

Dr hab. inż. Małgorzata M. Jaworska, prof. uczelni

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej

Politechnika Warszawska

ul. Waryńskiego 1

00-645 Warszawa

Recenzja

wniosku dr inż. Tomasza Boruty w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna w oparciu o cykl 8 publikacji pod wspólnym tytułem „Produkcja metabolitów wtórnych grzybów strzępkowych promieniowców w kokulturach wglębnych” oraz ocena całokształtu działalności naukowej

1. Prezentacja rozwoju naukowego Habilitanta

Dr inż. Tomasz Boruta ukończył studia magisterskie na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności oraz w Technical University of Denmark (DTU), Department of Systems Biology w 2009 r. Następnie, w okresie od stycznia 2010 do sierpnia 2010 pracował w Finepharm S.A. (Jelenia Góra). Kolejnym etapem rozwoju Habilitanta było uzyskanie w 2016 r. stopnia doktora nauk technicznych w dziedzinie inżynieria chemiczna na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechniki Łódzkiej; tytuł rozprawy: "Metabolizm wtórny *Aspergillus terreus*: indukcja biosyntezy metabolitów, analiza bioinformatyczna oraz modelowanie w skali genomu", promotorem był dr hab. inż. Marcin Bizukojć. Na tym etapie rozwoju naukowego dorobek Habilitanta to trzy publikacje w czasopismach z „listy filadelfijskiej” o łącznym IF = 9,474 oraz 3 publikacje w recenzowanych czasopismach spoza listy JCR.

Dalsza kariera zawodowa dr inż. Boruty związana była z Wydziałem Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej: od 2016 do 2018 był zatrudniony jako asystent w Katedrze Inż. Bioprocessowej, a od 2018 r jest zatrudniony na stanowisku adiunkta w tej samej Katedrze. Jego zainteresowania koncentrują się na badaniu wytwarzania metabolitów wtórnych, inżynierii metabolizmu, inżynierii morfologicznej oraz badaniu interakcji między mikroorganizmami w hodowlach mieszanych.

2. Ocena osiągnięcia naukowego

Dr inż. Tomasz Boruta przedstawił do oceny w procedurze habilitacyjnej cykl 8 oryginalnych publikacji naukowych tematycznie związanych z prowadzeniem hodowli kultur mieszanych w celu wytwarzania metabolitów wtórnych (np. leków, antybiotyków). Synteza tych związków nie jest bezpośrednio związana ze wzrostem i gospodarką energetyczną komórki, lecz wydaje się, że ma na celu uzyskanie przewagi nad konkurentami w danym środowisku. Wytwarzanie danego metabolitu wtórnego zachodzi w odpowiedzi na ściśle określone sygnały związane np. z obecnością innych mikroorganizmów, dostępnością źródeł węgla, azotu, fosforu lub innych pierwiastków, poziomem pH, temperaturą, światłem czy stresem komórkowym. Produkcja metabolitów wtórnych (np. antybiotyków) prowadzona jest zazwyczaj jako monokultura, lecz wydaje się, że kultury mieszane zawierające 2-3 mikroorganizmy mogą oferować intensyfikację ich wytwarzania. Takie hodowle nie są zbyt często opisywane w literaturze, zaś interakcje między mikroorganizmami w dalszym ciągu wymagają badań. Z tego względu uważam, że wybór tematyki Habilitanta uważam za ciekawy i w pełni uzasadniony.

Przedstawione do oceny artykuły zostały opublikowane w czasopismach naukowych znajdujących się bazie Journal Citation Reports i są to: *Applied Microbiology and Biotechnology*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *Molecules*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *Biomolecules*.

Głównym celem przedstawionych przez Habilitanta prac, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, było scharakteryzowanie produkcji metabolitów wtórnych we wglębnych hodowlach mieszanych wybranych mikroorganizmów oraz porównanie z wynikami uzyskanymi w hodowlach monokultur. Badania ukierunkowane były na wykorzystanie *Aspergillus terreus* ATCC 20542, wytwarzającego lowastatynę (związek obniżający poziom cholesterolu we krwi) oraz *Streptomyces rimosus* wytwarzającego oksytetracyklinę (antybiotyk wykorzystywany do leczenia trądziku).

Pierwsze publikacje cyklu (H1 i H2) poświęcone były porównaniu produkcji metabolitów wtórnych w mono- i kokulturach szczepu *A. terreus*. Hodowle monokulturowe *A. terreus* stanowiły kontrolę dla hodowli mieszanych w których wykorzystano grzyby strzępkowe *Penicillium rubens* ATCC 9178 (dawniej *Penicillium chrysogenum*), *Chaetomium globosum* ATCC 6205 i *Mucor racemosus* ATCC 7924. Większość hodowli mieszanych stanowiły hodowle 2-gatunkowe (*A. terreus* + inny szczep) oraz przeprowadzono eksperyment obejmujący kokulturę 4-gatunkową. W publikacji H1 zbadano 6 odrębnych sposobów inicjowania kokultury 2-gatunkowej: szczepienie sporami, szczepienie sporami po ich wcześniejszym zmieszaniu i hodowli przez 24 h, szczepienie 24-godziną monokulturą każdego ze szczepów w różnych proporcjach, szczepienie 72-godziną monokulturą każdego ze szczepów, szczepienie sporami jednego szczepu i hodowlą 24 godziną drugiego szczepu. Hodowle analizowano pod kątem wytwarzanych przez *A. terreus* metabolitów wtórnych: lowastatyny (w postaci kwasu mewinolinowego), (+)-geodyny, kwasu astrowego oraz butyrolaktonu I. Habilitant wykazał, że poziom danego produktu zależał nie tylko od gatunku obecnego w kokulturze obok *A. terreus*, ale również od sposobu inicjacji

kokultury. Nie zaobserwowano stymulacji biosyntezy lowastatyny jako efektu zastosowania kokultur, natomiast zaobserwowano wzrost produkcji butyrolaktonu I w kokulturze *A. terreus* z grzybem *C. globosum*. W hodowlach tych zaobserwowano dodatkowo obecność monakoliny J, jednego z prekursorów lowastatyny w szlaku biosyntetycznym. Habilitant tłumaczy jej obecność aktywnością enzymu wydzielanego przez *C. globosum* powodującego hydrolizę lowastatyny lub nadprodukcją prekursora i jego wydzielanie do środowiska.

W publikacji H2 Habilitant skupił się na zbadaniu wpływu składu podłoża na produkcję metabolitów wtórnych w hodowli mieszanej *A. terreus* ATCC 20542 oraz *P. rubens* ATCC 28089. Te hodowle były ukierunkowane na pozyskiwanie metabolitów wtórnych wytwarzanych przez oba szczepy. Pierwotnie hodowlę szczepiono osobno przygotowanymi prekulturami, lecz skutkowało to brakiem metabolitów *P. rubens* w brzeczce hodowlanej. W celu umożliwienia biosyntezy metabolitów wtórnych przez oba szczepy hodowle inicjowano 24-godzinnymi prekulturami *A. terreus* i *P. rubens* w stosunku objętościowym 1:20. Skład podłoża badano w trzech etapach: w pierwszym etapie badano wpływ stężenia glukozy, laktozy i ekstraktu drożdżowego, w drugim zastosowano suplementację świeżym sokiem marchwiowym lub puree warzywno-mięsny, a w trzecim stosowano podłoża różniące się stężeniem kwasu fenylooctowego (prekursor penicyliny G). W hodowli mieszanej zaobserwowano zwiększoną produkcję (+)-geodyny i kwasu astrowego, metabolitów wytwarzanych przez *A. terreus*. W przypadku pozostałych metabolitów nie zanotowano zwiększonej produkcji. Habilitant zanotował interesującą obserwację, że w monokulturze *P. rubens* obecność kwasu fenylooctowego w podłożu stymulowała produkcję penicyliny G.

Kolejna publikacja Habilitanta to praca przeglądowa (H3) dotycząca hodowli mieszanych promieniowców z rodzaju *Streptomyces*. Szczepy *Streptomyces* to producenci bogatego asortymentu metabolitów wtórnych (antybiotyków), zarówno tych dobrze poznanych i stosowanych w medycynie, jak i tych których działanie nie zostało jeszcze scharakteryzowane. Prowadzenie kokultur traktowano w tych pracach jak sposób „obudzenia” biosyntezy nieznanego wcześniej metabolitu wtórnego. Habilitant skupił się przede wszystkim na aspektach bioprosesowych kokultur: składzie podłoża hodowlanego, pH podłoża, sposobie przygotowania inoculum, metodzie hodowli (hodowla wstrząsana, hodowla w bioreaktorze), parametrach procesowych prowadzenia hodowli. Analizując dane literaturowe Habilitant zauważył, że większość badań, prowadzono w hodowlach wstrząsanych, gdzie sterowanie parametrami procesowymi jest utrudnione. Dodatkowo w pracach koncentrowano się na wytwarzaniu jednego, konkretnego związku nie badając obecności innych metabolitów wtórnych.

Przeprowadzony przegląd literatury skłonił Habilitanta do podjęcia badań mających na celu zastosowanie hodowli mieszanych do indukcji wytwarzania oksytetracykliny (antybiotyk stosowany w leczeniu trądziku) przez *Streptomyces rimosus* (H4). Szczep ten jest także „producentem” innych metabolitów wtórnych, m.in. związków z grupy rymocydyn i rymosamidów. W badaniach stosowano kokultury 2-gatunkowe obejmujące *S. rimosus* oraz jeden z następujących mikroorganizmów: *Streptomyces noursei*, *Penicillium rubens*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum* lub *Mucor racemosus*. Wybrane mikroorganizmy pozwoliły na zbadanie kokultur typu „promieniowiec/grzyb strzępkowy”

oraz „promieniowiec/promieniowiec”. Badania wykazały, że w hodowli mieszanej *S. rimosus* /*S. noursei* średnie stężenie oksytetracykliny było 2,9-krotnie wyższe niż ilość uzyskana w monokulturze *S. rimosus*. Badając sposób inokulacji, Habilitant zaobserwował, że zwiększoną ilość produkowanego antybiotyku obserwowano jedynie w hodowlach, gdzie inoculum wprowadzano w postaci „spory *S. rimosus*/spory *S. noursei*” oraz „prekultura *S. rimosus*/spory *S. noursei*”.

Kolejna publikacja poświęcona kulturom mieszanym (H5) połączyła pierwsze prace poświęcone *Aspergillus terreus* z pracami poświęconymi *Streptomyces rimosus*. Habilitant przeprowadził hodowle w bioreaktorze analizując nie tylko stężenia lowastyny (metabolit *A. terreus*) i oksytetracykliny (metabolit *S. rimosus*), lecz także analizując obecność i stężenie innych metabolitów wytwarzanych przez te mikroorganizmy. Identyfikacji metabolitów dokonywano na podstawie standardów (lowastyna, oksytetracyklina, (+)-geodyna i butyrolakton I) lub wykorzystując metody HPLC ze spektrometrią mas i porównanie wyników z danymi literaturowymi oraz bazami danych (Antibase i Natural Products Atlas). Habilitant oprócz metabolitów typowych dla obu szczepów wykazał obecność związków należących do grupy rymocydyn oraz metabolity zidentyfikowane jako milbemycyny. Uzyskane widma masowe wskazywały również na obecność w kokulturach modyfikowanych (utlenionych) form rymocydyn i milbemycyn. Stężenia i obecność tych związków zależała od sposobu inicjacji hodowli mieszanej oraz składu pożywki hodowlanej. Obserwowano także, że zazwyczaj *S. rimosus* dominował nad *A. terreus* w kokulturach, jednak *A. terreus* nadal miał wpływ na zdolności produkcyjne „dominującego” promieniowca. Stwierdzono także, że na podstawie profilu zmian stężenia tlenu rozpuszczonego w pożywce można wnioskować, który z mikroorganizmów przyjął dominującą rolę w kokulturze; profile w kokulturze były identyczne z profilem w monokulturze dla szczepu dominującego.

Uzupełnieniem badań poświęconych identyfikacji metabolitów wtórnych była analiza ilościowa dotycząca parametrów morfologicznych uzyskanych w kokulturach i monokulturach *S. rimosus* i *A. terreus* (H6). Na podstawie cyfrowej analizy fotografii mikroskopowych stwierdzono, że sposób inicjowania kokultury wpływał na morfologię silniej niż zmiany składu podłoża. Morfologia komórek obu szczepów w hodowli mieszanej różniła się od morfologii komórek w mono hodowlach, co zasugerowało, że obserwowane zmiany składu metabolitów wtórnych były wynikiem zmian morfologicznych, a nie tylko z interakcji natury chemicznej. Jednak, jak słusznie zauważył Habilitant zastosowanie inżynierii morfologicznej na obecnym poziomie wiedzy naukowej pozostaje niezwykle ambitnym i trudnym do osiągnięcia celem.

Wykorzystując zdobytą wiedzę Habilitant badał także hodowle mieszane *A. terreus* z promieniowcem *Streptomyces noursei* (H7). Jednym z metabolitów wtórnych wytwarzanych przez *S. noursei* jest nystatyna, antybiotyk o działaniu przeciwgrzybiczym. W ramach badań zidentyfikowano 50 metabolitów wtórnych z czego 19 związków było syntezowanych przez *S. noursei*, zaś 31 przez *A. terreus*. Stymulujący wpływ kokultury zaobserwowano dla speradine B, N-methoxyseptorinol, mitorubrin, butyrolactone I, asnovolin C, 4''-deoxy-3-hydroxyterphenyllin, 3-methoxy-6-methyl-5-(methylsulphonyl)benzene-1,2,4-triol, 1-(2',6'-dimethylphenyl)-2-n-propyl-1,2-dihydropyridazine-3,6-dione i desferrioxaminy. Można zatem stwierdzić, że hodowle mieszane są efektywnym sposobem na stymulację

wytwarzania metabolitów wtórnych w hodowlach prowadzonych w bioreaktorze. Interesującą obserwacją był też fakt, że w przeciwieństwie do wcześniejszych hodowli mieszanych „grzyby strzępkowe/promieniowce”, w tym przypadku oba szczepy wytwarzały metabolity wtórne i nie obserwowano efektu dominacji jednego z nich. Zaskoczeniem był także brak stymulacji wytwarzania nystatyny przez *S. noursei*, choć w hodowli obecny był szczep grzybów strzępkowych.

Ostatnia praca zamieszczona w cyklu (H8) dotyczyła połączenia dwóch metod stosowanych w celu stymulacji metabolizmu wtórnego u mikroorganizmów strzępkowych: hodowli w obecności mikrocząstek mineralnych i hodowli w warunkach kultur mieszanych. W badaniach stosowano kokultury: *A. terreus*/*P. rubens*, *A. terreus*/*S. rimosus* i *A. terreus*/*Cerrena unicolor*, zaś jako mikrocząstki mineralne wykorzystano tlenek glinu o wielkości cząstek około 10 µm. W badaniach analizowano wytwarzanie wybranych metabolitów wtórnych w hodowlach mieszanych i monokulturach z/bez mikrocząstek mineralnych. Habilitant wykazał, że wpływ cząstek mineralnych na produkcję metabolitów wtórnych jest inny w mono hodowlach i inny w kokulturach, zaś rodzaj indukcji (stymulacja/zahamowanie) bardzo wyraźnie zależy od składu pożywki wykorzystywanej do hodowli oraz czasu prowadzenia hodowli.

W ocenianym cyklu publikacji dr inż. Tomasz Boruta występuje jako jedyny autor (H3) lub współautor (pozostałe publikacje), przy czym Jego wkład w przedstawione do oceny publikacje waha się od 40% (H6) do 92% (H1). Udział w autorstwie publikacji został pisemnie potwierdzony przez autora i współautorów.

Podsumowując ocenę cyklu publikacji mogę z całym przekonaniem stwierdzić, że przedstawiony przez dr inż. Tomasza Borutę materiał zawiera istotne elementy nowości. Habilitant przyczynił się do rozwoju badań nad kulturami mieszanymi stosując w swoich badaniach układy „grzyby strzępkowe/grzyby strzępkowe”, „grzyby strzępkowe/promieniowce” i „grzyby strzępkowe/grzyby poroidalne”. Habilitant określił sposób inokulacji hodowli mieszanych promujący wytwarzanie danego metabolitu przez jeden ze szczepów lub wytwarzanie metabolitów wtórnych przez oba szczepy, wykazał możliwość zastosowania kokultur w celu biosyntezy nowych metabolitów wtórnych, których produkcja nie zachodzi w warunkach monokultury (np. związków należących do grupy milbemycyn oraz rymocydyn). Dodatkowo Habilitant udowodnił, że spory dwóch różnych gatunków grzybów strzępkowych mogą rozwinąć się tworząc 2-gatunkowe aglomeraty jak np. *A. terreus* i *C. globosum*, a dodatkowo stosował inżynierię morfologiczną wykorzystując mikrocząsteczki tlenku glinu w hodowlach monokultury i kultur mieszanych *A. terreus*, *S. rimosus* i *P. rubens*

Badania prowadzone przez Habilitanta mają charakter badań podstawowych.

3. Ocena istotnej aktywności naukowej

Zainteresowania dr inż. Boruty, już od czasów studenckich (studia magisterskie) koncentrowały się wokół metabolizmu mikroorganizmów, przede wszystkim w odniesieniu do produkcji metabolitów wtórnych. Początkowo były to badania dotyczące modelowania glikolizy u *Lactococcus lactis* oraz modelowania sieci metabolicznej drożdży *Saccharomyces*

cerevisiae, które realizował w ramach studiów magisterskich na Technical University of Denmark (MSc in Biotechnology, stypendium dla najlepszych studentów „DTU Student Sponsorship”). Zainteresowania te Habilitant kontynuował w trakcie 3-miesięcznego stażu badawczego w European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg), co zaowocowało wspólną publikacją. W pracy doktorskiej Habilitant koncentrował się na metabolizmie *Aspergillus terreus* prowadząc badania mające na celu indukcję produkcji metabolitów, a w szczególności lowastyny (lek obniżający poziom cholesterolu). Od chwili podjęcia badań naukowych po uzyskaniu stopnia doktora, zainteresowania Habilitanta koncentrują się na badaniach dotyczących produkcji metabolitów wtórnych w odniesieniu do rozwoju morfologicznego grzybów strzępkowych oraz promieniowców. Zainteresowania Habilitanta inżynierią morfologiczną zaowocowały publikacjami dotyczącymi opisu morfologii szeregu grzybów strzępkowych hodowanych w warunkach hodowli wstrząsanych i w warunkach hodowli w bioreaktorze oraz publikacją pokazującą wpływ składu podłoża hodowlanego na zmiany morfologiczne grzybów strzępkowych. Obecne zainteresowania Habilitanta koncentrują się wokół hodowli mieszanych. Doświadczenia zdobyte w trakcie tych prac, a w szczególności doświadczenie dotyczące identyfikacji metabolitów wtórnych, Habilitant wykorzystuje w badaniach dotyczących sposobu degradacji antybiotyków i leków przeciwbólowych, w których brał udział jako członek zespołu realizującego grant NCN

Cały udokumentowany dorobek Habilitanta obejmuje ogółem 31 publikacji, z czego po uzyskaniu stopnia doktora: 29 publikacji w czasopismach z bazy Journal Citation Reports. Indeks Hirscha Habilitanta wynosi 10, zaś liczba cytowań bez autocytowań 254 (WoS, stan na 31.08.2023). Sumaryczna wartość wskaźnika IF dla publikacji w czasopismach z bazy Journal Citation Reports wynosi 106,56 (WoS, stan na 31.08.2023).

Zdecydowana większość publikacji dr inż. Tomasza Boruty jest dziełem kilkusobowych zespołów autorskich. Dr inż. Boruta był autorem korespondencyjnym w 45% publikacji i pierwszym autorem w 52% publikacji. Działalność naukowa Habilitanta została nagrodzona Stypendium Ministra Edukacji i Nauki dla Wybitnych Młodych Naukowców przyznanym w 2022 r.

Dr inż. Boruta brał czynny udział w realizacji 3 grantów NCN (wykonawca) i był kierownikiem grantu PRELUDIUM (2013/11/N/ST8/00212). Habilitant nie wykazał w dokumentach udziału w konferencjach krajowych i zagranicznych.

Dr inż. Boruta jest także autorem 34 recenzji manuskryptów przesłanych do publikacji.

Działalność dydaktyczna i organizacyjna dr inż. Tomasza Boruty wiązana jest z Wydziałem Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej. Od momentu zatrudnienia w 2016 r. Habilitant prowadzi/ł zajęcia na studiach inżynierskich i magisterskich (kierunek inżynieria chemiczna i biochemiczna) w tym: 14 przedmiotów wykładowych, zajęcia w ramach 5 laboratoriów, zajęcia rachunkowe z 2 przedmiotów, zajęcia projektowe z 2 przedmiotów, 2 seminaria studenckie. Jest promotorem 19 prac dyplomowych (w tym 12 inżynierskich i 7 magisterskich), pełnił także funkcję promotora pomocniczego (przewód doktorski dr inż. Anny Kowalskiej obroniony w 2019 roku z wyróżnieniem).

Dr inż., Boruta udziela się także jako popularyzator nauki. W 2018 i 2022 roku był prelegentem podczas Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi, w 2019 był prelegentem w ramach obchodu „Dnia Liczby Pi”, jest prelegentem i członkiem komisji oceniającej prace uczniów w wydziałowym Seminarium Uczniowsko-Studentckim „Problemy Ochrony Środowiska”, promuje Wydział w ramach prelekcji w szkołach średnich.

Do działań organizacyjnych zaliczyć należy także udział w pracach Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Łódzkiej (od 2019 r.), w pracach Zespołu do spraw Promocji Wydziału (członek Zespołu od 2023), członek komisji egzaminacyjnej kierunku „Inżynieria biochemiczna” oraz członek komitetu organizacyjnego XIV Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Postępy Inżynierii Bioreaktorowej”.

4. Wniosek końcowy

Zestawiona powyżej działalność naukowo-badawcza, dydaktyczna i organizacyjna pozwala mi stwierdzić, że dr inż. Tomasz Boruta jest dojrzałym pracownikiem naukowym, legitymującym się dobrą wiedzą oraz uznanym specjalistą w dziedzinie inżynierii chemicznej, a w szczególności inżynierii bioprocessowej.

W tej sytuacji, zgodnie z aktualną ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, biorąc pod uwagę całokształt dorobku dr inż. Tomasza Boruty, wnoszę o nadanie kandydatowi stopnia naukowego doktora habilitowanego.


dr hab. inż. Małgorzata Jaworska