



Lodz University of Technology



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

ICRI-BioM

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 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



Fundusze
Europejskie
Inteligentny Rozwój



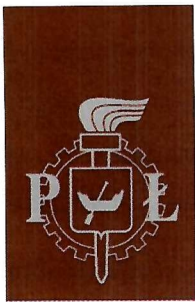
Rzeczpospolita
Polska



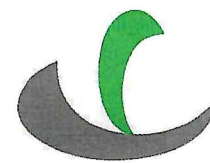
Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej

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. Drobnustrój ten wytwarza lewan - biopolimer składający się z jednostek D – fruktofuranozy, połączonych wiązaniami β -(2,6) – glikozydowymi w łańcuchach głównych oraz β -(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 część 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 cząsteczek



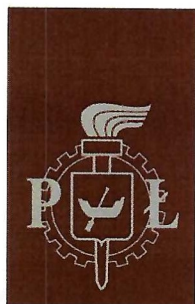
Rzeczpospolita
Polska



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

przez ten narząd. Informacje zawarte w tym rozdziale, choć moim zdaniem czasem zbyt podręcznikowe, są wyśmienitym 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, termogravimetrii, 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 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 2710kDa, a 95,4% frakcja LMW o masie 11,35 kD. Wydłużając hodowlę *Bacillus subtilis* natto KB1 do 216 godz (z 24 godzin) i wytrącając lewan z pofermentu etanolem w



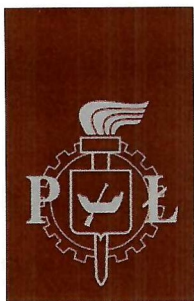
Rzeczpospolita
Polska



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

stosunku 1:2v/v uzyskała praktycznie czysty preparat (99,69%) LMW lewanu o masie cząsteczkowej 37.62kDa. Jakość tego preparatu lewanu określona została przez ^1H i ^{13}C NMR i FTIR. Bдания termograwimetryczne 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 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 Domżał-Kędzia, gdy dąży do opracowania na bazie lewanu różnych nanonośników 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. 220nm, 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 formulacjach kosmetycznych żeli pod prysznic. Podejrzewając, że efekt



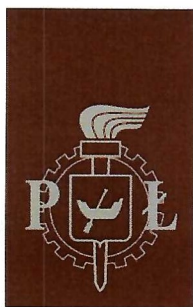
Rzeczpospolita
Polska



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

pozytywnego działania pofermentu (zmniejszenie efektu drażniącego żelu) wynika z obecności lewanu w jego składzie, zaplanowała 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 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 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 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 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 Marty Domżał-Kędzia jest napisana, mimo swej objętości w sposób komunikatywny. Wymaga tylko korekty edytorskiej, doprecyzowania lub poprawy niektórych sformułowań, jak np. „ferment”, „klastery polimerów”, „własności”. Niektóre z tabel i rysunków wymagają bardziej rozszerzonej i komunikatywnej legendy, czy zmiany odnośnika literaturowego, jak rys 13.



Rzeczpospolita
Polska



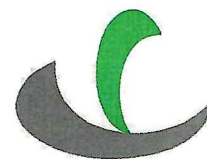
Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej

Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego





Lodz University of Technology



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

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 w dyscyplinie nauki biologiczne. Doktorantka wykazała umiejętności planowania badań i samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca doktorska mgr Marty Domżał-Kędzia „Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie biopolimeru syntetyzowanego

przez *Bacillus subtilis*” spełnia wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018r. - 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 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. 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



Rzeczpospolita
Polska



Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej

Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego

