

Warszawa, 25.07.2023

Dr hab. inż. Marek Kieliszek, prof. SGGW  
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Instytut Nauk o Żywności  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

## Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Pauliny Ciuurko  
pt. „*Mikrobiologiczna produkcja biologicznie aktywnych związków z odpadów  
rolno-spożywczych*” wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii  
Żywności na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu przygotowanej pod kierunkiem  
promotora dr hab. inż. Wojciecha Łaba, prof. UPWr oraz  
promotora pomocniczego dr Tomasza Janka

### Podstawa prawna sporządzenia recenzji

Recenzja została wykonana na zlecenie Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Prof. dr hab. Edyty Kostrzewa-Susłowa w dn. 21.06.2023 r. do pełnienia funkcji recenzenta w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne mgr inż. Dominiki Ciuurko. Postępowanie jest prowadzone na podstawie przepisów ustawy (art. 187 ust.) z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 z późn. zm.). Dalsza część recenzji zawiera omówienie oraz uzasadnienie oceny przedstawionej dysertacji doktorskiej.

---

Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Nauk o Żywności

ul. Nowoursynowska 159 C  
02-776 Warszawa  
+48 22 59 375 10  
+48 22 59 375 05  
inoz@sggw.edu.pl  
www.sggw.pl



### Ocena pracy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest pracą badawczą. Odnosząc się do aktualności podjętego tematu pracy doktorskiej oraz jej zakresu, należy podkreślić, że wpisuje się w szeroki nurt nowatorskich badań z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej oraz proteomiki. Sformułowany temat pracy jest perspektywiczny oraz jednoznacznie określa zaprezentowany problem badawczy. Autorka pracy podjęła bardzo ważny aspekt określający możliwości zagospodarowania odpadów rolno-spożywczych w produkcji metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego. W ostatnich latach wykorzystanie metod warunkujących zagospodarowanie odpadów i uzyskanie opłacalnego produktu ma decydujące znaczenie w rozwoju przemysłu biotechnologicznego. Przedstawione treści naukowo badawcze w pracy doktorskiej mieszczą się w zakresie nauk biologicznych. Warto podkreślić, że przedstawiona praca badawcza koncentruje się na analizie zagadnień oraz weryfikacji zjawisk związanych z gospodarką odpadami oraz określeniem możliwości utylizacji tych surowców pochodzących z przetwórstwa rolno-spożywczego.

Przedstawiona praca doktorska zachowuje standardowy klasyczny układ dla tego typu opracowań naukowych. W pracy zachowane zostały odpowiednie proporcje części literaturowej z metodyką badań w stosunku do omawiającej otrzymane wyniki badań. Dysertacja Pani Dominiki Ciuurko została przygotowana jako cykl trzech doświadczalnych artykułów naukowych. Prace zostały opublikowane w latach 2021 (*RSC Advances*), 2022 i 2023 (*International Journal of Molecular Sciences*). Zgodnie z zaktualizowanym wykazem współczynnika wpływu sumaryczna wartość Impact Factor dla tych prac badawczych wyniosła 15,236. Liczba punktów ministerialnych publikacji, które wchodziły w skład rozprawy doktorskiej wynosi 380. Warto zaznaczyć, że Doktorantka jest we wszystkich publikacjach pierwszym autorem (w jednej pracy autorem korespondującym). Doktorantka zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami w każdej z prac brała udział w opracowaniu koncepcji oraz planu pracy, metod badawczych, analizie otrzymanych wyników oraz przygotowaniu pierwszych wersji manuskryptów. Pomimo występowania w oświadczeniach opisu o merytorycznym udziale każdego ze współautorów zabrakło informacji o procentowym udziale każdego z nich w opracowaniu przedstawianych artykułów, co moim



zdaniem jest bardzo istotne w kwestii oceny zgłoszonego i przedstawionego osiągnięcia badawczego. W przypadku drugiej publikacji naukowej autorem korespondencyjnym artykułu jest prof. Zbigniew Lazar, oraz dr Tomasz Janek. Autorem korespondencyjnym ostatniej publikacji jest również dr Tomasz Janek. Jednak biorąc pod uwagę przedstawione do ceny materiały uważam, że należy podkreślić duży udział współautorów publikacji w ich rzetelnej pomocy Doktorantce w trakcie prowadzonych badań oraz w ostatecznym przygotowaniu końcowych wersji publikacji. Warto w tym miejscu podkreślić, że przedstawione badania zrealizowane w ramach pracy doktorskiej były finansowane z projektów Narodowego Centrum Badań (Miniatura, Opus), pt. „Ocena możliwości pozyskania bioaktywnych peptydów na drodze hydrolizy białek młota browarniczego w hodowli bakterii proteolitycznych” (2019/03/X/NZ9/00052), „Potencjał biotechnologiczny oraz aktywność przeciwdrobnoustrojowa nowych koniugatów biosurfaktant - lipaza immobilizowanych na powierzchni biopolimerów” (2020/37/B/NZ9/01519) oraz projektu: *Interdyscyplinarna współpraca międzynarodowa kluczem do doskonałości w nauce i edukacji* (INCREaSE), grant numer: PPI/APM/2018/1/00013/U/00.

Prezentowana rozprawa doktorska zawiera 177 stron maszynopisu. Praca zawiera wszystkie niezbędne części przedstawione w odpowiedniej kolejności. Dysertacja rozpoczyna się od przedstawienia spisu treści, wykazu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, oraz streszczenia pracy w języku polskim oraz angielskim. Pierwszy rozdział pracy doktorskiej Wstęp jest relatywnie zwięzły i stanowi adekwatne wprowadzenie do przedstawionej treści rozprawy. Zawiera 9 stron i przedstawia charakterystykę produktów odpadowych (m.in. młoto browarnicze, makuchy rzepakowy i słonecznikowy) oraz proponowaną ich waloryzację w celu otrzymania metabolitów mikrobiologicznych o znacznej wartości użytkowej. Doktorantka bardzo słusznie podkreśliła możliwości użytecznego zagospodarowania przedstawionych produktów odpadowych oraz ich ponownego wykorzystania. Z punktu widzenia ekonomicznego zagospodarowanie tych surowców jako składników podłoża hodowlanego dla mikroorganizmów jest bardzo dobrą alternatywą w niwelowaniu coraz większej ilości odpadów jakie powstają w poszczególnych gospodarstwach. Takie działania mają na celu odzysk cennych składników odżywczych jakie mogą być wykorzystane przez różne grupy drobnoustrojów w wyniku zachodzących



procesów mikrobiologicznych. Podsumowując Autorka w tej części pracy doktorskiej w sposób ciekawy i klarowny przeanalizowała podstawy oraz poszczególne czynniki wpływające na możliwości efektywnego wykorzystania odpadów. Szkoda, że w pracy nie został przedstawiony materiał ilustracyjny do każdej z zaprezentowanych publikacji. Taki sposób przedstawienia wykonanych badań w formie schematu pomogłoby w zrozumieniu i wyjaśnieniu poszczególnych problemów oraz zagadnień. Ponadto w pracy pojawiają się nieliczne błędy stylistyczne i merytoryczne, które z obowiązku recenzenta przedstawiłem w dalszej części recenzji. Błędnie została przedstawiona informacja na stronie 21, że fosfor jest metalem. Autorka niezbyt dobrze przedstawiła zdanie, że „*mikroorganizmy zdolne do syntezy biosurfaktantów zamieszkują wody*”. Uważam, że lepiej brzmiałoby sformułowanie, gdyby zamiast słowa „*zamieszkują*” wykorzystano: *występują w ekosystemie wodnym*. Ponadto Doktorantka napisała, że „*produkcję biosurfaktantów wspomagają substraty o odpowiedniej równowadze węglowodanów i lipidów*”, proszę o komentarz Autorki, jakie są to substraty i jaki jest odpowiedni stosunek tych poszczególnych składników w intensywnej produkcji biosurfaktantów? Ponadto przedstawione zdanie „*olej, powinien indukować syntezę biosurfaktantów wytwarzanych przez komórki celem metabolizowania nierozpuszczalnego w wodzie źródła pierwiastków budulcowych*” jest niezrozumiałe, proszę Doktorantkę o wyjaśnienia i komentarz. W Materiałach i metodach występują drobne błędy techniczne, tzw. literówki (np. „*w przeliczeni*”) ale nie mają one tak dużego wpływu na ocenę merytoryczną pracy doktorskiej. W tym miejscu chciałbym również zaznaczyć, że w przypadku referencji umieszczonych w pracy doktorskiej pozycja literaturowa numer 2, 4, 39, 43, 46 jest niewłaściwie przedstawiona. W przypadku literatury H. Zhang et al. 2007 (str. 31) brakuje nawiasu kwadratowego numeru przypisu pozycji literaturowej ze spisu zawartego w punkcie Literatura. W przypadku doniesienia literaturowego numer 34, 103 odpowiednio nazwy organizmów (roślin, bakterii) powinny być napisane kursywą i dużą literą.

Drugi rozdział dysertacji doktorskiej zawiera Cel pracy. Został on sformułowany prawidłowo i jednoznacznie. Doktorantka wyznaczyła nadrzędny Cel jakim była konwersja odpadów piwowarskich i olejarskich w biologicznie aktywne związki. Autorka rozprawy doktorskiej przedstawiła również cztery cele szczegółowe, jak: (1) produkcja hydrolizatów frakcji białkowej młota browarniczego (BSG) w hodowlach bakterii proteolitycznych oraz drożdży kładu *Yarrowia*, (2) analiza enzymów proteolitycznych zaangażowanych



w produkcję biologiczne aktywnych związków, (3) wykorzystanie makuchu słonecznikowego i rzepakowego w procesie biosyntezy mikrobiologicznego surfaktantu, surfaktyny w hodowlach bakterii *Bacillus subtilis* #309, (4) charakterystyka aktywności biologicznej otrzymanych związków. Biorąc pod uwagę powyższe informacje oraz aspekty biotechnologiczne z uznaniem należy przyjąć wybór tematu pracy doktorskiej. W mojej ocenie Autorka rozprawy doktorskiej sprawnie wywiązała się z postawionego Celu i w sposób pozytywny zrealizowała trudne zadanie badawcze.

Trzeci rozdział pracy przedstawia zastosowane Materiały i metody badawcze. Do każdego szczegółowego celu badawczego Doktorantka jasno oraz przejrzysto omówiła zastosowany materiał oraz metody. W pierwszej kolejności Doktorantka dokonuje przeglądu materiału biologicznego (bakterii i drożdży) jaki jest wykorzystywany w badaniach oraz prowadzenia ich hodowli inokulacyjnych. W kolejnym etapie przedstawiona jest wykorzystywana metoda charakterystyki materiałów odpadowych (m.in. makuchy rzepakowe i słonecznikowe) oraz ich źródła pochodzenia. W dalszej części rozprawy doktorskiej Autorka omawia warunki hodowli mikroorganizmów w podłożach składających się z produktów odpadowych uzupełnionych poszczególnymi solami (np.  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ). Kolejne etapy pracy obejmowały przeprowadzenie analiz bioinformatycznych (m.in. syntenii oraz ekspresji genów wpływających na biosyntezę enzymów proteolitycznych) oraz badań zmierzających do charakterystyki hydrolizy frakcji białkowych makuchów oraz młóta browarniczego przez mikroorganizmy. Kończącym etapem tego rozdziału pracy doktorskiej było omówienie metod badawczych zmierzających do scharakteryzowania surfaktyny produkowanej przez bakterie *Bacillus subtilis* #309. Warto podkreślić, że omówienie poszczególnych metod przez Autorkę jest wyczerpujące, chociaż uważam, że warto byłoby oddzielić zaprezentowane metody badawcze wyłącznie na prowadzone z wykorzystaniem tylko bakterii i drożdży. Taki podział pracy badawczej byłby bardziej czytelny. W obecnej formie zaprezentowany tekst jest zwarty i trudny do analizy. Warta pochwały jest wykorzystana analiza proteomiczna enzymów proteolitycznych drożdży *Yarrowia*. Doktorantka w sposób udany identyfikuje poszczególne frakcje białkowe i przedstawia ich biologiczną aktywność. W tym miejscu chciałbym jednak zaznaczyć, że warto byłoby wykorzystać analizę statystyczną w formie diagramu Venna. Taka forma przeglądu bardzo dużej liczby otrzymanych danych ma na celu zilustrowanie zależności jakie występują pomiędzy uzyskanymi peptydami, funkcjami oraz ich źródłem. Chciałbym nadmienić,



że pewne zastrzeżenie budzi wykorzystanie wysokiej temperatury 55°C w celu określenia aktywności proteolitycznej supernatantu otrzymanego po hodowli kładu *Yarrowia* w podłożu BSG (młóto browarnicze). Nawiązując również do innego wstępnego oznaczenia aktywności proteolitycznej drożdży na płytkach Petriego Autorka wykorzystywała temp. 25°C. Uprzejmie proszę podczas publicznej obrony Doktorantkę o komentarz i wyjaśnienie dlaczego została wykorzystana tak wysoka temperatura (55°C), mimo że optimum wzrostu drożdży, a więc również działalności rodzimych enzymów proteolitycznych oscyluje w zakresie 25-28°C.

Analizując ten rozdział pracy należy zaznaczyć, że Pani Dominika Ciurko zaprezentowała szeroki wachlarz metod badawczych. Ich realizacja z pewnością wymagała opanowania specjalistycznej wiedzy, odpowiedniego przygotowania metodycznego, interpretacji oraz usystematyzowania otrzymanych wyników badań. Podsumowując należy stwierdzić, że przedstawione informacje w tym rozdziale wprowadzają czytelnika w badawczą koncepcję rozprawy doktorskiej oraz późniejsze omówienie uzyskanych wyników badań.

W dalszej części pracy doktorskiej Autorka przedstawiła trzy artykuły naukowe wraz z ich omówieniem. Chciałbym nadmienić, że publikacje były już recenzowane przez szereg specjalistów w tej dziedzinie nauki, dlatego swoją ocenę ograniczę do najważniejszych informacji. W pierwszym artykule (P1) Pani Dominika wykonała symulację hydrolizy białka *in silico* w celu weryfikacji, czy młóto browarnicze może być źródłem biologicznie aktywnych peptydów. Po procesie hydrolizy Autorka otrzymała inhibitory ACE, zależne od kalmoduliny cyklicznej fosfodiesterazy nukleotydowej, oligopeptydazy prolilowej oraz reniny. Jak podaje Doktorantka prowadzona hydroliza frakcji białkowych młóta browarniczego w hodowlach bakterii proteomicznych wykazała, że „w pierwszej dobie obserwowano nieznaczny spadek pH, wskazujący na utylizację cukrów. Kolejno odnotowano wzrost pH charakterystyczny dla procesu proteolizy”. W związku z powyższym proszę Doktorantkę o wyjaśnienie jakie procesy biotechnologiczne mogą zachodzić w podłożu hodowlanym, które mają tak duży wpływ na zmianę pH środowiska. Pewien niedosyt budzi fakt, że Autorka w pracy doktorskiej nie przedstawiła parametrów kinetyki wzrostu badanych szczepów bakterii. Takie rezultaty badań umożliwiłyby lepszą interpretację zachodzących zmian w czasie wzrostu mikroorganizmów w stosunku do wykorzystywanego substratu młóta browarniczego.



Kolejnym etapem pracy było wykorzystanie techniki chromatografii wykluczenia oraz zymografii żelatynowej. Realizacja przedstawionych analiz umożliwiła charakterystykę zachodzącego procesu proteolizy młóta browarniczego przez szczepy bakterii, m.in. *Bacillus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* (nazwa bakterii zgodna z najnowszą taksonomią). Otrzymane liczne piki na chromatogramach potwierdziły niejednorodność składu frakcji peptydowej otrzymanych hydrolizatów. W wyniku przeprowadzonych badań Autorka wykazała, że frakcja białkowa młóta browarniczego pełni rolę induktora syntezy enzymów proteolitycznych w hodowlach bakterii. Co jest ciekawe, otrzymane płyny pohodowlane bakterii charakteryzowały się wysoką aktywnością antyoksydacyjną. W przypadku szczepu *Bacillus subtilis* PCM 2850 było to ponad 188,89  $\mu\text{M}$  TEAC/g peptydów w odniesieniu do zastosowanej metody DPPH. Ponadto Autorka stwierdziła, że odmiennosc otrzymanych rezultatów uzyskanych metodą DPPH i ABTS należy tłumaczyć istnieniem kilku ważnych różnic w odpowiedzi rodników na przeciwutleniacze. Autorka nie wskazała, czy użyła jakiegokolwiek kontroli do porównania zdolności antyoksydacyjnych (na przykład BHA, TBHQ itp.). Za istotną uważam ocenę potencjału antyoksydacyjnego na bazie jakiegoś powszechnie stosowanego w przemyśle przeciwutleniacza. Metody DPPH i ABTS są testami antyoksydacyjnymi opartymi na transferze elektronów, więc oczekuje się wysokiej korelacji między uzyskanymi wynikami. Ponadto metoda FRAP jest bardzo wrażliwa na obecność, np. kwasu askorbinowego, który odgrywa istotną rolę w utrzymaniu stanu redoks. W świetle powyższych informacji proszę Doktorantkę o komentarz czy zastanawiała się nad występującymi interferencjami stosowanych metod w ocenie aktywności antyoksydacyjnej? Podsumowując tą zaprezentowaną do oceny publikację warto zaznaczyć, że w dyskusji otrzymanych wyników Pani Dominika sprawnie konfrontuje otrzymane rezultaty z dostępną literaturą światową. Ma to na celu otrzymanie odpowiedzi na wcześniej postawione pytania w celu pracy doktorskiej.

Druga z zaprezentowanych publikacji (P2) z cyklu badań nad produkcją biologicznie aktywnych związków z surowców odpadowych przedstawia produkcję hydrolizatów frakcji białkowej młóta browarniczego przez szczepy drożdży kladu *Yarrowia*. Warto podkreślić, że literatura światowa jest uboga o przedstawione wyniki badań. Na szczególne uznanie zasługuje fakt przeprowadzenia przez Doktorantkę badań z zakresu bioinformatyki. Analiza genomów drożdży *Yarrowia* wykazała obecność od 5 do 21 sekwencji kodujących proteazy alkaliczne. Warto zaznaczyć, że Autorka pracy doktorskiej na podstawie homologii



sekwencji przedstawiła drzewo filogenetyczne z 13 grupami proteaz alkalicznych. Przeprowadzona analiza syntenii białek wykazała występowanie insercji genów w różnych miejscach. Jak podaje Doktorantka zachodzące duplikacje w ich obrębie mogły zachodzić niezależnie od siebie. W dalszych etapach pracy Autorka stwierdziła, że 12 genów drożdży *Y. lipolytica*, które potencjalnie kodują enzymy proteolityczne nie ulegają lub ulegają niewielkiej ekspresji w podłożach minimalnych wzbogaconych glukozą, kwasem oleinowym i trójmaślanem glicerolu. Natomiast przeprowadzona analiza genetyczna drożdży hodowanych w pożywce zawierającej młóto browarnicze (BSG) wykazała, że z 16 genów kodujących domniemane enzymy proteolityczne, aż 7 z nich uległo ekspresji. Najwyższą ekspresję zaobserwowano dla *XPR2*, a następnie dla genu *YALI0B16500*. Doktorantka otrzymane wyniki zweryfikowała przez nadekspresję genu *YALI0B16500* w auksotroficznym rekombinowanym szczepie *Y. lipolytica* Po1d (JMY 1852), gdzie nie wykryto aktywności proteolitycznej w podłożu agarowym z dodatkiem odtłuszczonego mleka. Najwyższą aktywność proteolityczną zaobserwowano dla drożdży *Y. yakushimensis* oraz *Y. lipolytica*. Średnica strefy proteolitycznej obserwowana na płycie wynosiła odpowiednio: 15,05 i 14,08 mm. W przypadku stężenia grup  $\alpha$ -aminowych ich największe stężenie odnotowano w podłożu mikrobiologicznym po hodowli drożdży *Y. lipolytica* i *Y. galli*, wartość wynosiła odpowiednio 4367 i 4245  $\mu\text{g/mL}$ .

W dalszych analizach Doktorantka wykazała, że hydroliza frakcji białkowych BSG przez drożdże *Y. lipolytica* przebiegała przy udziale dwóch proteaz o masie cząsteczkowej ok. 110 i 130 kDa. W przypadku szczepów *Y. galli* oraz *Y. parophoni* były to proteazy o masie molekularnej w zakresie 37-39 kDa. Przeprowadzona analiza aktywności antyoksydacyjnej (DPPH) wykazała największe jej rezultaty ( $>2500 \mu\text{M TEAC/g}$ ) w przypadku hodowli drożdży *Y. divulgata*. Jak stwierdziła Doktorantka „*tak duża wartość wynikała prawdopodobnie z produkcji erytrytolu, który jest uważany za silny antyoksydant.* W moim odczuciu ta informacja wymaga dokładnego sprawdzenia ponieważ inne szczepy drożdży również mogły produkować ten metabolit. Aktywność antyoksydacyjna supernatantu po hodowli drożdży *Y. lipolytica*, *Y. galli* oraz *Y. keelungensis* była na bardzo podobnym poziomie ( $>1500 \mu\text{M TEAC/g}$ ).

Podsumowując tą omawianą publikację uważam, że przedstawione wyniki badań eksperymentalnych są istotne a zaprezentowane wnioski właściwe. Można stwierdzić,





że uzyskane wyniki mogą znaleźć zastosowanie w praktyce przemysłowej do opracowania technologii produkcji przez drożdże bioaktywnych peptydów.

W ostatniej pracy publikacyjnej (P3) Pani Dominika Ciurko przedstawiła możliwości otrzymania lipopeptydowego biosurfaktantu (surfaktyny) z wykorzystaniem bakterii *Bacillus subtilis* #309. Warto podkreślić, że sformułowany w temacie przedstawionej publikacji obszar badań zawiera nowe zagadnienia, które zgodnie z wiedzą Doktorantki nie były poruszane na świecie. Hodowle bakterii *B. subtilis* #309 prowadzone były przy użyciu tanich odpadów rolno-spożywczych (makuchów słonecznikowych i rzepakowych) jako składników podłoża hodowlanego. W celu potwierdzenia przydatności zastosowanych parametrów technologicznych do produkcji surfaktyny Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę substratu oraz skrining aktywności proteolitycznej i lipolitycznej bakterii *B. subtilis* #309. Jednocześnie przeprowadzono charakterystykę antyoksydacyjną surfaktyny oraz jej dokowanie molekularne, aby potwierdzić możliwość zastosowania tego mikrobiologicznego metabolitu jako skutecznego inhibitora enzymu konwertującego angiotensynę (ACE). W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka stwierdziła, że proces produkcji surfaktyny przez *B. subtilis* #309 z wykorzystaniem dwóch rodzajów makuchów przebiegał bardzo podobnie. Największą zawartość tego metabolitu mikrobiologicznego wynoszącą 1,45 g/L otrzymano po 120 godzinnej hodowli bakterii w pożywce składającej się z makucha rzepakowego. W przypadku zastosowania makucha słonecznikowego stężenie surfaktyny wynosiło 1,19 g/L. Jednocześnie w przedstawionych badaniach obserwowano postępujący spadek napięcia powierzchniowego i wzrost aktywności emulgującej ( $E_{24}$  (%)). Maksymalną wartość emulgacji (%) oszacowano w podłożu z makuchem słonecznikowym oraz rzepakowym, odpowiednio na poziomie 66,1 i 67,1 %. Wykorzystanie techniki zymografii żelatynowej wykazało, że aktywność enzymów proteolitycznych była indukowana obecnością makuchów w podłożu hodowlanym. Po 96 godzinnej hodowli bakterii intensywność prążków odpowiadających enzymom o masach cząsteczkowych 16, 28 i 130 kDa wyraźnie wzrosła, natomiast wizualizacja frakcji białkowych reprezentujących enzymy o masach cząsteczkowych 55, 70 i 100 była zdecydowanie mniejsza. Wskazuje to na aktywność poszczególnych enzymów proteolitycznych na różnych etapach wykorzystania makuchów rzepakowych przez badane bakterie. W kolejnych doświadczeniach Doktorantka stwierdziła, że surfaktyna wytwarzana przez bakterie *B. subtilis* #309 wykazała silne działanie hamujące aktywność ACE. Wartość stężenia hamującego ( $IC_{50}$ )



w przeprowadzonych badaniach wynosiła 0,62 mg/mL. Ponadto Autorka pracy doktorskiej przeprowadziła analizę profilu homologów surfaktyny w podłożu pochodowlanym wykorzystując metodę chromatografii gazowej. W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że homolog surfaktyny C15 był frakcją dominującą w pożywkach pochodowlanych z makuchów słonecznikowych (47%) oraz rzepakowych (53%). W kolejnym etapie pracy Doktorantka przeanalizowała pochodzenie stabilizacji kompleksów enzym ACE-surfaktyna. W toku prowadzonych badań stwierdzono, że źródłem stabilizacji tego kompleksu są oddziaływania niekowalencyjne, ale także wodorowe i van der Waalsa występujące pomiędzy domenami C i N enzymu a badanym środkiem powierzchniowo czynnym. Na tej podstawie proszę Doktorantkę o konkretne doprecyzowanie charakterystyki przedstawionych oddziaływań. Czy Doktorantka spotkała się z podobnymi wynikami innych autorów w dostępnej literaturze? Proszę o komentarz.

Na zakończenie rozprawy Doktorantka przedstawiła krótkie podsumowanie które jest logicznie sformowane i zawiera przejrzyste opracowanie wyników badań stanowiących podstawę dysertacji. Ponadto Autorka prezentuje 11 wniosków, które stanowią odpowiedź na postawione cele badawcze.

Należy zwrócić również uwagę na całościowy dorobek naukowy Pani Dominiki Czurko, który obejmuje 5 publikacji naukowych (każda indeksowana w JCR o łącznym Impact Factor = 20,251). Kolejna publikacja jest w recenzji w czasopiśmie RSC Advances. Ponadto Doktorantka jest współautorką 6 doniesień konferencyjnych. Warto zaznaczyć, że Pani Dominika Czurko odbyła 3 miesięczny staż naukowy w Bicocca (Włochy) oraz brała udział jako stypendysta oraz wykonawca w projektach naukowych, odpowiednio Opus 19 oraz Miniatura 3 finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Podsumowując pragnę stwierdzić, że aktywność oraz osiągnięcia Doktorantki i jej duży dorobek publikacyjny w pełni uzasadniają o predyspozycjach i potencjale do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawiona do recenzji dysertacja Pani Dominiki Czurko spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 z późn. zm.). Uważam, że praca



doktorska zawiera oryginalne rozwiązania badawcze, które wpływają na walor naukowy pracy. Pragnę zaznaczyć, że moje uwagi zawarte w recenzji nie zmieniają jednak pozytywnej opinii o bardzo wysokim poziomie naukowym rozprawy doktorskiej. Powinny być one dla Doktorantki istotnymi wskazówkami w dalszej samodzielnej pracy naukowej. Podjęta tematyka pracy jest nowatorska a cele rozprawy zostały w pełni zrealizowane. Z tego też powodu otrzymane wyniki stanowią cenny wkład do rozwoju obszaru badawczego jakim jest z pewnością przemysł biotechnologiczny. Po zaznajomieniu się z dysertacją jestem przekonany, że Doktorantka opanowała wiedzę teoretyczną i możliwości wykorzystania metod badawczych niezbędnych do prowadzenia analiz. Wnoszę więc o przyjęcie pracy doktorskiej oraz dopuszczenie Pani Dominiki Czurko do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

*Krzysztof Meel*