



POLITECHNIKA POZNAŃSKA
INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ
Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. 61 665-37-16, fax 61 665 36 49
e-mail: lukasz.chrzanowski@put.poznan.pl
prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski
Zakład Chemii Organicznej i Bioorganicznej



Poznań, 31.08.2026

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Weroniki Śliżewskiej
pt. „Ekstremofilne grzyby strzępkowe – źródło biomolekuł o potencjalnych zastosowaniach
przemysłowych”

Oceniana praca doktorska została zrealizowana w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej, na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Olgi Marchut Mikołajczyk, prof. PŁ oraz promotora pomocniczego dr inż. Katarzyny Struszczyk-Świta

Podstawa wykonania recenzji

Recenzję wykonałem w oparciu o uchwałę nr 20/2026 Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Politechniki Łódzkiej z dnia 16 czerwca 2026, a także pisma Dziękana prof. dr hab. Edyty Gendaszewskiej-Darmach z dnia 23 czerwca 2026 roku oraz dostarczonego egzemplarza pracy doktorskiej.

Charakterystyka Kandydatki

Zgodnie z przedstawionymi informacjami Pani Weronika Śliżewska uzyskała tytuł inżyniera w lutym 2020 roku. Tytuł pracy: “Production of microbial oil from *Mucor circinelloides* IBT-83” - Bachelor of Engineering in Bioeconomy Lodz University of Technology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Institute of Molecular and Industrial Biotechnology with rotation semesters at Warsaw University of Technology and Military University of Technology in Warsaw. W lipcu 2021 roku uzyskała tytuł magistra za pracę: “Halophilic filamentous fungi as a source of lipolytic enzymes” - Lodz University of Technology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Institute of Molecular and Industrial Biotechnology. Od października 2021 realizowała pracę doktorską pt.: “Extremophilic filamentous fungi – source of biomolecules with potential industrial applications” jako PhD candidate in Interdisciplinary Doctoral School of Lodz University of Technology, Discipline - Food Technology and Nutrition Lodz University of Technology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Institute of Molecular and Industrial Biotechnology. W karierze naukowej Kandydatki warto wskazać staże naukowe:

- Plant Sciences Division, ITQB NOVA - Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Oeiras, Portugal Mar 2026 (2 weeks)
- Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisbon, Portugal Nov - Dec 2025 (1 month)
- Department of Agricultural Sciences, Biotechnology and Food Science, Cyprus University of Technology, Limassol, Cyprus Jun - Sep 2024 (3 months)
- Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisbon, Portugal Sep - Nov 2021 (3 months)
- Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil Aug - Sep 2019 (2 months)
- Department of Refrigeration Technology and Technique, Institute of Agriculture and Food Biotechnology, Lodz, Poland Aug - Sep 2020 (1 month).

Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej

Środowiska charakteryzujące się skrajnymi temperaturami, wartościami pH, zasolenia, ciśnienia a także promieniowania, bardzo długo uznawano za miejsca niesprzyjające funkcjonowaniu organizmów żywych czy wręcz całkowicie uniemożliwiające życie. Dzięki rozwojowi mikrobiologii środowiskowej zaczęto stopniowo zmieniać postrzeganie takich środowisk i bardzo szybko wykazano, że w tak skrajnych niszach środowiskowych nie tylko występują złożone zespoły mikroorganizmów, ale wykształciły one niezmiernie efektywne mechanizmy adaptacji do wzrostu w takich warunkach.

W początkowym etapie badanie podstaw funkcjonowania ekstremofili miało charakter poznawczy i było nastawione na zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie integralności i aktywności metabolicznej komórek. Krok po kroku odkrywano, że mechanizmy są wielopoziomowe i obejmują zmiany składu błon komórkowych, wykorzystywanie specyficznych substancji osmoregulacyjnych i krioprotekcyjnych, syntezę specyficznych białek oraz co niezmiernie istotne, wysokosprawnych systemów antyoksydacyjnych. Do tego dochodziła również zdolność wytwarzania ogromnej ilości słabo poznanych ówczesnie metabolitów wtórnych. Wszystkie te procesy przekładały się na realną możliwość wzrostu mikroorganizmów w warunkach ekstremalnych dla większości innych form życia, które poznaliśmy. Wszystkie te mechanizmy umożliwiają mikroorganizmom funkcjonowanie w warunkach wspomnianego na początku wysokiego zasolenia, niskiej temperatury lub ograniczonej dostępności składników pokarmowych, a równocześnie mogą prowadzić do powstawania biomolekuł o interesujących i niebanalnych właściwościach.

W miarę postępu badań, odkryto enzymy zachowujące aktywność w ekstremalnych warunkach co błyskawicznie spotkało się z zainteresowaniem ze strony biotechnologii przemysłowej. Bez trudu możemy sobie wyobrazić menadżera firmy produkującej proszki do prania, który dowiadując się o enzymach skutecznie usuwających tłuszcze w niskich temperaturach, błyskawicznie oblicza zysk związany z brakiem konieczności ogrzewania wody w pralkach. Ten banalny przykład to tylko jedna możliwość potencjalnego wykorzystania nowych związków. Jest to tym bardziej istotne, gdyż w wielu procesach technologicznych stosuje się wysokie stężenia soli, rozpuszczalniki organiczne, nietypowe wartości pH albo podwyższoną lub obniżoną temperaturę. Typowe enzymy produkowane przez mezofilne mikroorganizmy rzadko zachowują swoją aktywność czy stabilność w takich warunkach. Stąd też enzymy wytwarzane przez ekstremofile mogą potencjalnie stanowić bardzo cenną alternatywę umożliwiając prowadzenie procesów w bardzo wymagających warunkach. Ponadto ograniczają ryzyko zanieczyszczenia mikrobiologicznego, zmniejszając zużycie energii lub ułatwiając przetwarzanie surowców o nietypowych właściwościach fizykochemicznych.

Potencjalnie duże znaczenie przypisuje się enzymom aktywnym w niskiej temperaturze. Dzięki temu mogą one potencjalnie obniżyć zapotrzebowanie energetyczne procesów. Dodatkowo mogą chronić termolabilne składniki produktów a także umożliwić prowadzenie reakcji w warunkach chłodniczych. Nie bez znaczenia jest także możliwość wykorzystania enzymów halofilnych i halotolerancyjnych w procesach przebiegających w obecności solanek przy wysokiej sile jonowej, co jest dość typowe dla przemysłu spożywczego, farmaceutycznego oraz szeroko rozumianej technologii ochrony środowiska. Warto ponadto wskazać, że potencjał biotechnologiczny ekstremofili nie ogranicza się do enzymów. Mikroorganizmy żyjące w tak specyficznych warunkach wytwarzają również specyficzne pigmenty, związki przeciwutleniające, substancje powierzchniowo czynne, egzopolisacharydy, lipidy a także różnorodne metabolity wtórne. Co najważniejsze, związki te mogą w wielu przypadkach wykazywać większą odporność na wyjątkowe warunki środowiskowe, w których żyją wytwarzające je mikroorganizmy. Dlatego łatwo sobie wyobrazić wykorzystanie takich związków jako barwników, przeciwutleniaczy, emulgatorów, składników preparatów kosmetycznych, dodatków technologicznych lub związków o aktywności biologicznej. Dodajmy do tego możliwość zastosowania biologicznych związków powierzchniowo czynnych jako stabilizatorów emulsji, związków wspierających formułację produktów spożywczych i kosmetycznych czy technologie oczyszczania środowiska ze związków hydrofobowych. Wszystko to wskazuje na ogromny potencjał stojący za dalszymi pracami nad izolacją oraz poszukiwaniem potencjalnych możliwości wykorzystania związków produkowanych przez ekstremofilne mikroorganizmy.

O ile dotychczasowe badania ekstremofili skupiały się przede wszystkim na bakteriach i archeonach, o tyle dużo mniej uwagi poświęcono grzybom. Jest to dość zastanawiające gdyż organizmy te charakteryzują się wyjątkowo rozbudowanym metabolizmem, wyjątkową zdolnością wydzielania enzymów zewnątrzkomórkowych a przede wszystkim wytwarzaniem różnorodnych metabolitów wtórnych. Dlatego

należy podkreślić, że tematyka badawcza podjęta przez Panią mgr Weronikę Śliżewską bardzo dobrze wpisuje się w kierunki badań realizowane obecnie w międzynarodowych ośrodkach. Poszukiwanie grzybów zdolnych do wytwarzania enzymów hydrolitycznych, pigmentów i substancji powierzchniowo czynnych w warunkach podwyższonego zasolenia lub obniżonej temperatury jest nie tylko uzasadnione potrzebą poszerzenia wiedzy o metabolizmie grzybów ale przede wszystkim potencjalnym znaczeniem otrzymywanych biomolekuł dla biotechnologii przemysłowej.

Niniejsza rozprawa doktorska podejmuje zatem temat niezwykle aktualny, bardzo istotny poznawczo a przede wszystkim posiadający wyraźny wymiar aplikacyjny. Połączenie badań mikrobiologicznych, analitycznych i genomowych odpowiada współczesnemu podejściu do poszukiwania nowych producentów oraz charakterystyki biomolekuł pochodzenia mikrobiologicznego. Należy podkreślić, że nowoczesne techniki sekwencjonowania całych genomów oraz narzędzia bioinformatyczne wniosły nową jakość w omawiany obszar badawczy. Identyfikacja genów kodujących enzymy, szlaków metabolicznych oraz klastrów odpowiedzialnych za biosyntezę metabolitów wtórnych jest kluczowa aby w pełni zrozumieć molekularne podstawy adaptacji grzybów do ekstremalnych warunków. Genomy grzybów nadal kryją nieznane lub nieaktywne w standardowych warunkach hodowli klastry biosyntetyczne o ogromnym potencjale biotechnologicznym.

Formalna ocena pracy doktorskiej

Praca doktorska Pani mgr inż. Weroniki Śliżewskiej została zrealizowana i przedstawiona jako cykl trzech spójnych tematycznie prac doświadczalnych oraz jednej pracy przeglądowej:

- Śliżewska, W., Struszczyk-Świta, K., & Marchut-Mikołajczyk, O. (2022). Metabolic Potential of Halophilic Filamentous Fungi-Current Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4189. <https://doi.org/10.3390/ijms23084189> IF₂₀₂₂ 5.6 MEiN 140
- Śliżewska, W., Struszczyk-Świta, K., Otlewska, A., Pinzari, F., Canfora, L., Dybka Stępień, K., Napoli, R., Migliore, M., Manfredini, A., & Marchut-Mikołajczyk, O. (2025). Halophilic and halotolerant fungi across diverse climates: a comparative study of Polish and Italian soil ecosystems. *Frontiers in Microbiology* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1637496> IF₂₀₂₅ 4.5 MEiN 100
- Śliżewska, W., Struszczyk-Świta, K., Oracz, J., Pinzari, F., Daroch, M., Czyżowska, A., & Marchut-Mikołajczyk, O. (2026). Genomic insights and biotechnological potential of a saline soil fungus *Aspergillus tubingensis* FF14 for xanthophyll biosynthesis. *Microbiology Spectrum*, e01179-26. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01179-26> IF₂₀₂₅ 3.8 MEiN 100
- Śliżewska, W., Struszczyk-Świta, K., Białkowska, A., Daroch, M., Drożdżyński, P., & Marchut-Mikołajczyk, O. Linking genomic potential to cold-active biosurfactant production in Antarctic *Aureobasidium pullulans* P8. *FEMS Microbiology Ecology* (in review) IF₂₀₂₅ 3.2 MEiN 100

Trzy prace zostały już opublikowane w czasopismach bardzo dobrze rozpoznawalnych wśród naukowców zajmujących się zagadnieniami związanymi z charakterystyką mikroorganizmów. Czwarta praca wysłana do *FEMS Microbiology Ecology* jest obecnie recenzowana. Wszystkie czasopisma cieszą się również bardzo dobrą opinią w środowisku mikrobiologów / biotechnologów. Sumaryczny IF zgodny z rokiem opublikowania wynosi 17,1 co bardzo dobrze odpowiada cenionym czasopismom tematycznym, których IF zazwyczaj mieści się w okolicy IF 4.

W szczególności należy podkreślić, że we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a to zwyczajowo odpowiada roli osoby wykonującej większość badań laboratoryjnych. Jest to zgodne z oczekiwaniami względem osób planujących oraz realizujących badania w ramach własnego doktoratu.

Należy podkreślić, że niniejsza rozprawa doktorska jest oparta na bardzo czytelnym zbiorze trzech już opublikowanych artykułów, które jasno określają zakres pracy Doktorantki. Czwarta praca znajduje się obecnie w recenzji. Liczba artykułów odpowiada również średniej liczbie artykułów podobnych prac doktorskich w międzynarodowym środowisku naukowym i jest w 100% adekwatna do specyfiki

przewodzonych badań. Pragnę podkreślić, że jest to bardzo dobrze przygotowana rozprawa w formie zbioru publikacji.

Układ pracy jest dość typowy dla doktoratów tego typu. Całość pracy zawarto na 189 stronach. Po stronie tytułowej zamieszczono stronę z podziękowaniami dla promotora oraz promotora pomocniczego. Wyszczególniono również finansowanie części badań w ramach programu FU2N - Fund for the Improvement of Young Scientists' Skills, project no. W5/FU2N/02/2023.

Dwie kolejne strony zajmuje spis treści, po czym zawarto trzysstronicowe streszczenie w języku polskim oraz jego trzysstronicowy odpowiednik w języku angielskim. Na stronie 11 przedstawiono spis czterech prac stanowiących podstawę niniejszego doktoratu. Po nim znajduje się przegląd literaturowy, a następnie przedstawiono cel i zakres pracy. Dalej na stronach 25-30 umieszczono syntetyczny opis wykorzystywanych metod, po czym płynnie przystąpiono do omawiania najważniejszych wyników pokazanych w ramach opublikowanych prac P1-P4. Na stronach 50-51 przedstawiono zbiorcze wnioski i spostrzeżenia. Na stronach 52-65 zamieszczono spis wykorzystanych publikacji referencyjnych. Kolejne sześć stron to spis dorobku naukowego Doktorantki. W dalszej kolejności znajdują się kopie prac P1-P4 wraz z materiałami dodatkowymi. Po każdej pracy Doktorantka zamieściła oświadczenie określające Jej udział w prowadzonych badaniach.

Na stronach 175-189 zamieszczono tradycyjne oświadczenia współautorów dotyczące szacowanego udziału w opisywanych publikacjach. Dzięki tym oświadczeniom można jednoznacznie ocenić rolę Doktorantki jako wiodącą we wszystkich pracach P1-P4.

Doktorantka na stronie 24 umieściła krótką informację wskazującą na genezę Jej zainteresowania grzybami ekstremofilnymi, a następnie sformułowała główny cel pracy, w ramach którego trafnie wyodrębniła następujące zadania badawcze:

- przesiewanie szczepów grzybów ekstremofilnych pod kątem produkcji biomolekuł o potencjalnym zastosowaniu w przemyśle spożywczym, w tym enzymów hydrolitycznych, barwników i biosurfaktantów, w trudnych warunkach hodowli
- wybór wydajnych ekstremofilnych grzybów produkujących biomolekuły o działaniu powierzchniowo czynnym oraz barwników, a także identyfikacja i charakterystyka wytwarzanych związków biologicznych przy użyciu odpowiednich metod biochemicznych i strukturalnych
- optymalizacja produkcji związków biologicznych pochodzących z organizmów ekstremofilnych przy użyciu metod statystycznych oraz planowania eksperymentów
- zbadanie genomowych podstaw produkcji biomolekuł poprzez analizę szlaków metabolicznych i regulacyjnych biorących udział w ich biosyntezie.

Warto podkreślić, że wszystkie zadania zaplanowano w spójny sposób a ich prawidłowa realizacja powinna umożliwić osiągnięcie celu głównego postawionego we wprowadzeniu, dotyczącego możliwości wykorzystania grzybów ekstremofilnych jako źródła nowych związków bioaktywnych i biomolekuł o wyjątkowych właściwościach. W tym miejscu należy jednak zwrócić uwagę, że wskazana przez Doktorantkę główna hipoteza naukowa: „Grzyby ekstremofilne stanowią źródło nowych związków bioaktywnych lub biomolekuł o wyjątkowych właściwościach wynikających z ich zdolności do przystosowywania się do niekorzystnych warunków.” nie jest hipotezą. Jest to raczej ogólne stwierdzenie, które uzasadnia podjęcie badań, ale nie zawiera mechanistycznego wniosku podlegającego weryfikacji w ramach przeprowadzonych doświadczeń. Ta nieprecyzyjność nie ma jednak konsekwencji formalnych, gdyż badania mają charakter skринingowy i poznawczy, a nie weryfikacyjny, co ma znaczenie dla klasycznej hipotezy badawczej.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Przedstawiony w rozprawie cel badań jest czytelny i doskonale odpowiada potrzebie poszukiwania nowych źródeł biomolekuł o potencjale przemysłowym. Na szczególne podkreślenie zasługuje wybór

grzybów izolowanych ze środowisk zasolonych oraz obszarów polarnych, Grzyby w porównaniu z bakteriami i archeonami nadal pozostają zdecydowanie słabiej poznaną grupą ekstremofili. Stąd też podejmowanie badań zwiększających stan wiedzy o ich potencjale metabolicznym jest ważne zarówno z poznawczego, jak i potencjalnie aplikacyjnego punktu widzenia.

Doktorantka bardzo sprawnie przedstawiła obecny stan wiedzy dotyczący grzybów halofilnych i psychrofilnych wraz z informacjami na temat wytwarzanych przez nie enzymów hydrolitycznych, pigmentów a także związków powierzchniowo czynnych. Przegląd literatury jest relatywnie krótki, ale został doskonale ukierunkowany na konkretne zagadnienia bezpośrednio powiązane z tematyką rozprawy. W konsekwencji stanowi bardzo dobre wprowadzenie do kolejnych etapów badań i równocześnie pozwala zrozumieć przesłanki, które odpowiadały za wybór szczepów a także grup analizowanych biomolekuł. Wykorzystana literatura jest nowoczesna i adekwatna do omawianej tematyki badawczej.

Część doświadczalna jest sporządzona w logiczny sposób i opiera się na stopniowym zawężaniu obszaru badań. Jako pierwsze przeprowadzono eksperymenty przesiewowe dla 21 szczepów grzybów pochodzących z zasolonych gleb polskich i włoskich. Zweryfikowano ich zdolność do funkcjonowania w środowisku zwiększonego stężenia chlorku sodu a także zbadano zdolność do produkcji wybranych enzymów hydrolitycznych. Na podstawie wstępnych wyników wytypowano obiecujące szczepy do dalszych eksperymentów. Takie podejście jest zdecydowanie prawidłowe dla eksploracyjnych badań biotechnologicznych, w których szeroki etap przesiewowy stanowi podstawę wyboru najbardziej obiecujących producentów. Choć ta część z naukowego punktu widzenia nie stanowi wyzwania, jest niezbędna aby pozyskać materiał badawczy. Ta żmudna praca stanowi podstawę przyszłego sukcesu i pozwala młodemu badaczowi na pozyskanie wiedzy i umiejętności do samodzielnej pracy. Dlatego warto w tym miejscu podkreślić jej rolę w całokształcie pracy doktorskiej.

Za najciekawszą i w największym stopniu rozwiniętą część ocenianej pracy doktorskiej uważam badania dotyczące produkcji pigmentów wytwarzanych przez szczep *Aspergillus tubingensis* FF14. Doktorantka zdecydowanie wyszła poza standardowe opisywanie zmian zabarwienia hodowli / biomasy, ale podjęła samodzielną próbę identyfikacji produkowanych pigmentów z zastosowaniem doskonale dobranych do tego celu technik takich jak: UV-Vis oraz UHPLC-DAD-ESI-MS/MS. W następnej fazie dokonała oceny właściwości przeciwutleniających otrzymanego ekstraktu. Co ważne z biotechnologicznego punktu widzenia, Doktorantka wykonała sekwencjonowanie i analizę genomu badanego szczepu oraz przeprowadziła optymalizację warunków produkcji z wykorzystaniem metody Taguchiego. Takie połączenie metod hodowlanych, analitycznych, statystycznych i bioinformatycznych należy uznać za szczególnie wartościowe. W mojej ocenie wyniki dotyczące możliwości wytwarzania ksantofili przez *A. tubingensis* stanowią zdecydowanie najważniejszy element nowości naukowej niniejszej rozprawy.

Ciekawym uzupełnieniem badań była analiza antarktycznego szczepu *Aureobasidium pullulans* P8. W tym przypadku Doktorantka skoncentrowała się na zdolności do wytwarzania ekstraktu wykazującego właściwości emulgujące i powierzchniowo czynne. Badania laboratoryjne uzupełniono analizą genomu oraz poszukiwaniem genów i klastrow biosyntetycznych, które mogą uczestniczyć w produkcji tego rodzaju metabolitów. Takie rozwinięcie badań o grzyb pochodzący z obszaru polarnego w ogromny sposób zwiększyło zakres rozprawy a przede wszystkim umożliwiło porównanie potencjału mikroorganizmów przystosowanych do dwóch różnych rodzajów warunków środowiskowych.

Na pozytywną ocenę zasługuje wykorzystanie sekwencjonowania całego genomu zarówno dla weryfikacji identyfikacji taksonomicznej badanych szczepów, jak i do poszukiwania molekularnych podstaw obserwowanych właściwości. Dla szczepu FF14 analiza genomowa doprowadziła do zmiany wcześniejszej identyfikacji z *Aspergillus neoniger* na *Aspergillus tubingensis*. Doskonale pokazuje to ograniczenia klasycznej identyfikacji opartej wyłącznie na sekwencjach ITS i TEF1- α , szczególnie w obrębie blisko spokrewnionych gatunków z rodzaju *Aspergillus*. Zgodnie z wymogami Open Science genomy badanych szczepów zostały zdeponowane w publicznej bazie NCBI, dzięki czemu wyniki mogą być wykorzystane i ponownie analizowane przez innych badaczy.

Zaplanowane i zrealizowane przez Doktorantkę eksperymenty nie mają charakteru odtwórczego i eksplorują interesujący oraz nadal słabo poznany obszar badawczy. Przeprowadzone badania dostarczyły nowych informacji na temat właściwości metabolicznych wybranych grzybów pochodzących ze środowisk

zasolonych i polarnych. Nawet jeśli część zastosowanych określeń oraz interpretacji wyników wymaga doprecyzowania, nie zmienia to faktu, że zgromadzony materiał eksperymentalny jest wartościowy i stanowi bardzo dobrą podstawę rozprawy doktorskiej.

Szczegółowa analiza załączonych prac badawczych wraz z autorskim komentarzem Doktorantki, nasunęła Recenzentowi pewne komentarze, sugestie i pytania:

- strony 31-32 oraz publikacja P2 - Doktorantka przedstawia na Rysunku 6 „fungal community structural composition” a następnie interpretuje różnice w udziale poszczególnych rzędów i rodzajów grzybów. Wydaje się, że badania nie obejmowały jednak analizy całych społeczności grzybowych występujących w pobranych glebach a ograniczyły się jedynie do wyizolowanych szczepów. Czy zdaniem Doktorantki wykorzystane izolaty reprezentują wszystkie kolonie uzyskane z poszczególnych próbek? Kluczową kwestią jest fakt, czy zostały one wybrane na podstawie cech morfologicznych a także zdolności wzrostu w określonych warunkach. Można by założyć, że w takim przypadku liczba szczepów należących do poszczególnych rodzajów opisuje lepiej strukturę analizowanego zbioru izolatów, ale nie pozwala wnioskować o strukturze społeczności występującej w glebie. Do tego celu lepszą metodą byłaby metoda niezależna od hodowli, np. metabarkoding regionu ITS. Prosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie powyższych kwestii. Ponadto proszę o przedstawienie w jaki sposób należałoby zaprojektować badania umożliwiające wiarygodne porównanie społeczności grzybowych dla obu stanowisk?
- strony 32-33 oraz publikacja P2 - klasyfikacja szczepów jako halofilnych i halotolerancyjnych. Doktorantka zgodnie z wykorzystaną procedurą, klasyfikuje trzy szczepy rosnące najlepiej bez dodatku NaCl jako halotolerancyjne. Większość szczepów wykazujących największy wzrost przy 5% NaCl zalicza do umiarkowanych halofili. Nie ma wątpliwości, że taki sposób klasyfikacji jest zgodny z przyjętym kryterium stężenia soli zapewniającego dobry wzrost. Ponieważ zastosowane stężenia NaCl zmieniały się skokowo, a podstawę oceny stanowił wzrost kolonii na podłożu stałym, trudno odnosić się do optymalnego wzrostu. Jest to najlepszy wzrost w analizowanych przedziałach, ale nie optymalny. Ponadto dla grzybów znaczenie może mieć nie tylko samo stężenie NaCl, ale także aktywność wody, rodzaj soli oraz całkowity skład jonowy środowiska. Tym samym warto zauważyć, że zasolenie naturalnej gleby nie jest równoważne dodaniu chlorku sodu do wybranego podłoża. Wydaje się więc, że uzyskane wyniki stanowią wstępną klasyfikację badanych szczepów, ale raczej nie stanowią pełnej charakterystyki ich strategii fizjologicznej. W tym miejscu proszę Doktorantkę o wskazanie metodyki, która w idealny sposób pozwoliłaby na ilościowe wyznaczenie optimum oraz granic wzrostu analizowanych szczepów.
- strony 33-34 oraz publikacja P2 - zdolność szczepów do wytwarzania dziewięciu enzymów zewnątrzkomórkowych oceniono analizując wielkość stref hydrolizy powstających na podłożach stałych. Uzyskane wyniki przedstawiono jako Enzymatic Index, przyjmując wartość $EI \geq 2$ za kluczowe kryterium wyboru dobrego producenta. Jest to doskonały test przesiewowy, aczkolwiek nie stanowi chyba jednak ilościowego pomiaru aktywności enzymatycznej czy wydajności produkcji samego enzymu. Wielkość strefy hydrolizy to wypadkowa ilości wydzielanego enzymu, szybkości jego dyfuzji w agarze, specyficznego wzrostu i morfologii kolonii. Do tego można jeszcze wymienić stabilność enzymu, pH podłoża oraz właściwości wykorzystanego w badaniach substratu. Można hipotetycznie przeanalizować specyficzny problem, który pojawi się, gdy indeks jest obliczany jako stosunek średnicy strefy hydrolizy do średnicy kolonii. W takim przypadku szczep rosnący wolno może uzyskać wysoki EI mimo niewielkiej całkowitej produkcji enzymu. Natomiast szczep szybko rosnący może uzyskać niższą wartość, ponieważ duża średnica kolonii znajduje się w mianowniku. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, pojawia się pytanie czy tego typu kwestie nie utrudniają porównania różnych gatunków? W tym miejscu prosiłbym Doktorantkę o uzasadnienie stwierdzenia, że *Ramularia mali* FF1 jest najlepszym producentem enzymów. Jakie doświadczenia należałoby wykonać, aby niezależnie potwierdzić, że szczep FF1 rzeczywiście jest najlepszym producentem spośród analizowanych grzybów?
- strony 35-36 oraz publikacja P2 - test hemolizy jest dość często wykorzystywany do wstępnej oceny zdolności do wytwarzania biosurfaktantów, jednak jego selektywność jest bardzo niewielka. Rozpad erytrocytów może wynikać z aktywności pewnych enzymów, peptydów, kwasów organicznych a

nawet metabolitów wtórnych. Ponadto część biosurfaktantów może w ogóle nie wywoływać hemolizy. Stąd też wynik dodatni nie potwierdza produkcji biosurfaktanta, a wynik ujemny jej nie wyklucza. Doktorantka w dalszej części wykazała zdolność surowego ekstraktu FF3 do stabilizowania emulsji, jednak nie znamy chemicznej natury substancji odpowiedzialnej za obserwowany efekt. Podczas omawiania wyników wskazano na możliwość produkcji hydrofobin, czyli białek powierzchniowo czynnych, jednak nie przeprowadzono analiz potwierdzających ich obecność. W tym miejscu proszę o wskazanie idealnej sekwencji testów umożliwiających przejście od wstępnego skriningu do potwierdzenia produkcji określonego związku powierzchniowo czynnego.

- strony 35-36 i 50-51 oraz publikacja P2 - spośród badanych związków Doktorantka wykryła jedynie ochratoksynę A produkowaną przez *Penicillium canescens* S10. Oczywiście jest to cenna informacja, czy jednak na tej podstawie można sformułować wniosek o ograniczonej produkcji mykotoksyn i przydatności szczepów do zastosowań przemysłowych? Wydaje się, że brak sześciu wybranych mykotoksyn nie jest równoznaczny z brakiem innych toksycznych metabolitów. Zwłaszcza dotyczy to szczepów należących do rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, które znane są z wytwarzania bardzo szerokiego spektrum metabolitów wtórnych. Czy profil biosyntezy może zależeć od składu podłoża, temperatury oraz aktywności wody? Do tego dochodzi jeszcze zasolenie, sama faza wzrostu i czasu hodowli. Wydaje się, że szczep niewytwarzający określonego metabolitu w jednym wariancie doświadczenia może potencjalnie produkować go w innych warunkach. W tym miejscu proszę Doktorantkę o dyskusję wskazującą jaki zakres badań byłby konieczny przed uznaniem szczepu lub otrzymanego z niego preparatu za bezpieczny dla przemysłu spożywczego?
- strony 38-45 oraz publikacja P3 - szczególnie interesującym elementem rozprawy jest wykrycie w ekstrakcie otrzymanym z biomasy *Aspergillus tubingensis* FF14 neoksantyny, wiolaksantyny i anteraksantyny. Należy się zgodzić z Doktorantką, że dotychczas nie opisano naturalnego wytwarzania tych związków przez grzyby strzępkowe. W tym miejscu warto byłoby jednak zaprezentować mocniejsze dowody analityczne. Obecnie identyfikację oparto na czasach retencji, widmach UV-Vis oraz pełnych widmach masowych i widmach fragmentacyjnych, które porównano z danymi literaturowymi oraz ekstraktami ze szpinaku i żółtej papryki. Jednak ekstrakty roślinne nie są certyfikowanymi wzorcami analitycznymi pojedynczych związków. Ponadto są to zwykle złożone mieszaniny wielu karotenoidów, w tym ich izomerów oraz produktów utleniania. Dodatkowo wszystkie te związki znajdują się w specyficznej matrycy. W ESI znajduje się informacja, że związki przypisane do trzech ksantofili eluowały w krótkim przedziale czasu, około 1,76–2,25 min. Niewielkie różnice czasów retencji oraz bliskość początku chromatogramu zwiększają znaczenie jakości rozdzielania i konieczność potwierdzenia identyfikacji niezależnym materiałem referencyjnym. Zgodność czasu retencji i podobieństwo widma nie muszą oznaczać jednoznacznej identyfikacji strukturalnej. Największe wątpliwości budzi jednak analiza genomowa. Według niej, w genomie FF14 wykryto geny związane z podstawowym szlakiem biosyntezy karotenoidów, jednak nie odnaleziono bezpośrednich odpowiedników genów kodujących enzymy wymagane do syntezy omawianych związków. Oczywiście powyższa uwaga nie jest jednoznacznie negatywna, gdyż nie możemy wykluczyć ich produkcji przez nieopisane dotychczas enzymy. Wydaje się jednak, że część analityczna i genomowa nie potwierdzają się obecnie w sposób jednoznaczny. Stąd też bezpieczniejsze byłoby wskazanie, że wykryto związki wstępnie lub prawdopodobnie przypisane do wymienionych ksantofili. W tym miejscu prosiłbym Doktorantkę o określenie poziomu pewności tej identyfikacji oraz wskazanie metod, które pozwoliłyby ją potwierdzić ponad wszelką wątpliwość.
- strony 38-41 oraz publikacja P3 - Doktorantka podaje początkową wydajność otrzymywania pigmentu jako $20,35 \pm 2,67$ mg/g biomasy i $0,61 \pm 0,18$ g/L hodowli. Po optymalizacji wydajność wzrosła do $39,74 \pm 7,92$ mg/g biomasy i $2,00 \pm 0,35$ g/L. W dalszej części pracy wartości te są traktowane jako wydajność produkcji pigmentu, a w części miejsc wręcz jako wydajność produkcji ksantofili. Gdy jednak dokładnie przeanalizujemy opis wykorzystanych metod, wydaje się, że oznaczano masę ekstraktu uzyskanego z biomasy przy użyciu mieszaniny acetonu i metanolu. W tym przypadku ekstrakt prawdopodobnie nie składa się wyłącznie z ksantofili. Jest wielce prawdopodobnym, że będzie również zawierać lipidy, sterole oraz inne metabolity. Choć analiza chromatograficzna wykazała obecność pików przypisanych do ksantofili jednak w pracy nie

przedstawiono ich ilościowego udziału w całkowitej masie ekstraktu. Dlatego na chwilę obecną wydaje się, że wartość 2 g/L opisuje wydajność otrzymywania surowego ekstraktu, a nie udokumentowaną wydajność biosyntezy ksantofili. W tym miejscu prosiłbym Doktorantkę o przedyskutowanie poniższego scenariusza. Optymalizacja mogła spowodować wzrost ilości innych składników ekstrahowanych z biomasy a nie samych pigmentów. Czy po optymalizacji względny udział trzech pików pozostał taki sam, zwiększył się czy zmniejszył? Większa masa ekstraktu nie dowodzi zatem proporcjonalnego zwiększenia biosyntezy pigmentów. Analogicznie można dyskutować na temat badań aktywności przeciwutleniającej, gdyż podobnie jak w przypadku pigmentów analizowano aktywność całego ekstraktu. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, co dokładnie oznacza wskazana w pracy „pigment yield”. Czy optymalizacja metodą Taguchiego zwiększyła ich rzeczywistą produkcję?

- strony 20-21 oraz 46-49 - Doktorantka prawidłowo wskazuje, że klasyfikacja mikroorganizmu jako psychrofilnego wymaga określenia jego temperatury optymalnego wzrostu oraz temperatury maksymalnej. Natomiast w dalszej części pracy szczep *A. pullulans* P8 jest określany jako psychrofilny, chociaż zrealizowane eksperymenty nie pozwalają na jednoznaczne przypisanie mu takiej cechy fizjologicznej. Brakuje wykazania pełnej zależności pomiędzy temperaturą a szybkością wzrostu szczepu oraz określenia temperatury optymalnej i maksymalnej. Jest to o tyle istotne, że hodowle prowadzono w temperaturze 10 i 20°C, a z powodu bardzo powolnego wzrostu w 4°C zrezygnowano z jego hodowli. Wydaje się, że takie obserwacje wskazują na psychrotolerancję, czyli zdolność do wzrostu w niskiej temperaturze przy optimum znajdującym się powyżej zakresu typowego dla psychrofili. W tym miejscu proszę Doktorantkę o przedyskutowanie kryteriów pozwalających uznać szczep P8 za psychrofilny, a nie psychrotolerancyjny.
- publikacja P4 - po oddzieleniu biomasy *Aureobasidium pullulans* P8, supernatant z hodowli zakwaszono do pH 2, powstały osad odwirowywano, rozpuszczano w NaHCO₃, liofilizowano, a następnie ekstrahowano mieszaniną chloroformu i metanolu. Otrzymaną fazę organiczną odparowywano, a jej masę przedstawiono jako wydajność produkcji biosurfaktanta. Jest to typowa procedura wielokrotnie opisywana jako rekomendowana do izolacji biosurfaktantów. Jednakże nie zapewnia ona pozyskania czystego biosurfaktanta a jedynie jego mieszaninę ze składnikami o podobnych właściwościach hydrofilowo/hydrofobowych. Mieszanina chloroformu i metanolu ekstrahuje szerokie spektrum lipidów i związków amfifilowych. Ponieważ nie podano informacji o równoległym przeprowadzeniu całej procedury dla niezaszczepionej pożywki, istnieje duże prawdopodobieństwo, że pozyskano surowy ekstrakt biosurfaktantu wraz z innymi związkami. Dlatego nie można wykluczyć, że część masy określonej jako 0,628–0,654 g/L oraz część obserwowanych właściwości ekstraktu pochodzi ze składników takiej mieszaniny. Zdecydowanie korzystniej byłoby nazwać uzyskany ekstrakt jako surową mieszaninę a nie odnosić się jak do wydajności produkcji biosurfaktanta.
- strony 48-49 oraz publikacja P4 - Doktorantka używa nazwy biosurfaktant, a jest to przede wszystkim surowy ekstrakt wykazujący zdolność emulgowania oleju czy do rozprowadzania kropli na hydrofobowej powierzchni. Wartość tych testów jest bardzo duża podczas badań przesiewowych, ale nie pozwalają one stwierdzić, czy za obserwowane właściwości odpowiada surfaktant, bioemulgator o dużej masie cząsteczkowej czy może mieszanina lipidów i białek. W publikacji brakuje podstawowego pomiaru pozwalającego scharakteryzować surfaktant, czyli zależności napięcia powierzchniowego od stężenia preparatu. W konsekwencji nie określono również krytycznego stężenia micelizacji. Dlatego nie wiemy czy ekstrakt rzeczywiście obniża napięcie powierzchniowe do wartości typowych dla skutecznych związków powierzchniowo czynnych. Należy pamiętać, że zdolność emulgowania nie jest równoznaczna ze zdolnością obniżania napięcia powierzchniowego. Bioemulgatory mogą skutecznie stabilizować emulsje, jednocześnie wykazując niewielki wpływ na napięcie powierzchniowe. Bez wyznaczenia zależności efektu od stężenia nie można określić, czy ekstrakt zawiera niewielką ilość bardzo aktywnego związku, czy dużą ilość składników o słabych właściwościach powierzchniowych. W tym miejscu proszę Doktorantkę o wyjaśnienie różnicy między biosurfaktantem a bioemulgatorem oraz wskazanie prostej metody pozwalającej określić CMC? Czy porównanie wartości CMC może być miarą efektywności powierzchniowo czynnej surfaktantów?

- strony 47-49 oraz publikacja P4 - analiza FTIR wskazuje na obecność grup hydroksylowych, alkilowych, karbonylowych oraz pasm z zakresu charakterystycznego dla wiązań glikozydowych w surowym ekstrakcie. Jednak są to sygnały bardzo nieswoiste, występujące w ogromnej liczbie lipidów, cukrów, kwasów organicznych czy innych składników ekstraktów pochodzących. Ponadto w widmie odnotowano również szerokie, nakładające się pasma wskazujące na obecność białek lub składników białkopodobnych. Stąd też trudno traktować analizowany preparat jako jeden określony produkt chemiczny. Podobieństwo widma FTIR do widma liamocyny nie stanowi więc ostatecznego dowodu. Warto również z większą ostrożnością interpretować obecność homologów genów związanych z biosyntezą liamocyn. Z pewnością ta obecność wskazuje na potencjał metaboliczny szczepu, jednak szczegółowa analiza wykazała obecność HR-PKS, dehydrogenazy mannitolowej oraz potencjalnych transporterów. Wydaje się, że nie znaleziono białek homologicznych do PPTase i regulatora Gal1, opisywanych jako elementy odpowiedzialne za aktywację ekspresji szlaku. Dlatego sama obecność syntazy poliketydowej oraz enzymów występujących również w innych procesach metabolicznych nie dowodzi funkcjonalności całego szlaku. Nie wykazano również ekspresji wskazanych genów podczas eksperymentów. Stąd też choć dane chemiczne i genomowe są zgodne z możliwością wytwarzania liamocyn lub innych metabolitów poliketydo-poliolowych, jednak nie dowodzą, że to właśnie liamocyny odpowiadają za aktywność otrzymanego ekstraktu. Warto w tym miejscu docenić dojrzałość Doktorantki, która sama wskazuje w końcowych wnioskach na potrzebę zastosowania MALDI-MS, GC-MS i NMR do pełnej charakterystyki strukturalnej. Dlatego jako Recenzent powinienem zwrócić uwagę na potrzebę rozdzielenia trzech poziomów wnioskowania. Od prostego wykazania aktywności emulgującej poprzez określenie klasy chemicznej produktu oraz ostateczną identyfikację konkretnej struktury.
- publikacja P4 - Doktorantka podaje, że szczep P8 wytwarza biosurfaktant aktywny w niskiej temperaturze. Przedstawione wyniki wskazują, że preparaty z hodowli prowadzonej w 10°C wykazywały większą aktywność emulgującą względem oleju rzepakowego niż preparaty z hodowli w 20°C. Następnie pojawia się informacja, że stabilne emulsje obserwowano przy przechowywaniu w 4 i 10°C, natomiast w temperaturze pokojowej wartość indeksu emulgowania wynosiła poniżej 5%. Wydaje się jednak, że nie można automatycznie przypisać szczególnej aktywności związku w niskiej temperaturze. Generalnie właściwości emulsji zależą nie tylko od surfaktanta, ale także od lepkości faz, rozpuszczalności składników oraz oczywiście temperatury oleju. Do tego dochodzi kinetyka koalescencji i oczywiście skład całego surowego ekstraktu. Ponadto samo obniżenie temperatury zmienia właściwości fizyczne oleju rzepakowego oraz wodnej fazy emulsji, co już samo w sobie może zwiększać jej trwałość. Dlatego, aby wykazać rzeczywistą aktywność związku w niskiej temperaturze, należałoby porównać jego właściwości w szerszym zakresie temperatur z odpowiednim surfaktantem referencyjnym przy zachowaniu identycznych warunków pomiaru. Dodatkowo masa ekstraktu uzyskanego w 20°C była nieznacznie większa niż dla hodowli w 10°C. Stąd też trudno jednoznacznie przypisywać stymulację produkcji poprzez niską temperaturę. Wydaje się, że obserwowano raczej różnice we właściwościach emulgujących surowych preparatów. W tym miejscu proszę Doktorantkę o zdefiniowanie określenia „cold-active” oraz zaprojektowanie doświadczeń pozwalających jednoznacznie rozstrzygnąć, czy większa stabilność emulsji w niskiej temperaturze jest właściwością wytworzonego metabolitu, czy wynika raczej ze zmian fizycznych zachodzących w analizowanym układzie olej-woda.

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską należy wyróżnić bardzo duży wkład własnej pracy Doktorantki. Należy podkreślić, że wykonane eksperymenty wnoszą wiele ciekawych wyników i zdecydowanie mogą przysłużyć się poznaniu roli biosurfaktantów w funkcjonowaniu grzybów. Jest to również bardzo dobra praca doktorska zrealizowana w formie zbioru publikacji, przy uwzględnieniu jednej pracy znajdującej się w recenzji. Wydaje się również, że uzyskane wyniki mają znaczenie praktyczne, choć w tego typu pracach relatywnie łatwo jest wskazać elementy nowości naukowej. Jednak ocena realnego wpływu wyników na rozwój dziedziny, nie wspominając o praktycznym wykorzystaniu wyników jest zadaniem obciążonym zbyt dużą liczbą niewiadomych aby jednoznacznie wypowiadać się na te tematy.

Wniosek o wyróżnienie

Po wnikliwym zapoznaniu się z ocenianym doktoratem, chciałbym podkreślić bardzo duży wkład własny Doktorantki. Jej konsekwencja w realizacji trudnych i wymagających badań oraz interdyscyplinarny charakter

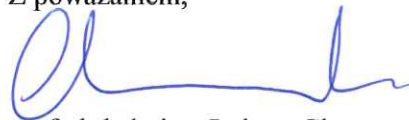
rozprawy. Wartość pracy wynika z połączenia klasycznych badań mikrobiologicznych z zaawansowanymi metodami analitycznymi i genomowymi. Bardzo wysoko oceniam podjęcie próby identyfikacji pigmentów wytwarzanych przez *Aspergillus tubingensis* FF14. Doktorantka nie ograniczyła się w tym przypadku do wykazania obecności barwnych metabolitów, lecz podjęła bardzo skomplikowaną próbę ich charakterystyki chemicznej i powiązania uzyskanych wyników z potencjałem genomowym badanego szczepu. Pomimo wskazanych w recenzji ograniczeń dotyczących jednoznaczności identyfikacji poszczególnych związków, zakres wykonanej pracy, uzyskane wyniki a przede wszystkim ogromna samodzielność Doktorantki uzasadniają w mojej ocenie wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Analizując niniejszą pracę doktorską pod kątem aktualności i oryginalności podjętych badań można stwierdzić, że Autorka odnalazła swoją niszę badawczą, a zrealizowane przez Nią badania będą interesujące dla szeregu naukowców zainteresowanych poznaniem potencjału biotechnologicznego ekstremofilnych grzybów strzępkowych.

Reasumując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr inż. Weroniki Śliżewskiej pt. **„Ekstremofilne grzyby strzępkowe - źródło biomolekuł o potencjalnych zastosowaniach przemysłowych”** oceniam pozytywnie oraz stwierdzam, że spełnia ona wszelkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.). Ponadto, praca stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego oraz wykazuje niezbędną ogólną wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Weroniki Śliżewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Z poważaniem,



prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski