Prof. dr hab. Barbara Wróblewska
Zakład Immunologii i Mikrobiologii Żywności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
ul. Tuwima10, 10-748 Olsztyn
Tel.: 89 5234688
E.mail.: b.wroblewska@pan.olsztyn.pl

Olsztyn dn. 31.08.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Anety Tomczak

pod tytułem

„Wartość odżywcza białek łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) i ich wpływ na alergenność żywności"

Podstawa opracowania recenzji

Podstawą opracowania recenzji jest Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 1 lipca 2021 roku oraz pismo podpisane przez Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu prof. UPP dr hab. Bożeny Danyluk z dnia 16.08.2021r.

Zawartość rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska wykonana została pod kierunkiem prof. UPP dr hab. inż. Magdaleny Zielińskiej-Dawidziak z Katedry Biochemii i Analiz Żywności, Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003r o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm., oraz Dz.U.2014, poz. 1383, z późn. zm) stanowi ona cykl pięciu spójnych tematycznie prac oryginalnych opublikowanych w angielskojęzycznych czasopismach naukowych oraz jednego opracowania polskojęzycznego. Wszystkie prace były opublikowane w latach 2018 - 2021:

1. Tomczak A., Zielińska-Dawidziak M., Piasecka- Kwiatkowska D., Lampart Szczapa E. 2018. Blue lupine seeds protein content and amino acids composition. *Plant, Soil and Environment,* 64 (4): 147-155.
IF: 1.530, MEiN: 70

2. Tomczak A., Zielińska-Dawdziak M., Piasecka- Kwiatkowska D., Springer E., Lampart-Szczapa E. 2018. Cross-reactions between proteins isolated from new narrow-leafed lupine breeding lines and antibodies present in the sera of patients sensitized to soybeans and peanuts. *European Food Research and Technology,* 245(2):433-441.
IF: 1.940, MEiN: 70
3. Tomczak A., Zielińska-Dawidziak M. 2018. Łubin - możliwości wykorzystania [Lupine - possibilities of use]. Przemysł spożywczy, 73(6): 25-28.MEiN: 5
4. Zielińska-Dawidziak M., **Tomczak A.,** Burzyńska M., Rokosik E., Dwiecki K., Pisaecka-Kwiatkowska D. 2019. Comparison of *Lupinus angustifolius* protein digestibility in dependence on protein, amino acids, trypsin inhibitors and polyphenolic compounds content. *International Journal of Food Science and Technology,* 55(5): 2029-2040.
MEiN: 70
5. **Tomczak A.,** Zielińska-Dawidziak M., Piasecka-Kwiatkowska D. 2020. Differences in the immunoreactivity of milk from local farms and from points of purchase. *European Food Research and Technology,* 246(1):93-101
IF: 2.998, MEiN: 70
6. Tomczak A., Kmiotek M., Zielińska-Dawidziak M. 2021. Soybean and lupine addition in hens nutrition - influence one egg immunoreactivity. *Molecules,* 26(14):4319.
IF: 4.411, MEiN: 100
SUMA IF: 10,879
SUMA MEiN: 385
Dla powyższych publikacji ilość punktów odpowiada punktacji czasopism umieszczonych na liście Ministra Edukacji i Nauki z dnia 9 lutego 2021 r.

Pani mgr Aneta Tomczak była pierwszym autorem w pięciu publikacjach.

Następstwem badań przedstawionych w powyższych publikacjach było opracowanie przez Doktorantkę projektu do konkursu Preludium pt.: „Badania nad składem białkowym i immunoreaktywnością jaj pozyskanych od kur karmionych paszami z dodatkiem nasion roślin strączkowych: łubinu i soi” , który uzyskał finansowanie z NCN.
Nr rejestracyjny: 2020/37/N/NZ9/00128; Kierownik projektu: mgr Aneta Tomczak.

Komentarz wstępny

W ostatnich latach obserwuje się wykorzystanie łubinu jako składnika żywności, zaś Polska jest jednym z największych producentów tego surowca wśród krajów europejskich. Łubin może być stosowany do zwiększenia zawartości białka w pieczywie, ciastkach, makaronach, sałatkach, hamburgerach i kiełbasach. Ze względu na swoje technologiczne właściwości może stanowić suplement białek soi i mleka. Białka nasion łubinu posiadają korzystne właściwości reologiczne takie jak właściwości emulgujące i pieniące oraz wysoką zdolność wiązania wody. Poza tym łubin ceniony jest ze względu na wartość odżywczą, stosunkowo wysoką zawartość białka i błonnika pokarmowego, ale niski poziom kwasów tłuszczowych i węglowodanów. Jest bogaty w przeciwutleniacze i witaminy, a w porównaniu do innych roślin strączkowych charakteryzuje się niskim poziomem czynników antyodżywczych takich jak inhibitory trypsyny lub saponiny.

Jednocześnie dane literaturowe wskazują, że łubin zawiera potencjalnie toksyczne alkaloidy i alergeny pokarmowe. Według danych z Allergen Nomenclature Subcommittee of the World Health Organization alergeny i izoalergeny łubinu należą do różnych rodzin białek: globulin (α-, β- i γ-konglutyna), albumin 2S (δ-konglutyna), białek związanych z patogenezą (PR-10), niespecyficznych białek przenoszących lipidy (nsLTP) i profilin. Alergia na białka łubinu może być konsekwencją dwóch różnych ścieżek uczulenia: pierwotnego uczulenie w wyniku spożycia białek łubinu lub pośrednio przez układ oddechowy. Uczulenie na białka łubinu może również wystąpić w wyniku reaktywności krzyżowej z innymi roślinami strączkowymi (soczewica, groch i soja), a w szczególności po kontakcie z orzechami ziemnymi.

W przedłożonej pracy Doktorantka skupiła się na ocenie wartości odżywczej polskich różnych odmian łubinu wąskolistnego, immunoreaktywności białek nasion oraz transmisji białek i peptydów potencjalnie alergennych do surowców roślinnych, a także zmianie ekspresji białek mleka i jaj pochodzących od zwierząt żywionych paszą wzbogaconą o nasiona łubinu wąskolistnego.

Omówienie

Rozprawa doktorska składa się z dwóch części. Pierwsza z nich (56 stron) to opis całości przeprowadzonych badań w języku polskim. Znajdują się tu wszystkie wymagane rozdziały tj. streszczenie po polsku i angielsku, wprowadzenie przybliżające czytelnikowi opracowane zagadnienie, hipotezy badawcze, cel pracy doktorskiej, wyniki badań w trzech podrozdziałach omawiające uzyskane rezultaty w porządku publikacyjnym, podsumowanie, wnioski, spis załączników oraz bibliografię. Drugą część opracowania stanowią kopie sześciu publikacji, składające się na rozprawę doktorską, a także oświadczenia współautorów o zakresie prac nad każdym z manuskryptów. Publikacje były już recenzowane przez ekspertów podczas walidacji ich do druku, nie mniej zapoznanie się z nimi nasunęło mi pewne wątpliwości, które chciałabym omówić i wyjaśnić z Doktorantką podczas obrony doktoratu.

1. Tomczak A., Zielińska-Dawidziak M., Piasecka-Kwiatkowska D., Lampart-Szczapa E. 2018. Blue lupine seeds protein content and amino acids composition. *Plant, Soil and Environment,* 64 (4): 147-155.

Przedstawione badania miały na celu wskazanie najkorzystniejszej odmiany łubinu wąskolistnego pod względem wartości odżywczej. Uprawy przeprowadzono w latach 2015 i 2016r, w dwóch lokalizacjach województwa wielkopolskiego, Wiatrowie i Przebędowie, oddalonych od siebie o ok. 26 km. Udział Doktorantki dotyczył wykonania analiz składu aminokwasowego, co stanowiło istotną część badawczą opisaną w manuskrypcie, przygotowanym w głównej mierze przez Pani mgr Anetę Tomczak. Różnorodność wyników nie pozwoliła na wskazanie jednej odmiany łubinu, którą można byłoby uznać za najkorzystniejszą. Wpływ warunków pogodowych, suma opadów i odmiana łubinu były decydującymi czynnikami wpływającymi na rezultaty badań w każdej lokalizacji geograficznej. Spostrzeżenia te są istotne w aspekcie prowadzenia upraw łubinu, albowiem uzyskane wyniki analityczne dowodzą, że nie można unifikować wyników chociażby ze względu na położenie geograficzne doświadczalnych pól. Warto podkreślić, że wyniki badań pozwoliły na weryfikację jednej z hipotez założonych na początku projektu.

2. Tomczak A., Zielińska-Dawdziak M., Piasecka-Kwiatkowska D., Springer E., Lampart-Szczapa E. 2018. Cross-reactions between proteins isolated from new narrow-leafed lupine breeding lines and antibodies present in the sera of patients sensitized to soybeans and peanuts. *European Food Research and Technology,* 245(2):433-441.
IF: 1.940, MEiN: 70

Kolejna publikacja dotyczy określenia immunoreaktywności białek obecnych w nowych odmianach łubinu waskolistnego. Wkład Doktorantki podczas realizacji badań w zakresie tego zadania był znaczny i dotyczył oznaczenia stężenia białka, ekstrakcji białek, przeprowadzenia elektroforezy SDS-PAGE, metody western-blot, a fazie końcowej przygotowania manuskryptu. Wobec braku dostępności do surowic ludzkich skierowanych bezpośrednio do białek łubinu Autorka użyła surowicę pacjentów z alergią na soję i orzechy ziemne wykorzystując wiedzę literaturową dotyczącą występowania reakcji krzyżowych pomiędzy białkami roślin strączkowych. Jest to praktyczny rodzaj podejścia analitycznego, pozwalający w przybliżeniu oszacować immunoreaktywność nowego źródła białek pokarmowych. Szkoda, że wykorzystano tylko dwie surowice, chociaż zdaję sobie sprawę, że jest to bardzo drogocenny analit i trudny do uzyskania, warunkujący badania tego typu. W opisie brakuje jednak dokładnej analizy użytych surowic. Interesuje mnie czy pacjenci, od których pochodziły surowice byli alergikami tylko na soję i orzechy arachidowe? Czy przeprowadzono analizę tylko w kierunku tych dwóch źródeł alergenów, na co wskazywałoby użycie testu ELISA? Jak wobec tego ustalić ewentualne reakcje krzyżowe wynikające z polialergii, o ile takowa występowała u pacjentów i mogłaby wpłynąć na modyfikcję wyników? Proszę o zajęcie stanowiska w tym zakresie.

Mam wątpliwości, czy stosowanie wymiennie nazwy „białko" i „peptyd" jest prawidłowym postępowaniem podczas interpretacji wyników uzyskanych metodą SDS-PAGE, która służy do analizy profilu białek?

Dotychczasowe dane literaturowe zalecają stosowanie nazw:
- „peptyd" - dla związków składających się z mniejszej ilości monomerów aminokwasowych niż 100.
- „białko" - dla związków składających się z większej ilości monomerów aminokwasowych niż 100.

Dlatego też granica masy molekularnej między peptydami (polipeptydami) a białkami jest określona jako 10 kDa.
W tym miejscu, proszę Doktorantkę o komentarz na temat zastosowanej nomenklatury przy opisie elektroforezy zarówno w publikacji (np. str 437: „20 peptides with MW in the range 21–84 kDa" i „extract obtained from peanut, only of 9 peptides with MW among 19–60 kDa" itd. na dalszych stronach publikacji) jak i w polskojęzycznej części opisowej doktoratu.

Odnosząc się do opisu przygotowanego przez Doktorantkę (str 29) chciałabym zwrócić uwagę, że podczas swoich badań nie przeprowadziła Ona identyfikacji głównych alergenów pokarmowych Gly m 5 i Gly m 6 (sojowych) oraz Ara h 2 i Ara h 3. Aby tego dokonać należałoby wykonać analizę spektrometryczną i poprzez analizę *in silico* ustalić skład wyizolowanego białka i jego pozycję oraz charakterystykę w bazach danych. Mogę sądzić, że wizualizacja profilu białkowego próbek łubinu i porównanie obrazów SDS-PAGE dostępnych literaturowo było pomocne w ustaleniu nazw uwidocznionych spotów białek o określonej masie molekularnej. Byłabym jednak ostrożna ze wskazywaniem białek łubinu jako znanych i zidentyfikowanych już

alergenów wyłącznie poprzez homologię z wynikami opublikowanymi wcześniej przez różnych autorów dla analogicznych surowców roślinnych. Należałoby wykonać dalsze analizy proteomiczne, które pozwoliłyby na faktyczną identyfikację reaktywnych białek łubinu.

3. Tomczak A., Zielińska-Dawidziak M. 2018. Łubin-możliwości wykorzystania [Lupine - possibilities of use]. Przemysł Spożywczy, 73(6): 25-28.MEiN: 5

Uważam, że zamieszczenie tej publikacji nie było konieczne, albowiem jest to polskojęzyczny artykuł opublikowany w Przemyśle Spożywczym, które to czasopismo jest „fachowym miesięcznikiem przeznaczonym dla menedżerów i technologów branży spożywczej". Autorka wspomniała (20 strona opisu rozprawy doktorskiej), że duża część artykułu została wykorzystana do opracowania słowa wstępnego doktoratu. Publikacja nie wnosi oryginalnych wyników do samego doktoratu, aczkolwiek przybliża wiedzę osobom zainteresowanym wykorzystaniem łubinu w przemyśle spożywczym. Popularyzowanie wyników własnych badań naukowych jest pożądanym krokiem, co uznaję za główne intencje Autorki.

4. Zielińska-Dawidziak M., **Tomczak A.,** Burzyńska M., Rokosik E., Dwiecki K., Piasecka-Kwiatkowska D. 2019. Comparison of *Lupinus angustifolius* protein digestibility in dependence on protein, amino acids, trypsin inhibitors and polyphenolic compounds content. *International Journal of Food Science and Technology,* 55(5): 2029-2040.
MEiN: 70

W niniejszym artykule Doktorantka dokonała porównania strawności białek badanych odmian łubinu wąskolistnego zebranych w dwóch kolejnych latach (2015 i 2016) w zależności od miejsca uprawy, czynników pogodowych, aktywności inhibitora trypsyny, stopnia ekstrahowalności białek, składu aminokwasowego nasion oraz obecności związków fenolowych. We wnioskach Doktorantka zawarła stwierdzenie, że nie zaobserwowała statystycznej zależności pomiędzy ilością flawonoidów a strawnością białka. Interesuje mnie czy Doktorantka rozważała możliwość analizy oddziaływania poszczególnych związków fenolowych na strawność białka, a nie tylko oceniając ich ogólną ilość. Czy w Pani opinii, któreś ze związków fenolowe mogą mieć szczególnie znaczący wpływ na strawność białek? I czy Doktorantka widzi potrzebę i /lub możliwość ingerencji w poziom strawności poprzez zmiany w składzie związków fenolowych?

5. **Tomczak A.,** Zielińska-Dawidziak M., Piasecka-Kwiatkowska D. 2020. Differences in the immunoreactivity of milk from local farms and from points of purchase. *European Food Research and Technology,* 246(1):93-101.
IF: 2.998, MEiN: 70

Zmiany immunoreaktywności wyrobów spożywczych wskutek procesów technologicznych, w kierunku ich obniżenia, są oczekiwanym wynikiem procesów prowadzonych na surowcach i produktach. W realizowanym projekcie Doktorantka dokonała obserwacji jakości mleka uzyskanego po żywieniu zwierząt paszami o zróżnicowanym składzie, tj. dodatku nasion łubinu wąskolistnego lub soi. W publikacji brakuje danych dotyczących dawki nasion łubinu zastosowanej podczas żywienia zwierząt oraz rodzaju obróbki technologicznej nasion o ile taka

była prowadzona. Jest to o tyle istotne, że nasiona łubinu posiadają w swym składzie substancje niepożądane, głównie alkaloidy, co decyduje o granicznej dawce stosowania ich do paszy. Proszę w tym miejscu Doktorantkę o wyjaśnienia.

Czytając wstęp zaintrygowało mnie zdanie dotyczące IgA- i IgG-zależnej alergii ("The mechanism of those undesirable and abnormal reactions of the immune system to milk proteins is recognized both as the IgE-mediated type as well as non-IgE mediated (i.e., IgA- or IgG-mediated) allergies"). Proszę Autorkę o wyjaśnienie, co w Jej ocenie oznacza „IgA- or IgG-mediated allergy".

Wyniki uzyskane w badaniach przez Doktorantkę nakłoniły Ją do wysnucia śmiałego wniosku dotyczącego możliwości wystąpienia różnic w składzie białek mleka (cyt.: „The presented results indicate a possible difference in milk protein composition, and—as a consequence—in immunoreactivity of milk obtained from the cows fed fodder of different compositions"). Trudno mi jest zgodzić się z Autorką, że w profilu białkowym mleka krowiego ujawniły się dodatkowe białka o masie cząsteczkowej ok. 18 kDa i ok. 15kDa (ang. additional proteins) na profilu SDS-PAGE, więc chętnie w tym miejscu wysłucham dodatkowych wyjaśnień.

Interpretacja wyników profilu białek na elektroforegramie dotycząca pojawienie się nowych białek w profilu wydaje się być kontrowersyjna. W procesie syntezy białek mleka u ssaków, przebiegającym szlakiem mTOR, kluczową rolę spełniają aminokwasy, jako elementy budulcowe, glukoza, która jest źródłem energii i insulina. Wydajność mleczna krów jest zależna od ich diety, jednakże kompozycja białek mleka jest niezmienna, chociaż ekspresja poszczególnych białek może zwiększać się lub zmniejszać wskutek żywienia i stymulowania zwierząt paszami o zróżnicowanym składzie (kukurydza, lucerna, zboża, kiszonki).

Proszę o wyjaśnienie dlaczego nie wykonano analiz mleka np. elektroforezą dwukierunkowa i Maldi-Tof/MS z wykorzystaniem danych np. z bazy informatycznej Mascot, co pozwoliłyby na rozpoznanie i dokładną identyfikację nieznanego białka. Wykonanie tej analizy nie jest obecnie kosztowne i w zależności od żądanego zakresu analizy zamknęłoby się w granicach 700-2000 PLN dla jednego białka. Takie podejście pozwoliłoby na pełne wnioskowanie i na pewno stanowiłoby nowość w badaniach, oraz od razu rozwiałoby wszelkie wątpliwości co do pochodzenia białka. Poproszę w tym miejscu Doktorantkę o komentarz czy zamierza rozwijać ten typ badań i jeżeli tak, to w jakim kierunku.

Doktorantka podkreśliła także, że immunoreaktywność mleka była pochodną rodzaju paszy jaką otrzymywały krowy. Próbki pozyskane od krów żywionych paszami zawierającymi rośliny strączkowe, soję bądź łubin, były mniej immunoreaktywne w reakcji z surowicami dzieci z alergią na soję. Przyjmuję ten fakt, ponieważ można sądzić, że dieta, a następnie metabolizm dokonujący się w organizmie krowy mógł mieć wpływ na taki stan rzeczy. Ekspresja białek alergennych mogła ulec zmianie, a co z tym jest związane, ich reaktywność.

W paragrafie dotyczącym materiałów i metod zabrakło mi informacji dotyczącej testu ELISA zastosowanego do określenia klasy przeciwciał użytych do analiz. Czy był to test komercyjny, jeśli tak to jakiej firmy (numer katalogowy)?

W części obejmującej wyniki i dyskusję Autorka napisała, że nie stosowała podczas badań trawienia *in vitro,* ponieważ dzieci cierpiące na alergię z racji niedojrzałego w pełni układu immunologicznego, trawią białka w upośledzony sposób (str. 96.: „To analyze peptides and

proteins in the studied samples, they were not digested in the in vitro experiment, because milk allergy affects mainly children with an immature immune system and the problem of allergy results also from incomplete digestion of proteins in their digestive tract").

Trudno zgodzić się z takim tłumaczeniem, albowiem bieżące badania dowiodły, że w mleku przeznaczonym do spożycia, peptydy są już obecne jeszcze przed jego konsumpcją, co jest wynikiem licznych procesów technologicznych, którym jest ono poddawane podczas produkcji. Dane literaturowe wskazują, że podczas trawienia w żołądku zidentyfikowano ok. 650 peptydów pochodzących z białek mlecznych, przy czym ich głównym źródłem jest β-kazeina. Bioaktywne peptydy, obecne na etapie żołądka niemowląt, posiadają różne aktywności biologiczne (immunomodulujące, opioidowe, przeciwnadciśnieniowe i przeciwbakteryjne). Na dalszych etapach trawienia powstają kolejne peptydy, których liczba przekracza ponad 1500. Te dane wskazują na potencjalną trudność w identyfikacji pochodnych białek na drodze *in vitro*, zaś epitopy są strukturami dość trwałymi, dlatego też migrując ze światła jelita do komórek stają się niebezpieczne dla osób z alergią. Warto podkreślić, że w badaniach na prosiętach stwierdzono także w świetle jelita obecność białek nietrawionych w ilości ok 1-2%.
Szkoda, że obserwacje poczynione podczas prac badawczych nie zostały skorelowane z analizą *in silico*, tym bardziej, że Autorka podkreśliła iż w bieżącej literaturze brak jest informacji nt. reaktywności krzyżowej pomiędzy β-lg, białkami soi i łubinu (str. 99.: "But there is no information in the literature about the cross-reactivity of BLG, soy and lupine."). Przedstawione analizy slot-blot są zazwyczaj obarczone błędem, aczkolwiek można sądzić, że pomagają we wnioskowaniu w zakresie immunoreaktywności badanych surowców i produktów.

6. Tomczak A., Kmiotek M., Zielińska-Dawidziak M. 2021. Soybean and lupine addition in hens nutrition - influence one egg immunoreactivity. *Molecules,* 26(14):4319.
IF: 4.411, MEiN: 100

Na tym etapie prac badawczych Doktorantka zaproponowała doświadczenie, w którym analizowała skład białkowy jaj pochodzących od kur żywionych różnymi paszami. W paszach zastosowano dodatek soi oraz łubinu wąskolistnego. Artykuł jest już opublikowany, jednakże kilka kwestii chciałabym przedyskutować z Doktorantką podczas obrony.

W celu ekstrakcji białek zostało użytych sześć różnych ekstrahentów, wybranych na podstawie dostępnej literatury. Uzyskano zróżnicowane profile białkowe poszczególnych ekstraktów. Jednakże słaba jakość elektroforegramów (Fig.1. str.3) nie pozwala na dokładną ich ocenę. Na elekroferegramie nie pokazano całości żelu, na którym byłyby widoczne studzienki, obrazujące początek analizy. Dół elektroforegramu jest ucięty i nie można ocenić czy analiza dobiegła końca. Są to wycinki profilu białkowego praktycznie niemożliwe do identyfikacji. Być może ilość białka w studzienkach była zbyt duża i stąd taki niewyraźny obraz (?), ponadto opisy poszczególnych ścieżek są przesunięte, co zaburza ich prześledzenie. Pomimo wyboru Doktorantki, co do ekstrahenta, osobiście uznałabym za korzystniejszy PBS, gdzie uzysk białka był wystarczający (Tab.1.) oraz obraz elektroforetyczny uzyskanych białek był wyraźniejszy. Stosując roztwory Tritonu lub SDS do ekstrakcji można sądzić, że białka były silnie zdenaturowane już podczas procesu ekstrakcji i podzielone na podjednostki i/lub izoformy, co mogło zaważyć na interpretacji uzyskanych wyników podczas elektroforezy i dalszej pracy badawczej.

Ze swej strony zalecałabym zapoznanie się np. z pracą GUILMINEAU et al., J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 9329−9336 gdzie zaprezentowano łagodny proces ekstrakcji białek, które następnie były uwidocznione w 20 oddzielnych prążkach, z opisem mas cząsteczkowych, relatywnego udziału i ich nazw prawdopodobnych białek. Niewątpliwie ta praca powinna znaleźć się w dyskusji wyników.

Fig.1. Ten elektroforegram jest kluczowy dla dalszego ciągu pracy. Uważam, że na tym etapie ekstrakty powinny być analizowane metodą elektroforezy dwukierunkowej, a wszystkie białka zidentyfikowane metodą proteomiczną do tego dedykowaną (MS, Maldi Tof MS/MS). Wówczas łatwo byłby ocenić zmiany w mapie białek jaj pochodzących od kur żywionych różnymi paszami.

Fig. 2 przedstawia profil białek obecnych w białku jaj kurzych. W tym miejscu Autorka używa frazy „alergen were identified". Niestety nie można mówić o „identyfikacji" białek tylko poprzez porównanie do danych literaturowych. Ponownie, moja uwaga dotyczy potrzeby analizy spektrofotometrycznej, która pozwoliłaby faktycznie na identyfikację białek, ich izoform, i/lub fragmentów aminokwasowych.

Uważam też, że trudno osądzić, aby białko o masie ok. 20 kDa było nowym, nieznanym białkiem. Może to być lekki łańcuch miozyny 1f (Gal d 7), który ma masę cząsteczkową 22 kDa, bądź inna determinanta alergenowa pochodząca z białek jaja. Baza Allergome opisuje obecnie 18 białek jaj o charakterze alergennym (Gal d 1.0101, Gal d 2, Gal d 2.0101, Gal d 3, Gal d 3.0101, Gal d 4, Gal d 4.0101, Gal d 5, Gal d 5.0101, Gal d Apo I, Gal d Apo VI, Gal d Clusterin, Gal d IgY, Gal d OIH, Gal d Ovomucin, Gal d Phosvitin, Gal d RfBP). Ciekawa jestem, czy Doktorantka będzie jeszcze kontynuowała swoje badania, albowiem warto byłoby zidentyfikować białko, które obecnie nosi miano "nieznanego".

Ponadto, chcę zwrócić uwagę, że elektroforeza nie jest analizą ilościową, dlatego też nie można użyć zwrotu „decrease in **the content** of the protein with the molecular mass ~17 kDa (marked by an asterisk) compared to their **content** in control eggs was observed".

Fig. 3 W porównaniu do poprzedniego elektroforegramu (Fig.2) zwróciłam uwagę, iż w celu uwidocznienia białek obecnych w białku jaj, Doktorantka zastosowała barwienia Coomasi. Co podyktowało taki wybór? Wydaje mi się, że korzystniejsze byłoby w tym przypadku barwienie srebrem, będące metodę czulszą od wybranej.

Fig.4. Ten elektroforegram jest odwrotnym przykładem problematycznego barwienia białek. Przy spodziewanej dużej ilości białek ujawnionych podczas SDS-PAGE, zastosowanie barwienia srebrem może być dyskusyjne, tym bardziej przy słabej jakości załączonego elektroforegramu. Widocznych jest tu wiele niewyraźnych prążków i w tym wypadku przyporządkowanie nazw poszczególnym białkom, ujawnionym w postaci licznych plam poprzez analogię do danych literaturowych może być obarczone dużym błędem.

Fig.5. Ważnym aspektem dobrze przeprowadzonej elektroforezy jest wypracowanie optymalnej ilości białka aplikowanego do studzienki. Wydaje się, że można byłoby jeszcze dopracować warunki rozdziału, aby uzyskać wyraźny profil białek. Ilość białka w czterech studzienkach z prawej strony żelu wydaje się być zbyt duża, tym samym objętość poszczególnych prążków jest większa niż w pierwszych ścieżkach z lewej strony żelu, co powoduje „zepchnięcie" niżej wszystkich białek w danej próbie. Dlatego też trudno kategorycznie wnioskować, jakie białka są obecne na profilu. Co prawda, na omawianym elektrforegramie brakuje merkerów białkowych dla białek powyżej ok. 26 kDa, aczkolwiek Autorka podkreśla obecność nowego białka o masie cząsteczkowej ok. 37 kDa. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie prawdopodobnego pochodzenia tego

białka. A może już były prowadzone dalsze badania w kierunku jego identyfikacji?
Na str 6. przy opisie wyników Western-blotu (p.2.2.4.) wkradł się błąd dotyczący nazwy alergenu lizozymu. Powinno być Gal d 4, a nie Gal d 3.
Fig. 6-10 prezentują wyniki uzyskane podczas analizy Western-blot. Identyfikacja zastosowanych surowic jest mało precyzyjna. Należałoby dodać jaką metodą były analizowane surowice. Czy pacjenci byli uczuleni tylko na jeden alergen (są to bardzo rzadkie przypadki), czy też surowice były diagnozowane wobec obecności jednego, poszukiwanego alergenu? Jakie objawy występowały u pacjentów podczas kontaktu z alergenami? Czy wynikały one jedynie z kontaktu z jajem lub soją, czy były wynikiem polialergii lub reakcji krzyzowych. W opisie metody Western-blot brak informacji ile razy była rozcieńczana surowica wzięta do badań. Być może postępowanie analityczne miało wpływ na słabą jakość uzyskanych wizualizacji. Proszę Doktorantkę o uzupełnienie tych informacji podczas obrony doktoratu.
Identyfikowanie białek obecnych na membranie, po blotingu bezsprzecznie wymaga użycia zaawansowanych technik spektrofotometrycznych. W inny sposób, trudno jest jednoznacznie określić z jakimi białkami mamy do czynienia, stosując jedynie analizę porównawczą.
W tym miejscu, w celu zachęcenia do dalszych, szczegółowszych badań chciałbym przytoczyć wyniki niemieckich naukowców, którzy opisali za pomocą metody LTQ Orbitrap Velos z wykorzystaniem oprogramowania MaxQuant identyfikację 158 białek w białku jaja kurzego, w tym 79 białek odkrytych zostało po raz pierwszy (Mann & Mann, 2011). Wskazuje to na możliwość identyfikacji nawet śladowych komponent, które mogą posiadać determinanty alergenowe reagujące krzyżowo z innymi alergenami. Być może metoda elektroforetyczna przeprowadzona przez Doktorantkę również ujawnia białka jaja dotychczas nie brane pod uwagę jako główne i silne alergeny. Nie mniej konieczna jest analiza proteomiczna, która mogłaby potwierdzić ten fakt.

Uwagi edytorskie

Podczas czytania przedłożonej do recenzji pracy zwróciłam uwagę na pewne niedociągnięcia redakcyjne w opisie przygotowanym w języku polskim, takie jak zgubione i przestawione litery w wyrazach, brak spacji czy przecinka. Gotowe publikacje też nie były wolne od małych błędów o czym wspominam jedynie z obowiązku osoby opiniującej. Jednakże w mojej ocenie, nie rzutują one na merytoryczną jakość pracy.

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że praca doktorska przedstawiona do recenzji jest dobrze zaplanowana i spójna pod względem przeprowadzonych badań. Merytorycznie, przedstawione zagadnienia mieszczą się w zakresie dyscypliny technologia żywności i żywienia. Doktorantka przedstawiła bogaty plan działań począwszy od uprawy łubinu wąskolistnego w dwóch lokalizacjach, poprzez ocenę jakości uzyskanych nasion i analizę ich właściwości, a skończywszy na suplementacji łubinem paszy krów i kur oraz ocenie pozyskanych surowców tj.

mleka i jaj. Realizacja projektu wymagała od Autorki pełnego zaangażowania, dużej wiedzy merytorycznej i dobrej organizacji badań. Niewątpliwie praca stanowi znaczący wkład w poszerzenie dotychczasowego stanu wiedzy na temat jakości białek łubinu wąsokolistnego i jego pośredniego wpływu na alergenność żywności pochodzenia zwierzęcego (mleko, jaja).

Stwierdzam, że praca doktorska jest napisana w sposób prawidłowy, zgodnie z wymogami określonymi w art.13. ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz.1383, z późn. zm). Jest to opracowanie oryginalne, dobrze zaplanowane z możliwością kontynuacji i zastosowania zdobytej wiedzy w przemyśle spożywczym i rolnictwie. A więc ma charakter aplikacyjny. Niedociągnięcia jakie zostały zauważone i wskazane w publikacjach przeze mnie podczas recenzji niniejszej pracy nie umniejszają jej merytorycznej wartości.

Powyższe stwierdzenie upoważnia mnie do przedłożenia Radzie Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wniosku o przyjęcie pracy doktorskiej pt.: „Wartość odżywcza białek łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) i ich wpływ na alergenność żywności" oraz o dopuszczenie jej Autorki mgr inż. Anety Tomczak do publicznej obrony.

Prof. dr hab. Barbara Wróblewska