



Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa



prof. dr hab. inż. Marcin Sobczak

Tel: (+48 22) 57 20 784; E-mail: marcin.sobczak@wum.edu.pl

Warszawa, dn. 28.03.2023 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Marty Domżał-Kędzia pt. "Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie biopolimeru syntetyzowanego przez *Bacillus subtilis*"

Pomimo dużego postępu dokonującego się w zakresie chemii polimerów opracowywanie nowych metod syntezy związków wielkocząsteczkowych jest aktualnie jednym z najważniejszych kierunków badawczych szeroko rozumianej biotechnologii, chemii i farmacji. Szczególnie interesujące są rozwiązania dotyczące biopolimerów syntetyzowanych przez mikroorganizmy. W celu zapewnienia maksymalnego bezpieczeństwa stosowania biopolimerów pochodzenia mikrobiologicznego, najlepszym rozwiązaniem jest zastosowanie do ich produkcji organizmów nieszkodliwych dla człowieka oraz środowiska naturalnego.

Przedstawiona do oceny praca doktorska pt. "Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie biopolimeru syntetyzowanego przez *Bacillus subtilis*" wykonana przez Panią mgr Martę Domżał-Kędzia (pod opieką prof. dr hab. inż. Marcina Łukaszewicza oraz dr Agnieszki Lewińskiej) bardzo dobrze wpisuje się w aktualne trendy badań nad metodami biosyntezy związków wielkocząsteczkowych.

Jako główny cel pracy badawczej Doktorantka postawiła sobie opracowanie metody otrzymywania lewanu z wykorzystaniem probiotycznych, bezpiecznych bakterii *B. subtilis*, zbadanie jego właściwości fizykochemicznych i biologicznych oraz określenie jego możliwości aplikacyjnych.

W części literaturowej pracy, Autorka przedstawiła w sposób bardzo syntetyczny najważniejsze informacje dotyczące polimerów syntetycznych, półsyntetycznych i naturalnych ze szczególnym uwzględnieniem polimerów biodegradowalnych. Przedstawiła klasyfikację, strukturę oraz źródła pochodzenia poszczególnych związków wielkocząsteczkowych. Doktorantka szczególnie dużo miejsca poświęciła polimerom pochodzenia roślinnego

i zwierzęcego. Przedstawiła m.in. charakterystykę celulozy, skrobi, ligniny, kolagenu, chityny, chitozanu i kwasu hialuronowego. W kolejnym rozdziale mgr Marta Domżał-Kędzia opisała biopolimery pochodzenia mikrobiologicznego (dekstran, pullulan, polihydroksyalkanolany). W rozdziale nr 6 Doktorantka przedstawiła charakterystykę bakterii Gram-dodatniej *B. subtilis* wykorzystywaną w części eksperymentalnej niniejszej pracy doktorskiej. Omówiła m.in. jej rozpowszechnienie, zdolność do tworzenia form przetrwalnikowych oraz wykorzystanie w technologii otrzymywania enzymów, biosurfaktantów, witamin, antybiotyków oraz innych grup związków stosowanych m.in. w przemyśle rolno-spożywczym, farmaceutycznym oraz chemii gospodarczej i kosmetyków. W kolejnym rozdziale Autorka opisała budowę, pochodzenie, metody i warunki biosyntezy oraz mikrobiologiczne metody otrzymywania, właściwości i zastosowanie lewanu. Ostatni rozdział części literaturowej Doktorantka poświęciła wykorzystaniu biopolimerów w technologii postaci leku (głównie transdermalnej) ze szczególnym uwzględnieniem lewanu. Opisała budowę ludzkiej skóry oraz mechanizmy transportu substancji aktywnych przez wspomniany narząd.

Oceniając tę część dysertacji uważam, że Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną, umiejętnością prawidłowego doboru źródeł literaturowych i selekcji informacji. Magister Marta Domżał-Kędzia bardzo umiejętnie uzasadniła konieczność podjęcia badań stanowiących przedmiot ocenianej rozprawy doktorskiej.

W pracy badawczej Doktorantka zdefiniowała następujące cele szczegółowe:

- a) dokonanie selekcji szczepów – poszukiwanie szczepów syntetyzujących lewan,
- b) opracowanie metody biosyntezy polimeru i optymalizacja wspomnianego procesu,
- c) wyznaczenie średniej masy molowej, struktury oraz zbadanie właściwości fizykochemicznych otrzymanego lewanu,
- d) ocena właściwości biologicznych oraz określenie bezpieczeństwa stosowania biopolimeru w warunkach *in vitro*,
- e) zbadanie właściwości aplikacyjnych zsyntetyzowanego lewanu.

W pierwszej części pracy badawczej Doktorantka przeprowadziła analizę szczepów zdolnych do syntezy lewanu. Łącznie potwierdziła tę zdolność u 25 z 45 badanych szczepów (w tym 9 zapewniających wysoką wydajność procesu). Najefektywniejszym szczepem okazał się *B. subtilis* natto KB1 i ten właśnie szczep został wykorzystany przez Autorkę w dalszych badaniach. Sekwencjonowanie genomu tego szczepu wykazało obecność genów warunkujących syntezę wielu interesujących metabolitów, tj. kwasu poli- γ -glutaminowego, α -glukanu, proteazy, lipazy, amylazy, ksylanazy, celulazy czy fitazy.

W kolejnym etapie, mgr Marta Domżał-Kędzia przeprowadziła biosyntezę lewanu. Autorka stwierdziła, że otrzymany biopolimer charakteryzował się bimodalnym rozkładem średniej masy molowej. Wydłużenie czasu hodowli oraz stopniowe wytrącanie lewanu z pofermentu wraz ze wzrastającym stężeniem etanolu umożliwiło otrzymanie frakcji biopolimeru wysokiej



czystości (99,69%) charakteryzującej się średnią masą cząsteczkową rzędu 37,62 kDa (LMW). Struktura lewanu została potwierdzona przy wykorzystaniu metod spektroskopowych (spektroskopii ^1H i ^{13}C NMR oraz FTIR). Dodatkowo zastosowana analiza termogravimetryczna potwierdziła obecność niewielkiej ilości rozgałęzień w makrocząsteczkach biopolimeru. Ponadto analiza metodą skaningowej mikroskopii elektronowej wykazała, że agregaty lewanu mają rozwiniętą powierzchnię właściwą i w związku z tym, może on adsorbować różne jony i związki chemiczne. Doktorantka wykonując dalsze eksperymenty wykazała różnice pomiędzy zdolnością sorpcji wody przez lewan LMW otrzymany z *B. subtilis* natto KB1 ($99,3 \pm 0,4\%$) i lewan otrzymany z *E. herbicola* ($1498,3 \pm 38,9\%$). Stwierdziła, że różnica ta prawdopodobnie wynika ze stopnia rozgałęzienia łańcuchów zsyntetyzowanego polimeru.

W dalszej części pracy eksperymentalnej, mgr Marta Domżał-Kędzia oceniła bezpieczeństwo lewanu w hodowlach *in vitro* ludzkich fibroblastów oraz keratynocytów. Przeprowadziła również badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych i przeciwutleniających lewanu. Stwierdziła, że badany biopolimer nie wykazał działania toksycznego wobec wybranych linii komórkowych w zakresie stężeń 0,98–1000 $\mu\text{g/ml}$. Zaobserwowała zdecydowane różnice w hamowaniu procesu utleniania. Biopolimer LMW dezaktywował ponad 42% rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylo-hydrazylowego), podczas gdy lewan otrzymany z *E. herbicola* nie wykazał tej aktywności. Ponadto nie wykazano toksycznego działania otrzymanych lewanów względem dwóch linii nowotworowych Hs 294t i A375 (w zakresie stężeń 0,98–1000 $\mu\text{g/ml}$).

W kolejnym etapie badań, Doktorantka otrzymała nanocząstki lewanu z wykorzystaniem dwóch metod (również w skali przemysłowej): 1) nanostruktur lewanu z wcześniej wytraconego polimeru i 2) z uzyskanego pofermentu. Okazało się, że niezależnie od zastosowanej metody otrzymane nanocząstki charakteryzowały się średnią wielkością ok. 220 nm. Z kolei analiza metodą transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazała różnice w powierzchni otrzymanych nanocząstek. Prawdopodobnie wynikały one ze sposobu otrzymywania lewanu. Magister Marta Domżał-Kędzia wykazała, że niezależnie od zastosowanej metody otrzymywane nanocząstki lewanu umożliwiają enkapsulację związków hydrofobowych oraz są one zdolne do przenikania przez warstwę rogową naskórka i wpływają pozytywnie na nawilżenie skóry.

W dalszej etapie, poferment z *B. subtilis* natto KB1 z nanocząstkami lewanu poddano badaniom pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej i wykazano pozytywne działanie bójcze względem bakterii i grzybów oraz działanie przeciwadhezyjne i redukujące biofilm. Doktorantka zbadała również interakcje pomiędzy anionowym środkiem powierzchniowo czynnym a lewanem w pofermencie. Następnie, poferment z lewanem otrzymany z *B. subtilis* natto KB1 wykorzystano do przygotowania prototypowych żeli pod prysznic.



Autorka stwierdziła, że jego dodatek spowodował znaczne zmniejszenie negatywnego wpływu gotowego produktu na skórę. Zaobserwowano spadek liczby zeinowej, która jest wskaźnikiem drażniącego potencjału oraz zmniejszenie zdolności emulgujących substancji hydrofobowych o 40%. Nanocząstki otrzymane z wytrąconego polimeru wprowadzono do matryc kosmetyków (kremu, toniku i serum), a następnie uzyskane formułacje poddano badaniom w warunkach *in vivo*. Po 28 dniach stosowania, przebarwienia na skórze zostały zredukowane o 4,8%, zmarszczki o 5,1% oraz zwiększyło się nawilżenie skóry w strefie T (czoło) i U (policzki) o odpowiednio o 9,8% i 10,8%.

W ostatniej części dysertacji, Doktorantka na podstawie krytycznej dyskusji sformułowała spójne, wyważone i logiczne wnioski.

Reasumując, dysertacja została zredagowana w sposób bardzo staranny. Pracę czyta się dobrze. Układ treści jest logiczny i spójny. Zakres pracy doktorskiej jest bardzo obszerny. Niewątpliwie, jest to bardzo duże osiągnięcie Doktorantki.

Magister Martę Domżał-Kędzia przeprowadziła dużą liczbę syntez, badań strukturalnych, fizykochemicznych, analitycznych i biologicznych, co jest dowodem wysokich kwalifikacji i dużego doświadczenia Doktorantki. Wszystkie dane eksperymentalne zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny i prawidłowo zinterpretowane. Wszystkie wyniki zostały logicznie skomentowane w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy. Autorka dokonała prawidłowej interpretacji dużej liczby danych eksperymentalnych, co świadczy o Jej biegłej znajomości zastosowanych metod i technik badawczych.

Na uwagę zasługuje również fakt, że część wyników uzyskanych w ramach pracy doktorskiej jest przedmiotem kilku opublikowanych artykułów:

- **Domżał-Kędzia M.**, Lewińska A., Jaromin A., Weselski M., Pluskota R., Łukaszewicz M., *Fermentation parameters and conditions affecting levan production and its potential applications in cosmetics*, Bioorganic Chemistry, Volume 93, 2019, <http://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.012>.
- Lewińska A., **Domżał-Kędzia M.**, Kierul K., Bochynek M., Pannert D., Nowaczyk P., Łukaszewicz M., *Targeted Hybrid Nanocarriers as a System Enhancing the Skin Structure*, Molecules 26, no. 4: 1063, 2021, <https://doi.org/10.3390/molecules26041063>.
- Wasilewski T., Seweryn A., Pannert D., Kierul K., **Domżał-Kędzia M.**, Hordyjewicz-Baran Z., Łukaszewicz M., Lewińska A. *Application of Levan-Rich Digestate Extract in the Production of Safe-to-Use and Functional Natural Body Wash Cosmetics*, Molecules 27, no. 9: 2793, 2022, <https://doi.org/10.3390/molecules27092793>.



- Lewińska A., Domżał-Kędzia M., Łukaszewicz M. *Self-assembly levan, as a natural active bio-nanocarrier*, Sustainable Chemistry and Pharmacy, Volume 31,100936, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100936>.

Z obowiązku recenzenta mam kilka drobny uwag formalnych. Autorka redagując bardzo obszerny materiał nie ustrzegła się drobnych błędów nomenklaturowych i edytorskich oraz niezręcznych sformułowań. Przykładowe uwagi:

- Sformułowanie „nanocząsteczki” powinno zostać zastąpione określeniem „nanocząstki”;
- Sformułowanie „własności” powinno zostać zastąpione określeniem „właściwości”;
- W przypadku polimerów należy używać pojęcia średnia masa cząsteczkowa/średnia masa molowa.

Chciałem podkreślić, że wyżej wymienione drobne uchybienia nie wpływają na bardzo wysoką wartość merytoryczną niniejszej pracy.

Prosiłbym Doktorantkę o komentarz/informację dotyczący/cą następujących kwestii:

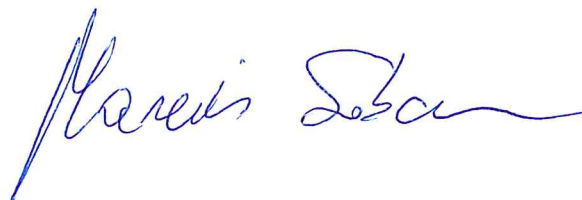
- 1) Jaką dyspersyjnością średniej masy molowej charakteryzowały się zsyntetyzowane biopolimery?
- 2) Jaka była wydajność procesu biosyntezy lewanu z wykorzystaniem *B. subtilis* natto KB1?
- 3) Czy dokonano podziału probantów na grupy uwzględniając wiek i płeć w przeprowadzonych testach aplikacyjnych? Czy wprowadzono warunki ograniczające dla probantów (np. typ skóry, brak schorzeń itp.)
- 4) Jakie są perspektywy zastosowania nanocząstek z lewanu w medycynie i farmacji?

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Marty Domżał-Kędzia jest wartościowym, oryginalnym i interdyscyplinarnym opracowaniem naukowym. Uważam, że uzyskane wyniki badań wzbogacają wiedzę w dyscyplinie nauki biologiczne. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i wykonywania eksperymentów, interpretowania i krytycznej dyskusji wyników badań oraz formułowania logicznych wniosków.

Reasumując z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Marty Domżał-Kędzia pt. *"Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie biopolimeru syntetyzowanego przez Bacillus subtilis"* z nadmiarem spełnia wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscyplin Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Marty Domżał-Kędzia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy, wartościowy materiał badawczy, charakter aplikacyjny pracy oraz fakt, że wyniki badań zostały opublikowane w formie czterech publikacji, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnieniu rozprawy doktorskiej mgr Marty Domżał-Kędzia.

A handwritten signature in blue ink, reading "Marek Soban". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.