



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wojska Polskiego 28

60-637 Poznań

tel. +48 61 848 73 52

e mail: kbiaz@up.poznan.pl

**WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIU**

**Katedra Biochemii i Analizy Żywności**

Poznań, 15.09.2022r.

Prof. UPP, dr hab. inż. Dorota Piasecka-Kwiatkowska

Katedra Biochemii i Analizy Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Ul. Mazowiecka 48

60-623 Poznań

## **RECENZJA**

### **Pracy doktorskiej mgr inż. Marty Magdaleny Turło**

pt. „Identyfikacja markerów peptydowych wspólnych dla sekwencji aminokwasowych tropomiozyn wybranych gatunków owoców morza”

wykonanej w Katedrze Biochemii Żywności Wydziału Nauk o Żywności  
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Promotor: prof. dr hab. Piotr Minkiewicz

### ***Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji***

Podstawę opracowania niniejszej recenzji stanowiło pismo Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie Pani prof. dr hab. Iwony Zofii Konopki z dn.11.07.2022 r.

### ***Komentarz wstępny***

Globalizacja jest nierozzerwalnie związana ze współczesnym światem. Obecny styl życia, możliwość podróżowania i łatwa dostępność do produktów spożywczych z całego świata sprawiają, że odkrywamy nieznane dotąd potrawy, a krewetki, awokado czy orzechy nerkowca stały się zwyczajnym składnikiem naszej codziennej diety. W konsekwencji do organizmu dostarczane są nieznane do tej pory substancje, które muszą zostać przetworzone przez układ pokarmowy, ale także odpornościowy. W przypadku niektórych osób układ immunologiczny nie nadąża za pojawiającymi się nowymi informacjami związanymi ze spożywaniem nowych składników i odpowiada nadwrażliwością dającą objawy alergii.

Owoce morza należą do grupy produktów, których obecność i spożywanie przez osoby nadwrażliwe jest szczególnie niebezpieczne, ponieważ może wywoływać objawy uogólnione, powodujące zagrażający życiu wstrząs anafilaktyczny. Produkty te obejmują szereg różnych gatunków jadalnych skorupiaków i mięczaków. Dla alergików dieta eliminacyjna polegająca na całkowitym wyeliminowaniu składników alergennych z diety jest jedynym skutecznym sposobem zapobiegania objawom choroby, gdyż nawet tak niewielkie ilości, jak 100µg mogą być niebezpieczne. Dlatego dla zapewnienia bezpieczeństwa

konsumentów konieczna jest kontrola obecności składników alergennych w produktach spożywczych. Klasycznie detekcja opiera się na identyfikacji określonych peptydów charakterystycznych dla danego alergenu, a metodami analitycznymi najczęściej wykorzystywanymi i rekomendowanymi do ich wykrywania są metody immunochemiczne. Podstawą tych metod jest zdolność przeciwciał detekcyjnych do rozpoznawania epitopów antygeny i tworzenia z nimi immunokompleksów. Metody te mają jednak pewne ograniczenia, są ukierunkowane na detekcję tylko określonego peptydu, który jest fragmentem antygeny, a zastosowanie obróbki technologicznej, czy zastąpienie jednego składnika innym w kontekście kontroli alergienności produktu, może skutkować wynikiem fałszywie negatywnym.

Techniki bioinformatyczne i proteomiczne otwierają nowe możliwości w zakresie detekcji alergenów, znacznie skracają czas poszukiwania markerów i ograniczają nakłady finansowe na kosztowne, mozolne badania analityczne, które są konieczne w znacznie ograniczonym zakresie. Pozwalają też na odejście od klasycznych rozwiązań i stanowią szansę na opracowanie nowych, innowacyjnych metod analitycznych. Wymaga to jednak umiejętności korzystania z baz informatycznych i powiązania wiedzy i kompetencji z różnych często odległych dziedzin. Przedstawiona do oceny praca z świadczy, że Doktorantka jest świetnie przygotowana do tak skomplikowanych zadań. Dysertacja wpisuje się w nurt badań związanych z kontrolą bezpieczeństwa żywności dla osób uczulonych na owoce morza. Pani mgr inż. Marta Turło wykorzystując narzędzia bioinformatyczne i proteomiczne poszukiwała uniwersalnych peptydów pochodzące z tropomiozyn, które mogłyby stanowić markery obecności różnych gatunków owoców morza w produktach spożywczych poddanych różnego rodzaju obróbce kulinarnej. **Biorąc pod uwagę powyższe, zarówno wybór tematyki pracy doktorskiej mgr inż. Marty Turło, jak również sposób jej realizacji uważam za interesujące, mające charakter nowości naukowej.**

### ***Formalna i ocena pracy***

Przedstawiona do oceny praca doktorska ma charakter eksperymentalny i została starannie opracowana w formie monografii liczącej łącznie 195 stron maszynopisu. Można w niej wyróżnić dwie zasadnicze części: teoretyczną (21 stron) i badawczą (58 stron), a ich wzajemne proporcje objętości są właściwe dla prac eksperymentalnych.

Całe opracowanie ma strukturę typową dla klasycznych prac doktorskich. Tradycyjnie rozpoczyna je spis treści oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Następnie rozpoczyna się główna część: Zagadnienie w świetle literatury; Cel pracy; Plan badań; Materiały i Metodyka; Omówienie wyników; Dyskusja wyników; Wnioski i stwierdzenia końcowe; Literatura oraz Komputerowe bazy danych wraz z programami wykorzystywanymi przy opracowaniu wyników. Ponadto na końcu rozprawy znajdują się spisy: ilustracji, tabel, załączników oraz wykaz skrótów. Na ostatnich 78. stronach manuskryptu w formie 6 rozbudowanych tabel oraz 34 rysunków zamieszczono 8 załączników, w których znajdują się szczegółowe wyniki analiz bioinformatycznych oraz widma masowe.

W głównej części pracy znajduje się 8 tabel z czego 6 odnosi się do części wynikowej oraz 26 rysunków, w tym 17 prezentujących wyniki badań. Ryciny są czytelne, jedynie w przypadku ryciny 26 sugerowałabym umieszczenie legendy pod wykresem, co zwiększyłoby jej czytelność.

Wykaz piśmiennictwa obejmuje 197 pozycji literaturowych. Wśród zacytowanych, większość stanowią prace opublikowane w ciągu ostatnich 10. lat, z czego prawie 35% przypada na lata 2018-2022. Ponadto Autorka podczas opracowania manuskryptu korzystała z zasobów 14. Internetowych baz danych.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że praca jest przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim, zawiera znikomą ilość drobnych błędów, napisana jest poprawnym i zrozumiałym językiem, jest ciekawa i łatwa w odbiorze, co biorąc pod uwagę złożoność zagadnień, które omawia nie było prostym zadaniem.

**Podsumowując mogę stwierdzić, że recenzowana praca spełnia formalne wymagania stawiane dysertacjom doktorskim.**

### ***Ocena merytoryczna rozprawy***

Po zapoznaniu się z treścią pracy stwierdzam, że **tytuł dysertacji został sformułowany w sposób prawidłowy, zwięzły i adekwatnie do jej treści**. Zastrzeżeń nie budzą także streszczenia, zarówno polska, jak i angielska wersja, które w syntetyczny sposób opisują badania wykonane przez Doktorantkę uwzględniając wynikające z nich najważniejsze wnioski.

### ***Przegląd piśmiennictwa***

W pierwszej części pracy (Zagadnienia w świetle literatury) Autorka dokonuje przeglądu piśmiennictwa i w ciekawy sposób zapoznaje i wprowadza czytelnika w tematykę dysertacji. Ta część została bardzo logicznie zaplanowana i podzielona na osiem podrozdziałów. Pierwszy wprowadza czytelnika do zagadnień, które są szczegółowo omawiane w kolejnych rozdziałach. W następnych dwóch omówiono ogólne zagadnienia związane z tematyką dysertacji. W tej części scharakteryzowana została alergia pokarmowa oraz krzyżowe reakcje alergiczne. W dalszej części Autorka przechodzi do zagadnień bardziej szczegółowych, bezpośrednio związanych z badanym materiałem. I tak w kolejnych trzech rozdziałach opisała owoce morza, systematyzując wiedzę na temat zaliczanych do tej grupy, kulinarnie wykorzystywanych skorupiaków i mięczaków. Scharakteryzowała je także pod kątem ich właściwości alergicznych, szczególną uwagę poświęcając tropomiozynom, które stanowiły główny przedmiot zainteresowań podczas realizacji niniejszej pracy. Ostatnie dwa rozdziały są poświęcone „Zastosowaniu markerów peptydowych w proteomice” i scharakteryzowaniu tropiomiozyn jako potencjalnych prekursorów takich markerów. Omówione zostały różne techniki spektroskopii mas, które są wykorzystywane w proteomice, w tym sposoby ich analizy jakościowej (identyfikacji) i ilościowej. Szczegółowo rozważano także kryteria jakie należy zastosować przy doborze peptydów, które mogą być wykorzystane jako markery alergenów w żywności. W ostatnim rozdziale przeanalizowano możliwości wytypowania markerów alergicznych tropiomiozyn.

**Podsumowując tę część pracy stwierdzam, że Pani Magister w rzetelny i ciekawy sposób, korzystając z właściwie dobranych źródeł, wprowadza w przedmiot swoich badań ukazując ich zasadność. Ta część pracy została opracowana, na podstawie trafnie dobranej bibliografii, wskazując na dużą wnikliwość pani mgr inż. Marty Turło. Dobór merytoryczny źródeł oraz sposób ich wykorzystania uważam za prawidłowy.**

### ***Cel pracy***

Doktorantka sformułowała cel pracy, który jest spójny z tytułem rozprawy. Ponadto biorąc pod uwagę obecny stan wiedzy Doktorantka prawidłowo sformułowała cztery hipotezy badawcze. Ich weryfikacja jest spójna z wyznaczonym celem. Na zakończenie tej części pracy przedstawiono etapy, które obejmowała realizacja pracy.

Czytając tę część pracy nasunęły się pewne sugestie:

- Cel pracy „wytypowanie peptydów z tropomiozyn, uwalnianych po hydrolizie tych białek trypsyną, które mogą stanowić uniwersalne markery obecności alergennych tropomiozyn w przetworzonych produktach spożywczych” został sformułowany poprawnie, jednak jest dość zawiły i zawiera powtórzenia językowe, dlatego sugerowałabym, jego uproszczenie (np. „wytypowanie peptydów uwalnianych z tropomiozyn po ich hydrolizie trypsyną, które mogą stanowić uniwersalne alergenne markery ich obecności w przetworzonych produktach spożywczych”).
- Analizowanie zidentyfikowanych peptydów pod kątem ich obecności w sekwencjach epitopów alergennych tropomiozyn była istotnym elementem realizacji badań, dlatego niezrozumiałym jest wyodrębnienie tego zadania jako samodzielnego akapitu.

### ***Metodyka pracy***

Ta część pracy obejmuje dwa główne rozdziały: Plan badań oraz Materiały i metodyka.

W pierwszym Doktorantka przedstawia plan badań, w którym prowadzone badania logicznie dzieli na dwie zasadnicze grupy analiz: bioinformatyczne oraz laboratoryjne. Jednocześnie przypisuje im określone zadania badawcze. Ten podział porządkuje prowadzone analizy, co bardzo ułatwia zapoznanie się z całym układem doświadczenia. W kolejnej części pracy wykorzystując zaprezentowany wcześniej plan badań i podział analiz scharakteryzowano badany materiał. W przypadku analiz bioinformatycznych badano wybrane sekwencje tropomiozyn, natomiast w badaniach laboratoryjnych wykorzystano mrożone oraz gotowane produkty z owoców morza. Produkty mrożone dodatkowo poddane były obróbce kulinarnej, gotowaniu i smażeniu, niestety w opisie brakuje szczegółów dotyczących parametrów tych zabiegów.

Zgodnie z przedstawionym na wstępie rozdziału planem badań poprawnie opisano metodyki wykorzystywane w ramach poszczególnych analiz.

**Podsumowując tę część stwierdzam, że układ doświadczenia został przez mgr inż. Martę Turło przemyślany, prawidłowo i logicznie zaplanowany, a metodyka pracy została przedstawiona w sposób właściwy, nie budzący zastrzeżeń.**

## **Wyniki i ich omówienie**

Najobszerniejszą część dysertacji stanowi rozdział, w którym Autorka zaprezentowała i omówiła wyniki swoich badań. Ta część pracy została podzielona na dwie części zgodnie z planem badań.

Pierwsza część dotyczy analizy bioinformatycznej, której celem było przeprowadzenie hydrolizy trypsyną *in silico* i znalezienie peptydu uniwersalnego dla tropomiozyn mięczaków i skorupiaków. Na wstępie Autorka przeprowadziła hydrolizę *in silico* 51 sekwencji tropomiozyn skorupiaków i mięczaków i uzyskała 384 peptydy. Później przeprowadziła selekcję peptydów w kierunku poszukiwania peptydu uniwersalnego, eliminując takie, które występowały tylko w jednej sekwencji aminokwasowej. Następnie z pozostałej puli 189 peptydów wykorzystując sugestie innych autorów do dalszych analiz wybrała peptydy o długości 7-15 aminokwasów (72 peptydy). Analizowała je w bazie UNIProtKB pod kątem częstości występowania w ogólnej liczbie sekwencji tropomiozyn. Na podstawie uzyskanych wyników analizy *in silico* Doktorantka potwierdziła hipotezę, że można wyodrębnić peptydy, które są charakterystyczne dla mięczaków, dla skorupiaków, ale także takie które są wspólne dla obu tych grup. Biorąc pod uwagę ogrom danych, które były analizowane bardzo cenne było zamieszczenie na Rys. 8, na początku rozdziału schematu postępowania przy wyborze peptydów podczas analizy *in silico*, który systematyzuje i wyjaśnia dobór próbek do kolejnych etapów badań. Świadczy też o dobrym przygotowaniu Pani magister do prowadzenia badań bioinformatycznych, o umiejętności poprawnego ich zaplanowania i właściwego wyciągania wniosków na poszczególnych etapach, co pozwalało prawidłowo dobierać próbki do dalszych analiz.

W kolejnej części przedstawiono wyniki analizy laboratoryjnej. Na podstawie obrazów SDS-PAGE przeprowadzono kontrolę postępu hydrolizy tropomiozyn w produktach zawierających owoce morza poddanych obróbce kulinarnej (mrożeniu, gotowaniu i smażeniu). Stwierdzono, że choć tropomiozyny niezależnie od rodzaju obróbki kulinarnej były obecne we wszystkich analizowanych produktach spożywczych, to pod wpływem trypsyny białka ulegają rozkładowi i nie są już widoczne na obrazach żeli. Następnie wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektroskopią mas przeprowadzono identyfikację peptydów zawartych w hydrolizatach. W pierwszym etapie zidentyfikowano 115 peptydów, a po dokonaniu sekwencjonowania *de novo* wybrano 40 peptydów, które występowały w co najmniej dwóch badanych próbkach. Następnie porównano je z wynikami analizy *in silico* i stwierdzono, że sekwencje 17 peptydów pokrywają się. W dalszej części analizowano je pod kątem stopnia ich pokrycia z alergennymi epitopami tropomiozyn umieszczonymi w bazie Immuno Epitope Database. Działania te pozwoliły określić potencjał alergenny peptydów uwolnionych z badanych produktów poddanych różnym typom obróbki kulinarnej. Analizując sekwencje uwolnionych peptydów korzystano też z bazy UniPept i wygenerowano drzewa filogenetyczne. Pozwoliło to wskazać organizmy zawierające białka, które mogą być źródłem uwolnionych peptydów, co dało możliwość ich specyfikacji gatunkowej. Uzyskane wyniki analiz laboratoryjnych połączone z analizą bioinformatyczną nie dają tak optymistycznych rezultatów jak te uzyskane w badaniach *in silico*. Niemniej prawie we wszystkich badanych produktach

(z wyjątkiem omułka chilijskiego) poddanych różnym typom obróbki kulinarnej zidentyfikowano peptyd IQLLEEDLER, który może stanowić potencjalny marker obecności skorupiaków i mięczaków. Peptyd ten też wykazuje homologię z alergennym epitopem tropomiozyny.

Niewątpliwie mocną stroną pracy jest ciekawa dyskusja wyników, którą Doktorantka prowadzi omawiając wyniki, ale na szczególne podkreślenie zasługuje ta zamieszczona w osobnym rozdziale „Dyskusja wyników”. W tej części Pani magister spogląda kompleksowo na wyniki badań jakie uzyskała w trakcie realizacji pracy, wnikliwie je analizuje, dyskutuje i wyjaśnia. Rzeczowo odniosła się do zaproponowanego rozwiązania wykorzystania uniwersalnych peptydów w detekcji tropomiozyn będących markerami alergennych owoców morza. Wskazała zalety takiego rozwiązania w kontekście aktualnie stosowanych rozwiązań zalecanych przez IUIS i FAO/WHO. Ponadto przeprowadziła bardzo ciekawe, krytyczne rozważania na temat stosowania metod proteomicznych w analizie żywności, w tym ograniczeń w ich wykorzystaniu i ryzyka uzyskania fałszywych wyników.

Podsumowując wyniki swoich badań Doktorantka sformułowała 10 wniosków i stwierdzeń końcowych, które weryfikują postawione hipotezy badawcze.

#### **Po przeczytaniu pracy nasuwają się następujące drobne uwagi i pytania, które chciałabym przedyskutować podczas obrony,**

1. Jak jest możliwość praktycznego wykorzystania uniwersalnych peptydów w rutynowej kontroli obecności owoców morza w produktach spożywczych. Jestem ciekawa opinii na ten temat Doktorantki.
2. Pojęcie epitopu nie jest równoznaczne z alergenem, taki skrót myślowy może być wprowadzać w błąd, niestety pojawił się w kilku miejscach pracy (np. na str.60, 66, 80, 81, itd.) również we wnioskach. Dlatego sugeruję doprecyzowanie i przededagowanie wniosków 6 i 8.
3. We wniosku 4. sugerowałabym zastąpić określenie „mimo modyfikacji” „mimo zastosowanej obróbki kulinarnej”
4. W wykazie piśmiennictwa brakuje pozycji Guan i in. 2015, która została zacytowana na str. 46.

Pragnę podkreślić, że przedstawione powyżej uwagi mają jedynie charakter dyskusyjny i nie wpływają w żaden sposób na wartość ocenianej pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

#### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

Problematyka badawcza poruszana w przedstawionej do oceny dysertacji doskonale wpisuje się w bardzo aktualny nurt badań bezpieczeństwa żywności, w tym wypadku pod kątem zawartości alergennych owoców morza. Zaproponowane rozwiązanie, wykorzystanie do tego celu uniwersalnego markera peptydowego charakterystycznego dla rodziny białek jest nowym podejściem do detekcji alergenów. Rozwiązanie to zakłada, że identyfikacji podlega nie pojedynczy alergen, ale cała grupa, co z punktu bezpieczeństwa konsumentów stanowi bardziej uniwersalne rozwiązanie.



Przedłożona do oceny rozprawa doktorska świadczy, że Pani mgr inż. Marta Turło potrafi dobrze zaplanować badania naukowe, wykonać je a także wnikliwie analizować i dyskutować uzyskane rezultaty z pracami innych badaczy w formie przyjętej w publikacjach naukowych. Zastosowane przez Doktorantkę podczas realizacji pracy nowoczesne techniki analityczne oraz bioinformatyczne są imponujące. Świadczą one nie tylko o bardzo nowatorskim podejściu do rozwiązania postawionego problemu badawczego jakim jest wykrywanie alergenów w żywności, ale także o opanowaniu najnowocześniejszych narzędzi badawczych, w tym także bioinformatycznych. Kompetentna interpretacja wyników różnych analiz i powiązanie ich w logiczną całość świadczą o dojrzałości naukowej mgr inż. Marty Turło.

**Podsumowując stwierdzam, że dysertacja mgr inż. Marty Turło 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 Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Turło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Jednocześnie biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, wysoką wartość merytoryczną, naukowo-aplikacyjny charakter osiągnięcia naukowego jakim jest wskazanie uniwersalnych peptydów tropomiozyny jako markerów obecności wybranych gatunków owoców morza wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny technologia żywności i żywienia o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Turło.**

*D. Piasecka-Kwiatkowska*

**Prof. UPP dr hab. inż. Dorota Piasecka-Kwiatkowska**