

Bydgoszcz, 28 grudnia 2023

dr hab. inż. Aleksandra Dunisławska, prof. PBŚ
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Politechnika Bydgoska im. J. J. Śniadeckich

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Michała Brody

pt. „Proces wytwarzania celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem medium produkcyjnego na bazie ziemniaków oraz analiza możliwości wykorzystania uzyskanego biomateriału”

Podstawę przygotowania recenzji stanowi pismo dr hab. inż. Małgorzaty Ożgo, prof. ZUT - Przewodniczącej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 26. października 2023 roku (WBiHZ/RDZiR/159/2023).

Praca doktorska Pana mgr inż. Michała Brody została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie pod kierunkiem promotora - dr hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT oraz promotora pomocniczego - dr inż. Anny Żywickiej. Ponadto niniejsza praca finansowana była ze środków budżetu państwa w ramach III edycji programu Ministra Edukacji i Nauki „Doktorat Wdrożeniowy”. Postępowanie w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora realizowane jest w dyscyplinie *zootechnika i rybactwo*.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska przygotowana została w formie monografii naukowej, na którą składa się trzynaście numerowanych rozdziałów, w skład której, prócz omówienia przedmiotowego, wchodzi również wykaz dorobku naukowego. Kandydat do stopnia naukowego doktora dokonał wnikliwego i szczegółowego przeglądu piśmiennictwa, o czym

doskonale świadczy 35-stronicowy rozdział zawarty w monografii. Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Michała Brody stanowi oryginalne rozwiązanie w zakresie opracowania sposobu wytwarzania celulozy bakteryjnej w oparciu o medium wytworzone na bazie soku z ziemniaków oraz charakterystyki otrzymanego produktu. Sformułowanych zostało siedem hipotez, cel badawczy oraz siedem celów szczegółowych. Za główny cel doktorant postawił opracowanie sposobu wykorzystania celulozy bakteryjnej w hodowli *Komagataeibacter xylinus* prowadzonych z wykorzystaniem pożywki na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków, w tym jako odpadu z przemysłu krochmalniczego, z przeznaczeniem między innymi jako nośnik do immobilizacji drobnoustrojów probiotycznych stosowanych w hodowli zwierząt oraz jako czynnik żelujący w podłożach do hodowli tkankowych roślin *in vitro*. Cele szczegółowe to przede wszystkim: opracowanie sposobu przygotowania pożywki na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaka jako odpadu z przemysłu krochmalniczego, ocena możliwości zastosowania opracowanej pożywki do wytwarzania celulozy bakteryjnej, wytypowanie odmiany ziemniaka dedykowanego do przygotowania pożywki, analiza właściwości fizykochemicznych celulozy bakteryjnej wytworzonej w oparciu o wyżej wspomnianą pożywkę, ocena otrzymanej celulozy bakteryjnej, a także zmiana czynnika żelującego w pożywkach stosowanych w laboratorium komercyjnym roślinnych kultur tkankowych *in vitro*. Tak zaproponowane cele składają się na spójny układ doświadczenia z kompleksową analizą planowanych przedsięwzięć.

Jak podkreśla autor, standardowo stosowana pożywka w hodowli mikroorganizmów syntetyzujących celulozę wpływa na znaczną kosztochłonność procesu (65% całkowitych wydatków w procesach fermentacyjnych). Fakt ten pozostaje nie bez znaczenia dla finalnego kosztu biomateriału. W tym kontekście kluczowe wydaje się opracowanie tańszej oraz równie efektywnej pożywki do procesu biosyntezy celulozy bakteryjnej. Ponadto bazując na obecnym stanie wiedzy oraz założeniach w zakresie gospodarowania materiałem odpadowym w myśl ekologicznych przemian gospodarczych, niezwykle korzystne jest zastosowanie odpadów przemysłowych. Zamysł połączenia technologii wytwarzania celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem surowców stanowiących przemysłowe produkty uboczne jest niezwykle istotny dla społeczeństwa, jak i szeroko pielęgnowanej w ostatnich latach myśli ekologicznej. Zastosowanie przemysłowe ziemniaka związane jest przede wszystkim z produkcją skrobi, czego produktem ubocznym jest sok komórkowy uwalniany z bulw w trakcie oddzielania miazgi ziemniaczanej przy zastosowaniu wirówek. Produkt ten w procesie utylizacji jest technologicznie

wymagający, natomiast wytwórcy odpadów w świetle obowiązujących przepisów zobowiązani są do znalezienia alternatywnych metod zagospodarowania odpadów przemysłu skrobiowego.

Sam przedmiot badań, którego dotyczy rozprawa, czyli celuloza bakteryjna jest biomateriałem wzbudzającym coraz większe zainteresowanie w wielu gałęziach przemysłu ze względu na charakterystyczne i unikalne właściwości. Liczne doniesienia naukowe wskazują na szerokie możliwości zastosowania celulozy bakteryjnej między innymi jako nośnika do immobilizacji w procesach biotechnologicznych, a także w medycynie i weterynarii. Ograniczeniem zastosowania tego bionanomateriału jest jego dostępność, a także wysokie koszty produkcji, wynikające przede wszystkim z wcześniej wskazanego kosztu wytworzenia pożywki hodowlanej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zakłada opracowanie metodyki produkcji celulozy bakteryjnej ze szczególnym naciskiem na opracowanie składu pożywki hodowlanej, warunków i czasu trwania biosyntezy oraz wykorzystywanego szczepu bakterii. Autor założył, że dzięki zastosowaniu pożywki wytworzonej z wykorzystaniem soku komórkowego z bulw ziemniaka, bogatego w składniki odżywcze, możliwe będzie wytworzenie celulozy bakteryjnej przy znacznie niższym nakładzie finansowym w porównaniu do standardowych pożywek wykorzystywanych w produkcji celulozy bakteryjnej. Co istotne, podjęta została próba wytypowania odmiany ziemniaka przeznaczonego do produkcji celulozy bakteryjnej oraz wskazania cech charakterystycznych dla danej odmiany. W kontekście badań kluczowych dla rozwoju dyscypliny zootechnika i rybactwo niezmiernie istotne wydaje się być poruszane zagadnienie dotyczące wykorzystania uzyskanego biomateriału jako nośnika do immobilizacji mikroorganizmów, w tym przede wszystkim bakterii probiotycznych wykorzystywanych w produkcji zwierzęcej. Jako mierzalny rezultat wdrożeniowy realizacji badań wskazano zmianę pożywki stosowanej w przedsiębiorstwie PMHZ Strzekęcín wykorzystywanej do namnażania roślin w warunkach *in vitro* na pożywkę celulozową.

W rozdziale materiały i metody dokładnie opisano proces doboru i pozyskiwania ziemniaków, wskazując również pełną charakterystykę odmian. Autor wskazuje iż sok komórkowy jako odpad poprodukcyjny uzyskano z dwóch krochmalni. Do samego procesu produkcji celulozy bakteryjnej wykorzystano referencyjne szczepy bakterii pochodzące z banku ATCC. Do hodowli *in vitro* zastosowano nasiona ogórka, pomidora, buraka, arbuza, a także ziemniaka, natomiast w procesie roślinnych kultur tkankowych wykorzystano trzy odmiany roślin (ziemniaków) pochodzące z Banku Genów Ziemniaka *in vitro* w Boninie. Szczegółowo opisano również sam

proces przygotowania pożywek mikrobiologicznych, a jako dużą zaletę opracowania należy wskazać bogate opracowania graficzne. Wytworzoną celulozę bakteryjną poddano pełnej charakterystyce tj. zdolność do pochłaniania cieczy, spektroskopia w podczerwieni, stopień polimeryzacji, analiza mikrostruktury oraz określenie stopnia cytotoksyczności. Finalnie dokonano oceny ilościowej oraz określenia żywotności komórek bakterii *Komagataeibacter xylinus* podczas wytwarzania celulozy bakteryjnej, tj. analiza możliwości wytworzenia celulozy bakteryjnej jako nośnika do immobilizacji bakterii probiotycznych, wizualizacja rozmieszczenia komórek na powierzchni i wewnątrz celulozy bakteryjnej po procesie immobilizacji, analiza wpływu symulowanego soku żołądkowego i soli żółci na immobilizowane bakterie *Lactobacillus*, zakładanie i prowadzenie hodowli *in vitro* różnych odmian roślin oraz hodowli ziemniaków *in vitro*.

Z ciekawości własnej, jak i wynikającej z obowiązków recenzenta moje główne pytanie dotyczy możliwości zastosowania i praktycznego wdrożenia wykorzystania wytworzonej celulozy bakteryjnej jako nośnika dla bakterii probiotycznych w produkcji zwierzęcej, w której możliwości bezpośredniego podania preparatu probiotycznego są ograniczone. Jaką drogą możliwe byłoby podanie preparatu w produkcji zwierzęcej? Czy podaż probiotyku musiałaby odbywać się w sposób bezpośredni? Jak sam autor podaje, w celu unieruchomienia substancji probiotycznej wewnątrz nośnika stosuje się hydrożelowe kapsułki. Jak wiadomo, podawanie doustne preparatów probiotycznych cechuje się trudnościami natury fizjologicznej, tj. możliwości zachowania żywotności bakterii w obecności soków trawiennych czy też narażenie na uszkodzenia. Jednak czy przy analizach uwzględniono również środowisko bytowania zwierzęcia? Czy właściwości wytworzonej celulozy bakteryjnej pozwalają na dłuższy okres przechowywania (co może być kluczowe dla producentów)?

Autor rozprawy powołuje się na liczne pozycje piśmiennicze. Świadczy o tym również rozdział piśmiennictwo, na który składa się 330 pozycji literatury naukowej, przede wszystkim anglojęzycznej w renomowanych czasopismach naukowych. Językowo, praca napisana jest w sposób klarowny i zrozumiały. Składnia oraz stylistyka są bardzo dobre, w efekcie pracę bardzo dobrze się czyta, ponieważ zasadniczo nie ma żadnych błędów utrudniających percepcję. Zdarzają się nieliczne błędy interpunkcyjne oraz leksykalne. Za przykład podaję kwestię dotyczącą zastosowania słowa *metodologia* (strona 11) w sformułowaniu „opracowanie pełnej metodologii produkcji celulozy bakteryjnej” – metodologia w myśl definicji jest nauką o metodach badań naukowych, stąd bardziej właściwe byłoby określenie „metodyka produkcji CB”. Niemniej jednak prawidłowe określenie „metodyka” zastosowane jest wielokrotnie w opisie wyników i dyskusji.

Sposób przygotowania rozprawy doktorskiej, rozmach w planowaniu analiz, a także szeroki wachlarz wykonanych prac świadczy o dużej dojrzałości naukowej i koncepcyjnej doktoranta, a także o bardzo dobrej współpracy z promotorami.

Za najważniejszy merytoryczny aspekt pracy można uznać fakt, iż dowiedziono, że sok komórkowy z bulw ziemniaków stanowiący odpad z przemysłu krochmalniczego stanowi dobrą pożywkę produkcyjną do efektywnego wytwarzania celulozy bakteryjnej, a otrzymywane wartości w produkcji biomateriału porównywalne są do produkcji z zastosowaniem konwencjonalnych pożywek hodowlanych. Co istotne, wykorzystanie soku z ziemniaka znacznie redukuje koszt pożywki produkcyjnej, przy równoczesnym zagospodarowaniu produktów odpadowych poprodukcyjnych. Pożywka na bazie soku z bulw ziemniaka pozwala również na otrzymanie dobrego uzysku celulozy bakteryjnej. Wskazano również, że właściwości fizykochemiczne celulozy bakteryjnej zależne są od zastosowanej odmiany i cech ziemniaka z której pozyskano sok, co jest cenną wiedzą w kontekście dalszych prac wdrożeniowych. Jako najważniejszy aspekt praktyczny należy wskazać, że wytworzona celuloza bakteryjna stanowi dobry nośnik do immobilizacji drobnoustrojów probiotycznych, a także dobrą alternatywę dla powszechnie używanego agaru w laboratorium roślinnych kultur tkankowych *in vitro*. Wiedza ta stanowi bez wątpienia cenny wkład w rozwój nauk rolniczych.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano wartościowe wyniki zarówno w kontekście poznawczym, jak i wdrożeniowym. Przeprowadzona została wnikliwa i rzeczowa dyskusję poparta solidnymi fundamentami w postaci przeglądu najnowszego piśmiennictwa. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska tworzy odpowiednio zaprojektowaną oraz kompleksowo zrealizowaną pracę badawczą. Poruszony problem badawczy jest niezwykle istotny w kontekście zagospodarowania odpadów poprodukcyjnych w myśl inicjatywy Europejskiego Zielonego Ładu, opracowywania tanich i efektywnych metod wytwarzania biomateriałów, a finalnie możliwości ich zastosowania praktycznego w rolnictwie i produkcji zwierzęcej. Wszystkie zdefiniowane tezy badawcze niniejszej pracy są mocno osadzone w literaturze światowej, a także w aktualnych trendach w zakresie nauk rolniczych.

W świetle przytoczonych argumentów stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr inż. Michała Brody pt. **„Proces wytwarzania celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem medium produkcyjnego na bazie ziemniaków oraz analiza**

możliwości wykorzystania uzyskanego biomateriału” spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. 2022 poz. 574 z późn. zm.)

Na podstawie przedłożonej rozprawy doktorskiej można stwierdzić jednoznacznie, iż zgodnie z **art. 187, pkt 1.** Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata do stopnia doktora w dyscyplinie zootechnika i rybactwo oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia prac naukowych; **pkt 2.** Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a także oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej; **pkt 3.** Rozprawę doktorską stanowi praca pisemna w formie monografii naukowej; **pkt 4.** Do rozprawy doktorskiej dołączono streszczenie w języku angielskim.

Tym samym wnoszę o dopuszczenie Pana mgr inż. Michała Brodę do dalszych etapów w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Równocześnie z uwagi na wskazane w tej recenzji walory pracy w zakresie poznawczym jak i aplikacyjnym, wnioskuję do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Michała Brody.

28.12.2023
Aleksandra
Duminauskę