodologia jest poprawna, przemyślana i w pełni adekwatna do badań mających dostarczyć wiedzy niezbędnej do osiągnięcia zamierzonych celów. Doktorantka zastosowała zaawansowane techniki analityczne w procesie otrzymywania ekstraktu i jego frakcji oraz późniejszej charakterystyki ilościowo-jakościowej. Wskazuje to na jej świadomość, że aby prawidłowo ocenić właściwości preparatów bioaktywnych niezbędna jest możliwa jak najpełniejsza wiedza o ich składzie, która umożliwi nie tylko dyskusję, ale także waliduje surowiec. Chciałbym również podkreślić, że nawiązanie współpracy z ośrodkiem naukowym z Wrocławia w zakresie analiz techniką UPLC-PDA-Q/TOF-MS wskazuje na dojrzałość naukową (dostrzeżona potrzeba wnikliwej analizy frakcji polifenolowej) oraz umiejętność pracy w szerszym zespole

(niezwykle istotne w czasach, gdy analizy żywności wymagają kosztownego, specjalistycznego sprzętu oraz wysokich kwalifikacji). Co istotne, Doktorantka podczas badania zdolności do hamowania aktywności enzymów zastosowała bardzo rozbudowany model badawczy. Nie ograniczyła się do jedynie do jednego źródła enzymów, ale testowała także grupę substratów, co pozwoliło jej na wykazanie roli modelu badawczego uwzględniającego specyficzność substratową oraz mechanizmy kontroli aktywności białka enzymatycznego na wyniki uzyskiwane podczas oceny potencjału inhibitorów. Krytycznie podeszła również do czystości preparatów enzymatycznych, co potwierdzają analizy elektroforetyczne. Do tej części pracy nasuwają się drobne uwagi:

-Kluczowym etapem projektu była ekstrakcja wchmielin. Zastosowała Pani 70% wodny roztwór acetonu uzyskując wydajność wyższą niż większość grup pracujących z tym surowcem. Jak rozumiem metodologia ta została zaczerpnięta z wcześniej realizowanego projektu Flwopiryna. Czy mogłaby Pani przybliżyć założenia metodologiczne? Czy optymalizowano tam parametry układu ekstrakcyjnego?

-W przypadku testów spektrofotometrycznych nie jest jasnym sposób przygotowania próby. Pojawia się informacja o przygotowaniu roztworów wodnych (strony 43-44) o objętości 50 ml. W sytuacji, gdzie inne analizy zostały wykonane na mikropłytkach zastanawiają duże objętości mieszanin reakcyjnych. Czy nie zaobserwowała Pani również problemów z rozpuszczalnością liofilizatów otrzymanych po ekstrakcji acetonowej w wodzie?

-W przypadku badania inhibicji α -amylazy to substrat w pierwszym etapie oznaczenia był inkubowany z substratem. Czy w tym przypadku nie zachodziła modyfikacja matrycy substratu ograniczająca jego dostępność dla enzymu? Czy nie byłoby zasadnym wstępnie inkubować roztwory inhibitorowe z enzymem (umożliwienie interakcji enzym - polifenole), zaś rozpoczynać reakcję poprzez dodanie substratu (model zastosowany przy oznaczaniu aktywności glukoamylazy). Temat interakcji dość szeroko porusza Pani w części Dyskusja.

- na etapie publikacji prosiłbym o korektę prędkości wirowania (powinna być wyrażona w wartościach rcf lub $\times g$, nie zaś rpm).

W tej części mej recenzji chciałbym się bezpośrednio odnieść się do wyników badań i ich dyskusji. Z uwagi na ilość wyników w ograniczonym zakresie przytaczam konkretne dane, zaś skupiam się na ich znaczeniu i roli w osiągnięciu celów projektu.

Pierwsza część obejmuje wnikliwą charakterystykę ilościowo jakościową frakcji polifenolowych. Zakres badań w tym zakresie jest imponujący i obejmuje nie tylko analizy techniką

UPLC-PDA-Q/TOF-MS (współpraca z ośrodkiem wrocławskim), ale także kilka badań analitycznych wykonanych bezpośrednio przez Doktorantkę. Jak należało się spodziewać badane frakcje istotnie różniły się pod względem zarówno ilościowym jak i jakościowym. W ekstraktach z wychmielin dominowały formy flawan-3-oli o różnym stopniu polimeryzacji. Stwierdzono w nim procyjanidyny, prodelfinidyny oraz propelargonidyny, wśród których wyróżniono zarówno proantocyjanidyny typu B oraz typu A. Badania te dostarczyły istotnych informacji, pozwalających w kolejnej części projektu doktorskiego na postulowaniu o roli konkretnych związków w inhibicji aktywności enzymów. Wysoki poziom badań oraz ich zakres z pewnością pozwolą na opublikowanie tej części wyników w czasopiśmie wiodącym w dyscyplinie.

Ocena antydiabetycznego działania substancji wchmielin rozpoczyna się od charakterystyki preparatów enzymatycznych, co pozwalało na potwierdzenie obecności innych białek, które poprzez interakcje z frakcją polifenolową mogą powodować niedoszacowanie rzeczywistej aktywności. Zdolność do hamowania aktywności amylazy testowano stosując pięć rodzajów skrobi (ziemniaczana, ryżowa, kukurydziana, pszenna i tapiokowa), zaś poziom rozkładu skrobi monitorowano z użyciem jodu. Jest to niezwykle istotne, z uwagi na fakt, że powszechnie używana metoda DNSA wykazuje duże interferencje w matrycy polifenolowej (prócz cukrów redukujących oznaczany jest również potencjał redukcyjny polifenoli). Badania wykazały, że poziom hamowania aktywności był determinowany zarówno pochodzeniem enzymu jak i substratu. Dla przykładu aktywność α -amylazy trzustkowej była hamowana przez polifenole z frakcji 3 jedynie przy zastosowaniu jako substratu skrobi pszennej. Z kolei, wartości IC₅₀ wyznaczone dla frakcji 5 wobec ludzkiej amylazy trzustkowej zawierały się w przedziale od 0,35 do 0,92 mg/ml odpowiednio dla skrobi pszennej i ziemniaczanej. Z punktu widzenia metodologii, chciałbym zwrócić uwagę, że być może zasadnym byłoby użycie mniejszych stężeń ekstraktów do wyznaczenia wartości IC₅₀. W czasie przygotowywania wyników do druku sugeruję uwzględnienie tego w przypadku rycin 27-28, 30, 32, 34, 36, 37. Z drugiej strony zdaję sobie sprawę, że przy takiej ilości analiz z góry założony zakres stężeń często jest badany „niejako z rozpędu”, w szczególności jeśli badania prowadzimy na mikropłytkach. W przypadku tych testów wykazano, że aktywność porównywalną z kontrolą pozytywną (akarboza) wykazywała frakcja 7. Zbliżony panel badań wykonano również w przypadku oceny zdolności do hamowania aktywności glukozamylazy, stosując jako substraty glukopiranozyd *p*-nitrofenolu

(pNPG), α -D-glukopiranozyd 4-metylumbeliferonu (MUG), maltozę, sacharozę oraz dekstryny. W układach zawierających maltozę, sacharozę i dekstryny aktywność glukoamylazy określono w oparciu ilości uwolnionej glukozy (test komercyjny), zaś w przypadku substratów syntetycznych ilość uwolnionego *p*-nitrofenolu lub *p*-metylumbeliferonu. Jak wykazano, zarówno sam ekstrakt jak i poszczególne jego frakcje wykazywały aktywność istotnie wyższą niż akarboza niezależnie od rodzaju enzymu (α -glukozydaza drożdżowa i szczurza). Generalnie, wysoką aktywność inhibicyjną względem obu α -glukozydaz wykazywały składniki frakcji 5, 6 oraz 7. Wyniki badań zostały skonfrontowane dotychczasowymi badaniami znajdującymi się w literaturze tematu. W części tej Pani Majewska dokonuje wnikliwej analizy i wskazuje potencjalne mechanizmy zaobserwowanych zmian i zależności. W mojej ocenie może zbyt dokładnie omawia tu tematy podstawowe oraz dokonuje wtórnego opisu wyników, czego niewątpliwie dałoby się uniknąć łącząc część Wyniki z Dyskusją. Całość badań Autorka podsumowała w 8 wnioskach, które odnoszą się do głównych celów badań.

Odnosząc się do części opisującej wyniki i dyskusję pragnę zwrócić uwagę na kilka zagadnień.

-Na rysunku 14 przedstawiła Pani rozdział chromatograficzny na złożu LH-20 (detekcja 360 nm). Wyraźnie widać wyodrębnione frakcje 1-4 oraz 7. Czy nie sądzi Pani, że zastosowanie innej długości fali mogłoby ułatwić wyodrębnienie frakcji 5-6. Analiza jakościowo -ilościowa wyraźnie wskazuje, że zawartość polifenoli jest w nich zbliżona.

- na etapie publikacji prosiłbym o uwzględnienie w części metodycznej błędnie podanego sposobu wyrażania aktywności antyoksydacyjnej (mmol/g vs. μ M dla testów ABTS i ORAC)

- z uwagi na wpływ wielu czynników na wyniki badań potencjału antydiabetycznego w tym miejscu chciałbym zapytać, czy w oparciu o swoje badania i dotychczasowe doświadczenie mogłaby Pani zaproponować „uniwersalny” model do oceny biodostępności węglowodanów w warunkach *in vitro*.

Dobra dysertacja to taka, która nie tylko rozwiązuje problem naukowy, ale jednocześnie generuje nowe pytania i kierunki badań lub po prostu kolokwialnie „daje do myślenia”. Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że przedstawiona praca należy do tego typu opracowań. Doktorantka wykazała, że wyniki dotychczasowych badań potencjału

antydiabetycznego są trudne do porównania, a ocena potencjału wybranych surowców/związków może być zafałszowana. Analizując wkład pracy Pani Majewskiej, sposób projektowania eksperymentów, opracowywania wyników oraz ich krytycznej oceny mogą stwierdzić, że posiada Ona umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Reasumując, Doktorantka umiejętnie połączyła ze sobą zagadnienia z zakresu technologii żywności, chemii analitycznej i towaroznawstwa, a przedstawiona do oceny dysertacja obejmuje wyniki wartościowe pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Na tym etapie mojej opinii chciałbym stwierdzić, że Pani Majewska osiągnęła wszystkie zamierzone cele projektu doktorskiego i zweryfikowała postawioną hipotezę badawczą, a sama dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Jednocześnie pragnę podkreślić, że wszystkie uwagi przedstawione w ocenie pracy mają charakter redakcyjny, część z nich dyskusyjny i nie mają one wpływu na pozytywną ocenę merytoryczną pracy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji dysertacja mgr inż. Iwony Majewskiej "Związki fenolowe wchmielin jako inhibitory enzymów glikolitycznych" spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim w ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018, poz. 261) i wnioskuję o dopuszczanie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wysoki poziom naukowy przedstawionych badań motywuje mnie do złożenia Wysokiej Radzie ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej wniosku o wyróżnienie ocenianej dysertacji w sposób praktykowany na Wydziale Biotechnologii Politechniki Łódzkiej.

prof. dr hab. Michał Świeca

Lublin, 16.10.2023

Prof. dr hab. Michał Świeca
Katedra Biochemii i Chemii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Iwona Majewska

Przestawiona do oceny dysertacja doktorska dotyczy tematyki niezwykle aktualnej i ma duże znacznie poznawcze. Sposób przeprowadzania badań, zakres metod badawczych, właściwy opis i interpretacja wyników oraz ich konfrontacja z literaturą tematu jednoznacznie wskazują na wysokie kwalifikacje i warsztat naukowy Pani mgr inż. Iwony Majewskiej. Co prawda, na tym etapie badania nie zostały opublikowane, ale osobiści widzę w nich duży potencjał. Na podkreślenie zasługuje również krytyczne i świadome podejście Doktorantki do tematu. Dysertacja stanowi niezwykle ciekawe opracowanie o możliwości wykorzystania wchmielin jako źródła substancji o potencjale antydiabetycznym, ale w mojej ocenie nie mniej ważnym jest wykazanie limitacji ogólnie stosowanych metod analitycznych.

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie dysertacji pt. „Związki fenolowe wchmielin jako inhibitory enzymów glikolitycznych” w sposób praktykowany na Wydziale Biotechnologii Politechniki Łódzkiej.

prof. dr hab. Michał Świeca