

Lodz University of Technology



International Centre for Research on Innovative Biobased Materials - ICRI-BioM  
International Research Agenda

Prof. dr hab. inż. Stanisław Bielecki,

Łódź, 3 kwietnia, 2023r.

## RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Marty Domżał-Kędzia

pt.: „**Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie biopolimeru syntetyzowanego przez *Bacillus subtilis***”

wykonanej w Zakładzie Biotransformacji, Wydziału Biotechnologii  
Uniwersytetu Wrocławskiego  
pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Marcina Łukaszewicza i dr Agnieszki Lewińskiej.

Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Domżał-Kędzia pt.: „Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie biopolimeru syntetyzowanego przez *Bacillus subtilis*” jest ciekawą, potrzebną i nowatorską pracą badawczą obejmującą praktycznie wszystkie etapy biotechnologicznego procesu wytwarzania i zastosowania lewanu. Tematyka i zakres pracy całkowicie wpisują się w obecne kierunki badawcze mające na celu poznanie mechanizmów biosyntezy naturalnych biopolimerów, ich ukierunkowane wytwarzanie i zastępowanie nimi stosowanych w dużych ilościach polimerów syntetycznych, nie poddających się biodegradacji. Biopolimery są wytwarzane praktycznie przez wszystkie organizmy żywe. Planując holistyczne podejście do swoich badań nad biopolimerami mgr inż. Domżał-Kędzia, jako źródło ich pochodzenia wybrała mikroorganizmy biosyntetyzujące polimer o szczególnej strukturze i różnorodnej funkcjonalności. Wymaganą cechą poszukiwanego drobnoustroju było jego bezpieczeństwo dla człowieka oraz środowiska naturalnego. Takim mikroorganizmem okazał się *Bacillus subtilis* będący źródłem wielu

1



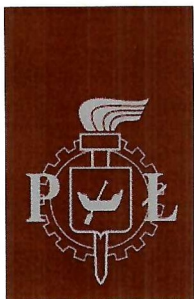
Rzeczpospolita  
Polska



Fundacja na rzecz  
Nauki Polskiej

Unia Europejska  
Europejski Fundusz  
Rozwoju Regionalnego





Lodz University of Technology



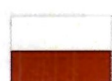
International Centre for Research on Innovative Biobased Materials - ICRI-BioM  
International Research Agenda

różnorodnych metabolitów i posiadający status GRAS, świadczący o bezpieczeństwie dla ludzi i zwierząt. Drobnoustrój ten wytwarza lewan - biopolimer składający się z jednostek D – fruktofuranozy, połączonych wiązaniami  $\beta$ -(2,6) – glikozydowymi w łańcuchach głównych oraz  $\beta$ -(2,1) – glikozydowymi w rozgałęzieniach. Właściwości biologiczne lewanu zależą od jego masy cząsteczkowej i stopnia rozgałęzienia. Brak standardowej charakterystyki tego biopolimeru jak i określenia zależności jego funkcji od struktury było z pewnością przyczyną naukowego zainteresowania się doktorantki lewanem. Celem przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej cyt.: „*było otrzymanie lewanu z wykorzystaniem probiotycznych, bezpiecznych bakterii Bacillus subtilis, zbadanie jego właściwości fizykochemicznych i biologicznych oraz określenie jego możliwości aplikacyjnych*”. Badania w tak szerokim zakresie były możliwe dzięki interdyscyplinarnemu podejściu do zagadnienia badawczego, wykorzystaniu różnorodnych metod badawczych i analitycznych dostępnych w laboratoriach uczelnianych, współpracy z przemysłem i innymi jednostkami badawczymi, jak i współfinansowaniu przez granty NCBR.

Podobnie jak odpowiednio zaplanowany i przeprowadzony jest ciąg badań, również i przedstawiona rozprawa doktorska jest napisana, mimo swej obszerności, w sposób komunikatywny. W pracy tej na 162 stronach, z pomocą 24 tabel i 56 rysunków oraz ponad 350 pozycji literaturowych, dokonano przeglądu literatury, przedstawiono metodykę badań, omówiono i przedyskutowano uzyskane wyniki, kończąc pracę podsumowaniem i wnioskami. W pracy wydzielono streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów i symboli, podziękowania oraz dorobek naukowy czyniąc ją bardziej czytelną.

Przed ustosunkowaniem się do niektórych wyników otrzymanych przez doktorantkę, chciałbym zwrócić uwagę na rozdział nazwany wstępem. Stanowi on bardzo dobre wprowadzenie czytelnika w zagadnienia związane z polimerami, biopolimerami i ich biodegradowalnością. Przedstawiono podział tych substancji w zależności od pochodzenia, topologii, budowy i jej jednorodności oraz struktury. Dużą cześć informacji, z racji wyboru kierunku badawczego, poświęcono aspektom molekularnym i inżynierskim biosyntezy lewanu. Omówiono rolę operonów istotnych w produkcji lewanu przez *Bacillus subtilis*. Pokazano dotychczasowe potencjalne możliwości wykorzystania lewanu, szczególnie w postaci nośników różnych aktywnych substancji. Zwrócono uwagę na nanosytemy i ich wykorzystanie w medycynie, farmacji i kosmetologii. Stąd bardzo dobrze przedstawiony opis budowy ludzkiej skóry i transportu różnych

2



Rzeczpospolita  
Polska



Fundacja na rzecz  
Nauki Polskiej

Unia Europejska  
Europejski Fundusz  
Rozwoju Regionalnego







Lodz University of Technology



International Centre for Research on Innovative Biobased Materials - ICRI-BioM  
International Research Agenda

cząsteczek przez ten narząd. Informacje zawarte w tym rozdziale, choć moim zdaniem czasem zbyt podręcznikowe, są wysmienitym wprowadzeniem w zagadnienia badawcze przedstawione w pracy jak i stanowią dobre odniesienie do uzyskanych przez Doktorantkę wyników i ich dyskusji.

W równie obszernym rozdziale dotyczącym metodyki podano procedury postępowania w prowadzonych przez Doktorantkę badaniach. Z uznaniem należy przyjąć szeroki zakres metodologii zastosowanych w planowaniu i analizie ścieżek badawczych, w których dokładnie przedstawiono molekularne sposoby oceny dobieranych szczepów drobnoustrojów, hodowle mikroorganizmów w różnej skali, procesy izolacji i bogatej charakterystyki różnych form lewanu z wykorzystaniem zaawansowanych metod spektroskopowych, mikroskopii elektronowej, konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej i ramanowskiej, termograwimetrii, ocenę toksyczności, zdolności przeciwutleniających, antyrodnikowych i antybakteryjnych badanego biopolimeru i jego zdolność przenikania przez warstwę rogową skóry. Nie wiem, ile z tej listy metodologii Doktorantka wykonywała sama, a na ile była wspierana przez innych, ale na pewno była zaangażowana we wszystkie doświadczenia i analizy, co jest bardzo imponujące.

Kolejno Pani mgr inż. Domżał-Kędzia przystępuje do analizy i dyskusji wyników swoich badań, poczynając od selekcji odpowiedniego szczepu spośród drobnoustrojów znajdujących się w kolekcji Zakładu Biotransformacji oraz spośród szczepów wyizolowanych przez siebie ze środowisk, takich jak przewód pokarmowy dżdżownicy kalifornijskiej, różne rodzaje miodów i melasy. Część szczepów zakupiono w światowych kolekcjach kultur drobnoustrojów. Poprzez określanie cech morfologicznych, biologicznych i genetycznych badanych drobnoustrojów oraz identyfikację wytwarzanego polimeru doktorantka wybrała do dalszych badań najefektywniejszy szczep, którym okazał się *Bacillus subtilis* natto KB1. Wytwarzał on jednak tylko 1,54 g/l lewanu zidentyfikowanego spektroskopią NMR. Z punktu widzenia ekonomiki procesu przemysłowego otrzymywania tego polimeru uważam, że ta wartość musi być znacznie zwiększona.

Zajmując się dalej biosyntezą lewanu przez ten szczep Doktorantka otrzymała w standardowych, dobranych przez siebie warunkach hodowli biopolimer z bimodalnym rozkładem średniej masy molowej, gdzie 4,59 % stanowiła frakcja HMW o masie 2710 kDa, a 95,4% frakcja LMW o masie 11,35 kDa. Wydłużając hodowlę *Bacillus subtilis* natto KB1 do 216 godz. (z 24 godzin) i wytrącając lewan z pofermentu etanolem w stosunku 1:2 v/v uzyskała praktycznie czysty preparat (99,69%) LMW lewanu o masie

3



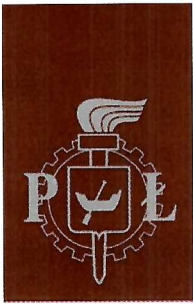
Rzeczpospolita  
Polska



Fundacja na rzecz  
Nauki Polskiej

Unia Europejska  
Europejski Fundusz  
Rozwoju Regionalnego





Lodz University of Technology



International Centre for Research on Innovative Biobased Materials - ICRI-BioM  
International Research Agenda

cząsteczkowej 37.62 kDa. Jakość tego preparatu lewanu określona została przez  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR i FTIR. Badania termogravimetryczne stanowiły dalszą przesłankę wskazującą na niewielką ilość rozgałęzień w tym polimerze, które jak wykazała Doktorantka wpływają na zdolność sorpcji wody przez lewan. Tę zdolność potwierdziła analiza SEM wskazując na rozwiniętą powierzchnię właściwą lewanu, co pozwoliło również Doktorantce wnioskować o przydatności tego polimeru do zatrzymywania wody w skórze. Biorąc pod uwagę te właściwości i potencjalne możliwości wykorzystania lewanu w procesach emulgacji, zagęszczania czy żelowania, należy uznać, że proces biosyntezy i oczyszczania lewanu przez strącanie etanolem pokazany przez Doktorantkę wykazuje istotne parametry technologiczne i otwiera drogę do dalszej optymalizacji z uwzględnieniem dodatkowych czynników molekularnych i inżynierskich. Ten kierunek badawczo-rozwojowy jest mocno uzasadniony przez wykazanie przez mgr inż. Domżał-Kędzia, że lewan wytwarzany przez *B. subtilis* natto KB1 jest nietoksyczny dla komórek ssaczych i ujawnia silne działanie przeciwutleniające, antyrodnikowe jak i przeciwnowotworowe, dlatego może być rozważane jego zastosowanie w różnych dziedzinach biomedycyny.

Usprawnienie procesu technologicznego jest widoczne w dalszych eksperymentach w pracy doktorskiej mgr inż. Domżał-Kędzia, gdy dąży do opracowania na bazie lewanu różnych nanoosłonek z uwzględnieniem wpływu technologii ich otrzymywania na środowisko. Jako źródło lewanu Doktorantka stosowała zarówno wytrącony polimer jak i poferment otrzymując z obu tych źródeł nanocząstki o średnich rozmiarach ok. 220 nm, aczkolwiek o zróżnicowanej strukturze. Podała je badaniom mającym na celu określenie ich użyteczności w kosmetykach, gdyż umożliwiają, jak to oznaczyła, enkapsulację związków hydrofobowych oraz są zdolne do przenikania przez warstwę rogową naskórka nawilżając skórę i mogą ułatwiać w niej transport substancji aktywnych. Dość dużą uwagę Autorka poświęca cieczy pochodzącej z *B. subtilis* natto KB1 zwanej w tym przypadku pofermentem. Wykazuje on właściwości bakterio- i grzybobójcze. Z racji coraz większego komercyjnego zastosowania w kosmetyce pofermentów i przypisywaniu im wielu pozytywnych właściwości, Doktorantka zbadała oddziaływanie składników pofermentu wraz z zawartym w nim lewanem z anionowym środkiem powierzchniowo czynnym i przetestowała jego użyteczność w formułacjach kosmetycznych żeli pod prysznic. Podejrzewając, że efekt pozytywnego działania pofermentu (zmniejszenie efektu drażniącego żelu) wynika z obecności lewanu w jego składzie, zaplanowała

4



Rzeczpospolita  
Polska

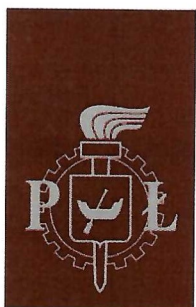


Fundacja na rzecz  
Nauki Polskiej

Unia Europejska  
Europejski Fundusz  
Rozwoju Regionalnego







Lodz University of Technology



International Centre for Research on Innovative Biobased Materials - ICRI-BioM  
International Research Agenda

wprowadzenie nanocząstek z wytrąconego polimeru do matryc kremu, toniku i serum. Po 28 dniach ich stosowania *in vivo* zarówno przebarwienia jak i zmarszczki zostały zredukowane o kilka procent i zwiększyło się nawilżanie skóry na czole i policzkach. Niewiele jest danych dotyczących wprowadzenia lewanu w rozbudowane matryce kosmetyczne. Uzyskane przez panią mgr inż. Domżał-Kędzia wyniki stanowią bardzo dobrą bazę do rozwoju serii nowych produktów kosmetycznych.

Analizując przedstawioną rozprawę doktorską chciałbym wspomnieć o dyskusji wyników. Często jest to część, która jest zaniedbywana w pracach doktorskich lub czyta się ją bardziej jak streszczenie. Pani mgr inż. Domżał-Kędzia starała się uciec od takiego schematu. Omówiła własne wyniki badań, porównała z dostępnym jej *state of the art* w literaturze światowej, pokazała dalsze kierunki badań. Biorąc pod uwagę zakres badań i wielce skomplikowaną zróżnicowaną zależność poszczególnych parametrów procesu od rodzaju drobnoustrojów, kontroli procesu otrzymywania polimeru, obróbki cieczy pochodowlanej, struktury polimeru i jego funkcjonalności, doktorantka poradziła sobie bardzo dobrze. Na podstawie tej dyskusji pani mgr inż. Marta Domżał-Kędzia sformułowała rzeczowe, koherentne i logiczne wnioski, z których ostatni cyt.: „Obecnie powstają kosmetyki z opracowanymi nowymi surowcami” zasługuje na odnotowanie.

Przechodząc do końcowej części mojej recenzji chciałbym podkreślić, że przedstawione wyniki badań ukazują bardzo ważne cele użytkowe z punktu widzenia rozwoju biosyntezy i wykorzystania biopolimerów, a w konsekwencji i biogospodarki. Pani mgr inż. Marta Domżał-Kędzia krytycznie podchodzi do otrzymanych wyników, rozwiązuje swoje szczegółowe cele naukowe czy technologiczne nowoczesnymi metodami. Jestem przekonany, że wprowadzając dalej nową wiedzę z zakresu biosyntezy biopolimerów i ich modyfikacji zwiększy efektywność proponowanych przez siebie rozwiązań. Jak już wspomniałem praca doktorska mgr inż. Marty Domżał-Kędzia jest napisana, mimo swej objętości w sposób komunikatywny. Wymaga tylko korekty edytorskiej, doprecyzowania lub poprawy niektórych sformułowań, jak np. „ferment”, „klaster polimerów”, „własności”. Niektóre z tabel i rysunków wymagają bardziej rozszerzonej i komunikatywnej legendy czy zmiany odnośnika literaturowego, jak rys 13. Te drobne uwagi w żaden sposób nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną niniejszej pracy. Natomiast czytając pracę i analizując nowatorskie wyniki

5



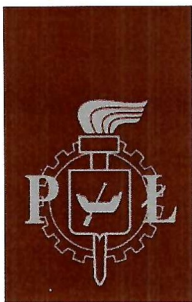
Rzeczpospolita  
Polska



Fundacja na rzecz  
Nauki Polskiej

Unia Europejska  
Europejski Fundusz  
Rozwoju Regionalnego





Lodz University of Technology



International Centre for Research on Innovative Biobased Materials - ICRI-BioM  
International Research Agenda

przedstawione przez Autorkę, zastanawiałem się po co Bacillusowi ten lewan. Ciekawi mnie komentarz Doktorantki w tej kwestii.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną, jakość i zakres wykonanych doświadczeń, przedstawioną do recenzji rozprawę oceniam bardzo wysoko. Uważam, iż przedstawiona rozprawa doktorska jest oryginalnym i interdyscyplinarnym opracowaniem naukowym, o dużym aspekcie użytkowym, a uzyskane wyniki znacząco poszerzają wiedzę w dyscyplinie nauki biologiczne. Doktorantka wykazała umiejętności planowania badań i samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Marty Domżał-Kędzia „Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie biopolimeru syntetyzowanego przez *Bacillus subtilis*” spełnia wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Spełnia też wymogi zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne, Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr inż. Marty Domżał-Kędzia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne, Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Domżał-Kędzia. Zgodnie z powyższą moją opinią podtrzymuję, że praca wyróżnia się szerokim zakresem przeprowadzonych prac, zawiera wiele nowatorskich elementów i stanowi istotny wkład w rozwój metod biotechnologicznego pozyskiwania biopolimeru lewanu oraz poszerza możliwości aplikacyjne tego polimeru.

  
Stanisław Bielecki