

Katowice, dnia 26.05.2021 r.

Prof. dr hab. Grażyna A. Płaza
Politechnika Śląska
Wydział Organizacji i Zarządzania
Katedra Inżynierii Produkcji

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Idy Szmigiel

pt.: „Biotransformacja śruty rzepakowej z wykorzystaniem *Bacillus subtilis*”

Przesłanki formalno-prawne przygotowania oceny pracy doktorskiej

Podstawą wykonania oceny pracy doktorskiej Pani mgr Idy Szmigiel było pismo Pana dr hab. inż. Marcina Kadeja, prof. UWr z dnia 23 kwietnia 2021 r. informujące o powołaniu mnie na recenzenta ww pracy zgodnie z uchwałą nr 57/2021 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne UWr z dnia 22 kwietnia 2021 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów w przewodzie doktorskim.

Pani mgr Ida Szmigiel przedstawiła rozprawę doktorską zatytułowaną „**Biotransformacja śruty rzepakowej z wykorzystaniem *Bacillus subtilis*”** wykonaną pod kierunkiem dr hab. Anny Krasowskiej, prof. UWr. w Zakładzie Biotransformacji Wydziału Biotechnologii.

Pracę wykonano w ramach realizacji projektów z programu Demonstrator (POIR.01.02.00-00-0064/17) oraz Innochem (POIR.02.01.00-IZ.00-00-001/19) finansowanych przez NCBiR.

Uwagi ogólne na temat problematyki podjętej w rozprawie

Zgodnie z celem osiągnięcia neutralności klimatycznej UE do 2050 r. zawartym w Zielonym Ładzie, Komisja Europejska zaproponowała w marcu 2020 r. nowy plan działania dotyczący gospodarki o obiegu zamkniętym (GOZ), koncentrujący się na zapobieganiu powstawaniu odpadów i gospodarowaniu nimi oraz mający na celu pobudzenie wzrostu, konkurencyjności i globalnego przywództwa UE w tym zakresie. Gospodarka o obiegu zamkniętym jest modelem prowadzenia gospodarki, w którym wszystkie produkty, materiały oraz surowce powinny być możliwie jak najdłużej wykorzystywane. Ideą jest, aby zużyty

produkt nie stał się odpadem, lecz surowcem do dalszej produkcji. Jest to odejście od obecnego systemu „weź – wyprodukuj – zużyj – wyrzuć” na rzecz modelu powtórnego wykorzystywania surowców, dążącego ostatecznie do wyeliminowania z cyklu życia produktu etapu „końca jego życia”. Obieg zamknięty i zrównoważony charakter muszą charakteryzować wszystkie etapy łańcucha wartości, aby możliwe było osiągnięcie gospodarki o w pełni zamkniętym obiegu: od projektu, przez produkcję, aż po konsumenta.

Europejska Agencja Środowiska w raporcie „The circular economy and the bioeconomy” prezentuje koncepcję gospodarki o obiegu zamkniętym w ujęciu biogospodarki oraz przedstawia wyzwania i korzyści wynikające z przekształcenia tradycyjnego modelu gospodarki w gospodarkę o obiegu zamkniętym. Strategia ta ma na celu przynieść korzyści dla ochrony środowiska oraz zwiększyć innowacyjność i konkurencyjność europejskich przedsiębiorców. Wszystko to dzięki zwiększonej wydajności systemu recyklingu, ograniczeniu ilości odpadów i emisji szkodliwych zanieczyszczeń oraz zmniejszeniu zużycia energii. Zmniejszenie produkcji odpadów, zwiększenie użycia komponentów biologicznych oraz postępy w recyklingu stanowią wyzwanie dla nowoczesnej i przyjaznej dla środowiska gospodarki. Zgodnie z unijną "hierarchią gospodarki odpadami" zapobieganie powstawaniu odpadów i ponowne wykorzystywanie są najbardziej pożądanymi scenariuszami.

Ograniczenie zużycia zasobów nieodnawialnych na rzecz biomateriałów jest ważnym aspektem modelu gospodarki o obiegu zamkniętym, zwłaszcza że obecnie nadmiernie eksploatujemy nieodnawialne zasoby środowiska. Strategia biogospodarki obejmuje programy badawcze i wprowadzanie innowacji, których celem jest zwiększenie wykorzystania biomateriałów w zrównoważony dla środowiska sposób. Szczególnym wyzwaniem jest przedłużenie życia produktów biologicznych poprzez wprowadzanie ich w kaskadowe cykle obiegu - recyklingu. W całym tym systemie istotne jest promowanie ponownego użycia i symbiozy przemysłowej, tj. przemiany produktu ubocznego jednej branży przemysłu w surowiec dla innej branży.

Biorąc powyższe pod uwagę należy uznać wybór tematyki pracy doktorskiej Pani mgr Idy Szmigiel za trafny i wpisujący się w trendy współczesnej gospodarki. Zarówno poznawcze, jak i utylitarne aspekty pracy reprezentują nurt nowoczesnych badań i są zgodne z wyznaczonymi celami rozwoju gospodarki. Praca dotyczy procesu biotransformacji, a dokładnie fermentacji podłoży stałych (SSF – ang. solid-state fermentation), do przekształcenia odpadu jakim jest śruta rzepakowa do bioproduktów. Ważną cechą tego procesu jest możliwość wykorzystywania różnych odpadów rolno-przemysłowych jako substratu do produkcji bioproduktów w oparciu o procesy mikrobiologiczne podobnie jak kompostowanie czy kiszenie.

Ocena układu pracy i ocena merytoryczna

Układ rozprawy jest typowy dla prac doktorskich, eksperymentalnych prac badawczych, z wydzielonymi rozdziałami: streszczenie, wstęp stanowiący przegląd literatury i obejmujący 5 podrozdziałów (30 stron), następnie cel i zakres pracy, część eksperymentalną (21 stron), wyniki badań i dyskusję, podsumowanie i wnioski, bibliografia (284 pozycje literaturowe) oraz spisy tabel (25) i ilustracji (21). Ogółem, praca liczy 149 stron i zredagowana jest według ogólnie przyjętego, w tej dziedzinie nauki, schematu.

W części teoretycznej Doktorantka, w oparciu o najnowsze pozycje piśmiennictwa, przedstawiła stan wiedzy związany z tematyką pracy i nawiązujący do jej części eksperymentalnej, tj. biorafinerie jako nowoczesne zakłady pracy oparte o biosurowce i realizujące zasady gospodarki o obiegu zamkniętym, proces fermentacji na podłożu stałym i jego zastosowanie w biorafineriach, odpady organiczne, w tym śrutę rzepakową, jako surowiec do produkcji bioproduktów i paszy w żywieniu drobiu. W następnym podrozdziale przedstawiono bakterie z rodzaju *Bacillus*, a szczególnie gatunek *Bacillus subtilis* i jego szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, ze względu na produkcję różnych bioproduktów, w tym enzymów hydrolizujących polisacharydy i biosurfaktanty – surfaktynę wykazującą szereg biologicznych aktywności (przeciwbakteryjnych, przeciwwirusowych, przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych), udział tych bakterii w rozkładzie mykotoksyn. Ostatni podrozdział dotyczy roli fermentowanych pasz w żywieniu drobiu, wpływu probiotyków i fermentowanych pasz na mikrobiom układu pokarmowego i układ odpornościowy drobiu.

Podsumowując, część teoretyczna napisana jest w sposób wyczerpujący, wskazujący na dużą wiedzę Doktorantki z tego zakresu i świadczy o tym, że Doktorantka opanowała bardzo dobrze teoretyczne podstawy danego zagadnienia i na tej podstawie sformułowała poprawnie cel i zakres pracy oraz doskonale przygotowała się do realizacji części badawczej.

Cel i zakres pracy zostały sformułowane poprawnie, jasno i precyzyjnie, co przyczyniło się do zaplanowania części doświadczalnej w sposób spójny i logiczny.

Praca koncentruje się na 5 podstawowych aspektach, mających charakter zarówno badań podstawowych jak i aplikacyjnych:

1. Opracowanie parametrów hodowli *B. subtilis* 87Y na podłożu stałym z śrutą rzepakową w celu zoptymalizowania produkcji surfaktyny i enzymów: ksylanaz i celulaz.
2. Identyfikacja genów kodujących specyficzne enzymy degradujące nie skrobiowe polisacharydy (NSP) w genomie *B. subtilis* 87Y oraz określenie poziomu ich ekspresji.

3. Porównanie wartości odżywczych śruty rzepakowej niefermentowanej i fermentowanej *B. subtilis* 87Y w celu wykorzystania jej jako paszy dla zwierząt monogastrycznych.
4. Badanie rozkładu mykotoksyn podczas fermentacji stałej biomasy śruty rzepakowej oraz identyfikacja genów biorących udział w rozkładzie mykotoksyn w genomie *B. subtilis* 87Y; zaproponowanie mechanizmów biodegradacji badanych mykotoksyn.
5. Badanie probiotycznych właściwości szczepu *B. subtilis* 87Y *in vitro* metodami kohodowli mikroorganizmów i *in vivo* poprzez żywienie kurcząt typu broiler fermentowaną śrutą rzepakową i analizę mikrobiomu ich przewodu pokarmowego.
6. Produkcja dodatku paszowego do żywienia kurcząt – fermentacja śruty rzepakowej w skali półtechnicznej w bioreaktorze fermentacji stałej.

Zarówno część eksperymentalna, jak opis wyników i ich dyskusja są podzielone według wyżej wymienionych zagadnień.

Doktorantka podjęła się rozwiązywania bardzo trudnych, a jednocześnie ciekawych problemów naukowych związanych z badaniem procesu fermentacji stałej śruty rzepakowej i wykorzystaniu biomasy powstałej z odpadu jako surowca do produkcji wartościowych bioproduktów - enzymów i biosurfaktantu oraz jako wysokowartościowy dodatek do pasz.

W pracy Autorka zaprezentowała badania o charakterze interdyscyplinarnym z zakresu mikrobiologii, biochemii, chemii, biologii molekularnej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Autorka w swoich badaniach wykorzystwała wiedzę i warsztat badawczy obejmujący tradycyjne metody mikrobiologiczne (metody hodowlane) oraz metody współczesne – sekwencjonowanie, metagenomika, mikroskopia fluorescencyjna, konfokalna, chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas (LC-MS/MS). Zastosowanie różnych metod badawczych z zakresu biologii, mikrobiologii, chemii świadczy o szerokim spojrzeniu Doktorantki na zagadnienie przedstawione w pracy i ich wielowątkowość, co należy docenić w pracy naukowej. Niektóre badania były realizowane przy współudziale ośrodków zewnętrznych, co też świadczy o otwartości Doktorantki na rozwiązywanie problemów naukowych w aspekcie interdyscyplinarnym. Wiedza i doświadczenie Doktorantki z biologii i chemii pozwoliły również na wnikliwą i naukową interpretację otrzymanych wyników.

W części doświadczalnej, Autorka zamieścił opis badań przeprowadzonych w pracy i propozycje rozwiązań eksperymentalnych decydujące o wartości opiniowanej pracy. Warsztat metodyczny zaproponowany przez Doktorantkę był optymalny dla realizacji celów pracy, nowoczesny, odpowiadający współczesnym standardom badań w tej dziedzinie. Ilość i jakość

zaplanowanych i przeprowadzonych badań w pracy świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę w stopniu bardzo dobrym warsztatu pracy doświadczalnej oraz umiejętności samodzielnego myślenia. Odpowiednio zaplanowane badania umożliwiły Doktorantce uzyskanie odpowiednich wyników i na ich podstawie osiągnięcie celów oraz sformułowanie odpowiednich wniosków.

Następną część pracy, zajmującą ponad 50% objętości, stanowią rozdziały dotyczące przedstawienia wyników badań i ich dyskusji oraz wnioski końcowe. Ta część pracy jest bogato ilustrowana dobrej jakości rysunkami oraz tabelami (ilość tabel 25; ilość rysunków 42). Dyskusja przedstawionych wyników została napisana poprawnie, Doktorantka analizuje uzyskane wyniki na tle danych ze współczesnego piśmiennictwa. Dyskusja jest szczegółową, inteligentną i krytyczną analizą wyników na tle innych, opublikowanych doniesień. Ta część pracy wystawia dobre świadectwo o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Doktorantka podczas pisania pracy korzystała z 284 najnowszych pozycji literaturowych zgodnych z tematyką pracy.

Właściwe proporcje objętościowe pomiędzy poszczególnymi częściami pracy, logiczny i przejrzysty układ kolejnych rozdziałów, poprawny technicznie i stylistycznie język stanowią o pozytywnej formalnej opinii pracy.

Dokonując oceny pracy doktorskiej stwierdzam, że teść pracy odpowiada jej tytułowi i sformułowanym na początku pracy celom. Analiza otrzymanych w trakcie badań wyników pozwoliła Doktorantce na wysunięcie odpowiednich wniosków. Przedstawiona do oceny rozprawa w pełni odpowiada warunkom stawianym dysertacjom doktorskim.

Podsumowując recenzję, uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Idy Szmigiel jest napisana na bardzo wysokim poziomie, a tematyka badawcza aktualna. Dobrze został sformułowany cel rozprawy, Doktorantka doszła do konkretnych i jasnych wniosków. Dodatkowo chciałabym jeszcze raz podkreślić bardzo wysoką jakość prowadzonych badań przez Doktorantkę pod względem zastosowanych technik analitycznych. Umiała Ona wykorzystać szereg najnowocześniejszych aparatów badawczych takich jak chromatografy cieczowe i gazowe sprzężone ze spektrometrami mas, różne analizy mikroskopowe, czy też techniki biologii molekularnej do osiągnięcia założonego celu pracy.

Podczas realizacji pracy doktorskiej opublikowano 5 artykułów naukowych, w tym w trzech Doktorantka jest pierwszym autorem, w czasopismach o wysokim IF: *Bioorganic Chemistry*, *Biomass Conversion and Biorefinery*, *Microorganisms*, *Biomolecules*, *Dalton Transactions*. Sumaryczny IF: 19,719. h-index – 2 (Web of Science, 24.05.2021)

Wyniki otrzymane w ramach realizacji projektów Doktorantka prezentowała na konferencjach polskich i zagranicznych w formie wystąpień ustnych i plakatów (10 doniesień konferencyjnych). Doktorantka jest również współautorem zgłoszenia patentowego (P.430111).

Uwagi do rozprawy doktorskiej

Jak już kilka razy wspominałam rozprawę doktorską Pani mgr Idy Szmigiel oceniam bardzo wysoko. Jednocześnie chciałabym przedstawić kilka uwag/niejasności o różnym charakterze z prośbą o ich komentarz.

1. Proszę przedstawić koncepcję biorafinerii i ich podział – przykłady
2. Przykłady biorafinerii w Polsce
3. Proszę wymienić inne biosurfaktanty produkowane przez bakterie *Bacillus*; w pracy Pani o nich nie wspomina – czy były identyfikowane ?
4. Proszę wyjaśnić eksperyment kohodowli mikroorganizmów metodą insertów (Rysunek 11)
5. Proszę omówić w jaki sposób przeprowadzono sekwencjonowanie i analizę genomu *B. subtilis* 87Y (Podrozdział 3.2.15) – jakie programy użyto do analizy genomu; Czy sekwencje zdeponowano w bazie NCBI. Jest bardzo dobre czasopismo Microbiology Resource Announcements, w którym można złożyć artykuł dotyczący charakterystyki genomów bakterii i metagenomów.
6. Tabela 8 (str. 53) – proszę omówić do jakich genów były projektowane startery – brak informacji w tabeli; w tekście tylko niektóre opisano
7. Uwaga do tekstu str. 66 i ilustracji 12 – produkcja surfaktyny na modyfikowanych podłożach płynnych; stwierdzono, że w rozdziale chromatograficznym standardu SU obserwowano piki należące do analogów C12-C17 – brak na ilustracji 12
8. Uwaga jak wyżej do tekstu str. 66 i ilustracja 14.
9. Uwaga ogólna – w rozdziale Wyniki i Dyskusja znajdują się elementy pracy, które należą do sekcji Materiały i Metody (powtórzenia lub nowe informacje)
10. Tabela 16 (str. 91) – brak oznaczeń grup kurcząt – proszę to wyjaśnić i omówić wyniki
11. Rozdział 4.6 dotyczący procesu fermentacji stałej mieszanki śruty rzepakowej i owsa oraz produkcji surfaktyny i aktywności ksylanaz na zmodyfikowanych podłożach – gdzie jest opis metodyki doświadczeń, z których przedstawiono wyniki w rozdziale 4.6. Jaki był cel zamieszczenia wyników badań przedstawionych w rozdziale 4.6 w pracy doktorskiej ?

12. Ze względu na dużą ilość badań i uzyskanych wyników prezentowanych w pracy korzystne byłoby zamieszczenie schematu badań w formie graficznej
13. Drobną uwagą do rozdziału 5 – Podsumowanie i Wnioski (str. 123) – zdanie pierwsze powinno się zakończyć „...zadania, z których sformułowano następujące wnioski:”

Przedstawione powyżej uwagi o charakterze dyskusyjnym nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę niniejszej rozprawy doktorskiej.

WNIOSEK KOŃCOWY

Na podstawie recenzowanej pracy doktorskiej Pani mgr Idy Szmigiel pt.: „**Biotransformacja śruty rzepakowej z wykorzystaniem *Bacillus subtilis***” stawiam wniosek o przyjęcie przez Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne UWr pracy doktorskiej Pani mgr Idy Szmigiel i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Praca doktorska przedstawiona przez Panią mgr Idę Szmigiel, w oparciu o oryginalny materiał badawczy, spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DzURP nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami.

Jednocześnie, z całym przekonaniem składam wniosek rekomendujący Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne UWr podjęcie uchwały o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, bardzo wysoką jakość prowadzonych badań, ich interdyscyplinarność oraz sposób przedstawienia i interpretację otrzymanych wyników.

