Dr hab. inż. Małgorzata Dżugan, prof. UR
Zakład Chemii i Toksykologii Żywności
Instytut Technologii Żywności i Żywienia
Uniwersytet Rzeszowski

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr inż. Marty Stefanii Burzyńskiej
pt.: „Badania nad immunoreaktywnymi właściwościami polskich odmianowych miodów nektarowych"

wykonanej w Katedrze Biochemii i Analizy Żywności,
Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
pod kierunkiem **dr hab. prof. UPP Doroty Piaseckiej-Kwiatkowskiej**

Podstawą przygotowania recenzji jest pismo Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu prof. UPP dr hab. Bożeny Danyluk z dn. 23.07.2021r. powołujące się na Uchwałę Rady Wydziału z dn. 19.09.2019 r.

Ocena podjętej tematyki badawczej

Miód jest zdrowym naturalnym produktem dietetycznym o wielowiekowej tradycji stosowania, obfitym w cenne składniki odżywcze i biologicznie aktywne. Profil jakościowy i zawartość tych składników w miodzie jest niezwykle zróżnicowana, zależy od pochodzenia botanicznego (odmiany) i geograficznego miodu. Racjonalnie spożywany miód, podnosi odporność organizmu, uzupełnia niedobory witamin i biopierwiastków, a także wspomaga leczenie wielu schorzeń. Ze względu na zawartość specyficznych białek może jednak wykazywać działanie alergizujące. Alergia na miód pszczeli występuje rzadko, silna dotyczy <0.001% populacji, zwykle występuje u osób uczulonych na pyłki kwiatowe roślin, niektóre składniki pożywienia (alergia krzyżowa), jad owadów czy zarodniki grzybów pleśniowych. Uczulenie na miód może objawiać się w różny sposób, zazwyczaj obejmuje zaburzenia dermatologiczne i ze strony układu pokarmowego, rzadziej prowadzi do zaostrzenia objawów astmy czy reakcji natychmiastowej -anafilaksji.

W literaturze popularnonaukowej można znaleźć informacje o zróżnicowanym odmianowo działaniu alergizującym miodu. Alergików ostrzega się przed miodem spadziowym, za „bezpieczny" uważany jest miód wielokwiatowy i akacjowy. Informacje te znalazły potwierdzenie w nielicznych badaniach naukowych. Problem alergennych składników miodu rzadko stanowi obiekt badań naukowych, chociaż tematyka związana z miodem wzbudza coraz szersze zainteresowanie naukowców. Liczba artykułów naukowych indeksowanych w bazie Scopus w latach 2018-2020 zawierających słowo kluczowe „miód" wyniosła 7125, ale dla kombinacji słów „miód" i „alergia" to zaledwie 50 publikacji. Wśród nich pojawiają się

doniesienia naukowe potwierdzające skuteczność stosowania miodu w terapiach odczulających u osób cierpiących z powodu alergii pyłkowej, głównie dzieci.
W tym kontekście tematyka podjęta przez Doktorantkę dotyczy problemu naukowego, oczekującego na rozwiązanie, stanowi wyzwanie analityczne i diagnostyczne, a w obliczu rosnącej częstotliwości występowania alergii ma niezwykle istotne znaczenie medyczne i żywieniowe. **Biorąc to pod uwagę wysoko oceniam aktualność i znaczenie podjętej tematyki rozprawy.**

Formalna ocena pracy

Przedłożona do oceny praca doktorska ma charakter eksperymentalny i została opracowana w formie monografii zawartej na 165 stronach maszynopisu. Struktura rozprawy jest poprawna, typowa dla prac o charakterze empirycznym, z podziałem na część literaturową oraz doświadczalną, których wzajemne proporcje są odpowiednie dla tego typu opracowań. Treść pracy poprzedzają jednostronicowe streszczenia w języku polskim oraz angielskim. Część literaturowa, obejmująca 10 podrozdziałów liczy 40 stron, a część doświadczalna, zawierająca cel i hipotezę pracy, opis materiału badanego i metod badawczych, omówienie wyników połączone z dyskusją, podsumowanie i wnioski końcowe oraz materiały dodatkowe (Aneks), została zawarta na 103 stronach. Wykaz bibliografii obejmuje 383 pozycji, w tym 358 źródeł literaturowych, 14 aktów prawnych i 11 źródeł internetowych. Ok. 50% pozycji pochodzi z ostatnich 10 lat, a 13% to prace opublikowane w latach 2016-2020. Bogaty materiał graficzny, obejmujący 28 rycin i 29 tabel, stanowi cenne uzupełnienie zaprezentowanych treści. Dodatkowe 15 tabel i 4 przykładowe chromatogramy Autorka zamieściła w Aneksie.
Praca jest napisana poprawnym językiem, z pojedynczymi błędami edytorskimi, co nie wpływa istotnie na jakość tekstu. Podsumowując tę część oceny pracy mogę stwierdzić**, że recenzowana praca spełnia wszystkie formalne wymagania stawiane rozprawom naukowym.**

Ocena merytoryczna rozprawy

Tytuł pracy został sformułowany prawidłowo, zwięźle i adekwatnie do treści pracy, która stanowi raport z badań nad immunoreaktywnością polskich miodów nektarowych.
Streszczenie pracy w wersji polskiej i równoważnej angielskiej zawiera syntetyczny opis przeprowadzonych badań, zabrakło w nim jednak podkreślenia najważniejszych osiągnięć Doktorantki.
Wstęp i Przegląd literatury sprawnie wprowadzają czytelnika w tematykę dysertacji. Ta część stanowi wyczerpujące wprowadzenie do eksperymentalnej części pracy i potwierdza bardzo dobrą znajomość podjętej tematyki. Rozdział obejmuje zwięzły przegląd literatury dotyczącej zagadnień związanych z powstawaniem miodu oraz wymagań odnośnie jego jakości ujętych w obowiązujących regulacjach prawnych. Przedstawiono także aktualne dane określające stan branży pszczelarskiej w Polsce, z podkreśleniem znaczenia pszczół dla uprawy roślin. W kolejnym podrozdziale dokonano charakterystyki składu chemicznego miodów, z naciskiem na składniki decydujące o jego aktywności biologicznej. Szczególną uwagę poświęcono białkom

miodowym, opisano enzymy pochodzenia pszczelego i pyłkowego oraz proteiny występujące w mleczku pszczelim (MRJP). W rozdz. 2.7 zamieszczono szczegółową charakterystykę podstawowych frakcji alergennych pochodzących od pszczoły miodnej *Apis mellifera*, zarejestrowanych w banku danych o alergenach WHO/IUIS, a dalej przedstawiono stan wiedzy nt. występowania alergii na miód. Przegląd literatury kończą rozważania dotyczące występowania pyłków kwiatowych w miodach, ich potencjalnego działania alergizującego, jak również znaczenia dla swoistej immunoterapii alergenowej. Zwrócono także uwagę na problemy analityczne w badaniach immunochemicznych, związane z występowaniem determinant węglowodanowych CCDs w glikoproteinach miodu. Przegląd literatury został wzbogacony materiałem ilustracyjnym w postaci licznych fotografii własnego autorstwa, struktur białek alergennych i ich charakterystyki zebranej w formie tabeli. W tym ostatnim przypadku zabrakło cytowania prac, z których zaczerpnięto ryc. 4 i tab. 3. Treść rozdziału 2. oparta jest na aktualnych publikacjach zamieszczonych w indeksowanych czasopismach naukowych.

Lektura tej części pracy pozwala na wskazanie nieścisłości, które pojawiły się w tekście:

Str 3 błędnie podana nazwa Zakładu Pszczelnictwa w Puławach

Str 10 raczej „bezpieczeństwa żywieniowego" niż „żywności"'

Str 11 „miód krystalizuje bardzo łatwo i szybko", to zbyt duże uogólnienie tempo krystalizacji jest bardzo zróżnicowane, zależne od odmiany

Str 12 kwasy organiczne odpowiadają za „stabilność mikrobiologiczną" a nie „stabilność wobec mikroorganizmów"

Str 12 skład mineralny miodów należało porównywać do miodów krajowych, jest on determinowany głównie przez pochodzenie geograficzne miodu

Str 15 Apiterapia to metoda leczenia stosowana powszechnie w medycynie naturalnej

Str 16 raczej „od nektarowania" niż „plonowania roślin"

Str 36 błąd w numeracji rozdz. 2.9.2

Str 42 brak wyjaśnienia skrótu PNGazy F

Podsumowując tą część pracy stwierdzam, że Pani mgr Burzyńska w rzetelny i ciekawy sposób wprowadza czytającego w przedmiot swoich badań, podkreślając celowość ich prowadzenia. **Dobór merytoryczny źródeł oraz sposób ich wykorzystania uważam za prawidłowy.**

Hipotezy badawcze i cel pracy

Główny cel pracy został sformułowany bardzo precyzyjnie, jako „Identyfikacja i ustalenie źródła pochodzenia immunoreaktywnych frakcji białkowych w badanych polskich odmianowych miodach nektarowych". Do jego realizacji wyodrębniono 4 cele szczegółowe, które wytyczyły poszczególne etapy prowadzonych badań: 1- ocena jakości odmianowych miodów nektarowych z różnych regionów Polski, 2- analiza melisopalinologiczna badanych miodów, 3 -porównanie frakcji białkowych różnych odmian miodów nektarowych, 4- analiza immunoreaktywności polskich miodów odmianowych. Do weryfikacji postawiono jedną hipotezę badawczą, skoncentrowaną na wykazaniu, że „Alergenność polskich miodów

nektarowych jest silnie związana z odmianą miodu i stężeniem aeroalergenów w okolicy pasieki". Tak sformułowana hipoteza jest spójna z wyznaczonym celem pracy.

Metodyka pracy

W tej części pracy Doktorantka opisała materiał badany, dokumentując pochodzenie geograficzne próbek miodu na mapie Polski i przedstawiając je na fotografii (ryc. 6). Następnie opisała materiały stosowane w badaniach nad immunoreaktywnością miodów, scharakteryzowała stosowane surowice pacjentów z alergią wg testu RAST i przeciwciała komercyjne. W dalszej części szczegółowo opisała stosowane metody analityczne, dzieląc je na trzy grupy, służące realizacji określonych celów pracy, jakimi były: analiza jakości miodów (zawartość wody, kwasowość, barwa wg skali Pfunda, zawartość cukrów prostych i analiza pyłkowa), analiza białek występujących w miodach (białko ogólne i frakcja rozpuszczalna, profil aminokwasowy metodą UPLC i profil białkowy metodą SDS-PAGE) oraz immunoreaktywne właściwości miodów (metoda Western-blotting i Slot-blot). Rozdział kończy opis zastosowanych metod statystycznych.

Lektura tej części pracy nasuwa następujące uwagi:

1. Jak długo przechowywano miody pochodzące z sezonu pszczelarskiego 2017 do czasu prowadzenia analiz, z załączonej fotografii wynika, że wszystkie miody (w tym akacjowe) uległy naturalnej krystalizacji?
2. Mimo zróżnicowanej lokalizacji pasiek, niektóre odmiany miodów pozyskano z tych samych regionów kraju, co mogło wpłynąć na wyniki analizy aeroalergenów w miodach.
3. Zawartość aminokwasów w miodzie wyrażono na 100 mg białka. W sytuacji, gdy zawartość białek w miodzie zwykle nie przekracza 1%, taka jednostka utrudnia interpretację uzyskanych wyników np. w pod względem spełniania wymogów odnośnie zawartości proliny.

Wyniki i dyskusja

Ta część stanowi najobszerniejszy fragment rozprawy, zawarty na 64 stronach. W tym rozdziale Autorka zaprezentowała i omówiła wyniki przeprowadzonych badań, w kolejności zgodnej z założonymi do realizacji celami szczegółowymi. W mojej ocenie połączenie omówienia osiągniętych rezultatów z ich dyskusją w oparciu o dane literaturowe, przy tak dużej liczbie wyników i zróżnicowaniu metod analitycznych, stanowiło karkołomne zadanie. Takie połączenie często prowadzi do skoncentrowania się na opisie uzyskanych wyników, ogranicza ich konfrontację z ustaleniami innych autorów oraz utrudnia wyciąganie wniosków. Rozdział „Wyniki oraz dyskusja" został podzielony na cztery podrozdziały, wyniki są przedstawione w logiczny i uporządkowany sposób, a rezultaty przeprowadzonych analiz statystycznych zamieszczono głównie w Aneksie. W rozdziale (6.1) dokonano oceny jakości handlowej 35 próbek badanych miodów (5 odmian z 7 pasiek) wg wskaźników ujętych w odpowiednich regulacjach prawnych. Za szczególnie cenne uważam dodatkowe analizy polegające na określeniu barwy miodów w skali Pfunda, nie ujęte w przepisach, które mogą służyć jako narzędzie uzupełniające dla analizy melisopalinologicznej. Szkoda, że Autorka

pominęła korelację pomiarów barwy i analizy pyłkowej miodów, mogłoby to potwierdzić celowość stosowania tego wskaźnika w ocenie jakości miodu. Niezwykle cenną i wymagającą ogromnego nakładu pracy część wyników zawarto w podrozdziale „Mikroskopowa analiza pyłkowa" (błędnie zanumerowany jako 6.1.2), która dotyczy autentykacji odmiany miody w oparciu o zawartość pyłku przewodniego. Obecnie taka analiza jest jedynym pewnym narzędziem do weryfikacji odmiany miodu zadeklarowanej przez pszczelarza. Obraz mikroskopowy osadu pyłków w miodzie ze względu na duże ich zróżnicowanie jest bardzo trudny do oceny, niewielka grupa analityków w kraju taką analizę wykonuje. Przedstawione wyniki pozwalają dołączyć Doktorantkę do grona ekspertów w zakresie analizy melisoplinologicznej miodów.

Przeprowadzone badania potwierdziły, raportowaną często na rynku miodów niewłaściwą deklarację pochodzenia botanicznego (odmiany) miodów oferowanych przez pszczelarzy, szczególnie wysoką dla miodów. Ta część badań pozwoliła na wyodrębnienie miodów o właściwie sklasyfikowanej odmianie, w mojej opinii tylko te miody powinny być przeznaczone do badań nad immunoreaktywnością.

W rozdziale 6.2 dokonano oceny profilu pyłków roślin wiatropylnych i wskaźników spadzi w analizowanych miodach, wykazując duże zróżnicowanie obecności w osadach miodowych potencjalnie alergennych pyłków, szczególnie w miodach gryczanych i lipowych. Stwierdzono, że polskie odmianowe miody nektarowe zawierają aeroalergeny, o zróżnicowanym profilu, bardziej zależnym od lokalnej szaty roślinnej niż odmiany miodu. Wydaje się, że szczegółowa analiza uzyskanych wyników mogłaby pozwolić na wyselekcjonowanie miodów o wysokiej i niskiej zawartości aeroalergenów do kolejnego etapu badań.

W kolejnym rozdziale scharakteryzowano białka zawarte w analizowanych miodach, tak pod względem ilościowym jak i jakościowym Analiza zawartości białka ogólnego i frakcji białek rozpuszczalnych potwierdziła znaną zależność, ze miody jasne zawierają znacznie mniej białka niż miody ciemne. Podobnych obserwacji dostarczyła analiza SDS-PAGE, gdzie znacznie więcej frakcji białkowych obserwowano w profilu miodów ciemnych. Metodą UPLC-PDA określono także profil aminokwasowy badanych miodów. Te wyniki, po przeliczeniu na zawartość w miodzie, należy uznać za szczególnie cenne, gdyż jest to pierwsza tego typu charakterystyka krajowych miodów nektarowych, stanowiąca niewątpliwe osiągnięcie Doktorantki. Immunoreaktywne właściwości miodów oceniano stosując techniki Western-blotting i Slot-blot (rozdz. 4.4), także te analizy zostały przeprowadzone dla polskich miodów w tak szerokim zakresie po raz pierwszy. Szkoda, że nie udało się zróżnicować alergennych właściwości miodów w zależności od odmiany, wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że wszystkie krajowe miody nektarowe zawierają immunoreaktywne frakcje białkowe, rozpoznawane przez przeciwciała obecne w surowicach alergików oraz przeciwciała komercyjne. Końcowy etap badań, dotyczący deglikozylazji glikoprotein miodów wskazuje, ze Doktorantka ma wątpliwości odnośnie uzyskanych wyników analiz immunochemicznych, na których mógł zaważyć wysoki stopień glikozylacji białek miodu warunkujący możliwość występowania niespecyficznych reakcji krzyżowych z determinantami węglowodanowymi CCDs.

Lektura tej części dysertacji nasuwa pytania, na które mam nadzieję Doktorantka udzieli odpowiedzi podczas obrony:

1. Czy weryfikacja odmiany miodu deklarowanej przez pszczelarza jest możliwa wyłącznie w oparciu o analizy fizykochemiczne, bez przeprowadzania analizy pyłkowej? Czy próbowano korelować wyznaczone parametry składu chemicznego z zawartością pyłku przewodniego?
2. Czy pogrupowanie wyników analizy densytometrycznej według odmian miodu (a nie pochodzenia pasiecznego) pozwoliłoby na stworzenie odmianowych profili białkowych jako tzw. „fingerprint" odmiany miodu?
3. Czy porównanie miodów w obrębie danej odmiany o relatywnie niskiej i wysokiej zawartości aeroalergenów nie pozwoliłoby na zróżnicowanie ich immunoreaktywności? Czy bazując na przeprowadzonych doświadczeniach można wskazać miody bardziej bezpieczne dla alergików, np. zawierające mniej aeroalergenów?
4. Jakie mogły być przyczyny niepełnej deglikozylacji glikoprotein z udziałem PNGazyF? Czy w opinii Autorki zastosowanie inhibitorów CCDs mogłoby zmienić charakter uzyskanych wyników?

W końcowej części pracy znajduje się czterostronicowe *Podsumowanie,* w którym Autorka ujęła syntetycznie najważniejsze osiągnięcia pracy i 9 wniosków, z których w mojej ocenie tylko część wynika z przeprowadzonych w pracy badań. Zabrakło w nich wskazania głównego osiągnięcia badawczego Doktorantki i bezpośredniej weryfikacji postawionej hipotezy badawczej.

Zamieszczony na końcu Aneks zawiera 15 tabel oraz 4 rysunki, stanowiące uzupełnienie wyników prezentowanych w zasadniczej części pracy o wyniki analiz statystycznych. Na koniec zamieszczono niezwykle starannie opracowaną bibliografię, z utrzymaniem jednolitej formy zapisu, co przy blisko 400 pozycjach wskazuje na wysiłek edytorski Doktorantki.

Reasumując, należy podkreślić, że w związku z olbrzymią liczbą wyników prezentowanych w pracy doktorskiej syntetyczne ich przedstawienie stanowiło spore wyzwanie edytorskie. Zwraca uwagę staranne i przejrzyste opracowanie graficzne pracy. Wymienione z obowiązku Recenzenta nieliczne błędy edytorskie, literaturowe i interpunkcyjne, nie mają znaczenia dla oceny merytorycznej rozprawy.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Problematyka badawcza poruszana w przedstawionej do oceny dysertacji wpisuje się w niezwykle istotny problem występowania alergenów w żywności, a uzyskane wyniki mają dużą wartość poznawczą. Rozprawa doktorska mgr inż. Marty Burzyńskiej jest dowodem kompetencji Autorki do prowadzenia analiz w zakresie oceny jakości handlowej miodów, w tym analizy pyłkowej, co stawia ja w gronie nielicznych analityków w kraju, którzy taką analizę wykonują. Poziom przygotowanej rozprawy świadczy o dojrzałości naukowej

Doktorantki, praktycznej znajomości wielu metod badawczych oraz obszernej wiedzy teoretycznej związanej z podjętym zagadnieniem.

Podsumowując stwierdzam, że dysertacja mgr inż. Marty Burzyńskiej spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane pracom na stopień doktora (art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14.03.2003r. Dz.U.nr 65, poz.595, z późn. zm. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia żywności i Żywienia Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Burzyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rzeszów, 14.09.2021

dr hab. inż. Małgorzata Dżugan, prof. UR