UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
KATEDRA I ZAKŁAD LECZENIA OTYŁOŚCI, ZABURZEŃ METABOLICZNYCH ORAZ DIETETYKI KLINICZNEJ
PROF. DR HAB. N. MED. PAWEŁ BOGDAŃSKI

Ul. Szamarzewskiego 84
60-569 Poznań

tel. 61 8549 742
fax: 61 8478 529
e-mail: pbogdanski@ump.edu.pl

Dr hab. n. med. Marta Stelmach-Mardas
Katedra i Zakład Leczenia Otyłości,
Zaburzeń Metabolicznych oraz Dietetyki Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
e-mail: stelmach@ump.edu.pl
Tel: +48 697424245

Poznań, dnia 10 września 2020 roku

RECEZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Aneta Tomczak pt. „Wartość odżywcza białek łubinu wąskolistnego *(Lupinus angustifolius*) i ich wpływ na alergenność żywności".

(promotor: dr hab. inż. Magdalena Zielińska-Dawidziak, prof .UPP)

- wydana zgodnie z pismem z dnia 16.08.2020 r. dr hab. Bożeny Danyluk, prof. UPP – Dziekana Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu na podstawie Uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 1 lipca 2021 roku

Zaprezentowane badania naukowe, które zostały opublikowane w cyklu 6 publikacjach o łącznej wartości wskaźnika *Impact Factor: 10.879 i pkt MEiN: 385* wskazują na szerokie potencjał wykorzystania łubinu wąskolistnego w żywieniu człowieka oraz żywieniu zwierząt. Analiza eksperymentalnych linii hodowlanych łubinu pod kątem zarówno wartości odżywczej białek jak i różnic w ekspresji frakcji reagujących z przeciwciałami skierowanymi przeciwko alergennym i immunoreaktywnym frakcjom białkowym rodziny bobowatych jest niezwykle istotna z uwagi na okrojone zastosowanie łubinu wpisanego na listę potencjalnych alergenów pokarmowych. Ponadto, z punktu widzenia żywienia człowieka analizę immunoreaktywności mleka i jaj pochodzących od zwierząt żywionych paszami z dodatkiem nasion łubinu wąskolistnego oraz wpływ ich stosowania na zmianę profilu białkowego i peptydowego wybranych produktów spożywczych uważam za niezwykle cenny.

W tym kontekście sam wybór tematu pracy przez Doktorantkę jest nowatorski, aktualny i ważny z punktu widzenia dietetyki klinicznej.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska liczy 56 stron wydruku komputerowego, który został starannie przygotowany. W pracy zamieszczono 1) Streszczenie w języku polskim i angielskim 2)Wprowadzenie, 2) Hipotezy badawcze, 3) Cele 4) Wyniki badania ujmujące a. wartość odżywczą białek Łubinu wąskolistnego; b. immunoreaktywność i alergenność nowych linii łubinu wąskolistnego c. wpływ dodatku łubinu wąskolistnego jako źródła białka do pasz, na immunoreaktywność surowców pochodzenia zwierzęcego 5) Podsumowanie 8) Wnioski, oraz spis załączników (publikacji) i wykaz piśmiennictwa. Współautorzy wykorzystanych w cyklu prac naukowych podpisali oświadczenia, które również stanowią załącznik pracy.

Dysertacja jest dobrze zaplanowana. Omówienie publikacji w kolejnych podrozdziałach daje możliwość płynnego przejścia analizowanych zagadnień i wyciągania wniosków.

Ocena merytoryczna

WPROWADZENIE

Wprowadzenie teoretyczne zostało przygotowane przez Doktorantkę w oparciu o wcześniej wydaną publikację (Tomczak A, Zielińska-Dawidziak M; 2018) opublikowaną na łamach czasopisma *Przemysł spożywczy*. Na 10 stronach Doktorantka szczegółowo omawia pochodzenie łubinu, uprawiane gatunki i ich wykorzystanie podkreślając istotę odbudowy pozycji roślin bobowatych w Europie. W podrozdziale *Wartość odżywcza nasion łubiu wąskolistnego* Doktorantka koncentruje się na znaczeniu łubinu jako dodatku do produkcji żywności dla osób o szczególnych wymaganiach żywieniowych, wartości biologicznej białka, właściwej proporcji białka roślinnego i zwierzęcego w diecie zaznaczając przy tym znaczenie niskiego indeksu glikemicznego łubinu i korzystnego wpływu na stężenie glukozy po posiłku. Za szczególnie cenny uznaję podrozdział opisujący właściwości alergenne łubinu wąskolistnego z uwagi na rosnący odsetek dzieci z alergiami wziewnymi i pokarmowymi. Dodatkowo, reakcje krzyżowe z udziałem białek soi oraz orzeszków ziemnych stanowią o istocie problemu w żywieniu małego pacjenta. Przenikanie alergenów do mleka kobiecego czy dodatek potencjalnych alergennych bobowatych do paszy niosek mogą wpływać na skład odpowiednio mleka lub jaja kurzego. Niemniej jednak prawidłowa diagnostyka w zakresie

alergii nie zawsze musi prowadzić do stosowania restrykcji żywieniowych u pacjenta. Wydaje się, że nowe odmiany łubinu wąskolistnego stanowią dobrą alternatywę w żywieniu osób chorujących na celiakię, dla wegetarian czy osób aktywnych przyjmujących odżywki wysokobiałkowe.

HIPOTEZY BADAWCZE I CELE PRACY

Hipotezy oraz cele pracy zostały prawidłowo sformułowane w liczbie 3. Są interesujące z poznawczego i praktycznego punktu widzenia.

WYNIKI BADAŃ

Zebrane w części wynikowej prace stanowią o istotnym wkładzie Doktorantki w ich powstawanie. Poza pracą analityczną Doktorantka uczestniczyła w przygotowywaniu manuskryptów, co świadczy o opanowaniu warsztatu naukowego w trakcie trwania studiów doktoranckich. Kolejno omawiane w dysertacji publikacje oryginalne zostały opublikowane w zagranicznych czasopismach o współczynniku oddziaływania *Impact Factor* od 1.53-4.41 i pkt MEiN od 70-100. Uzupełnienie stanowi praca poglądowa opublikowana na łamach czasopisma Przemysł spożywczy (5pkt *MEiN*). Łączna liczba IF: 10.879 i 385 pkt MEiN stanowi o randze prowadzonych badań naukowych w zakresie technologia żywności i żywienie człowieka i bardzo dobrym dorobku naukowym młodego badacza.

Na podkreślenie zasługuje staranność opisu części metodycznej i dobór odpowiednich metod statystycznych, którymi Doktorantka wraz z zespołem posłużyli się w opracowywaniu wyników. W pracy opublikowanej w *Plant, Soil and Environment*. Doktorantka oceniła zmienność składu aminokwasowego w nowych odmianach łubinu za pomocą chromatografii cieczowej UPLC oraz ogólną zawartość białka metodą Kjeldahla. Do pełnej charakterystyki wartości odżywczej białek zabrakło jednak oznaczenia aminokwasów siarkowych, co należałoby uwzględnić przy kolejnych analizach. Z uwagi na zmienne warunki agronomiczne nie udało się jednak wytypować, spośród badanych 18 nowych odmian łubinu wąskolistnego pochodzących z dwóch lat zbiorów i dwóch miejsc uprawnych, najlepszej odmiany pod względem wartości odżywczej białka.

W kolejnej pracy opublikowanej na łamach *International Journal of Food Science and Technology* Doktorantka poddała analizie strawność białka badanych odmian łubinu wąskolistnego i czynników na nie wpływających. Strawność oznaczono metodą *in vitro*

multienzymatyczną, symulującą trawienie dwuetapowe (żołądkowo-jelitowe, z wykorzystaniem pepsyny i pankreatyny). Inhibitory oznaczono metodą spektrofotometryczną. Z kolei, zależność strawności białka od składu aminokwasowego badanych nasion wyznaczono za pomocą chromatografii cieczowej (UPLC). Całkowitą zawartość związków fenolowych w ekstraktach oznaczona za pomocą wysokowydajnej chromatografii cieczowej (HPLC). Badanie potwierdziło, że zawartość związków wpływających na strawność białka zależy od odmiany i warunków agronomicznych.

Pracę dotyczącą określenia różnic w immunoreaktywności nowych eksperymentalnych linii łubinu metodą *ex vivo* przeprowadzonej u pacjentów uczulonych na białko sojowe i orzeszki ziemne uważam za niezwykle interesującą. Wykorzystane metody badawcze pozwoliły na kompleksową analizę, choć mimo wszystko powiększenie liczby badanych pacjentów byłoby wartościowe i pozwoliłoby na uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników badań. Nie potwierdzono związku pomiędzy całkowitą zawartością białka a obniżoną immunoreaktywnością badanych linii łubinu. Niemniej jednak, linie o obniżonej immunoreaktywności można byłoby uznać za materiał do przyszłego krzyżowania linii łubinu w celu uzyskania odmian przeznaczonych do produkcji żywności. Stąd, warto podjęte badania kontynuować w kolejnych latach.

Pracę opublikowaną na łamach *European Food Research and Technology*, która koncentruje się na poszukiwaniu różnic w profilu białkowym i peptydowym oraz immunoreaktywności, w próbach mleka pozyskanych od krów karmionych paszami różniącymi się źródłem białka (łubinu wąskolistnego i soi) również uważam za niezwykle cenną. Starannie opisano materiał (18 prób mleka i surowica pobrana od 10 pacjentów) i metody badawcze. Wykazano zmienność zawartości aminokwasów w zależności od żywienia bydła mlecznego a także zauważono istotne różnice w immunoreaktywności pomiędzy próbami mleka w zależności od dodatku roślin bobowatych do pasz. Potwierdzono obecność laktoglobuliny we wszystkich badanych próbach, co sugeruje, że mleko z dodatkiem łubinu lub soi do żywienia krów jest bogatsze w laktoglobulinę. Jak wynikało z kolejnej analizy (metoda slot-blot) próby mleka z dodatkiem łubinu wąskolistnego i soi do pasz zawierały nieznany peptyd o innej immunoreaktywności w porównaniu do prób mleka bez dodatku roślin bobowatych do pasz co sugeruje, że żywienie krów paszą z dodatkiem roślin bobowatych, w tym łubinu wąskolistnego może wpływać na immunoreaktywność. W próbach z dodatkiem soi w paszy stwierdzono obecność frakcji o masie cząsteczkowej ~18kDa, natomiast w tych z dodatkiem łubinu wąskolistnego obecność frakcji ~ 15kDa. Być może frakcje te związane są z immunoreaktywnością dzieci z alergią na soję oraz mleko. Niemniej

jednak badania wymagają kontynuacji w większej grupie pacjentów i z udziałem większej ilości prób.

Dopełnienie cyklu prac przedstawionego do oceny przez Doktorantkę stanowi praca opublikowana w czasopiśmie *Molecules,* o wysokim wskaźniku oddziaływania *Impact Factor: 4.411,* której celem głównym było określenie potencjalnych różnic w immunoreaktywności oraz składzie białkowym i peptydowym jaj, pochodzących od kur żywionych paszą zawierającą nasiona roślin bobowatych. Badany materiał stanowiło 40 jaj od kur zielononóżek kuropatwianych karmionych paszą z dodatkiem lub bez dodatku roślin bobowatych oraz surowica od 4 pacjentów ze zdiagnozowaną alergią na jaja kurze oraz 4 surowice pacjentów z alergią na soję. Po wyborze odpowiedniego ekstrahenta oznaczono stężenie białka metodą Smitha, frakcje białkowe rozdzielono metodą elektroforezy SDS-PAGE. Rozdzielone frakcje na drodze elektroforezy analizowano dalej metodą western-blot z wykorzystaniem surowicy krwi badanych pacjentów. Odnotowano różnice w profilu białkowym między próbami jaj. Różnice zaobserwowano w przypadku próbek białka jaja kurzego, gdzie dodatkiem do pasz był łubin wąskolistny - nowa frakcja białkowa o masie ~23-24kDa - sugeruje potencjalny wpływ na ekspresję nowych białek w jaju. W badaniach wskazano również nową frakcję białkową o masie cząsteczkowej ~20 kDa w próbkach białka jaja kurzego uzyskanych jedynie od kur żywionych paszą sojową. W ekstraktach z żółtka jaja kurzego również zidentyfikowano podstawowe białka, w tym dwie frakcje alergenne (Gal d 5 i Gal d 6). W ekstraktach jaj pochodzących od kur karmionych paszą z dodatkiem roślin strączkowych do pasz również zidentyfikowano frakcję białkową o masie cząsteczkowej ~13 kDa prawdopodobne odpowiadającą cystatynie (~12,7 kDa). Niewątpliwie dodatek łubinu może wpływać na ekspresje białek jaj w tym alergenów. W przyszłości wykorzystanie technik *omics* chociażby do analizy proteomicznej będzie kokiem na przód i pozwoli na identyfikację nieznanych frakcji białkowych.

Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu.

WNIOSKI PRACY

Wnioski pracy zostały sformułowane w liczbie 8 i stanowią odpowiedź na postawione przez Doktorantkę cele badawcze. Rozwinięciem wniosków jest 3-stronnicowe podsumowanie, w którym Doktorantka podkreśla Borutę jako odmianę łubinu o najwyższym poziomie białka ogólnego przy jednoczesnym brak związku ze stężeniem aminokwasów oraz odmiany Bojar i Oskar jako te o najwyższej zawartości aminokwasów. Z uwagi na zawartość

aminokwasów podkreślono, że łubin może stanowić dobre uzupełnienie dla produktów zbożowych ubogich w lizynę. Jednak biorąc pod uwagę warunki agronomiczne nie ustalono odmiany najbardziej pożądanej z punktu widzenia żywienia człowieka. Analizując biodostępność/strawność Doktorantka sugeruje, że to odmiana Dalbor może być najbardziej przydatna w produkcji żywności. Udowodniono, iż tworzenie nowych linii łubinu wąskolistnego wpływa na ich właściwości immunoreaktywne, jednak wskazanie tej pozbawionej β-konglutyny wymaga dalszych prac badawczych. Natomiast, dodatek roślin motylkowatych do pasz wpływa na immunoreaktywność mleka oraz jaj poprzez powstanie niezidentyfikowanych do tej pory frakcji białkowych.

STRESZCZENIA

Streszczenia – w języku polskim i w języku angielskim – zostały napisane poprawnie na 4 stronach.

PIŚMIENNICTWO

Doktorantka cytuje w sposób poprawny (w kolejności alfabetycznej) 121 pozycji piśmiennictwa, w zdecydowanej większości obcojęzyczne. Ponad 27% wszystkich pozycji to prace opublikowane w ciągu ostatnich pięciu latach. Piśmiennictwo zostało starannie dobrane i ściśle odnosi się do omawianych zagadnień. Autorka nie ustrzegła się jednak błędów edytorskich i literowych.

PODSUMOWANIE

Reasumując rozprawa doktorska mgr Anety Tomczak oparta o cykl 6- publikacji naukowych w pełni spełnia kryteria stawiane dysertacji doktorskiej na stopień doktora nauk. Doktorantka jest młodym badaczem o rozbudowanym warsztacie analitycznym, potrafi poprawnie zaplanować, przeprowadzić i opisać oryginalne badania własne, ale także krytycznie się do nich odnieść. Całość rozprawy doktorskiej, poza wcześniej skomentowanymi drobnymi uwagami, wskazuje jednoznacznie na opanowanie warsztatu naukowego przez Doktorantkę

Na podstawie dokonanej powyżej, pozytywnej oceny, zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie mgr Anety Tomczak do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim. Jednocześnie z uwagi na dobry dorobek naukowy, wartość

merytoryczną prac, podjęty warsztat analityczny, w osobnym piśmie załączam wniosek o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej.

Marta Stelmach-Mardas

Dr hab. n. med. Marta Stelmach-Mardas

Katedra i Zakład Leczenia Otyłości, Zaburzeń Metabolicznych oraz Dietetyki Klinicznej

Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu