

Instytut Nauk Leśnych

Wydział Budownictwa i Nauk o Środowisku

Politechnika Białostocka

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Eweliny Sylwii Sidor pt.:
„Analiza składu chemicznego i aktywności biologicznej preparatów z czerwiu
trutowego oraz możliwości ich wykorzystania w projektowaniu suplementów diety”**

1. Uwagi formalne

Podstawą opracowania recenzji stanowi pismo prof. dr hab. Idalii Kasprzyk Prorektor Uniwersytetu Rzeszowskiego ds. Kolegium Nauk Przyrodniczych z dn. 27.04.2023 r. skierowane do mnie w sprawie dokonania oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Sidor pod tytułem: „Analiza składu chemicznego i aktywności biologicznej preparatów z czerwiu trutowego oraz możliwości ich wykorzystania w projektowaniu suplementów diety”. Opinię opracowano na podstawie przesłanej dokumentacji stanowiącej zwarte opracowanie składające się z: charakterystyki podejmowanego problemu, przyjętych hipotez badawczych, opisu wykorzystanych materiałów i zastosowanych metod badawczych oraz omówienia wyników, podsumowania i wniosków wraz z literaturą – w sumie 54 stron. Opracowanie zawiera aneks, w którym zamieszczono: spis pozostałych osiągnięć naukowych (publikacje, monografie i rozdziały w monografiach oraz wygłoszone referaty konferencyjne). Dodatkowo w zwartym opracowaniu znajdują się w aneksie wydruki publikacji w czasopismach naukowych wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

- Publikacja I. Ewelina Sidor (80%), Małgorzata Dżugan. Drone Brood Homogenate as Natural Remedy for Treating Health Care Problem: A Scientific and Practical Approach. *Molecules* 2020, 25 (23), 5699, doi.org/10.3390/molecules25235699.
- Publikacja II. Ewelina Sidor (50%), Michał Miłek, Grzegorz Zaguła, Aleksandra Bocian, Małgorzata Dżugan. Searching for Differences in Chemical Composition and Biological Activity of Crude Drone Brood and Royal Jelly Useful for Their Authentication. *Foods* 2021, 10 (9), 2233, doi.org/10.3390/foods10092233.
- Publikacja III. Ewelina Sidor (60%), Michał Miłek, Monika Tomczyk, Małgorzata Dżugan. Antioxidant Activity of Frozen and Freeze-Dried Drone Brood Homogenate Regarding the Stage of Larval Development. *Antioxidants* 2021, 10 (5), 639, doi.org/10.3390/antiox10050639.
- Publikacja IV. Ewelina Sidor (70%), Monika Tomczyk, Michał Miłek, Małgorzata Dżugan. The effect of storage time on the antioxidant activity and polyphenolic profile of frozen and lyophilized drone brood fixed in honey. *Food. Science. Technology. Quality* 2022, 29 (2), 45-56, doi.org/10.15193/zntj/2022/131/415.
- Publikacja V. Małgorzata Dżugan, Ewelina Sidor (40%), Michał Miłek, Monika Tomczyk. The possibility of using bee drone brood to design novel dietary supplements for apitherapy. *Applied Sciences* 2023, 13 (8), 4687, doi.org/10.3390/app13084687.

Przed każdą publikacją znajdują się oświadczenia autorki i współautorów o wkładzie pracy w poszczególnych artykułach.

2. Ogólna charakterystyka zawartości rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Sylwii Sidor pt.: „Analiza składu chemicznego i aktywności biologicznej preparatów z czerwi trutowego oraz możliwości ich wykorzystania w projektowaniu suplementów diety”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter empiryczny i dotyczy badań składu chemicznego i aktywności biologicznej preparatów otrzymanych z czerwi trutowego oraz możliwości ich wykorzystania w projektowaniu suplementów diety. Zawartość pracy jest zgodna ze sformułowaniem tematem. Autorka deklaruje, że zrealizowała badania w trzech etapach. Pierwszy etap związany był z analizą zawartości składników bioaktywnych w czerwiu z uwzględnieniem jego fazy rozwoju i pochodzenia. Na tym etapie przeprowadziła również poszukiwania markerów pozwalających jednoznacznie odróżnić homogenat trutowy od mleczka pszczelego. Badania te zostały zawarte w publikacjach oznaczonych numerami II i III. Drugi etap stanowi analiza wpływu różnych metod utrwalania czerwiu trutowego na zmiany potencjału antyoksydacyjnego, całkowitej zawartości związków polifenolowych i profil polifenolowy. Wyniki tych badań zostały opublikowane w publikacji III i IV. Etap trzeci dotyczył oceny biodostępności składników czerwiu z zaprojektowanych suplementów diety i ocena bezpieczeństwa ich stosowania. Uzupełnieniem tych badań jest publikacja I, która w powyższej chronologii można uznać za etap zerowy, gdyż zawiera przegląd literatury dotyczący analizowanych problemów.

Pierwszą część pracy stanowią studia literaturowe dotyczące pochodzenia, składu chemicznego, stabilności, aktywności preparatów uzyskiwanych na bazie czerwiu trutowego.

Studia literaturowe pozwoliły Autorce sformułować następujące hipotezy badawcze:

1. Homogenat trutowy jest obfitym źródłem składników bioaktywnych.
2. Faza rozwoju larwy istotnie wpływa na aktywność biologiczną homogenatu czerwiu trutowego.
3. Liofilizacja pozwala zachować cenne składniki czerwiu trutowego o dobrej biodostępności.
4. Czerw trutowy może być rekomendowany jako wartościowy suplement diety o dobrej przyswajalności składników odżywczych i bioaktywnych.

W dalszej części Autorka charakteryzuje badany materiał i zastosowane metody badawcze. Transparentnym zakończeniem tej części pracy jest zestawienie wykorzystanych technik badawczych do realizacji badań, przedstawione w tabeli 1 (str. 20).

Główną część pracy stanowi omówienie wyników badań. Autorka rozpoczęła od przedstawienia aktywności biologicznej czerwiu trutowego. Wykazała wpływ stadium rozwojowego czerwiu na zawartość składników bioaktywnych. Stwierdziła wyższą zawartość białka rozpuszczalnego oznaczonego metodą Bradforda dla czerwiu trutowego w wieku 11 i 14 dni w stosunku do larw 7-dniowych. Dodatkowo metodą SDS-PAGE zidentyfikowała duże zróżnicowanie profilu białkowego w zależności od wieku czerwiu. Przeprowadziła analizę aktywności enzymów hydrolitycznych w homogenacie trutowym w zależności od fazy rozwoju i stwierdziła szczególnie wysoką dla α -glukozydazy (α -GLU) i heksozaminidazy (HEX), których ekstremum występuje w 11-dniowym czerwiu. Wyniki badań zawartości hormonów płciowych wykazały wzrost poziomu testosteronu i spadek estradiolu w trakcie rozwoju czerwiu. Kolejnym parametrem identyfikowanym przez autorkę był potencjał antyoksydacyjny wodnych i etanolowych ekstraktów uzyskiwanych z mrożonego czerwiu trutowego, badanych metodami kolorymetrycznymi: DPPH, ABTS i FRAP. Najwyższą aktywność zmiatania

rodników wyznaczoną testem DPPH stwierdzono dla wodnych roztworów czerwiu w wieku 11 dni. Poziom aktywności ekstraktów etanolowych był istotnie niższy. Podobne zależności jakościowe uzyskano metodą FRAP a odwrotnie metodą ABTS. Na tej podstawie autorka wyciągnęła wniosek, że dominującą frakcją antyoksydantów czerwiu stanowią związki hydrofilowe. Wykazała też maksymalny poziom związków polifenolowych i flawonoidów w 11-dniowym czerwiu trutowym. Kolejnym celem badań była charakterystyka profili: polifenolowego, cukrowego i aminokwasowego za pomocą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej HPTLC. Metoda ta została wybrana ze względu na krótki czas badań wielu próbek jednocześnie co jest szczególnie ważne w stosunku do nietrwałych preparatów uzyskiwanych na bazie czerwiu trutowego. Wykazano różnice jakościowe i ilościowe w profilu polifenolowym badanych próbek czerwiu trutowego w różnym wieku zidentyfikowanych wcześniej kwasów fenolowych i flawonoidów. Nie stwierdzono wpływu wieku czerwiu na profil cukrowy w przeciwieństwie do składu aminokwasowego, który charakteryzował się zmianami ilościowymi. Autorka podkreśliła, że w tych badaniach była (wraz z zespołem autorskim) pionierem w wykorzystaniu techniki HPTLC do czerwiu trutowego. W dalszej części oznaczając potencjał antyoksydacyjny (DPPH), ABTS i FRAP), całkowitą zawartość polifenoli (TPC) i flawonoidów (TFC), wykazała istotny wpływ warunków pasiecznych na te parametry nie uszczegółowiając co pod tym stwierdzeniem się kryje. Kolejnym problemem badawczym przedstawionym w rozprawie było porównanie parametrów charakteryzujących właściwości fizykochemiczne homogenatu trutowego i mleczka pszczelego. Wykazała podobnie jak inni autorzy, że zarówno właściwości fizyczne jak i skład chemiczny tych produktów pszczelich jest bardzo podobny, niemniej wskazała zidentyfikowane białka o masie 28 kDa i 12 kDa specyficzne dla czerwiu trutowego, jako markery pozwalające jednoznacznie rozróżnić te substancje. W dalszej części pracy analizowała sposoby utrwalania preparatów uzyskiwanych na bazie czerwiu trutowego i wykazała, że najkorzystniejszą formą utrwalania jest liofilizacja wodnego ekstraktu czerwiu, z którego przez odwirowanie odseparowano nierozpuszczalne struktury komórkowe. Wytworzenie suchego osadu ekstraktu wodnego wpłynęło na zwiększenie jego właściwości antyoksydacyjnych i poprawiło rozpuszczalność w wodzie. Straty spowodowane procesem liofilizacji wynosiły około 10% aktywności antyoksydacyjnej i 7-11 % całkowitej zawartości związków fenolowych. W dalszej części weryfikowała sposób utrwalenia poprzez mieszanie z miodem co znacząco ułatwia zagospodarowanie preparatów trutowych, jak i ich dystrybucję oraz transport. Potwierdzono zachowanie pełnej aktywności miodu z dodatkiem czerwiu do 6 miesięcy przechowywania i synergizm we wzmocnieniu właściwości antyoksydacyjnych i profilu polifenolowego. Tym samym wykazano, że miód z dodatkiem czerwiu może być uznany za wartościowy suplement diety o wysokiej trwałości przechowalniczej a co ważne możliwy do wytworzenia w warunkach pasiecznych. Ostatnim etapem badań przedstawionych przez Autorkę było zaprojektowanie i wytworzenie na bazie czerwiu trutowego suplementów diety. Przedstawiono trzy propozycje w formie rozpuszczalnych kapsulek, które zawierały: 300 mg liofilizatu siedmiodniowego homogenizowanego czerwiu (DB), 300 mg DB i 250 mg wapnia organicznego i 300 mg DB i 250 mg wapnia nieorganicznego. Wykorzystując laboratoryjny model przewodu pokarmowego analizowano biodostępność głównych składników przygotowanych preparatów i strawność białka podczas symulowanego trawienia w warunkach *in vitro*. Definiowano biodostępność składników jako procent spożytych składników. W wyniku badań stwierdzono, że dodatek wapnia zwiększa biodostępność testosteronu, który wchłaniany był w fazie żołądkowej i jelitowej trawienia. Estragon uwalniał się dopiero w jelicie. Wykazano wysoki wskaźnik biodostępności wapnia zarówno czystego preparatu trutowego, jak i z wapniem

organicznym. Niezależnie od badanego preparatu stwierdzono trawienie białek głównie w fazie żołądkowej. W fazie jelitowej zidentyfikowano wyższy stopień strawienia białka z wapnem organicznym. Postęp w trawieniu białek potwierdzono analizując profil wolnych aminokwasów w poszczególnych etapach trawienia za pomocą chromatografii cienkowarstwowej HPTLC. Określono również biodostępność związków przeciwutleniających z badanych suplementów metodą FRAP. Biodostępność polifenoli z czystego czerwiu była największa i w obecności wapnia spadała. W podsumowaniu autorka zwróciła uwagę, że suplement diety łączący liofilizowany czerw trutowy z organicznym wapniem może znaleźć zastosowanie w profilaktyce i leczeniu osteoporozy. Niemniej Autorka stwierdziła konieczność prowadzenia dalszych badań związanych z określeniem bezpieczeństwa stosowanych preparatów dla człowieka np. ryzyko schorzeń układu sercowo-naczyniowego spowodowane wysokim poziomem testosteronu, obniżenie odporności po choroby nowotworowe i depresje. Zwróciła uwagę, że stosowanie 3x1 kapsułka proponowanych suplementów daje całkowite bezpieczeństwo stosowania. Na zakończenie wskazała pierwsze próby wykorzystania czerwiu trutowego w hodowli zwierząt. Pokazała również pierwsze badania w terapii nowotworów oraz wskazała perspektywy wykorzystania homogenatu trutowego jako „nowa żywność”.

W podsumowaniu Autorka zamieściła wnioski wskazujące na czerw trutowy jako cenne źródło: białka i aminokwasów, testosteronu i estradiolu, związków polifenolowych, kwasów fenolowych i flawonoidów. Zawartość tych związków jest optymalna w 11 dniu rozwoju czerwiu trutowego. Podkreśliła, że aktywność hormonalna, enzymatyczna i antyoksydacyjna czerwiu trutowego jest istotnie wyższa w porównaniu z mleczkiem pszczelim. Surowiec ma niestety niską stabilność więc natychmiast po pozyskaniu powinien być utrwalony a najkorzystniejszą formą konserwacji jest liofilizacja ekstraktu wodnego po odseparowaniu nierozpuszczalnych struktur komórkowych. Preparaty uzyskane w ten sposób mogą być utrwalane w miodzie przy maksymalnym dodatku do 4% a uzyskane produkty zachowują właściwości antyoksydacyjne przez 6 miesięcy przechowywania. Składniki czerwiu trutowego wykazują wysoką biodostępność co potwierdzono w warunkach symulowanego trawienia. Hormony uwalniają się głównie w jelicie, białko natomiast jest trawione w żołądku. Występuje przy tym synergizm pomiędzy biodostępnością testosteronu i białka przy obecności wapnia organicznego, co może być wykorzystane w profilaktyce osteoporozy. Autorka podkreśla, że przed wprowadzeniem preparatów na rynek konieczność przeprowadzenia dodatkowych badań toksykologicznych. Istotnym wnioskiem jest potwierdzenie po raz pierwszy wysokiej przydatności techniki wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej HPTLC w badaniu czerwiu pszczelego. Metoda jest szybka, tania i ma możliwość jednoczesnego porównania kilkunastu próbek.

3. Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Sylwii Sidor pt.: „Analiza składu chemicznego i aktywności biologicznej preparatów z czerwiu trutowego oraz możliwości ich wykorzystania w projektowaniu suplementów diety”

Temat podjęty przez Autorkę jest bardzo ambitny i ma ogromne znaczenie użytkowe. Zakres przeprowadzonych badań bardzo szeroki i łączy pomysł z konkretną propozycją zastosowania w praktyce poprzez zaproponowanie trzech suplementów diety na bazie czerwiu trutowego.

Zdaniem recenzenta szczególnymi osiągnięciami naukowymi Doktorantki są:

1. Zaplanowanie i przeprowadzenie szerokich badań fizykochemicznych preparatów uzyskiwanych na bazie czerwiu trutowego z wykorzystaniem zróżnicowanych technik badawczych.
2. Wykazanie, że optymalną fazą wykorzystania czerwiu trutowego o największej wypadkowej bioaktywności jest 11 dzień rozwoju.
3. Opracowanie metody utrwalania czerwiu trutowego poprzez liofilizację ekstraktu wodnego czerwiu po usunięciu struktur komórkowych.
4. Udowodnienie, że możliwe jest stosunkowo proste z technologicznego punktu widzenia utrwalanie i wykorzystywanie preparatów uzyskiwanych z czerwiu trutowego w miodzie.
5. Zidentyfikowanie specyficznych dla czerwiu trutowego białek o masie 28 kDa i 12 kDa, które mogą być wykorzystane jako markery pozwalające jednoznacznie rozróżnić homogenat trutowy od mleczka pszczelego i tym samym wykrywać zafałszowania mleczka homogenatem.
6. Zaproponowanie trzech suplementów wykonanych na bazie czerwiu trutowego i przeprowadzenie badań biodostępności ich głównych składników i strawności białka podczas symulowanego trawienia *in vitro* w laboratoryjnym modelu przewodu pokarmowego.
7. Istotnym wkładem autorki do badań preparatów czerwiu trutowego jest wykazanie, że wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa cieczowa HPTLC daje dobre wyniki w badaniu profilu aminokwasowego, polifenolowego i cukrowego homogenatu czerwiu trutowego.
8. Na uwagę zasługuje umiejętność organizacji pracy w zespole i tworzenia zespołów badawczych do poszczególnych etapów badań.
9. Zdobyte doświadczenie w realizacji zawansowanych badań naukowych przy wykorzystaniu szerokiego wachlarza technik badawczych.

Uwagi krytyczne, które nasunęły się recenzentowi w trakcie zapoznania się z wynikami badań o charakterze merytorycznym przedstawiono poniżej w formie trzech pytań.

1. Dlaczego przy badaniu dodatku czerwiu mrożonego do miodu nie określano aktywności wody? Parametr ten determinuje trwałość mikrobiologiczną uzyskiwanych produktów i jest prosty w wykonaniu.
2. Dlaczego w zaproponowanych suplementach wykorzystano czerw siedmiodniowy, podczas gdy z badań wynika, że optymalnym wiekiem czerwiu jest jedenastodniowy?
3. W części wstępnej pracy zdaniem recenzenta brakuje odniesienia się Autorki do stosowanych metod badawczych we wcześniejszych badaniach preparatów otrzymanych z czerwiu trutowego. Ten problem nie jest też analizowany w publikacji I. Czy Doktorantka się zgadza z tym stwierdzeniem?

Uwagi krytyczne o charakterze redakcyjnym:

1. Istotnym błędem redakcyjnym jest postawienie hipotez badawczych i braku jednoznacznego odniesienia się do nich w podsumowaniu i wnioskach. Potwierdzenia hipotez można doszukać się w treściach sformułowanych wniosków niemniej Doktorantka powinna to jednoznacznie sformułować.
2. Autorka jest niekonsekwentna w podziale pracy na etapy. Na str. 10 autorka deklaruje, że pierwszym etapem pracy było zgromadzenie dostępnych informacji na podejmowany temat – co jest zgodne z prawdą. Studia literaturowe są bardzo istotnym pierwszym etapem badawczym, przy czym skupiają się na przyswajaniu wyników uzyskanych przez innych autorów. Na stronie 16 wyszczególniając etapy badań autorka nie uwzględnia tego elementu w realizacji badań.

5. Analiza dorobku naukowego mgr inż. Eweliny Sylwii Sidor

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w latach 2020 – 2023. Ich sumaryczny IF wynosi 20,485 a suma punktów wg Ministerstwa Edukacji i Nauki wynosi 430 pkt.

Analiza dorobku publikacyjnego doktoranta nie jest obligatoryjnie wymagana. Niemniej jest wyznacznikiem aktywności naukowej oraz wagi podejmowanych problemów badawczych. Mgr inż. Ewelina Sylwia Sidor jest współautorką 12 publikacji naukowych, jednej monografii i 6 rozdziałów w monografiach. Sumaryczny współczynnik publikacji wynosi $IF=54,26$, $h-index=6$, a suma punktów wg MEiN=1585. Niemniej szczególną aktywność Doktorantka wykazuje w udziale w konferencjach naukowych. W latach 2019 – 2023 była autorką 35 doniesień konferencyjnych zarówno jako prelegent (25 razy) i współautor posteru lub prezentacji (10 razy).

Dorobek publikacyjny i aktywność konferencyjna jednoznacznie pokazują, że autorka rozprawy doktorskiej jest aktywnym pracownikiem naukowym, podejmującym istotne zagadnienia naukowe i realizującym badania na wysokim poziomie naukowym.

4. Wnioski końcowe

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska pt. „Analiza składu chemicznego i aktywności biologicznej preparatów z czerwiu trutowego oraz możliwości ich wykorzystania w projektowaniu suplementów diety” autorstwa Pani mgr inż. Eweliny Sylwii Sidor jest oryginalnym opracowaniem aktualnego problemu naukowego w zakresie dziedziny nauk rolniczych i dyscypliny technologia żywności i żywienia. Doktorantka w oparciu o zaawansowane techniki badawcze zaplanowała, wykonała i opublikowała wyniki badań o dużym znaczeniu dla nauki i praktyki związanej z technologią żywności i żywienia. Autorka pracy wykazała się wiedzą teoretyczną oraz umiejętnościami pracy samodzielnej i w zespołach badawczych. Rozprawa opiera się na obszernym materiale źródłowym związanym z tematyką pracy a wyniki zostały opublikowane i są już wielokrotnie cytowane. Drobne uwagi krytyczne nie umniejszają wyników przeprowadzonych badań. Stroną redakcyjną opracowania i jej struktura jest właściwa a autorka sprostała zadaniu przedstawienia rozprawy w sposób poprawny i zwięzły. Autorka wykazała się znajomością wiedzy ogólnej i szczegółowej dotyczącej szeregu zaawansowanych technik analitycznych. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1688). Praca przygotowana przez mgr inż. Ewelinę Sylwię Sidor zawiera wiele nowych cennych informacji, które w przyszłości będą mogły być wykorzystane w praktyce do zagospodarowania czerwiu trutowego i przygotowania na jego bazie suplementów diety. Wyniki badań stanowią cenną wiedzę odkrywającą nowe obszary jakże starych produktów pszczelich.

Wnoszę o dopuszczenie rozprawy do publicznej obrony i jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. inż. Sławomir Bakier