



Wrocław 24.08.2023r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Pauliny Czurko

„Mikrobiologiczna produkcja biologicznie aktywnych związków z odpadów rolno-spożywczych”

Żywność nienadająca się do spożycia przez ludzi oraz odpady powstające przy produkcji żywności stanowią cenne źródło substancji organicznych. W celu zminimalizowania kosztów zagospodarowania, te produkty powinny być użyte jako karma dla zwierząt lub poddane biotransformacji. Wartość rynku odpadów żywnościowych szacuje się na około 70 mld \$. Najprostszym sposobem biotransformacji odpadów jest użycie ich do produkcji biogazu lub płynnych biopaliw. Ze względu na bogaty skład odpadów spożywczych bardzo atrakcyjne jest ich wykorzystanie jako substratów do otrzymania złożonych związków organicznych lub peptydów o wysokiej wartości rynkowej. Opracowanie nowych technologii przeróbki odpadów wiąże się z pracochłonnym procesem selekcji odpowiednich biokatalizatorów i analizy efektywności transformacji, sporządzeniem metody oczyszczania bioproduktu oraz skalowania produkcji.

W przedstawionej do recenzji pracy, Pani mgr inż. Dominiki Czurko opisała mikrobiologiczne metody konwersji produktów ubocznych przetwórstwa piwa i oleju w związki biologicznie aktywne. Tematyka rozprawy jest atrakcyjna, odpowiada na wyzwania stojące przed współczesną biotechnologią, a efekty pracy doktorantki mogą znaleźć praktyczne zastosowanie. Rozprawa powstała pod opieką dr hab. inż. Wojciecha Łaby, profesora uczelni oraz promotora pomocniczego dr Tomasza Janka z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności UPWr. Zespół posiada bardzo bogate doświadczenie w modyfikacji oraz biotechnologicznym zastosowaniu mikroorganizmów, co w połączeniu z zasobami będącymi w dyspozycji Katedry w efektywny sposób przyczyniły się do powstania tej, pod wieloma względami atrakcyjnej dysertacji.

Rozprawa doktorska składa się trzech opublikowanych artykułów naukowych, poprzedzonych wprowadzeniem przybliżającym czytelnikowi tematykę badań, zagadnienia techniczne związane z pracą oraz komentarzem do osiągnięć opisanych w załączonych pracach. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach, a jej udział w powstaniu manuskryptów,

zgodnie z oświadczeniami zamieszczonymi na końcu rozprawy jest dominujący. Wyniki pracy zostały zamieszczone w recenzowanych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu (jedna praca w *RSC Adv.*, *IF*= 4,036, dwie prace w *IJMS*, *IF*= 6,208)

We wprowadzeniu doktorantka pokrótce przedstawia informacje o problemie jakim jest zagospodarowanie odpadów spożywczych, zwracając uwagę na skalę i koszty zjawiska na świecie. Następnie opisuje materiał biologiczny, na którym zostały przeprowadzone badania oraz funkcjonujące obecnie metody jego przetwarzania. Autorka rozprawy zwraca uwagę na bioprodukty, mające potencjalnie prozdrowotne właściwości. Ta część pracy jest napisana starannie i pozwala czytelnikowi zapoznać się ze skalą oraz wyzwaniem procesów biokonwersji odpadów pochodzących z produkcji spożywczej. Doktorantka w dobry sposób wprowadza w tematykę swoich badań, pozwalając zrozumieć tok postępowania w pracy oraz zakres przeprowadzonych doświadczeń. W dalszej części rozprawy Pani mgr inż. Dominika Ciuurko opisuje narzędzia badawcze, którymi posłużyła się w pracy. Jest to poszerzona wersja informacji zawartych w publikacjach. Doktorantka w swojej pracy zastosowała szeroki wachlarz metod badawczych. Opis procedur jest staranny i zasadniczo pozwala na odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów.

Do najważniejszych osiągnięć mgr inż. Dominiki Ciuurko zaliczam:

- Wykonanie komputerowej analizy peptydów pochodzących z białek młota browarnianego (BSG) co wykazało, że hydrolizaty mogą stanowić bogate źródło bioaktywnych peptydów.
- Przeprowadzenie fermentacji na podłożu zawierającym BSG z użyciem dziewięciu różnych bakterii. Wykazanie, że te mikroorganizmy efektywniej degradują białka BSG w stosunku do dostępnych handlowo preparatów enzymów oraz określenie efektywności hydrolizy BSG dla poszczególnych mikroorganizmów. Wyznaczenie aktywności przeciwutleniającej preparatów zabierających peptydy oraz analizy wydajności wydzielania enzymów przez mikroorganizmy prowadzące biokonwersję.
- Wykonanie analizy aktywności enzymów proteolitycznych wydzielanych przez drożdże kladu *Yarrowia*. Przeprowadzanie pomiarów kinetyki oraz efektywności hydrolizy BSG dla 15 szczepów drożdży, co pozwoliło na określenie ich przydatności do produkcji proteaz oraz efektywności konwersji BSG. Wyznaczenie profili enzymów proteolitycznych kladu *Yarrowia*. Wykazanie, że BSG jest induktorem syntezy enzymów proteolitycznych oraz, że wybrane szczepy *Yarrowia* mogą produkować enzymy proteolityczne z wydajnością porównywalną do grzybów strzępkowych.

- Przeprowadzenie analizy aktywności przeciwutleniającej hydrolizatów białek BSG po fermentacji z użyciem drożdży kladu *Yarrowia*. Wykazanie, że aktywność antyoksydacyjna preparatów jest znacznie wyższa od tych, które otrzymano z wykorzystaniem bakterii.
- Wykonanie fermentacji na podłożu zawierającym makuch słonecznikowy lub rzepakowy z użyciem bakterii *B. subtilis* #309 celem syntezy surfaktyny oraz wykonanie analizy kinetyki i efektywności produkcji surfaktyny. Przeprowadzenie analizy profilu homologów surfaktyny w podłożu pochodowym. Określenie efektywności produkcji enzymów lipolitycznych i proteolitycznych przez analizowany szczep bakterii.
- Sprawdzenie aktywności przeciwutleniającej oraz inhibitorowej otrzymanej surfaktyny wobec konwertazy angiotensyny (ACE). Zbadanie możliwości zastosowania supernatantu po hodowli *B. subtilis* #309 do usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych.

Podsumowując, Pani mgr inż. Dominika Czurko przeprowadziła szeroki panel badań, wykazując, że produkty uboczne powstające podczas otrzymywania piwa lub oleju mogą na drodze biokonwersji zostać przetworzone na wartościowe związki o dużym potencjale aplikacyjnym. Ze względu na właściwości antyoksydacyjne, hydrolizaty BSG mogą być stosowane w różnych sektorach przemysłu lub użyte w produkcji nutraceutyków, czy funkcjonalnych składników żywności. Surfaktyna będąca produktem biokonwersji makuchów słonecznikowych lub rzepakowych może znaleźć zastosowanie w przemyśle kosmetycznym lub spożywczym, ponadto nawet nieoczyszczone medium po konwersji makuch może być użyte do bioremediacji. Interesujące również jest potencjalne zastosowanie otrzymanej surfaktyny jako inhibitora ACE.

Autorka rozprawy nie ustrzegła się pewnych niedociągnięć. Do określenia procentu podobieństwa pomiędzy sekwencjami w rozprawie jest używane słowo homologia (np.: 40% i 44% homologiczna względem Aep, str. 47), która oznacza pochodzenie od wspólnego przodka (powinien być % podobieństwa lub identyczności). W pracy używany jest termin chromatografia wykluczenia, powinno być chromatografia z użyciem sita molekularnego, sączenie molekularne lub filtracja żelowa. Doktorantka podaje, że „Bioaktywne peptydy to związki organiczne składające się z 2 do 20 reszt aminokwasowych, ... o masie cząsteczkowej nie przekraczającej 6000 Da. Masa 6000 Da oznacza peptyd (lub małe białko) o wielkości około 55 aminokwasów (str. 17). Koszty odpadów są podane w bilionach euro, przypuszczenie miało być w miliardach euro (str. 14).

Do doktorantki mam kilka pytań:

W jaki sposób „mechanizm katalizy enzymów użytych do proteolizy” (str. 17), może wpływać na aktywność biologiczną peptydów?

Co oznacza wysoka selektywność biosurfaktantów (str. 20)?

Czy powstające na drodze hydrolizy BSG lub makuch peptydy mogą być immunogenne?

Jeśli pochodne surfaktyny znalazłyby zastosowanie w leczeniu, w jakich ilościach należałoby je podawać i jaką drogą.

Czy podczas pomiarów aktywności inhibitorowej surfaktyny wobec ACE były stosowane kontrole w postaci detergentów niejonowych o podobnej wielkości? Jak się ma teoretycznie wyznaczona wartość oddziaływania surfaktyny do ACE do wartości zmierzonej eksperymentalnie? Jak wyglądała krzywa hamowania ACE, w jaki sposób była wyznaczona wartość IC_{50} dla surfaktyny?

Czy użyte do biokonwersji mikroorganizmy są bezpieczne dla ludzi?

Co oznacza, że peptydy mogły ulegać częściowej denaturacji (str. 43)?

W jaki opłacalny sposób można by oczyszczać surfaktynę?

Podsumowując, pragnę podkreślić wysoki poziom przedstawionej do oceny pracy. Mgr inż. Dominika Ciurko w swojej pracy wykorzystwała szereg metod badawczych, otrzymując wartościowe wyniki. Rezultaty swoich badań przedstawiła w trzech publikacjach, w których jest pierwszym autorem. Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej „Mikrobiologiczna produkcja biologicznie aktywnych związków z odpadów rolno-spożywczych” jest wysoka, a rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 ust 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Wnoszę o dopuszczenie magister inż. Dominiki Ciurko przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, mając na uwadze poziom przedstawionej pracy oraz fakt opublikowania jej wyników w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Daniel Krowarsch