

Łódź, 14.06.2021

Ocena Pracy doktorskiej Idy Szmigiel

nt. „**Biotransformacja śruty rzepakowej z wykorzystaniem *Bacillus subtilis***”

wykonanej

w Zakładzie Biotransformacji na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego

pod kierunkiem dr. hab. Anny Krasowskiej

W Polsce, podobnie jak w przypadku wielu innych krajów członkowskich UE, problematyka dotycząca pozyskiwania, wprowadzania do obrotu i stosowania w żywieniu zwierząt wysokojakościowych komponentów paszowych wytwarzanych zgodnie z zasadami gospodarki obiegu zamkniętego jest ciągle aktualna. Ważnym obszarem jest także pokierowanie produkcją wytwórczą, by zagwarantować wykorzystywanie surowców odnawialnych przy jednoczesnym zagospodarowaniu wszystkich półproduktów i produktów ubocznych, w tym zapewnienie zrównoważonego gospodarowania zasobami. W ten trend wpisują się zagospodarowanie produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego, takich jak śruta rzepakowa, otręby, wyśładki buraczane czy wyłoki owocowo-warzywne. W zależności od gałęzi przemysłu, z którego pochodzi biomasa odpadowa, dostarcza ona bardzo szerokiej gamy produktów zarówno objętościowych, jak i treściwych. Produkty te charakteryzują się zróżnicowanymi walorami, a ich zastosowanie, w wielu przypadkach, pozwala zminimalizować koszty żywienia zwierząt gospodarskich. Niewątpliwą jednak wadą ubocznych produktów przemysłu rolno-spożywczego jest fakt, że są one dostępne dla ograniczonej liczby gospodarstw, w określonych porach roku i jedynie dla tych producentów, którzy znajdują się dość blisko zakładów przetwórczych. Opracowanie technologii bio-przetwarzania oraz utrwalania surowca odpadowego poprawić może dostępność surowca w ciągu roku oraz pozwolić na wyeliminowanie w/w problemów. O wartości paszowej stanowi głównie skład chemiczny, w tym przede wszystkim jakościowy i ilościowy udział węglowodanów, białek i tłuszczów, ale również związków o charakterze anty-żywniowym.

Podjęte przez Panią mgr Idę Szmigiel badania związane z realizacją pracy doktorskiej są studium opisującym proces biotransformacji śruty rzepakowej, który prowadzony był z udziałem szczepu *Bacillus subtilis* 87Y wyizolowanego z dżdżownicy kalifornijskiej, charakteryzującego się aktywnościami

ksylolitycznymi oraz celulolitycznymi, a także zdolnością do biosyntezy surfaktyny. Doktorantka podjęła się weryfikacji składu fermentowanej oraz niefermentowanej biomasy roślinnej pod kątem właściwości odżywczych analizując zmiany zachodzące po przeprowadzeniu procesu biotransformacji. W założeniu, badania te miały zweryfikować poprawę podstawowych parametrów z zakresie zawartości włókna oraz substancji antyżywniowych (w szczególności redukcji zawartości mykotoksyn). Jak podaje doktorantka śruta rzepakowa ma dobrze zbilansowany skład niezbędnych aminokwasów, korzystny stosunek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, znaczną zawartość minerałów, szeroką gamę witamin oraz jest najważniejszym źródłem białka wykorzystywanym w komercyjnych dietach dla świń i drobiu zaraz po mączce sojowej. Przedstawiona do oceny praca doktorska wpisuje się zatem w priorytetowe obszary działań wskazane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. W drodze uchwały nr 222/2015 Rady Ministrów z dnia 15 grudnia 2015 r ustanowiono bowiem na lata 2016--2020 realizację programu pt. „Zwiększenie wykorzystania krajowego białka paszowego dla produkcji wysokiej jakości produktów zwierzęcych w warunkach zrównoważonego rozwoju”.

Zamierzeniem pracy doktorskiej Pani Idy Szmigiel było wzbogacenie lignocelulozowej biomasy roślinnej w surfaktynę, a także enzymy ksylano- oraz celulolityczne. Ze względu na dużą aktywność biologiczną oraz właściwości antyadhezyjne biosurfaktanty stanowią mogą naturalne konserwanty pasz dla zwierząt, i obok enzymów (poprawiających trawienie i przyswajanie składników pokarmowych), cenny ich składnik. Jako substrat dla biosyntezy biosurfaktantu oraz enzymów zewnątrzkomórkowych stosowano śrutę rzepakową, ziarna owsa, plewki owsa, mielony owies oraz mieszanki śruty rzepakowej oraz mielonego owsa. Dla wybranych wariantów eksperymentalnych porównano produktywności surfaktyny oraz aktywności ksylanaz. Autorka rozprawy pojęła się również próby wyjaśnienia mechanizmów procesowych, w tym indukcji procesów biosyntezy, a w szczególności zależności zawartości hemicelulozy z podwyższoną produkcją ksylanaz i biosurfaktantu w fermentowanych mieszankach śruta rzepakowa : owies oraz analizy ekspresji genów kodujących specyficzne enzymy ksylanolityczne. Stosując min. techniki mikroskopii konfokalnej oraz znakowania immunologicznego wykazano, że pochodne ksylanu obecne w ścianie komórkowej owsa są prawdopodobnie przyczyną zwiększonej produktywności surfaktyny, przy czym znacznie efektywniejsze okazało się stosowanie mieszanek śruty rzepakowej i mielonego owsa niż wprowadzanie ksylanu do środowiska, zarówno jako jedyne źródła węgla jak i wraz z sacharozą. Otrzymywany związek zidentyfikowany został jako aktywny biologicznie względem *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, potencjalnego patogennego dla zwierząt, w tym drobiu. W mojej opinii cennym byłoby również sprawdzenie aktywności otrzymywanego biosurfaktantu względem mikroflory własnej surowca oraz jego najczęstszych zakażeń. Badanie takie mogłoby wskazać rolę związku w stabilizacji

biologicznej otrzymywanego komponentu. Aspekt „konserwacji” Autorka przywołuje w rozdziale 4.4 komentując wyniki analiz dotyczących redukcji zawartości mykotoksyn związanej z prowadzonymi procesami biotransformacji śruty rzepakowej. W toku badań odnotowano obniżenie zawartości deoksynivalenonu, zearelanenonu, aflatoksyny B1 oraz B2 po procesach fermentacyjnych odpowiednio o 22,5%, 77,7 %, 9,3 % oraz 11,8%. Na potrzeby prezentowanego eksperymentu wprowadzono do środowiska badane mykotoksyny w ilości 2 µg /mL, przy czym Autorka nie podaje wartości oznaczonych po tym zabiegu, stanowiących podstawę do obliczeń. Tym samym brak jest informacji o poziomie zanieczyszczenia materiału wyjściowego tymi związkami i skali problemu. Nieco przedwczesne jest wg. Recenzenta również wnioskowanie o zabezpieczeniu przed skażeniem mykotoksynami. Ten obszar wymaga dalszych eksperymentów. Ewentualny późniejszy rozwój zakażeń wtórnych (w postaci grzybów pleśniowych) mógłby doprowadzić do zwiększenia stężenia tych związków. Należałoby ustalić jak długo utrzymują się aktywność związana z redukcją zawartości toksyn. Pod uwagę wziąć należy również fakt, iż o aktywności lakkazy rozkładającej aflatoksynę B1 wnioskowano jedynie na podstawie występowania genów kodujących ten enzym, a nie metabolitów uwalnianych podczas lizy. Ponadto warto pamiętać, że przypuszczalna adsorpcja deoksynivalenonu i zearelanenonu na powierzchni komórek *B. subtilis* 87Y nie dezaktywuje tych związków.

Cenny element pracy stanowią badania związane z określeniem potencjalnego działania probiotycznego szczepu *B. subtilis* 87Y zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. W toku badań określono przeżywalność w obecności kwaśnego środowiska i soli żółci; wpływ na przeżywalność wybranych bakterii Gram+: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. hirae*, *E. faecium*; wpływ dodatku do paszy fermentowanej śruty rzepakowej na mikrobiom kurcząt typu brojler. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów Doktorantka wskazuje na cechy probiotyczne zastosowanego w procesach fermentacyjnych szczepu. Są one w dużej mierze związane z zahamowaniem rozwoju mikroflory niepożądanego i patogennej, w szczególności *Blastocytis hominis*. Moją wątpliwość budzi jednak interpretacja wyników przedstawionych na ilustracjach 20-24. Jak podaje Autorka monitoring wzrostu i żywotności szczepów prowadzony był w oparciu o badania densytometryczne. Zmętnienie środowiska występuje jednak zarówno w przypadku komórek aktywnych jak i nie aktywnych oraz obecności innych komponentów zawieszonych. Dlatego też nie można mówić o przeżywalności szczepów opierając się o takiego rodzaju dane. Ponadto według Recenzenta termin „przeżywalność” zarezerwowany jest do opisu zjawisk związanych z działaniem czynników stresowych - letalnych lub subletalnych i w takim znaczeniu stosuje się go powszechnie. Niepoprawnym zatem jest odnoszenie go do eksperymentów, w których obserwujemy intensyfikację wzrostu. Potwierdzenie wzrostu liczebności komórek, zarówno dla szczepu *Bacillus subtilis* jak i *Lactococcus lactis* ATCC19435, *Lactococcus lactis* ATCC 49032, *Lactococcus lactis* ATCC 11454 powinno być wykonane z wykorzystaniem metod hodowlanych i wyrażone w jtk.

W zakresie liczby jednostek tworzących kolonie ciekawość Recenzenta budzi również stopień namnożenia komórek *Bacillus subtilis* w hodowlach SSF prowadzonych z wykorzystaniem biomasy śruty rzepakowej i ich żywotność w momencie aplikacji do diety kurcząt.

Na podkreślenie zasługuje wieloaspektowe podejście do tematu oraz szeroki warsztat badawczy. Przeprowadzenie eksperymentów wymagało znajomości przez Doktorantkę zarówno standardowych technik analizy mikrobiologicznej i histologicznej, jak i metod genetyki molekularnej (w tym metagenomiki), a także obok rutynowych analiz chemicznych, umiejętności posługiwania się zaawansowanymi technikami mikroskopowymi oraz instrumentalnej analizy chemicznej. W trakcie realizacji prac wykorzystano m.in. techniki: chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas, optycznej spektroskopii emisyjnej, spektroskopii bliskiej podczerwieni, MaLDi-TOF-MS, mikroskopii stereoskopowej i konfokalnej, izolacji DNA i RNA oraz reakcji odwrotnej transkryptazy, sekwencjonowania genomowego DNA czy kohodowli mikroorganizmów metodą insertów.

Imponujący jest również zakres współpracy jaką nawiązała Doktorantka z zewnętrznymi jednostkami naukowymi: z Katedrą Mikrobiologii Przemysłowej Uniwersytetu Łódzkiego, Katedrą Biofizyki i Morfogenezy Roślin Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, Laboratorium Katedry Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, Stacją Badawczo-Dydaktyczną oraz Katedrą Biostruktury i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Laboratorium Spektroskopii Mass i Chromatografii Polskiego Ośrodka Rozwoju Technologii (PORT) we Wrocławiu oraz firmami InventionBio SA i niemiecką Eurofins Genomics.

Pani Ida Szmigiel założone cele konsekwentnie realizowała poprzez zaplanowanie i realizację szerokiego zakresu logicznego ciągu eksperymentów. O skali i różnorodności badań świadczy rozbudowany rozdział metodyczny, w którym Recenzent odnalazł niewielkie uchybienia. Wielorazowo podając warunki wirowania Autorka wskazuje jedynie wartości prędkości obrotowej (rpm) - brak jest jednak wartości siły (g). Nie znalazłam również szczegółów metodycznych odnoszących się do oznaczeń MIC₅₀ oraz zawartości hemiceluloz (frakcji NDF oraz ADF). Ponadto w rozdziale 3.2.9 nie podano objętości w jakiej prowadzono eksperyment, sposobu pomiaru gęstości optycznej oraz przygotowania próby kontrolnej.

Na podkreślenie zasługuje również fakt, że Pani Ida Szmigiel wykazała niezbędną w badaniach naukowych, umiejętność analizy wyników oraz ich uogólniania z wykorzystaniem metod statystycznych. Podjęte przez Doktorantkę badania mają również wysoką wartość aplikacyjną, dostarczając wartościowej wiedzy i gotowych rozwiązań. Na potrzeby pracy wykonano bowiem próby w skali półprzemysłowej otrzymując 50 kg preparatu, z którego sporządzono właściwą mieszankę

paszową. Ogólny praktyczny cel działań jest więc mocno zarysowany i co bardzo ważne wpisuje się w strategię gospodarki obiegu zamkniętego.

Przedstawiona do oceny praca obejmuje 149 stron, w tym 104 strony tekstu i 17 stron wykazu literatury. Rozprawa zawiera następujące części: Streszczenie (w języku polski i angielskim), Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Bibliografia, Wykaz ilustracji i tabel, Dorobek naukowy. Opracowanie charakteryzuje się właściwym układem, proporcja poszczególnych części jest odpowiednia. Połączenie omówienia wyników z ich dyskusją stanowi trzon rozprawy, liczący 60 stron. W części tej zaprezentowano 31 ilustracji oraz 15 tabel z wynikami. Wyniki badań własnych zostały przedstawione na tle przytaczanych danych literatury światowej, stanowiąc uzupełnienie wiedzy w obszarze tematycznym rozprawy i właściwie podsumowując rezultaty eksperymentów. Tekst został dobrze przygotowany pod względem edytorskim, a drobne błędy literowe i stylistyczne, które wymieniam poniżej, nie wpływają na wartość naukową rozprawy.

OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Przeгляд literatury jest zwięzły i ściśle dotyczy zagadnień związanych z podjętą tematyką badawczą wyników czyli: procesów fermentacyjnych typu *solid-state* prowadzonych w nich podłożach, charakterystyką szczepów gatunku *Bacillus subtilis*, a także enzymów hydrolizujących polisacharydy oraz surfaktyny jako dodatków paszowych. Doktorantka przybliży również rolę substancji antyżywniowych oraz komponentów probiotycznych w żywieniu drobiu.

Cel i zakres pracy zostały sformułowane właściwie, w pełni wprowadzając w koncepcję pracy doktorskiej. Część metodyczna jasno opisuje dobór materiału do badań i sposób poboru próbek. Dobór materiału, liczba próbek i powtórzeń eksperymentów umożliwiają ocenę statystyczną, która podnosi wartość pracy.

Uważam, że wyniki badań zostały opisane syntetycznie i wystarczająco, a bogaty materiał ilustracyjny znacznie ułatwia analizę danych doświadczalnych. Na podkreślenie zasługuje przejrzystość opisu, co przy tak rozbudowanej analitycznej pracy nie jest łatwe. Wnioski zostały sformułowane logicznie i prawidłowo, w oparciu o dane eksperymentalne.

Pracę uzupełnia zestawienie 284 pozycji bibliografii, obejmujących zarówno pozycje sztan-darowe dla omawianego tematu, jak i najnowsze doniesienia naukowe (jedną szóstą piśmiennictwa stanowią pozycje pochodzące z ostatnich pięciu lat). Spis literatury został przygotowany starannie, bez istotnych uchybień.

UWAGI NATURY EDYTORSKIEJ

Z obowiązku recenzenta wymieniam poniżej potknięcia edytorskie i drobne nieścisłości:

- Str. 21 – ostatnia linia – jest „zawartość” powinno być „wartość”
- Str. 22 – tytuł w drugiej kolumnie tabeli powinien być bardziej precyzyjny (do „produktów” nie należą m.in. „garbarnie i rzeźnie”
- Str. 22 – zamiast „przemysł cukierniczy” powinno być „przemysł cukrowniczy”
- Str. 24 – przed „brojlery” powinno być „na”
- Str. 26 – dolny akapit – zamiast „wytwarzanych metabolitów” powinno być wytwarzanych zewnątrzkomórkowo metabolitów i białek” (enzymów nie zalicza się do metabolitów)
- Str. 74 – 5 linia od dołu – zamiast „efektywniej” powinno być „efektywnego”
- Str. 80 – pierwszy akapit – powtórzenie ze strony 79
- Str. 86 – brak oznaczeń „A” i „B” na ilustracji
- Str. 90 – trzecia linia pod tabela – dodatkowy „enter”
- Str. 91 – Tabela 16 – brak opisu kolumn
- Str. 93 – 8 linia od góry – zamiast „Kolonie” powinni być „Bakterie” lub „Szczepy”
- Str. 93 – 10 linia od góry – powinno być „W wysiewach wykonanych z treści jelitowej kurcząt karmionych paszą z dodatkiem
- Str. 93 – 9 linia od dołu – powinno być „w treści jelitowej czwórki kurcząt ...”
- Str. 93 – 5 linia od dołu, Str. 94 – 7 linia od góry, Str. 94 – 3 linia od dołu nieprawidłowe jest użycie słowa „morfologia”
- Str. 96 – 3 linia od dołu – zamiast „kolonie” powinno być „szczepy”
- Str. 99 – 17 linia od dołu – słowo „probiotycznych” powinno zostać zastąpione innym – dla tego szczepu właściwości probiotyczne nie zostały sprawdzone
- Ilustracje 35, 36 – w podpisie znajduje się rozwinięcie skrótu MO nieobecnego na ilustracji
- Ilustracja 39 – w podpisie znajduje się rozwinięcie skrótów PO, SR, PNFLZO nieobecnych na ilustracji, nie wyjaśniono skrótów LMO, RSM, PNFL, PFL

KONKLUZJE RECENZJI

Podsumowując, stwierdzam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane, a założenia i tezy badawcze zweryfikowane w toku badań. Podkreślam walor aplikacyjny badań, których wymiernym rezultatem jest opracowanie sposobu otrzymywania komponentu paszowego. Zamieszczone w tekście recenzji moje uwagi i sugestie, nie umniejszają wartości pracy doktorskiej Pani mgr Idy Szmigiel.

Stwierdzam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa Pani mgr Idy Szmigiel spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowe Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani Idy Szmigiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz przyznanie rozprawie doktorskiej mgr Idy Szmigiel wyróżnienia.

