UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI
KATEDRA ROZWOJU FUNKCJONALNYCH PRODUKTÓW ŻYWNOŚCIOWYCH

dr hab. inż. Małgorzata Korzeniowska, prof. UPWr
Katedra Rozwoju Funkcjonalnych
Produktów Żywnościowych
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 02.02.2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Tianyu Yang**

pt.: **„Identification and physicochemical evaluation of lysozyme after its thermo-oxidative modification with microwave radiation"**

wykonanej w Katedrze Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

pod kierunkiem **dr hab. Grzegorza Leśnierowskiego, profesora UPP**

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 21 października 2021r w związku z postępowaniem wszczętym celem nadania panu mgr Tianyu Yang stopnia naukowego doktora nauk rolniczych.

Dobór i znaczenie tematu

Lizozym (EC 3.2.1.17), jedno z najważniejszych biologicznie aktywnych białek jaja kurzego (najbardziej popularne i dostępne źródło), występujący również w innych surowcach zwierzęcych i roślinnych, jest znanym silnym enzymem o działaniu hydrolitycznym w stosunku do polisacharydów, bakteriolitycznym i mukolitycznym. Hydrolizując peptydoglikany obecne w ścianach komórkowych bakterii, składające się z naprzemiennie połączonych reszt β-1-4 N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylomuraminowego, lizozym jest w stanie inaktywować i eliminować bakterie Gram-dodatnie. Jakkolwiek był on intensywnie badany od czasu jego odkrycia przez Fleminga w 1922 roku, wciąż jest miejsce na nowe i naukowo uzasadnione prace, skupiające się głównie na strukturalnej modyfikacji cząsteczki lizozymu w celu uzyskania szerszego spektrum aktywności litycznej, szczególnie wobec bakterii Gram-

ujemnych, które powodują jedne z najpoważniejszych problemów zdrowia publicznego na świecie ze względu na swoją wysoką oporność na antybiotyki. Ponadto, wybrane modyfikacje struktury lizozymu pod wpływem czynników chemicznych i fizycznych, w tym obróbki termicznej i mikrofalowej, mogą również skutkować zwiększeniem funkcjonalności białka i rozszerzeniem jego zastosowań w różnych produktach spożywczych. Dlatego podjęty przez Doktoranta temat optymalizacji obróbki mikrofalowej lizozymu białka jaja kurzego może uzupełnić wiedzę teoretyczną na temat tego białka, a także poszerzyć jego praktyczne zastosowania.

Ocena strony formalnej pracy

Oceniana rozprawa spełnia wymagania formalne stawiane tego typu pracom przedstawianym w postępowaniu na stopień naukowy doktora, tj. ma charakter eksperymentalny i zawiera wszystkie niezbędne rozdziały ułożone w typowej sekwencji. Opracowanie stanowi zwartą całość i jest poprawnie napisane jasnym i zrozumiałym językiem.

Ocena merytoryczna pracy

Praca doktorska zgłoszona przez mgr inż. Tianyu Yang pt. „Identification and physicochemical evaluation of lysozyme after its thermo-oxidative modification with microwave radiation" składa się z 83 stron podzielonych na następujące części: Streszczenie, Wprowadzenie, Cel i zakres badań, Wyniki i dyskusja, Nieoczekiwane efekty mikrofalowo-modyfikowanego lizozymu po 12-miesięcznym przechowywaniu w warunkach chłodniczych, Wnioski, Bibliografia, Załącznik podzielony na Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, załączone wydruki Publikacji opisanych w rozprawie, Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Część wstępna dotyczy pierwszej publikacji, czyli pełnego artykułu przeglądowego na temat lizozymu opublikowanego w bardzo wysoko ocenianym (IF=12,563, 200 punktów MEiN) czasopiśmie Trends in Food Science and Technology. Po jednostronicowym rozdziale przedstawiającym hipotezy badawcze i cel badań przedstawiono cztery części z krótkim opisem i głównymi wnioskami z prac eksperymentalnych. Wszystkie te części odzwierciedlają cztery odrębne, opublikowane w uznanych czasopismach naukowych, prace, w których mgr inż. Yang jest pierwszym autorem (z wyjątkiem pracy nr 5, w której mgr Yang jest drugim autorem). Wnioski wraz z krótkim podsumowaniem oraz wykazem zacytowanych publikacji zamykają merytoryczną część pracy. Dodatkowo w pracy załączono dwa oświadczenia podpisane przez współautorów wybranych publikacji.

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI
KATEDRA ROZWOJU FUNKCJONALNYCH PRODUKTÓW ŻYWNOŚCIOWYCH
UL. J. CHEŁMOŃSKIEGO 37, 51-630 WROCŁAW
TEL. +48 71 320 7782 • FAX +48 71 320 7781
E-MAIL: DFFPD@UPWR.EDU.PL •

Oceniana rozprawa spełnia wymogi formalne dla tego typu prac, tj. przedstawianych do oceny w postępowaniu o nadanie tytułu doktora, tj. ma charakter eksperymentalny i zawiera wszystkie niezbędne rozdziały ułożone w typowej kolejności. Opracowanie stanowi spójną całość i jest poprawnie napisane jasnym i zrozumiałym językiem.

Treść pracy

Wstęp – Opracowano na podstawie pierwszej publikacji przedstawianej w rozprawie doktorskiej (Lysozyme and its modified forms: a critical appraisal of selected properties and potential, Trends in Food Science and Technology, 2021, 107, 333-342) część wstępna jest napisana zwięźle i zawiera najważniejsze najbardziej istotne informacje na temat lizozymu, jego naturalnych źródeł i wybranych właściwości biologicznych. W dwóch akapitach autor wskazał na możliwości modyfikacji lizozymu na drodze chemicznej, termicznej i z wykorzystaniem technik membranowych. Wskazano także pozytywny wpływ tych działań na wybrane właściwości oraz aktywność biologiczną enzymu. Ponadto, wymieniono inne metody modyfikacji strukturalnej białek z wyraźnym wskazaniem na potencjalnie pozytywne efekty zastosowania promieniowania mikrofalowego na wybrane właściwości lizozymu.

Cel i zakres badań – Na podstawie danych literaturowych mgr inż. Yang sformułował cztery hipotezy badawcze, jako punkt wyjścia do określenia celu badań. Doktorant stwierdził, że promieniowanie mikrofalowe, wspomagane przez czynniki utleniające, może pozytywnie modyfikować funkcjonalność lizozymu, która może być dalej zmieniana przez warunki zastosowane w trakcie przechowywania produktu. Jakkolwiek, przedstawione hipotezy mają charakter informacyjny i pokazują najważniejsze założenia dla zakładanych badań, można było sformułować je znacznie prościej i jaśniej. Cel pracy, opracowanie nowego sposobu modyfikacji lizozymu, jest zbyt długi i zbyt szczegółowy, co jest poniekąd mylące. Autor powinien sformułować jeden ogólny cel pracy, a następnie kilka bardziej szczegółowych i sprecyzowanych celów.

Wyniki i dyskusja – Tematyka naukowa wszystkich czterech przedstawionych prac dotyczy wpływu mikrofal i mikrofal w powiązaniu z działaniem czynnika oksydującego na lizozym w formie proszku (praca 2 i 3) oraz płynnego koncentratu (praca 4 i 5) w zakresie stopnia oligomeryzacji białka, wybrane cechy funkcjonalne (hydrofobowość i rozpuszczalność) oraz aktywność hydrolityczną. Celem badań przedstawionych w **Publikacji 2** (Thermal modification of hen egg white lysozyme using microwave treatment, Acta Scientarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2020, 19(2), 149-157) było zastosowanie promieniowania mikrofalowego do modyfikacji lizozymu białka jaja kurzego. Te wstępne badania wykazały, że lizozym (5%) jest zdolny do tworzenia form oligomerycznych, głównie dimerów, o zwiększonej hydrofobowości, ale zmniejszonej rozpuszczalności i aktywności

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI
KATEDRA ROZWOJU FUNKCJONALNYCH PRODUKTÓW ŻYWNOŚCIOWYCH
UL. J. CHEŁMOŃSKIEGO 37, 51-630 WROCŁAW
TEL. +48 71 320 7782 • FAX +48 71 320 7781
E-MAIL: DFFPD@UPWR.EDU.PL •

hydrolitycznej pod wpływem mikrofal o mocy między 270 W a 630 W przy różnych warunkach pH (4,0, 6,0 i 8,0). Wykazano, że chociaż bioaktywność zmodyfikowanego lizozymu wobec *Micrococcus lysodeikticus* zmniejszyła się w wyniku zastosowania nowego typu obróbki termicznej, to nadal była ona istotnie wyższa w porównaniu z preparatami po klasycznym działaniu termicznym lub termiczno-chemicznym.

Pytania: 1. Na jakich założeniach oparto dobór wybranych warunków dla pierwszego, wstępnego eksperymentu (Pub. 2)? 2. Dlaczego w pierwszym eksperymencie tylko 2 ml roztworu lizozymu (zawiesiny?) poddano działaniu promieniowania mikrofalowego? 3. Na jakiej podstawie do badań wybrano metodykę oznaczania aktywności hydrolitycznej lizozymu (Parry i in., 1965)? Czy jest jakaś istotna różnica między wybraną metodyką a metodą spektrofotometryczną wg. Leśnierowskiego (2007), Nakimbugwe i in. (2006) czy Touch et. (2004)?

Publikacja 3 (Changes in selected physicochemical properties of lysozyme modified with a new method using microwave field and oxidation. PLoS ONE, 2019, 14(2): e0213021) przedstawia wyniki i wnioski z badań nad modyfikacją lizozymu promieniowaniem mikrofalowym (270 W), a następnie obróbką chemiczną polegającą na dodaniu nadtlenku wodoru jako substancji o działaniu utleniającym (0%-4%) oraz liofilizacji w celu konserwacji preparatu. Główny wniosek wynikający z pracy dotyczy potwierdzenia pozytywnego wpływu zastosowanego promieniowania mikrofalowego, a także dodatku czynnika utleniającego na tworzenie dimerów i trimerów lizozymu wykazujących wyższą hydrofobowość, ale obniżoną aktywność lityczną enzymu (nadal wyższą niż prosta klasyczna obróbka termiczna). Pan Yang jako pierwszy autor przedstawianej w dysertacji publikacji stwierdził również, że zastosowana nowa metoda modyfikacji lizozymu jest szybką i łatwą opcją poprawy jego funkcjonalności.

Pytania: 1. Dlaczego zastosowano H_2O_2 po obróbce mikrofalowej a nie przed nią? Czy obecność nadtlenku wodoru podczas obróbki mikrofalowej może uszkodzić cząsteczkę i aktywność enzymu?

Trzecia eksperymentalna część badania przedstawiona w ocenianej rozprawie doktorskiej (**Publikacja 4**: Microwave modification as an excellent way to produce unique lysozyme with potential for food and human health, Foods, 2021, 10,1319) opisuje wpływ obróbki mikrofalowej o mocy 270 W oraz dodania nadtlenku wodoru (1,5%) na funkcjonalność i działanie bakteriolityczne płynnego koncentratu lizozymu. Podobnie jak w badaniach przeprowadzonych na lizozymie w formie proszku, Autorzy wykazali, że mikrofale o małej mocy wraz z niskim stężeniem środka utleniającego prowadziły do uzyskiwania wysokich zawartości utworzonych oligoform lizozymu o większej hydrofobowości i potencjalnie silnej i rozszerzonym spektrum aktywności przeciwbakteryjnej. Niemniej jednak zmniejszonej aktywności litycznej wobec bakterii Gram-dodatnich.

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI
KATEDRA ROZWOJU FUNKCJONALNYCH PRODUKTÓW ŻYWNOŚCIOWYCH
UL. J. CHEŁMOŃSKIEGO 37, 51-630 WROCŁAW
TEL. +48 71 320 7782 • FAX +48 71 320 7781
E-MAIL: DFFPD@UPWR.EDU.PL •

W ostatniej części pracy przedstawiono wyniki doświadczenia przechowalniczego przeprowadzonego na bazowym i modyfikowanym (takie same warunki jak w P4) koncentracie lizozymu w formie ciekłej (**Publikacja 5** Unconventional effects of long-term storage of microwave-modified chicken egg white lysozyme preparations, Scientific Reports, 2021, 11, 10707). Badania mające na celu ocenę funkcjonalności i aktywności biologicznej materiału doświadczalnego przechowywanego przez 6 i 12 miesięcy w warunkach chłodniczych wykazują znaczną poprawę funkcjonalności enzymu poddanego działaniu mikrofal i czynnika oksydującego oraz wskazują nowe spektrum działania antybakteryjnego wraz z upływem czasu przechowywania. Im dłuższe przechowywanie tym wyższe stężenie form oligomerycznych lizozymu charakteryzujących się wyższą hydrofobowością powierzchniową. Pomimo utraty aktywności litycznej po procedurze modyfikacji białek, przechowywanie w temperaturze 4-6°C skutkowało większą zdolnością antybakteryjną wobec bakterii Gram+, a nawet niektórych testowanych bakterii Gram-.

Pytania: 1. Jakimi testami mikrobiologicznymi można zweryfikować potencjał przeciwdrobnoustrojowy preparatu lizozymu otrzymanego w wyniku zastosowania nowej metody modyfikacji? 2. Czy neutralizowano dodatek H_2O_2, jeśli tak to w jaki sposób? 3. Czy efekt antybakteryjny jest związany tylko z oligomerami enzymu czy może z obecnością nadtlenku wodoru? 4. Dlaczego w badaniach nie uwzględniono analizy pozostałych, poza barwą, właściwości sensorycznych preparatu, które mogłyby mieć wpływ na barwę, smak, a nawet zapach samego białka, wpływając na końcową atrakcyjność preparatu/produktu w którym może zostać zastosowany? 5. Jakie są potencjalne zastosowania nowego lizozymu w przemyśle spożywczym i nie tylko? 6. Jaka jest efektywność ekonomiczna produkcji nowego preparatu enzymatycznego?

Pracę podsumowują cztery wnioski korespondujące z publikacjami zawartymi w rozprawie doktorskiej. Przedstawiona forma wniosków jest zbyt opisowa, zamiast w sposób ścisły i czytelny wskazywać najważniejsze osiągnięcia pracy. Zaletą tej części dysertacji jest wskazanie przyszłych kierunków, w których można by kontynuować badania nad rozpoznaniem możliwości modyfikacji oraz charakterystyki biologicznej i technologicznej lizozymu, jak również przyszłych zastosowań przemysłowych.

Wniosek końcowy

Podsumowując, chciałbym stwierdzić, że oceniana praca doktorska ma potencjał naukowy z nowatorskimi aspektami dotyczącymi modyfikacji lizozymu metodami fizycznymi i fizykochemicznymi. Przedstawione badania zostały starannie zaplanowane i przeprowadzone przy użyciu odpowiednio dobranej i dostępnej klasycznej metodologii oraz wyposażenia.

UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI
KATEDRA ROZWOJU FUNKCJONALNYCH PRODUKTÓW ŻYWNOŚCIOWYCH

Zebrane wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty, za pomocą nowych narzędzi graficznych (bardzo korzystne i pomocne jest zastosowanie graficznego abstraktu na początku każdej części eksperymentalnej pracy), przeanalizowane, omówione i zinterpretowane w sposób dokładny i rzeczowy. Wyniki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o wysokiej punktacji, co świadczy o nowości i wysokim poziomie prowadzonych badań (łączna liczba punktów MEiN=550). Treść rozprawy doktorskiej mgr inż. Tianyu Yang pt.: „ Identification and physicochemical evaluation of lysozyme after its thermo-oxidative modification with microwave radiation" i wynikające z niej możliwości praktycznego zastosowania wskazują, iż spełnia ona wszystkie wymagania określone w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Wyższego Wykształcenie (art. 261., 19 stycznia 2018 r.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 261, z późn. zm.). Dlatego z pełnym przekonaniem składam wniosek do Rady dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Tianyu Yang do dalszych etapów postępowania związanego z ubieganiem się o nadanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych.

dr hab. inż. Małgorzata Korzeniowska, prof. UPWr

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI
KATEDRA ROZWOJU FUNKCJONALNYCH PRODUKTÓW ŻYWNOŚCIOWYCH
UL. J. CHEŁMOŃSKIEGO 37, 51-630 WROCŁAW
TEL. +48 71 320 7782 • FAX +48 71 320 7781
E-MAIL: DFFPD@UPWR.EDU.PL •