



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIU

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Dr hab. inż. Wojciech Białas, Prof. UPP

Poznań, 24.08.2023 r.

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. **Dominiki Pauliny Ciorke** pt. „Mikrobiologiczna produkcja biologicznie aktywnych związków z odpadów rolno spożywczych”

wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
pod kierunkiem dr hab. inż. Wojciech Łaby, profesora Uczelni
oraz promotora pomocniczego dr Tomasza Janka

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani **mgr inż. Dominiki Pauliny Ciorke** została wykonana na zlecenie Pani Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne, Prof. dr hab. Edyty Kostrzewy-Susłow zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne z dnia 20 czerwca 2023 roku.

1. Ocena zasadności wyboru tematyki rozprawy doktorskiej

Celem rozprawy doktorskiej były kompleksowe badania dotyczące możliwości wykorzystania odpadów piwowarskich i olejarskich do mikrobiologicznej syntezy biologicznie aktywnych związków wykazujących między innymi właściwość przeciwutleniającą oraz aktywność inhibitorową wobec konwertazy angiotensyny (ACE).

Wytwarzaniu żywności nieodłącznie towarzyszy powstawanie różnego rodzaju odpadów zarówno w formie stałej jak i ciekłej. Szacuje się, że procent masy surowca niewykorzystanego w produktach końcowych wytwarzanych przez przemysł spożywczy



stanowi od 6-75%. Większość powstających odpadów wykorzystywana jest jako składnik pasz, nawozów lub stanowi substrat w procesie produkcji biogazu. Mając na uwadze różnorodność składników zawartych we wspomnianych odpadach wskazane metody ich zagospodarowania należy uznać za mało efektywne lub w pewnym sensie ekonomicznie wadliwe. Stąd na przestrzeni ostatnich kilku lat obserwujemy bardzo duży wzrost zainteresowania innowacyjnymi rozwiązaniami pozwalającymi nie tylko na poprawę efektywności produkcji żywności, ale także umożliwiającymi frakcjonowanie i przetwarzanie powstających odpadów. Są to często rozwiązania interdyscyplinarne, łączące osiągnięcia biotechnologii bazującej na wykorzystaniu enzymów oraz mikroorganizmów i technologii chemicznej wspomagającej procesy separacji i oczyszczania produkowanych substancji. Zaletą wspomnianych technologii enzymatycznych oraz mikrobiologicznych jest przede wszystkim relatywnie małe zapotrzebowanie na energię oraz możliwość prowadzenia procesu w łagodnych warunkach, sprzyjających biosyntezie nowych substancji o niespotykanych dotychczas właściwościach funkcjonalnych oraz aktywności biologicznej. W ten trend doskonale wpisuje się recenzowana rozprawa doktorska, w ramach której Autorka w sposób systematyczny prezentuje możliwości wykorzystania potencjału mikroorganizmów do biosyntezy substancji bioaktywnych w oparciu o takie substraty jak młóto browarniane i makuchy. Mając na uwadze konieczność ciągłego poszukiwania nowych technologii, charakteryzujących się niskim zapotrzebowaniem na energię oraz niskim poziomem emisji zanieczyszczeń, podjęte w rozprawie badania należy uznać za bardzo aktualne i mające szeroko zakrojony wymiar poznawczy oraz aplikacyjny.

2. Charakterystyka formalnej strony rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska składa się z dwóch części. Część pierwszą, o objętości 71 stron, stanowi autoreferat, który obejmuje: wykaz dorobku naukowego Doktorantki stanowiący przedmiot rozprawy doktorskiej, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, wykaz materiałów i metod stosowanych podczas realizacji pracy oraz prezentację poszczególnych publikacji wraz z komentarzem odnoszącym się do wybranych wyników badań. Na końcu tej części pracy znajduje się krótkie podsumowanie oraz najważniejsze wnioski i stwierdzenia dotyczące uzyskanych wyników, a także wykaz literatury. Drugą część rozprawy stanowi jednolity tematycznie zbiór 3 oryginalnych publikacji naukowych:

- **Ciurko D., Łaba W., Żarowska B., Janek T.** 2021. Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain.



RSC Advances: 11 (8), 4688-4700. DOI: [10.1039/D0RA08830G](https://doi.org/10.1039/D0RA08830G); IF= 4,036; MEiN= 100

- **Ciurko D.**, Neuvéglise C., Szwechłowicz M., Lazar Z., Janek T. 2023. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of *Yarrowia* Clade Species and Their Putative Applications. *International Journal of Molecular Sciences*: 24 (7), 6514. <https://doi.org/10.3390/ijms24076514>; IF= 6,208; MEiN= 140
- **Ciurko D.**, Czyżnikowska Ż., Kancelista A., Łaba W., Janek T. 2022. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. *International Journal of Molecular Sciences*: 23 (18), 10824. <https://doi.org/10.3390/ijms231810824>; IF= 6,208; MEiN= 140

Wymienione wyżej publikacje zostały opublikowane w renomowanych czasopismach znajdujących się w bazie JCR. Ich łączny współczynnik oddziaływania IF oraz liczba punktów MNiSW wynoszą odpowiednio 16, 452 i 380, co świadczy o bardzo dobrym poziomie przeprowadzonych badań, ocenionych również przez niezależnych recenzentów. Wszystkie publikacje są pracami zespołowymi, a liczba współautorów waha się od 4 do 5. Należy podkreślić, że we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i zgodnie z oświadczeniami pozostałych członków zespołu badawczego Jej udział w ich powstaniu był wiodący. Indywidualny wkład pracy doktorantki w przypadku większości publikacji obejmował: współtworzenie koncepcji pracy, udział w opracowaniu założeń metodycznych, realizację badań laboratoryjnych, analizę i opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu. W mojej opinii udział Doktorantki w poszczególnych pracach jest znaczący i jednocześnie wystarczający do włączenia ich do cyklu publikacji stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Mając na uwadze zakres merytoryczny publikacji wchodzących w skład dzieła należy stwierdzić, że tytuł rozprawy doktorskiej doskonale odzwierciedla jej treść i jest w pełni adekwatny. Prezentacja publikacji wraz z komentarzem, poprzedzona szczegółowym opisem metodyki badań i jasno sformułowanym celem rozprawy, ułatwiają jej lekturę i zrozumienie przyjętej koncepcji badań.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

We wprowadzeniu do rozprawy Autorka omówiła pokrótce zagadnienia związane z powstawaniem, właściwościami oraz potencjalnym wykorzystaniem odpadów: młota browarnianego oraz makuchów pochodzących z produkcji oleju rzepakowego i słonecznikowego. Doktorantka słusznie zauważa, że odpady te ze względu na swój skład mają



potencjalnie bardzo szerokie zastosowanie w technologii żywności oraz biotechnologii. Nie tylko jako źródło wartościowych substancji pozyskiwanych na drodze ekstrakcji, ale także jako substrat do syntez enzymatycznych i mikrobiologicznych. Zwróciła przy tym uwagę, że zastosowanie enzymów ma bardzo szerokie możliwości, ale wiąże się z pewnymi ograniczeniami oraz wysokimi kosztami. Na kanwie tego stwierdzenia Autorka zarekomendowała zastosowanie mikroorganizmów takich jak bakterie oraz drożdże kladu *Yarrowia*. Jako jedno z potencjalnych zastosowań wskazała proces otrzymywania bioaktywnych peptydów o właściwościach przeciwutleniających. W dalszej części wstępu doktorantka omówiła możliwości zastosowania makuchów w procesie mikrobiologicznej produkcji surfaktantów. Pierwszy rozdział dysertacji to syntetyczny i logicznie przygotowany przegląd dostępnych danych literaturowych, który stanowi doskonałe wprowadzenie do omówienia wyników badań zrealizowanych w ramach recenzowanej pracy. Na zakończenie tego rozdziału postawiony został cel badań wraz z celami szczegółowymi, które obejmowały swym zakresem produkcję hydrolizatów frakcji białkowej BSG w hodowlach bakterii proteolitycznych oraz drożdży kladu *Yarrowia*, analizę enzymów proteolitycznych zaangażowanych w produkcję biologicznie aktywnych związków, wykorzystanie makuchu słonecznikowego i rzepakowego w procesie biosyntezy surfaktyny w hodowlach bakterii *B. subtilis* oraz charakterystykę aktywności biologicznej otrzymanych związków. Sposób sformułowania głównego celu pracy oraz etapów realizacji prac badawczych uważam za poprawny i świadczący o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia tego rodzaju badań. Ta część pracy ma przemyślaną strukturę i stanowi doskonałą podbudowę teoretyczną do omówienia wyników prac badawczych zaprezentowanych w dalszej części rozprawy.

W kolejnej części rozprawy Autorka omawia podstawowe materiały oraz metody wykorzystane podczas badań opisanych w pracach P1-P3. Autorka podzieliła ten rozdział na siedem podrozdziałów odwołujących się do kolejnych publikacji. Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykorzystania obok konwencjonalnych metod badawczych (hodowlanych, elektroforetycznych) także nowoczesnych metod analitycznych takich jak GC-MS, HPLC-MS, pozwalających między innymi na kompleksową charakterystykę produkowanych metabolitów. Doktorantka opanowała także metody instrumentalne stosowane w analizie związków powierzchniowoczynnych. Bardzo silną stroną dysertacji jest także wykorzystanie zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych wspomagających planowanie i realizację prac eksperymentalnych dotyczących w głównej mierze procesu proteolizy i syntezy bioaktywnych peptydów. W mojej opinii dobór metod badawczych oraz statystycznych wykorzystanych



podczas analizy i omawiania wyników należy uznać za w pełni zasadny i prawidłowy.

Postawiony w niniejszej rozprawie doktorskiej cel badawczy zrealizowano w trakcie badań eksperymentalnych, których wyniki opisano w publikacjach P1-P3. W pierwszym etapie badań prowadzonych metodą *in silico* wykazano, że białka zawarte w surowcu jakim jest BSG mogą być między innymi źródłem peptydów o właściwościach przeciwutleniających i hamujących ACE. Istotnym osiągnięciem Doktorantki jest także to, że dzięki pogłębionej i krytycznej analizie danych uzyskanych metodą *in silico* wykazała, że BSG może być również źródłem peptydów o zdecydowanie negatywnym oddziaływaniu na organizm ludzki. Wyniki badań prowadzonych metodą *in silico* potwierdzono podczas badań eksperymentalnych prowadzonych z wykorzystaniem bakterii z rodzaju *Bacillus*. Doktorantka udowodniła, że uzyskanie stopnia hydrolizy (DH%) na poziomie 30-45% wymaga obecności szerokiego spektrum enzymów proteolitycznych syntetyzowanych przez badane bakterie. Dzięki nim możliwe jest uzyskanie złożonej mieszaniny peptydów wykazujących zgodnie z przewidywaniami istotną aktywność przeciwutleniającą. Prace związane z proteolizą BSG kontynuowano w trakcie badań opisanych w pracy P2. Proteolizę prowadzono w hodowlach drożdży kładu *Yarrowia* posiadających status GRAS (ang. generally recognized as safe). Badania eksperymentalne wykazały, że wybrane drożdże kładu *Yarrowia* mają znacznie wyższe uzdolnienia proteolityczne aniżeli badane wcześniej szczepy bakterii, przy czym aktywność ta jest pochodną obecności szerokiego spektrum enzymów proteolitycznych. W tym miejscu należy zaznaczyć, że badania bioinformatyczne, na podstawie których sporządzono drzewo filogenetyczne alkalicznych proteaz kładu *Yarrowia*, jak również wykonano analizę ich syntenii, stanowią jedno z kluczowych osiągnięć naukowych Doktorantki. Szeroko zakrojone badania eksperymentalne wykonane przez Doktorantkę potwierdziły zdolność niektórych gatunków *Yarrowia* do zewnątrzkomórkowej sekrecji aktywnych proteaz, co jak trafnie sugeruje Doktorantka może czynić je potencjalnymi producentami przemysłowych enzymów proteolitycznych. Z całą pewnością wyniki te mają istotny wkład w badania nad uzdolnieniami metabolicznymi drożdży kładu *Yarrowia*. W przypadku trzeciej pracy wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Autorka sięgnęła po surowce odpadowe pochodzące z przemysłu olejarskiego. Badania skupiały się na procesie produkcji oraz analizie właściwości biologicznych surfaktyny, biosurfaktantu lipopeptydowego, produkowanego przez szczep *Bacillus subtilis* #309. Opisane we wspomnianej pracy badania były wielowątkowe. Autorka na wstępie dokonała oceny składu chemicznego obu rodzajów makuchów, wskazując na istotne różnice w składzie frakcji tłuszczowej. W kolejnym etapie badań Doktorantka potwierdziła zasadność wyboru szczepu *Bacillus subtilis* #309 do badań nad biosyntezą



surfaktyny w oparciu o wspomniane surowce odpadowe. Wykazała między innymi, że szczep ten jest zdolny do biosyntezy enzymów takich jak lipazy i proteazy. Dzięki zastosowaniu technik elektroforetycznych udowodniła, że wydajna hydroliza białek zawartych w makuchach możliwa jest dzięki obecności kilku enzymów proteolitycznych. Jednym z najistotniejszych osiągnięć naukowych zaprezentowanych w omawianej publikacji było wykazanie, że skład ilościowy produkowanych homologów surfaktyny jest zależny od składu aminokwasowego frakcji białkowej oraz profilu kwasów tłuszczowych zawartych w badanych makuchach. Doktorantka wiele uwagi poświęciła także badaniom mającym na celu wskazania potencjalnych aplikacji dla syntetyzowanej surfaktyny. Wykazała między innymi, że surfaktyna w sposób istotny obniża napięcie powierzchniowe, co potencjalnie może sprzyjać jej wykorzystaniu w procesach oczyszczania gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. Udowodniła także, że substancja ta ma wysoką aktywność inhibitorową wobec ACE. Co istotne, bazując na analizach *in silico*, podjęła także próbę wyjaśnienia mechanizmu hamowania ACE przez surfaktynę. Na podstawie przeprowadzonych obliczeń autorka stwierdziła, że za powstanie stabilnego kompleksu w głównej mierze odpowiedzialne są oddziaływania niekowalencyjne, przede wszystkim hydrofobowe, jak również wiązania wodorowe i oddziaływania van der Waalsa. Otrzymane wyniki wskazują, że surfaktyna może w przyszłości stanowić potencjalną alternatywę dla obecnie stosowanych substancji o działaniu przeciwnadciśnieniowym.

Wyniki uzyskane podczas realizacji badań umożliwiły sformułowanie krótkiego podsumowania oraz jedenastu wniosków, które w większości przypadków należy uznać za uzasadnione.

4. Komentarze i uwagi

Recenzowana rozprawę należy ocenić bardzo wysoko, jednakże jej lektura nasuwa pewne drobne uwagi oraz pytania, które powinny stanowić podstawę do dyskusji w trakcie dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej:

- W streszczeniu rozprawy pojawia się stwierdzenie mówiące o tym, że „udowodniono skuteczność surfaktyny jako środka do usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych, a zastosowana technologia miała sens ekonomiczny”. Uważam, że wykonane badania wskazują na możliwość wykorzystania płynu pochodzącego w tego rodzaju procesach, jednakże stwierdzenie mówiące o zasadności ekonomicznej uważam za zdecydowanie nieuprawnione na tym etapie badań. Zaprezentowane wyniki w żaden sposób nie odnoszą się do kosztów procesu biosyntezy surfaktyny, który trwa 120h oraz



aplikacji uzyskanego preparatu w warunkach rzeczywistych.

- We wstępie do pracy autorka wspomina, że „Polska, na tle krajów Unii Europejskiej, zajmuje niechlubne piąte miejsce generując 9,2 miliona ton odpadów rolno-spożywczych rocznie, których wartość wynosi 14 bilionów euro”. Myślę, że tutaj chodziło o 14 mld euro, a podana kwota jest pochodną błędnego tłumaczenia danych zawartych w cytowanej pozycji literaturowej.
- W pracy P1 jednym z badanych szczepów bakterii był *Bacillus cereus* PCM 2849, który występuje powszechnie w żywności i stanowi poważne zagrożenia dla zdrowia konsumentów. Czym kierowała się autorka rozprawy przy wyborze szczepów bakterii do badań?
- W rozdziale materiały i metody znajduje się opis sposobu oznaczania stężenia surfaktyny. Prawdopodobnie rozdział HPLC standardu pozyskanego z firmy Sigma-Aldrich daje więcej niż jeden pik, podobnie jak rozdział płynów pochodowlanych. W związku z tym chciałbym zapytać, czy na etapie obliczania stężenia pod uwagę była brana jedynie wiodąca forma surfaktyny (prawdopodobnie C15) czy suma pików dla surfaktyn C13, 14 i 15? Sposób obliczania końcowego stężenia surfaktyny ma istotne znaczenie w kontekście porównania uzyskiwanych wyników z dostępnymi danymi literaturowymi.
- Podczas oceny właściwości przeciwutleniających peptydów uzyskiwanych w hodowlach drożdży kladu *Yarrowia* Doktorantka zwraca uwagę na potencjalny wpływ erytrytolu oraz związków fenolowych zawartych w BSG (kwas ferulowy), które uwalniały się do roztworu podczas procesu proteolizy. Tutaj nasuwa się pytanie, dlaczego nie wykonano dodatkowych oznaczeń metodą HPLC, mających na celu określenie stężenia zarówno erytrytolu jak i wspomnianego kwasu ferulowego. Podczas większości hodowli obserwowano alkalizację środowiska reakcji, która sprzyja ekstrakcji frakcji białkowej z BSG. Można zakładać, że ten proces może mieć także wpływ na ilość uwolnionego kwasu ferulowego, który wykazuje właściwości przeciwutleniające. Wyniki tych analiz z pewnością pozwoliłyby rozwiązać wszelkie wątpliwości związane z danymi odnoszącymi się do potencjału przeciwutleniającego produkowanych hydrolizatów i potwierdzałyby ponad wszelką wątpliwość treść szóstego wniosku zawartego na stronie 54 opracowania.

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska mgr inż. Dominiki Pauliny Czurko pt.



„Mikrobiologiczna produkcja biologicznie aktywnych związków z odpadów rolno spożywczych” wykonana została z należytą starannością oraz zachowaniem właściwej metodologii badań. Czytałem ją z przyjemnością oraz uznaniem dla Doktorantki, która wykazała się wysoką wiedzą oraz umiejętnością dyskusji uzyskanych wyników.

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Dominiki Pauliny Ciurko spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UP we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Dominiki Pauliny Ciurko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 24.08.2023 r.

Wojciech Białas.....