

Prof. dr hab. Maria Śmiechowska, prof. zw. UMG  
Katedra Towaroznawstwa i Zarządzania Jakością  
Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa  
Uniwersytet Morski w Gdyni

Gdynia, 12.11.2021

**Recenzja rozprawy doktorskiej**  
zatytułowanej  
**„Wybrane panalergeny w żywności pochodzenia roślinnego”**

**Autor pracy: mgr inż. Mateusz Aninowski**

Praca została wykonana w Instytucie Surowców Naturalnych i Kosmetyków na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Jakości Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem dr hab. inż. Joanny Leszczyńskiej, prof. uczelni.

Recenzję przygotowano w związku z pismem Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej dr hab. inż. Anny Diowsz, prof. uczelni, na podstawie uchwały nr 53/2021 Rady ds. Stopni i Tytułów Naukowych Politechniki Łódzkiej z dnia 6 lipca 2021 r.

Niniejsza recenzja sporządzona została zgodnie z art. 25. 1-3 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789) oraz Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r., poz. 261, art. 18).

**Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego**

Rozwój cywilizacyjny obok niekwestionowanych osiągnięć dla rozwoju człowieka jak wydłużenie okresu życia i poprawę jego jakości przyniósł ze sobą wiele niekorzystnych zmian w otoczeniu groźnych zarówno dla człowieka jak i środowiska. Dodatkowo jeszcze wzrosła liczba zachorowań na choroby niezakaźne określane mianem cywilizacyjnych.



Wielu epidemiologów uważa, że przyczyny wzrostu występowania tych chorób mogą być różne, ale najczęściej wśród przyczyn wymienia się czynniki związane z zanieczyszczonym środowiskiem oraz żywnością i żywieniem. Żywność, chociaż jest niezbędnym warunkiem do życia powoduje niekiedy różnego rodzaju zaburzenia w organizmie człowieka, a nawet może być przyczyną chorób.

Te niepożądane reakcje zachodzące w organizmie po spożyciu niektórych produktów żywnościowych stały się przedmiotem badań Doktoranta, który swoją dysertację poświęcił wybranym alergenom w żywności pochodzenia roślinnego. W świetle dotychczasowych badań większość IgE zależnych alergii pokarmowych jest wynikiem spożywanej żywności. Badania naukowe dotyczące alergii i nietolerancji pokarmowych podążają w dwóch kierunkach, po pierwsze zmierzają do wyjaśnienia przyczyn i mechanizmu powstawania oraz do przeciwdziałania tym nieprawidłowym reakcjom organizmu, które w skrajnych przypadkach mogą prowadzić do wstrząsu anafilaktycznego.

Praca doktorska mgr inż. Mateusza Aninowskiego wpisuje się w nurt prac dotyczących zapewnienia bezpieczeństwa żywności pochodzenia roślinnego przed niepożądanymi reakcjami alergicznymi i ich negatywnymi skutkami. Podjęta tematyka badawcza jest niezwykle istotna dla bezpieczeństwa ludzi i produkowanej żywności. Wśród wielu czynników wpływających na jakość żywności pochodzenia roślinnego jest m.in. sposób uprawy. Stąd też jednym z celów tej pracy było określenie zawartości alergenów w żywności pochodzenia roślinnego z upraw ekologicznych i konwencjonalnych. Dlatego wybór problematyki badawczej w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej uważam za uzasadniony, interesujący, mający charakter naukowy, innowacyjny i aplikacyjny.

### **Struktura pracy**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 147 numerowanych stron i składa się z następujących rozdziałów: Wstęp, Część teoretyczna, Cel i zakres pracy, Hipoteza badawcza, Materiały, Metody analityczne, Analiza statystyczna, Wyniki i dyskusja, Aplikacyjne zastosowanie wyników badań, Wnioski, Spis tabel, Spis rycin oraz Literatura. Pracę poprzedzają Spis treści oraz Streszczenia w języku polskim i angielskim. W pracy zamieszczono 28 tabel i 21 rycin. Wykaz piśmiennictwa zawiera 137 pozycji bibliograficznych.

Stronę formalną pracy doktorskiej oceniam jako poprawną. Układ pracy jest prawidłowy, typowy dla prac o charakterze doświadczalnym.

## Uwagi redakcyjne i edytorskie

Praca doktorska została przygotowana dość starannie, ale Autor nie ustrzegł się jednak błędów, na które pragnę zwrócić uwagę. Takim uchybieniem jest niezamieszczenie w spisie literatury norm prawnych i rozporządzeń, które są przywoływane w treści pracy. Pragnę również zwrócić uwagę na nieprawidłowe cytowanie prac dwuautorskich, które w niniejszej pracy mają zapis: Nazwisko pierwszego autora i inni. W pracach, w których jest tylko dwóch autorów należy przywołać w cytowaniu nazwiska obu autorów.

W wykazie bibliografii znajdują się powtórzone zapisy tych samych prac. Dotyczy to następujących pozycji w wykazie bibliograficznym: 40 i 41, 123 i 124.

Kolejna uwaga dotyczy przywoływanej w treści pracy publikacji autorstwa Michalskiej-Pozoga i in., która to publikacja w wykazie bibliograficznym jest przypisana autorom Pozoga-Michalska I., Straszak O. (poz. 91).

Błędnie również zostały zapisane w treści pracy nazwiska autorów umieszczonych w wykazie bibliograficznym w poz. 13, 45, 67, 115.

Bardzo istotna uwaga dotyczy zapisu cytowania prac w sytuacji, gdy prace zostały opublikowane w tym samym roku. W recenzowanej pracy dotyczy to publikacji zapisanych w wykazie bibliograficznym w poz. 27 i 28, 31 i 32, 79-82 oraz 118 i 119. W takim przypadku aby odróżnić te publikacje przyjmuje się przy roku publikacji, który jest identyczny, dostawić małą literę alfabetu a, zaś przy kolejnej publikacji małą literę b, itd.

Pragnę też zwrócić Autorowi uwagę na błędy literowe, których nie brakuje w pracy. Jako przykład podam tylko „komórki eukarioryczne” zamiast „komórki eukariotyczne” i bardzo poważny błąd literowy, który uważam również za błąd merytoryczny, a mianowicie „kwas egalowy” zamiast „kwas elagowy”. Ponadto wiele zdań z bardzo poważnymi tzw. „skrótami myślowymi” i zdań niedokończonych, jak np. zdanie na str. 31: „Przewidywanie struktury białka przez modelowanie porównawcze można opisać w następujący sposób (Kuttalingam Gopalasubramaniam S., i inni 2008)”. Kolejne zdanie: „Uzyskane wyniki są jednak przeciwieństwem wyników przedstawionych przez wcześniejszych badanych dla różnych upraw ekologicznych” (str. 101). Czy wreszcie zdanie: „Wydaje się, że w pomidorach potencjał alergizujący związany jest z karotenoidami barwnika” (str. 101).

Bardzo proszę Autora, aby zwrócił uwagę na te niedoskonałości językowe podczas przygotowywania publikacji.



## Ocena merytoryczna pracy

W krótkim wstępie Autor nakreśla zagadnienie alergii uwzględniając jej rodzaje i uciążliwość dla jakości życia społeczeństwa. Należy podkreślić trafność informacji przekazanych we wstępie z jednoczesną zapowiedzią tematów, którymi mgr inż. Mateusz Aninowski zajmie się w pracy. Warzywa i owoce stanowią ważny element diety, a w przypadku wegan, wegetarian, fleksitarian żywność pochodzenia roślinnego stanowi podstawę dziennej diety. Z tego też względu reakcje, zwłaszcza krzyżowe pomiędzy alergenami wziewnymi a pokarmowymi są niezwykle uciążliwe dla konsumentów. Z uznaniem przyjęłam zapowiedź badań nad alergennością przypraw ze względu na rolę i znaczenie jakie posiada ta grupa produktów żywnościowych.


Zabrakło mi wykazu zastosowanych skrótów, symboli i akronimów, których jest w pracy bardzo dużo, a który to wykaz w mojej opinii mógł poprzedzić pracę i pomógłby w jej odbiorze.

Teoretyczna część pracy doktorskiej zawarta została na 44 stronach i składa się na nią 17 nienumerowanych części, gdyż trudno je nazwać rozdziałami ponieważ kilka spośród nich nie zajmuje nawet całej strony. Z reguły teoretyczna część pracy poświęcona jest przeglądowi literatury, który jest prezentacją stanu wiedzy w danym obszarze nauki. Uważam, że Autor mógł w części teoretycznej zaproponować strukturę pracy w formie rozdziałów, aby aktualny stan wiedzy w badanym obszarze zaprezentować w bardziej zwartej formie.

Pierwsza część tego przeglądu została poświęcona typom nadwrażliwości immunologicznej. W kolejnej Autor omawia zjawisko alergii pokarmowej dokonując prezentacji jej objawów i klinicznych typów alergii pokarmowej.

Mam w związku z tym pytanie do Doktoranta jakie jest źródło 5 tabel i 3 wykresów zamieszczonych w teoretycznej części pracy? Czy są to opracowania własne na podstawie prac innych autorów, czy też może zostały zaczerpnięte z innych publikacji? Z reguły w takich przypadkach zamieszcza się odpowiednią legendę, która precyzuje źródło tabel i wykresów. Jedynie tabela 5 w teoretycznej części pracy zawiera informacje o źródłach literaturowych, z których zaczerpnięto dane zamieszczone w tej tabeli.

W części poświęconej alergii krzyżowej Autor zwięźle omawia reakcje organizmu wywołane przez alergeny oraz interakcje z antygenami o zbliżonej budowie.



W mojej opinii słusznie te sytuacje zostały ograniczone do obszaru Europy, a szczególnie do alergenów Bet v 1 i reagentów z grupy panalergenów PR 10, jak profiliny. Jest więc zrozumiałe, że w kolejnej części pracy mgr inż. Aninowski omawia te bardzo powszechnie występujące białka jakimi są profiliny.

Do dość szczegółowych opisów profilin, które m.in. biorą udział w wydłużaniu włókien aktynowych, zabrakło w mojej opinii rysunków lub schematów, które zobrazowałyby mechanizm tych reakcji. Dopiero zapoznanie się z artykułem, który zostaje przywołany przez Autora do tego bardzo obszernego wywodu, zdecydowanie ułatwia zrozumienie tych reakcji, gdyż Zwiefel i Courtemanche (2020) zamieścili w artykule rysunki dla aktywny *Saccharomyces cerevisiae*.

Z kolei część zatytułowana „Homolog Bet v 1” pomimo bardzo krótkiej charakterystyki dobrze oddaje istotę zagadnienia powstawania uczulenia na pyłek brzozy i związany z tym zespół alergii jamy ustnej (OAS).

Zdecydowanie więcej miejsca Doktorant poświęca panalergenom, co nie dziwi, bo przecież są one głównym przedmiotem jego badań. Bardzo dobrze zostały zaprezentowane główne źródła panaalergenów oraz struktury białek alergenów na podstawie literatury.

Po bardzo krótkiej prezentacji zespołów alergicznych Autor przechodzi do charakterystyki roślin z rodzin *Lamiaceae* i *Apiaceae*. Przedstawiciele tych rodzin stanowią podstawę diety śródziemnomorskiej, która jest w opinii dietetyków i żywieniowców uważana za jedną z najzdrowszych diet i zalecana w profilaktyce chorób na tle wadliwego żywienia. Przedstawicielami tych rodzin jest również wiele przypraw stosowanych w technologii żywności i domowych kulinariach.

W dalszej części Doktorant dokonuje krótkiej charakterystyki owoców jagodowych takich jak maliny używając nazwy „malina czerwona”, która prawidłowo w systematyce jest przedstawiana jako malina właściwa *Rubus idaeus* L. W dalszej kolejności zostają omówione truskawki *Fragaria x ananassa* Duchesne oraz wiśnie *Prunus cerasus* L.

W następnej części rozprawy Autor przedstawia metody badania alergenów i jest to test ELISA z jego głównymi odmianami i wariantami.

Podstawowym informacjom o przeciwciałach poli- i monoklonalnych został poświęcony kolejny fragment części teoretycznej. W bardzo zwięzłej formie Autor scharakteryzował oba rodzaje przeciwciał, ukazując ich budowę, pochodzenie oraz ich zalety i wady. Wydaje się, że ten fragment części teoretycznej mógłby być poszerzony o klasy przeciwciał, tym bardziej, że w reakcjach immunologicznych odgrywają one bardzo ważną rolę.



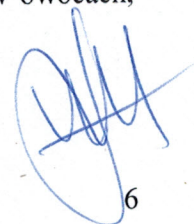
5

Kolejny fragment części teoretycznej to interakcje polifenoli z białkami. Autor rozpoczyna omawianie roli i znaczenia polifenoli zdaniem: „Polifenole są obecne w żywności i napojach pochodzenia roślinnego...” Jest to niefortunne sformułowanie, bo napoje pochodzenia roślinnego też są żywnością.

Jest to jeden z przykładów licznych tzw. skrótów myślowych, których jest bardzo wiele w pracy, gdyż przypuszczam, że Autor pisząc o żywności miał na myśli warzywa i owoce. Ten fragment części teoretycznej jest niezwykle ważny w świetle realizowanej pracy doktorskiej. Polifenole to duża grupa związków biologicznie aktywnych, wśród których najliczniejsze są flawonoidy o działaniu przeciwzapalnym i antyoksydacyjnym, a także przeciwalergicznym. Właśnie to przeciwalergiczne działanie flawonoidów jest przedmiotem zainteresowania badaczy poszukujących naturalnych związków o działaniu hamującym proliferację limfocytów. Takie działanie zostało już potwierdzone dla kwercetyny i luteoliny (Jafarinia M. i in.: *Quercetin with the potential effect on allergic diseases*. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2020, 16, 36; Mizuno M. i in.: *Enhancement of Anti-inflammatory and Anti-allergic Activities with Combination of Luteolin and Quercetin in in vitro Co-culture System*. *Food Science and Technology Research*, 2017, 23 (6), 811-818). Szkoda, że Autor nie poszerzył tego właśnie fragmentu pracy o stan badań nad wpływem flawonoidów na układ odpornościowy. Flawonoidy są podstawowymi związkami bioaktywnymi warzyw, owoców, ziół i przypraw.

Teoretyczną część pracy kończy fragment poświęcony metodzie dokowania ligandów. Metoda ta należy do metod modelowania, czyli przewidywania struktury białko-ligand. To modelowanie nie ogranicza się do ukazania struktury tego połączenia ale pozwala na określenie konformacji wiązań i energii swobodnej wiązania. Przewidywanie struktury białko-ligand, a zwłaszcza takiej konfiguracji, która jest najbardziej prawdopodobna termodynamicznie, jest niezwykle istotne w profilowaniu oddziaływania na organizm takich kompleksów. W realizowanej pracy doktorskiej przewidywanie struktury i siły wiązania alergenów z receptorami mają fundamentalne znaczenie dla przebiegu reakcji alergicznych i ich rokowania.

W rozdziale IV rozprawy doktorskiej mgr inż. Mateusz Aninowski przedstawia założenia badawczej części pracy precyzując jej cele i zakres. Głównym celem rozprawy była analiza zawartości homologów Bet v 1 i profilin w żywności pochodzenia roślinnego: w owocach,



6

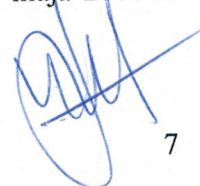
warzywach i ziołach, przy czym były to produkty zarówno w stanie świeżym, jak i przetworzonym.

Doprecyzowując cele tej pracy Doktorant kieruje swoje zadania badawcze w stronę dwóch rodzin roślin *Lamiaceae* i *Apiaceae*, gdyż zioła i przyprawy należące do tych dwóch rodzin są powszechnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym, gastronomii i domowych kulinariach. Owocami do badania zawartości panalergenów były owoce jagodowe z rodzaju *bacca*.

Autor nie sprecyzował celów cząstkowych pracy, co narzuca się przy zaprezentowanym 11. punktowym zakresie pracy. Szkoda, że Doktorant nie zamieścił w tym miejscu modelu lub schematu tych badań, co w mojej opinii podniosłoby wartość tej pracy.

Rozdział VI tej rozprawy nosi tytuł hipoteza badawcza. Niestety, to co Autor przedstawił w tym rozdziale nie jest hipotezą badawczą, a jedynie rozszerzonym celem pracy. Trudno za hipotezę badawczą uznać zdanie: „W tej pracy podjęto próbę zbadania i analizy zawartości alergenów w produktach spożywczych pochodzenia roślinnego oraz zbadanie wpływu różnych czynników środowiskowych na zawartość alergenów w żywności.” W mojej opinii nawet wyrażenie „różne czynniki” powinno być zastąpione wyrażeniem „wybrane czynniki”. Według metodologii nauk i zasad prowadzenia badań naukowych hipoteza naukowa/badawcza jest to przypuszczenie naukowe, które wynika z dotychczasowego stanu wiedzy, które w procesie badawczym podlega weryfikacji lub falsyfikacji, co oznacza, że w procesie badawczym następuje potwierdzenie bądź odrzucenie hipotezy. Takich zdań oznajmujących w tym rozdziale nie znajdujemy. Przygotowana przez Autora obszerna teoretyczna część pracy pozwalała na sformułowanie 2-3 hipotez badawczych, zwłaszcza przy tak obszernym zakresie badań.

Rozdział VII niniejszej rozprawy nosi tytuł Materiały. Charakterystyka materiału badawczego jest dalece niewystarczająca. Autor nie precyzuje skąd pochodziły próbki przypraw, kto był ich producentem, jaki był skład mieszanek przyprawowych, czy były to zioła świeże, czy suszone, jak były oznakowane i czy na opakowaniach tych przypraw, jeśli były to przyprawy nabywane w handlu, były informacje o zawartości alergenów. Bezpieczeństwo informacyjne żywności jest jednym z najważniejszych elementów znakowania towarów w myśl Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności... oraz Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2018/848 z dnia 30 maja 2018 r.



w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych i uchylające rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007. To ostatnie rozporządzenie dokładnie określa jakie są wymagania dotyczące produkcji żywności ekologicznej, jej certyfikacji i oznakowania.

Nie znajdujemy również szczegółowych opisów pochodzenia próbek owoców, poza informacją, że owoce pochodziły z upraw doświadczalnych SGGW, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Nie mamy wiedzy w jakim okresie dokonywano zbiorów, ani też czy były to uprawy prowadzone w systemie konwencjonalnym, ekologicznym czy zintegrowanym z rolnictwa zrównoważonego. Brakuje informacji o certyfikacji produktów ekologicznych. Brak podstawowych informacji o malinach *Kweli* pochodzących z obszaru Limassol na Cyprze.

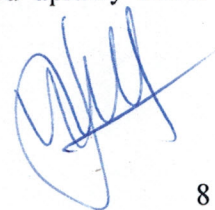
Nie zamieszczono informacji gdzie i w jaki sposób pozyskano owoce, czy np. zakupiono je na rynku lokalnym; brakuje też informacji o warunkach transportu i przechowywania.

Przy prowadzeniu badań z materiałem biologicznym, takim jak żywność, niezwykle ważne są informacje o pochodzeniu próbek żywności, warunkach uprawy i zbioru, transportu i przechowywania. Część informacji o pochodzeniu próbek oraz informacje o odmianach znajdują się dopiero w opisie metodycznym, są więc bardzo oddalone od rozdziału pt.: Materiały.

W rozdziale VIII zatytułowanym Metody analityczne zamieszczono opisy zastosowanych metod analitycznych. Metodyka pracy badawczej została przedstawiona bardzo dokładnie, co jest mocną stroną doświadczalnej części dysertacji. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie aparatury i urządzeń gwarantujących powtarzalność i odtwarzalność wyników, co jest niezwykle istotne w pracy naukowej. Zastosowane metody analityczne świadczą o dobrej znajomości warsztatu badawczego oraz wskazują na dobre przygotowanie mgr inż. Mateusza Aninowskiego do badań laboratoryjnych.

W dalszej części Autor prezentuje przygotowanie próbek truskawek do oznaczania zawartości alergenów. Opis ten rozpoczyna zdanie: „Świeże owoce ze wszystkich ferm doświadczalnych...” Określenia „fermy” jest stosowane dla hodowli zwierząt, owoce uprawiamy w ogrodach lub specjalistycznych jagodnikach lub maliniakach.

Na str. 62 podano skład gleby, na której rosły maliny, ale brak informacji jakich upraw to dotyczy? Czy chodzi o skład gleby, na której uprawiano odmiany *Laszka*, *Glen Ample* i *Polka*, czy też jest to skład gleby, na której uprawiano odmianę *Kweli* na Cyprze. Brakuje też odwołania się do źródła. W mojej opinii ta charakterystyka gleby pod uprawy malin powinna się znaleźć w rozdziale Wyniki i Dyskusja.





Na str. 76 Doktorant wymienia programy użyte do obliczeń modelowych oddziaływań niektórych polifenoli i alergenów Bet v 1 i profilin. Opis metodologii symulacji jest dalece niezadowalający. Jako otwarte oprogramowanie, programy te powinny zostać dokładnie opisane, przynajmniej z podaniem numeru wersji (co pozwala na weryfikację obliczeń) oraz poprawnego cytowania programów:

- N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, G. R. Hutchison: *Open Babel: An open chemical toolbox*. J. Cheminform. 2011, 3, 33.

- E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin: *UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis*. J. Comput. Chem., 2004, 25, 1605–1612.

- O. Trott, A. J. Olson: *AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading*. J. Comput. Chem., 2010, 31, 455–461.

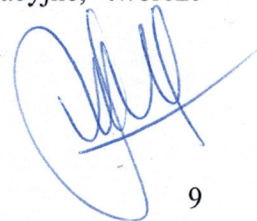
Bardzo krótki rozdział IX przynosi informacje na temat zastosowanych metod statystycznych. Obliczenia statystyczne zostały przeprowadzone za pomocą programu Statistica version 10 (StatSoft, Tulsa, OK).

Do porównywania średnich wyników zastosowano jednokierunkową analizę wariancji oraz test post-hoc Duncana przy poziomie istotności  $p \leq 0.05$ .

Rozdział X zatytułowany Wyniki i Dyskusja rozpoczyna przedstawienie wyników zawartości białka metodami Bradforda i Pierce'a w przyprawach kmin, koper, pietruszka, anyż, kolendra pozyskanych metodami konwencjonalnymi i ekologicznymi oraz bazylii i oregano. Po przeprowadzonych badaniach i ich weryfikacji Autor wytypował do dalszych badań metodę Pierce'a.

Oznaczenie homologów Bet v 1 w przyprawach wykazało, że istotnie mniej białek alergizujących zawierają zioła z uprawy ekologicznej. Z kolei zawartość profilin w przyprawach z upraw konwencjonalnych i ekologicznych, pomimo niższej zawartości w ziołach ekologicznych, nie była istotna statystycznie.

W literaturze przedmiotu brak prac, które pozwoliłyby Doktorantowi odnieść się w dyskusji do wyników badań innych autorów w zakresie obecności alergenów w przyprawach konwencjonalnych v. ekologiczne oraz w przyprawach z rodziny *Apiaceae*. Ten fakt przemawia na korzyść Doktoranta, jako że podjęte badania są innowacyjne, twórcze i powinny być kontynuowane.



Na szczególne podkreślenie zasługuje wykrywanie alergenów w mieszankach przyprawowych. Mieszanki przyprawowe mogą być potraktowane jako wygodne dodatki służące do przygotowania posiłków. W literaturze przedmiotu żywność wygodna to produkty i usługi, które pozwalają oszczędzić czas na przygotowanie posiłków.

Warto zaznaczyć, że w skład mieszanek przyprawowych mogą wchodzić nie tylko komponenty roślinne, ale również substancje takie jak glutaminian sodu, który jest często stosowany w kuchni chińskiej i jest odpowiedzialny za powstawanie smaku *umami* (bulionowego, rosołowego), charakterystycznego dla chińskich zup i koncentratów. Jest również odpowiedzialny za niektóre reakcje typu alergicznego tzw. „syndrom chińskiej kuchni”, objawiające się pieczeniem w jamie ustnej, swędzeniem skóry, niekiedy zmianami atopowymi i wzmożoną potliwością (Wang W., Zhou X., Liu Y., *Characterization and evaluation of umami taste: A review*. Trends in Analytical Chemistry, 2020, 127, 115876).

W reakcjach alergicznych możemy więc obserwować nie tylko incydenty związane z zespołem syndromu przypraw ale także nakładanie się dodatkowo syndromu chińskiej kuchni, w wyniku czego może dochodzić do synergistycznego działania.

Mieszanki przyprawowe mogą zawierać od kilku do kilkunastu składników roślinnych w kompozycji z tzw. wzmacniaczami smaku, co może być niezwykle groźne dla konsumentów.

Badania te należy kontynuować z uwagi na innowacje procesowe i produktowe w mieszankach przyprawowych, gdyż bserwujemy dynamiczny wzrost tej żywności na rynku. Kolejnym przyczynkiem do badania alergenów przypraw i mieszanek przyprawowych jest rozwój turystyki, w tym turystyki kulinarnej. Podczas podróży turyści konsumują nowe potrawy, nabywają również różne przyprawy, często nie znając ich składu, co może być przyczyną alergii, niekiedy o bardzo poważnym przebiegu. Liczba tych incydentów odnotowana w Systemie Szybkiego Ostrzegania o Żywności i Paszach (RASFF) jest znacząca (Soon J.M. i in.: *Determining common contributory factors in food safety incidents – A review of global outbreaks and recalls 2008–2018*. Trends in Food Science & Technology, 2020, 97, 76-87; Śmiechowska M. i in.: *Spices and Seasoning Mixes in European Union – Innovations and Ensuring Safety*. Foods, 2021, 10, 2289. <https://doi.org/10.3390/foods10102289>).



W dalszej części Autor prezentuje wyniki oznaczania zawartości alergenów w owocach. Analizie poddano próbki jagód, borówek, wiśni, truskawek i malin, w tym także malin pochodzących z Cypru. Dopiero w tym miejscu dowiadujemy się nieco więcej szczegółów o pochodzeniu próbek owoców, jednak w dalszym ciągu charakterystyka materiału badawczego jest niewystarczająca. Nie można uznać za precyzyjny opis próbek owoców, iż pochodziły one „z różnych sezonów upraw, zbieranych w różnych odstępach lat” (str. 89).

Mam pytanie do Doktoranta dlaczego w części teoretycznej scharakteryzował spośród owoców jedynie maliny, truskawki i wiśnie, skoro badaniom poddał oprócz wymienionych także jagody i borówki?

Mam również kolejne pytanie: czym Autor pracy tłumaczy znaczące różnice w zawartości homologów Bet v 1 i profilin w badanych próbkach jagód w latach 2018 i 2019? Czy przypadkiem nie ma to związku z wpływem klimatu (rok suchy i rok mokry)? Dane zawarte w tabeli 15 na str. 89 informują, że próbki jagód pochodziły z lat 2018 i 2019, ale czy z tych samych poletek upraw?

Z kolei czym można wytłumaczyć wyższą zawartość homologów Bet v 1 w borówkach w 2019 roku, aniżeli w 2018, przy jednoczesnej zróżnicowanej zawartości profilin (tabela 16 na str. 91)?

Podobne zróżnicowanie wyników zawartości homologów Bet v 1 i profilin stwierdzono dla próbek wiśni z trzech kolejnych lat 2016, 2017 i 2018, z dwóch systemów upraw konwencjonalny i ekologiczny oraz czterech odmian (tabela 17, str. 94).

Te wyniki wskazują, że nie dla wszystkich odmian i nie we wszystkich latach, i nie zawsze dla wiśni uprawianych systemem ekologicznym, zawartość homologów Bet v 1 i profilin była niższa. Dlatego z dużą ostrożnością należy podejść do zdania, które zamieszczone jest na str. 96 „...owoce uprawiane metodami ekologicznymi/organicznymi są bezpieczniejsze i uboższe w związku powodujące alergię w porównaniu z owocami uprawianymi metodami konwencjonalnymi lub zintegrowanymi.” Ta ostrożność powinna wynikać z faktu, że np. wiele owoców w niniejszej pracy nie pochodziło z uprawy zintegrowanej.

Podobną uwagę kieruję do zdania zapisanego na str. 97, cytuję: „Po analizie wyników okazało się, że truskawki z upraw ekologicznych miały najniższy poziom alergenu Bet v 1 i homologu profilin w porównaniu z truskawkami konwencjonalnymi i zintegrowanymi (tabela 18)”. Ta prawidłowość została potwierdzona dla homologów Bet v 1, natomiast najmniej profilin stwierdzono dla uprawy konwencjonalnej truskawek, co zapisał Doktorant w tabeli 18.

Bardzo ważne dla badania stabilności homologów Bet v 1 i profilin Wyniki tych badań potwierdziły dużą wrażliwość alergenów wiśni na procesy trawienne.



Maliny to kolejne owoce, w których oznaczano zawartość alergenów. W tabeli 19 na str. 99 Autor zamieścił wyniki zawartości alergenów w malinach z upraw ekologicznej i konwencjonalnych pochodzące z upraw w 2013 i 2014 roku. Mam natomiast pytanie do Doktoranta z jakich upraw pochodzą zawartości alergenów w trzech odmianach malin: *Laszka*, *Glen Ample* i *Polka*? Czy nie jest to przypadkiem średnia zawartość alergenów w malinach z dwóch systemów upraw konwencjonalnej i ekologicznej w tych trzech odmianach? Pytanie to zadaję dlatego, że nie ma tej informacji w tabeli nr 19 na str. 99 ani w treści pracy.

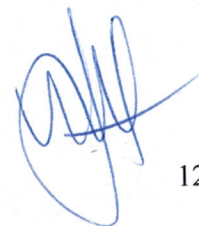
Dane o zawartości alergenów w trzech odmianach malin z upraw ekologicznych i konwencjonalnych zamieszczone zostały natomiast w tabeli 20 na str. 100. Omawiając te wyniki Autor używa określenia „maliny hodowane ekologicznie” (str. 99) i „jagody hodowane metodami tradycyjnymi” (str. 102) zamiast uprawiane. Z kolei na str. 98 pisze o ekspresji białek zamiast o ekspresji genów kodujących te białka. Takich lapsusów językowych jest niestety bardzo wiele w tej pracy.

Autor wykazał, że maliny odmiany *Kweli* pochodzące z Cypru zawierały od 7 do 8 razy mniej homologu Bet v 1, podczas kiedy zawartość profilin była porównywalna. Czy na obecnym etapie badań można podjąć próbę wyjaśnienia tych różnic?

W dalszej części badań Autor przedstawia badania nad zdolnością antyoksydacyjną i zawartość antocyjanów i polifenoli w malinach odmiany *Kweli*. Badania te wykazały, że maliny tej odmiany charakteryzują się wysoką aktywnością antyoksydacyjną.

Graficznie wyniki te zostały przedstawione na wykresach nr 5 (str. 105) i wykres 6 (str. 106). Wykresy te zostały jednak bardzo nieprawidłowo opisane, gdyż nie można uznać zapisu „Wykres przedstawiający próbki malin z rodzaju *Kweli* metody TEAC z metanolem” za opis prawidłowy.

Analiza chromatograficzna zawartości związków polifenolowych wykazały, że maliny *Kweli* są bogatym źródłem polifenoli. W badaniu profilu polifenolowego malin *Kweli* Autor zidentyfikował dwie cyjanidyny i pelargonidynę należące do antocyjanów oraz lambertianinę C, sanguinę H-6 i kwas elagowy należące do ellagotanin. Badania te powinny być kontynuowane, aby jednoznacznie określić wpływ takich czynników jak odmiana, strefa klimatyczna, średnia temperatura podczas owocowania na profil polifenolowy malin uprawianych na Cyprze i w Polsce. Dotychczas uzyskane wyniki wskazują, że zawartość polifenoli w malinach uprawianych na Cyprze jest wyższa.



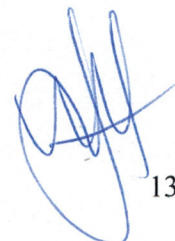
Analiza otrzymanych wyników z oddziaływania ligandów białek z receptorami jest kolejną częścią rozdziału Wyniki i Dyskusja. Uważam, że tytuł został sformułowany nieprawidłowo i powinien on brzmieć np. „Analiza powinowactwa ligandów polifenolowych do wybranych białek metodą dokowania molekularnego”.

Niedostatecznie opisany został sposób postępowania w oprogramowaniu Chimera, które „zostało użyte do zminimalizowania struktur, a następnie przygotowania do dokowania”. Brakuje tu szczegółów technicznych operacji minimalizacji struktury, takich jak choćby użyte pole siłowe (zapewne Amber, chyba że zostało zmienione) lub algorytm osiągnięcia minimum (najwyższego spadku albo gradientu sprzężonego).

Autor podaje, że „aby proces się powiódł, niektóre atomy mogą być unieruchomione”, ale nie precyzuje, czy takie unieruchomienie zostało wymuszone, dla jakich atomów i w jakich cząsteczkach.

Następnie Autor przedstawia wyniki dokowania molekularnego ligandów do Bet v 1 (Tabela 26) oraz profiliny (Tabela 27). Niestety przy omówieniu tych wyników autor nie ustrzegł się błędu polegającego na myleniu energii z energią swobodną, jak pośrednio wynika z opisu „polifenole te posiadają najniższą energię wiązania wynoszącą, a zatem jest najbardziej korzystną” (str. 116). Zawarte w tabeli 26 powinowactwo wiązania (ang. binding affinity) nie jest bynajmniej energią wiązania, tylko entalpią swobodną wiązania ligandu do receptora. Biorąc pod uwagę fundamentalną zależność wiążącą standardową entalpię swobodną ze stałą równowagi, wyniki bywają często raportowane jako wartość tej ostatniej, oznaczanej  $K_i$  lub  $K_d$ , w zależności od tego, czy mowa o stałej asocjacji, czy dysocjacji kompleksu. Z uwagi na dużą rozpiętość wyników podaje się je często w skali logarytmicznej, jako  $pK_i$  lub  $pK_d$ . (Jain A.N., *Scoring Functions for Protein-Ligand Docking*. Current Protein and Peptide Science, 2006, 7, 407)

Cała dyskusja tych wyników (str. 113-124) pełna jest lapsusów językowych, zdań będących kalkami z języka angielskiego oraz sprzeczności. Brakuje jasno postawionego celu przeprowadzenia eksperymentów metodą dokowania molekularnego. Na str. 120 Autor w następujących po sobie zdaniach twierdzi, że „Badanie to jest obiecujące, jeśli chodzi o wygaszenie alergenicności poszczególnych białek poprzez wiązanie z nimi odpowiednich ligandów polifenoli”, a następnie „wiadomym jest, że związki polifenoli, antocyjanów z białkami są odpowiedzialne za wywołanie reakcji alergicznych”. Nie wiadomo więc, czy podejmując te badania Autor miał na myśli możliwość wygaszenia alergenicności czy też zwiększenia potencjału reakcji alergicznych.



Wnioski z tego fragmentu badań podane na str. 130 ograniczają się do podania numerycznych wyników wyznaczenia „energii wiązania”, bez żadnej próby ich powiązania z analityczną częścią pracy. Zdanie „polifenole te posiadają najniższą energię wiązania, pozwalającą na najbardziej korzystne związanie się ich powierzchni białka” znów ujawnia problemy z interpretacją. Eksperymenty dokowania nie wyznaczają energii wiązania, tylko jego energię swobodną, a więc pośrednio stałą równowagi reakcji. Mylenie efektów czysto energetycznych z efektami energetyczno-entropowymi jest poważnym błędem z punktu widzenia termodynamiki (Du X. i in., *Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods*. Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 144).

Ostatnią częścią rozdziału Wyniki i Dyskusja jest „Zbadanie panelu alergenów wybranych soków spożywczych”. To kolejny tytuł, który jest niezbyt fortunnie sformułowany. W dyskusji wyników nie możemy mówić o badaniu ale o jego efektach, czyli np.: „Zawartość homologów Bet v 1 i profilin w wybranych sokach, nektarach i przecierach owocowych i warzywno-owocowych”.

Autor stwierdzając, że „ dla dzieci najchętniej kupowane są soki w małych kartonikach o smaku wieloowocowym, dla dorosłych pomarańczowym” nie cytuje żadnych badań marketingowych, które stały się podstawą tego stwierdzenia.

Z tabeli 28 na str. 125 wynika, że przedmiotem badań były soki, nektary, przeciery owocowe i warzywno-owocowe, w których zawartość Bet v 1 jak i profilin była niewielka. Mam w związku z tym pytanie do Doktoranta, czy nie powinien odnieść tych wyników do zawartości alergenów w owocach i warzywach, z których zostały otrzymane?

Pracę kończy bardzo krótki rozdział Aplikacyjne zastosowanie wyników badań, w którym Autor stwierdza, że przeprowadzone badania pozwoliły na opracowanie testów analogów Bet v 1 i profilin. Ze stwierdzeniem tym trudno jest się zgodzić, gdyż w celu i zakresie pracy nie zapisano takich działań. Z kolei wyniki badań powinny być udostępnione dietetykom i żywieniowcom opracowującym spersonalizowane diety, szczególnie dla osób, jak określił to Autor „ze zdiagnozowanymi licznymi reakcjami krzyżowymi”.

Pracę kończy 15 nienumerowanych wniosków, które w mojej opinii noszą charakter stwierdzeń, z których niektóre są oczywiste, a które są odpowiedzią na rozbudowany zakres pracy. Wnioski powinny wypływać z przeprowadzonych badań i być powiązane z celem pracy i hipotezami, których niestety w tej pracy brak. Ponadto, Autor znowu we wnioskach pisze o kwasie „egalowym” zamiast elagowym.



## Wniosek końcowy

Reasumując, rozprawa mgr inż. Matusza Aninowskiego pt.: „Wybrane panalergeny w żywności pochodzenia roślinnego” wykonana pod kierunkiem naukowym promotora dr hab. inż. Joanny Leszczyńskiej jest szerokim studium wiedzy o homologach Bet v 1 i profilinach w wybranych produktach pochodzenia roślinnego, jak: przyprawy i owoce oraz przetwory owocowe i owocowo-warzywne.

Przedstawiona do recenzji praca jest jednym z nielicznych studiów na temat obecności alergenów w żywności pochodzenia roślinnego w uprawach konwencjonalnych, ekologicznych i zintegrowanych.

Ta wielowątkowa i obszerna rozprawa doktorska wymagała ogromnej dyscypliny od Doktoranta, aby nie odejść od głównego nurtu pracy. Praca doktorska mgr inż. Mateusza Aninowskiego obok wartości naukowej i poznawczej posiada również walory użytkowe, które mogą być wykorzystane w kolejnych pracach i projektach naukowych. Wyniki tych badań powinny być opublikowane w czasopismach naukowych przeznaczonych m.in. dla środowisk medycznych, dietetyków i żywieniowców, technologów żywności, a także popularyzowane w programach edukacyjnych dla społeczeństwa.

Jednocześnie pragnę zaznaczyć, że uwagi zawarte w recenzji stanowią w większości uchybienia edytorskie i nie odnoszą się do merytorycznej wartości pracy.

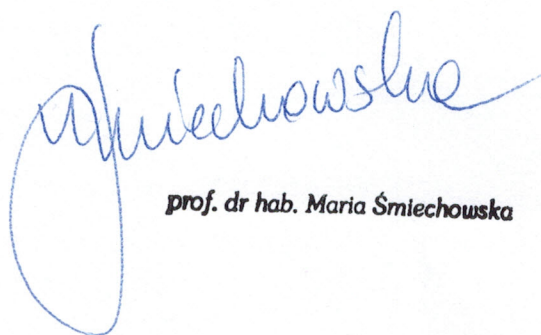
Mgr inż. Mateusz Aninowski jest współautorem 3. artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach międzynarodowych i krajowych, przy czym w 2. artykułach jest pierwszym autorem:

- Aninowski M., Kaźmierczak R., Hallmann E., Majak I., Leszczyńska J., (2020): *Evaluation of the Potential Allergenicity of Strawberries in Response to Different Farming Practices*. *Metabolites*, 10, 102.
- Aninowski M., Leszczyńska J., 2019: *The determination of potentially allergenicity of selected herbs*. *Biotechnology and Food Science* 83(1), 3-11.
- Hallmann E., Ponder A., Aninowski M., Narangerel T., Leszczyńska J., (2020): *The Interaction between Antioxidants Content and Allergenic Potency of Different Raspberry Cultivars*. *Antioxidants*, 9, 256.



Praca doktorska mgr inż. Matusza Aninowskiego pt.: „Wybrane panalergeny w żywności pochodzenia roślinnego” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn.: Dz.U. z 2017 r. poz. 1789).

Wniosuję więc do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Matusza Aninowskiego do dalszych etapów postępowania w procedurze o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.



**prof. dr hab. Maria Śmiechowska**