



Lublin, dnia 24.11.2025 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Adama Grzywaczyka

pt.: „Interaction of Surfactants of Natural Origin with Phospholipid Membranes”

Podstawą recenzji rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Adama Grzywaczyka było pismo Pani prof. dr hab. inż. Ewy Kaczorek, Dziekana Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej z dnia 07.10.2025 r. z prośbą o opracowanie recenzji pracy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr. inż. Adama Grzywaczyka została wykonywana na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Ewy Kaczorek. Promotorem pomocniczym rozprawy był Pan dr hab. inż. Wojciech Smulek. Recenzowana rozprawa dotyczy wpływu surfaktantów pochodzenia naturalnego, tj. saponin, na właściwości błon fosfolipidowych. Autor analizuje te oddziaływania w kontekście potencjalnego zastosowania saponin jako adiuwantów zwiększających skuteczność antybiotykoterapii. Warto w tym miejscu podkreślić, że problem oporności na antybiotyki stale narasta, a szczepy wielolekooporne pojawiają się nawet wobec antybiotyków ostatniej szansy. Ponieważ proces powstawania nowych leków jest często hamowany przez rygorystyczne kryteria wymagane do skutecznego projektowania farmaceutyków, jak najbardziej pożądane jest zgłębianie mechanizmów oporności na istniejące antybiotyki. Zatem związki niebędące antybiotykami, zwane adiuwantami antybiotykowymi, które oddziałują na mechanizmy oporności bakterii, mogą być stosowane w połączeniu z istniejącymi lekami, tworząc skuteczniejszy schemat terapeutyczny. Tematyka recenzowanej rozprawy łącząc elementy fizykochemii granic faz, biochemii błon biologicznych, technologii chemicznej oraz mikrobiologii stosowanej wpisuje się w nurt badań nad zwiększeniem biodostępności substancji leczniczych i pokonywaniem oporności drobnoustrojów. Wychodząc od mechanizmów poprzez które saponiny modyfikują właściwości błon postawiono hipotezę, że saponiny modyfikują właściwości fizykochemiczne błon fosfolipidowych, zarówno w



żywych komórkach, jak i modelowych układach błonowych, dzięki czemu mogą zwiększać skuteczność działania substancji leczniczych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim w formie opracowania, którego integralną część stanowi zbiór pięciu opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Rezultaty badań naukowych zawarte w tych artykułach są ściśle związane z tematem ocenianej pracy i są wynikiem badań prowadzonych w związku z realizacją projektu OPUS 20 „Is there a synergistic effect of plant surfactants and antibiotics against bacterial cells? (Grant number: 2020/39/B/NZ9/03196). Są to następujące publikacje:

P1. Adam Grzywaczyk, Wojciech Smulek, Agnieszka Zgoła-Grześkowiak, Ewa Kaczorek, Anna Zdziennicka, Bronisław Jańczuk Nanofiltered saponin-rich extract of *Saponaria officinalis* – Adsorption and aggregation properties of particular fractions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 661 (2023) 130937 DOI: 10.1016/j.colsurfa.2023.130937

Praca ta dotyczyła rozdziału ekstraktu z mydlnicy lekarskiej (*Saponaria officinalis* L.) z wykorzystaniem dwustopniowego procesu nanofiltracji. Celem było otrzymanie frakcji bogatych w saponiny charakteryzujących się określonymi właściwościami powierzchniowymi. Wykazano, że frakcja 0,5-3 kDa (E2) jest bogata w saponiny, tworzy micelle o rozmiarach rzędu kilkudziesięciu nanometrów i zachowuje aktywność powierzchniową porównywalną z ekstraktem surowym.

P2. Monika Rojewska, Wojciech Smulek, Adam Grzywaczyk, Ewa Kaczorek, Krystyna Prochaska Study of interactions between saponin biosurfactant and model biological membranes: Phospholipid monolayers and liposomes. *Molecules* 2023, 28, 1965. DOI: 0.3390/molecules28041965

Badania przedstawione w tej publikacji koncentrowały się na badaniach oddziaływania saponin pochodzących z lukrecji (*Glycyrrhiza glabra*) z błonami modelowymi. Zaobserwowano rozszerzanie filmu i spadek modułu ściśliwości w układach monowarstwowych. Uzyskane wyniki wskazują, że



saponiny oddziałują z błoną fosfolipidową utworzoną przez cząsteczki DPPE i że stabilność mieszanej monowarstwy DPPE/saponiny silnie zależy od obecności zanieczyszczeń w saponinach. Ponadto stwierdzono, że ekstrakt roślinny bogaty w biosurfaktant oddziałuje głównie z hydrofilową częścią liposomów.

P3. Adam Grzywaczyk, Wojciech Smulek, Ewa Kaczorek *Saponaria officinalis* saponins as a factor increasing permeability of *Candida* yeasts' biomembrane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2024) 40:152. DOI: 10.1007/s11274-024-03961-9

Badania przedstawione w tej pracy koncentrują się na wpływie surowego i oczyszczonego metodą nanofiltracji ekstraktu z mydlnicy lekarskiej (*Saponaria officinalis* L.) na komórki *Candida albicans* (bielnik biały) i *Candida krusei* (grzybów należący do rzędu drożdżakowców), z których enzymatycznie usunięto ściany komórkowe (sferoplasty). Wykazano min., że surowe frakcje saponiny w większym stopniu wpływają na przepuszczalność błon komórkowych *Candida albicans*.

P4. Adam Grzywaczyk, Monika Rojewska, Wojciech Smulek, Daniel A. McNaughton, Krystyna Prochaska, Philip A. Gale, Ewa Kaczorek *Glycyrrhiza glabra* L. saponins modulate the biophysical properties of bacterial model membranes and affect their interactions with tobramycin. *Langmuir* 2025, 41, 18, 11701–11710. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5c00927

W tej publikacji wybrano inne naturalne źródło saponin, *Glycyrrhiza glabra* (lukrecję), aby ocenić jej potencjał w zakresie zmiany właściwości błony bakteryjnej i wzmocnienia oddziaływań z antybiotykami. Badania koncentrują się na tobramycynie, antybiotyku aminoglikozydowym o szerokim spektrum działania. Wykazano działanie synergetyczne prowadzące do modyfikacji ładunku powierzchniowego liposomów bez ich uszkodzenia.

P5. Adam Grzywaczyk, Wojciech Smulek, Anna Olejnik, Urszula Guzik, Agnieszka Nowak, Ewa Kaczorek Co-interaction of nitrofurantoin antibiotics and the saponin-rich extract on gram-negative bacteria and colon epithelial cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2023) 39:221. DOI: 10.1007/s11274-023-03669-2

W pracy tej wykazano synergetyczne działanie saponin z *Sapindus mukorossi* (mydleniec indyjski) z nitrofurantoiną oraz furazolidonem wobec bakterii z rodzaju *Pseudomonas* przy jednoczesnym braku zwiększenia cytotoksyczności wobec komórek ludzkiego nabłonka okrężnicy.

Artykuły stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej stanowią monotematyczny cykl publikacji i zostały opublikowane w latach 2023-2025 w czasopiśmie indeksowanym w bazie JCR. W czterech artykułach mgr inż. A. Grzywaczyk jest pierwszym autorem, a w dwóch autorem korespondencyjnym. Dodatkowo publikacja P4 powstała we współpracy z naukowcami z Uniwersytetu Technologicznego w Sydney, co jest dowodem rozwijania działalności naukowej na polu międzynarodowym. Każda publikacja została opatrzona stosownymi oświadczeniami wszystkich Współautorów ze wskazaniem zakresu wykonanych prac. Z oświadczeń Autora rozprawy wynika, że we wszystkich tych publikacjach Jego udział polegał na stworzeniu koncepcji pracy, koordynacji i przeprowadzeniu szeregu badań eksperymentalnych, opisie prac badawczych czy edycji manuskryptu. Podsumowując, dobór czasopism oraz liczbę artykułów, w których przedstawiono wyniki związane z przedstawioną dysertacją oceniam bardzo wysoko. Stwierdzam, że rola Autora dysertacji w tworzeniu poszczególnych prac była wiodąca i twórcza, Jego wkład samodzielny i znaczący, a związane z nią wszystkie działania spełniają wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora.

Pragnę w tym miejscu wyraźnie podkreślić, iż w mojej opinii, dysertacja w postaci pięciu monotematycznych publikacji naukowych, logicznie uporządkowanych i posiadających wnikliwą analizę na każdym etapie badań będących efektem badań w Zespole Badawczym kierowanym przez Panią Promotor, Panią Prof. dr. hab. inż. Ewę Kaczorek jest wzorcowa. Zakres prowadzonych badań, ich analiza i interpretacja zostały bardzo dobrze przemyślane i zrealizowane, co jednoznacznie przełożyło się na powstanie pracy na bardzo wysokim poziomie merytorycznym.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska oprócz wykazu prac stanowiących jej podstawę (str. 27) i ich przedruków (str. 64) zawiera także streszczenie w języku polskim i angielskim, przegląd literaturowy, lukę i hipotezę badawczą, cele rozprawy, podsumowanie



wyników, wnioski oraz bibliografię. Układ taki uważam za klarowny i logiczny, pozwalający śledzić powiązania pomiędzy poszczególnymi etapami badań a każda część wprowadza czytelnika w kolejny poziom szczegółowości – od tła teoretycznego po wyniki eksperymentalne. Na stronie 57 znajduje się opis innych osiągnięć naukowych Doktoranta, z którego wynika, że Doktorant posiada także szereg innych istotnych publikacji naukowych, dwa patenty, aktywnie bierze udział w konferencjach krajowych i międzynarodowych, był i jest wykonawcą wielu projektów badawczych, a także laureatem wielu nagród.

Podsumowując mogę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została dobrze zaplanowana i przedstawiona w sposób logiczny i zrozumiały. Stanowi oryginalny wkład w rozwój nauki, dostarczając solidnych podstaw eksperymentalnych do projektowania nowych, bezpieczniejszych i bardziej efektywnych systemów terapeutycznych, w tym nośników lipidowych i strategii zwalczania opornych mikroorganizmów. Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury, umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia badań oraz interpretacji wyników w szerokim kontekście chemicznym i biologicznym. Otrzymane wyniki mają znaczenie poznawcze i aplikacyjne mogące znaleźć zastosowanie w biotechnologii, farmakologii i inżynierii biomateriałów. Strona graficzna recenzowanej pracy jest bardzo dobra, a wszystkie przedstawione rysunki, schematy i zdjęcia są czytelne.

Do najważniejszych osiągnięć recenzowanej pracy doktorskiej Pana mgr. inż. Adama Grzywaczka zaliczam przede wszystkim:

1. Udowodnienie, że saponiny z *Saponaria officinalis* i *Glycyrrhiza glabra* istotnie modyfikują strukturę i płynność błon fosfolipidowych, wpływając na ich przepuszczalność i ładunek powierzchniowy.
2. Stwierdzenie istnienia efektu synergetycznego w procesie oddziaływania saponin z antybiotykami (nitrofurantoiną, furazolidonem, tobramycyną) poprzez modyfikację błon, z potwierdzeniem skuteczności wobec bakterii Gram-ujemnych (*Pseudomonas*).

3. Wykazanie, że saponiny z *Saponaria officinalis* bezpośrednio zwiększają przepuszczalność błon sferoplastów drożdżaków *Candida*, co potwierdza ich potencjał jako adiuwantów w terapii przeciwgrzybiczej.

Pomimo ogólnej bardzo wysokiej oceny rozprawy w jej treści można się doszukać elementów budzących pewne wątpliwości lub niedosyt informacji.

1. Na str. 10 Autor pisze: "Moreover, certain genera, such as *Methylobacterium*, have been observed to incorporate hopanoids into their membranes". Na str. 15 czytamy że: "organisms such as bacteria have developed mechanisms to adjust their membrane fluidity through a process known as homeoviscous adaptation". Czy Autor może dokładnie wyjaśnić te procesy?
2. Na str. 10 Autor pisze, że: „bacterial membranes consist of equal amounts of phospholipids and proteins”. Czy stwierdzenie to dotyczy zarówno masy i objętości?
3. Na str. 19 czytamy o "formation of non-selective pores, which facilitate the escape of the contents of liposomes" a także, że: "The function of these saponins is thought to be the disruption of the bilayer integrity, potentially through pore formation". Czy Autor może wyjaśnić co oznaczają „non-selective pores”, a także proces ich tworzenia.
4. Na str. 21 Autor pisze, że: „ Certain saponins insert into phospholipid monolayers without cholesterol, reducing surface tension”, zaś na str. 22: „ Saponins induce the formation of elongated worm-like aggregates and membrane curvature, leading to domain budding”. Czy Autor może wyjaśnić czego dotyczy redukcja napięcia powierzchniowego i scharakteryzować powstające domeny?
5. Na str. 28 czytamy o „surfactant properties of the extract”, zaś na str. 29 o „surfactant activity”. W mojej opinii w zamiast „surfactant” powinno być „surface”. Jeśli jednak w drugim przypadku istotnie jest mowa o aktywności proszę o wyjaśnienie, jak ta aktywność została wyznaczona.
6. Na str. 29 widnieje stwierdzenie: „The standard free energy of micellisation for these plant extracts was found to be negative, signifying a greater tendency to aggregate than classical



- synthetic surfactants”. Stwierdzenie to sugeruje, że energia ta dla surfaktantów syntetycznych przyjmuje wartości dodatnie. Czy rzeczywiście dla surfaktantów syntetycznych, min. omawianych w publikacji P1, energia ta jest dodatnia?
7. Na str. 33 czytamy o „measurements of the zeta potential”, zaś na str. 45 o „zeta potential calculations”. Zatem potencjał ten był mierzony czy obliczany? Dodatkowo na str. 38 czytamy, że „*S. officinalis* saponin-rich extract affects *Candida* membranes, causing biophysical changes: approximately a 20% rise in permeability and a shift in zeta potential values”. Proszę wyjaśnić „shift” potencjału i jego znaczenie.
 8. Na str. 34, w streszczeniu publikacji P2, Autor pisze, że „the adsorption of saponin neutralised a proportion of the surface charge or introduced some positively charged groups at the interface”, zaś na str. 35: „This indicates partial insertion, which leaves the membrane largely intact”. Czy zatem wprowadzenie ładunku pozostawia „membrane largely intact”?

Niestety Doktorant nie uniknął także pewnych niedociągnięć związanych z poprawną edycją tekstu. Są to np: niejednołitość w zapisie (adiuwantów i adjuwantów str. 8) czy powtórzenia dotyczące wpływu kwasów tłuszczowych na odpowiedź bakteryjną (str. 44) i badań dotyczących adsorpcji oraz agregacji (str. 46).

Podsumowując uważam, że wymienione uwagi nie zmniejszają wartości i istoty prezentowanych wyników oraz mojej pozytywnej oceny pracy. Rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Adama Grzywaczyka jest dziełem o bardzo istotnych walorach zarówno poznawczych, ale także i aplikacyjnych. Z materiału zawartego w rozprawie wynika, że rozprawa ta jest dojrzałym, logicznie zorganizowanym i oryginalnym opracowaniem naukowym. Uzyskane wyniki badań mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia mechanizmów działania biosurfaktantów, a ponadto wskazują na ich praktyczny potencjał w zwiększaniu skuteczności antybiotyków wobec drobnoustrojów wielolekoopornych. Takie połączenie badań podstawowych i aplikacyjnych świadczy o zdolności Doktoranta do samodzielnego prowadzenia nowoczesnych badań interdyscyplinarnych.



Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. inż. Adama Grzywaczyka zatytułowana „Interaction of Surfactants of Natural Origin with Phospholipid Membranes” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, z dnia 20 lipca 2018 r. (t.j. dz. U. 2022, poz. 574 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne.

Jednocześnie biorąc pod uwagę niezwykłą aktualność podjętej tematyki badawczej, a także wielotorowość, wysoki poziom i oryginalność prowadzonych w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej badań o bardzo dużym potencjale aplikacyjnym składam do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. inż. Adama Grzywaczyka.