



Olsztyn, dnia 19 grudnia 2023 roku

Dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. uczelni
Katedra Mikrobiologii i Mykologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 1A
10-719 Olsztyn

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra Michała Brody

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

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgra Michała Brody pt. „Proces wytwarzania celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem medium produkcyjnego na bazie ziemniaków oraz analiza możliwości wykorzystania uzyskanego biomateriału” została wykonana w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie pod opieką naukową Pana dra hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT oraz dr inż. Anny Żywickiej (promotor pomocniczej). Rozprawa doktorska była finansowana ze środków budżetu państwa w ramach III edycji programu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Doktorat wdrożeniowy”. Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo z dnia 26 października 2023 roku Pani dr hab. inż. Małgorzaty Ożgo, prof. ZUT, Przewodniczącej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo.

1. Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska liczy 215 stron. Składa się z 13 rozdziałów typowych dla prac o charakterze eksperymentalnym: Streszczenia (w języku polskim oraz angielskim), Wstępu, Przeglądu Piśmiennictwa, Hipotez, Celu pracy, Materiałów i Metod, Wyników i Dyskusji, Wniosków, Piśmiennictwa, Spisu tabel i rycin. Literatura wykorzystana do przygotowania dysertacji jest ściśle związana z tematyką rozprawy i obejmuje pozycje opublikowane głównie w ostatnich latach. Przegląd literatury uważam za wartościowy. W moim odczuciu brakuje wykazu zastosowanych skrótów co znacznie ułatwiłoby czytanie przygotowanej monografii.

Rozprawa doktorska przygotowana przez Pana mgra Michała Brodę ma charakter wdrożeniowy oraz prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

2. Ocena zasadności wyboru tematu rozprawy doktorskiej

Tematyka rozprawy doktorskiej Pana mgra Michała Brody dotyczy opracowania taniego sposobu wytwarzania celulozy bakteryjnej w hodowlach *Komagataeibacter xylinus* z wykorzystaniem pożywki na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków, w tym jako odpadu z przemysłu krochmalniczego. Wyprodukowany biomateriał został poddany ocenie możliwości jego zastosowania w przemyśle w formie nośnika do immobilizacji bakterii probiotycznych oraz jako czynnika żelującego w podłożach do hodowli tkankowych roślin *in vitro*.

Ze względu na unikalne właściwości celuloza bakteryjna wzbudza duże zainteresowanie nie tylko badaczy, ale również przedstawicieli przemysłu. Z uwagi na wysokie koszty mikrobiologicznej produkcji tego biopolimeru nadal są prowadzone intensywne prace badawcze nad opracowywaniem i doskonaleniem warunków technologicznych. Uzasadnionym wydaje się wykorzystanie do produkcji celulozy bakteryjnej takich składników pożywki hodowlanej, których cena będzie gwarantować opłacalność procesu. Tematyka przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest więc związana z niezwykle ważnym zagadnieniem poszukiwania produktów odpadowych gwarantujących efektywną produkcję celulozy bakteryjnej.

Ponadto, nadal poszukuje się odpowiedniego biomateriału w celu poprawy efektywności działania preparatów probiotycznych. Mikroorganizmy probiotyczne przechodząc przez układ pokarmowy mogą ulec uszkodzeniu, a tym samym ich pożądana żywotność obniża się w obecności soków trawiennych w żołądku czy też żółci w jelitach. Ze względu na nietoksyczność, łatwość obróbki, odporność na zmiany pH środowiska celuloza bakteryjna może być nośnikiem/matrycą dla bakterii probiotycznych.

Dodatkowo, produkcja ziemniaków w laboratorium kultur tkankowych daje możliwość rozmnażania ziemniaków wolnych od chorób oraz szkodników, w tym hodowli zachowawczej. Do hodowli tkankowych roślin powszechnie stosuje się agar jako środek żelujący. Jednakże z uwagi na wysokie koszty jak również stosunkowo łatwą degradowalność przez mikroorganizmy istnieje potrzeba opracowania substytutów o lepszych właściwościach, a także takich, których wykorzystanie będzie uzasadnione ekonomicznie. Biorąc pod uwagę wysoką czystość chemiczną, stabilność w różnych warunkach fizykochemicznych czy też porowatość, celuloza bakteryjna jest obiecującym biomateriałem do zastosowania jako substancja żelująca w hodowlach roślin *in vitro*.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że wybór tematu przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest uzasadniony, aktualny oraz dotyczy oryginalnego rozwiązania problemu naukowego,

w tym w zakresie zastosowania otrzymanych wyników badań w sferze gospodarczej. Postawiony cel naukowy odpowiada poziomowi jakim powinna odznaczać się rozprawa doktorska.

3. Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Tytuł przedłożonej rozprawy doktorskiej sformułowany przez Doktoranta odzwierciedla zakres prowadzonych przez niego prac badawczych.

Streszczenia, w języku polskim oraz angielskim, zostały przygotowane starannie. Przekazują czytelnikowi w sposób syntetyczny opis podjętych zagadnień badawczych, otrzymanych wyników oraz wniosków końcowych. Niemniej jednak w treści pojawiły się nieliczne błędy literowe np.: „skoku” zamiast „soku”; „cech ziemniaka wykorzystywanej” zamiast „cech ziemniaka wykorzystywanego”.

W syntetycznym „**Wstępie**” do rozprawy Pan mgr Michał Broda, w sposób przekonujący, uzasadnił celowość podjęcia tematyki badawczej, podkreślając korzyści wykorzystania surowców stanowiących odpady przemysłowe w technologii wytwarzania celulozy bakteryjnej. Nadmienił, że koszt pożywki produkcyjnej może stanowić 65% całkowitych kosztów procesu technologicznego. Czy powyższą wartość procentową Doktorant oszacował na podstawie wyników badań własnych? Czy też Doktorant zaczerpnął ją z literatury naukowej? Ponadto, argumentując zasadność wykorzystania odpadów przemysłu skrobiowego Pan mgr Michał Broda zaznaczył, że obecnie obowiązujące przepisy prawne nakładają na wytwórców odpadów przemysłowych obowiązek ich utylizacji. Warto byłoby uzupełnić tą część „Wstępu” o treści związane ze sposobami zagospodarowania tego typu produktów ubocznych powszechnie stosowanymi przez przedsiębiorców. Doktorant, w sposób jasny i klarowny, opisał założenia opracowania taniej pożywki produkcyjnej, która pozwoli na uzyskanie biomateriału o potencjalnym zastosowaniu jako nośnik do immobilizacji mikroorganizmów oraz jako podstawowego składnika podłoża do hodowli tkankowych roślin *in vitro*.

W kolejnym rozdziale „**Przegląd piśmiennictwa**” Doktorant w sposób obszerny opisał dotychczasowy stan wiedzy z zakresu problematyki dysertacji. Wykonał wnikliwą analizę dostępnej literatury naukowej, pozwalając docenić nowatorski charakter przeprowadzonych badań. Szczegółowo scharakteryzował celulozę bakteryjną podkreślając fakt, że najwydajniejszymi producentami tego biopolimeru są bakterie z rodzaju *Komagataeibacter*. Ponadto, bazując na aktualnych wynikach badań innych autorów opisał molekularne aspekty biosyntezy celulozy, jej strukturę, metody jej wytwarzania oraz oczyszczania, właściwości, zastosowanie, rodzaje pożywek produkcyjnych, podkreślając możliwość zastosowania odpadów z produkcji skrobi ziemniaczanej. Dodatkowo, wyczerpująco opisał wykorzystanie celulozy bakteryjnej jako nośnika do immobilizacji bakterii probiotycznych oraz jako czynnika żelującego w hodowlach roślin *in vitro*. Jednakże,

skrótowo opisał oraz zwizualizował na Rycinie 8 sposoby produkcji celulozy bakteryjnej mające na celu zwiększenie efektywności procesu oraz obniżenie kosztów. Sugerowałabym dodać na Rycinie 8 numerację (a, b, c,...) oraz krótko odnieść się do sposobów przedstawionych na zdjęciach. Niemniej jednak, rozdział ten jest wartościowym przeglądem literatury ściśle związanym z tematyką opisanych prac badawczych.

W kolejnych rozdziałach sformułowano **Hipotezy badawcze**, **Cel główny pracy** oraz **Cele szczegółowe**. Hipotezy i cele pracy są poprawne oraz zostały uporządkowane w logiczny ciąg związany z poszczególnymi etapami wykonanych prac badawczych.

W celu weryfikacji hipotez rozprawy doktorskiej oraz spełnienia sformułowanego celu Pan mgr Michał Broda przeprowadził szereg prac laboratoryjnych opisanych w rozdziale „**Materiały i Metody**”. Rozdział ten został prawidłowo napisany, a przedstawione opisy pozwalają na odtworzenie przeprowadzonych doświadczeń. W Tabelach 6 i 7 przedstawiających warunki meteorologiczne w sezonie wegetacyjnym w Strzekęcinie w roku 2020 i 2021 otrzymane wartości temperatury powietrza i gleby przedstawiono jako „suma”, podczas gdy w tabeli obliczono wartości średnie dla tych parametrów. Jako „suma” powinny zostać przedstawione jedynie wartości opadów w danym miesiącu. W rozdziale „7.3. Drobnoustroje” brakuje nazwy kolekcji, z której wykorzystano referencyjne szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Ponadto, aby lepiej zobrazować rośliny wykorzystywane w trakcie doświadczenia pochodzące z Banku Genów Ziemiaka *in vitro* w Boninie (Rycina 17) należałoby dodać odpowiednią numerację oraz opisy odpowiadające poszczególnym odmianom roślin zwizualizowanych na załączonym zdjęciu. Nie wyjaśniono skrótów η_r oraz η_{sp} w rozdziale „7.12.3. Stopień polimeryzacji”. Ponadto, na Rycinie 20 umieszczono informację, że procesowi immobilizacji poddano oczyszczoną i sterylną celulozę bakteryjną, podczas gdy w tekście nie wspomniano o procesie sterylizacji membran celulozowych.

Do tej części pracy chciałabym zadać następujące pytania:

- Czy proporcja objętościowa 3:1 – 1:3 zastosowana do przygotowania pożywki na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków została przez Doktoranta zoptymalizowana (str. 64)?
- Jaki zakres czasowy oraz temperaturowy zastosowano, aby wstępnie oczyścić celulozę bakteryjną poprzez płukanie w wodzie demineralizowanej (str. 67)?
- Ile trwało nasączenie postaci oczyszczonej celulozy bakteryjnej pożywką MS (str 67)?

Biorąc pod uwagę powyższe chciałabym podkreślić, że metodyczne zróżnicowanie wykonanych badań oraz prawidłowe dostosowanie metod do postawionego celu badawczego świadczy o dobrym warsztacie naukowym Pana mgr Michała Brody.

Uzyskane rezultaty badań zostały przedstawione i przedyskutowane w rozdziale „**Wyniki i dyskusja**” w formie opisu, rycin oraz tabel. Doktorant w sposób logiczny omówił otrzymane wyniki w konfrontacji z danymi z piśmiennictwa. Jednakże, mój niedosyt budzi „skrótowa” dyskusja niektórych uzyskanych danych. W rozdziale „8.1 Wpływ wybranych źródeł węgla na ilość uzyskiwanej suchej masy celulozy bakteryjnej” Autor wyczerpująco opisał otrzymane wyniki, natomiast nie porównał uzyskanych wartości suchej masy celulozy bakteryjnej z danymi raportowanymi przez innych autorów. Stwierdzenie, że „na podstawie danych literaturowych można zauważyć, iż pożywki o bardziej złożonym składzie, zwłaszcza pod względem źródeł węgla oraz azotu, są bardziej uniwersalne i dają wysoki uzysk CB” uważam za niewystarczające. Warto byłoby podać konkretne wartości oraz przykłady tego typu procesów hodowlanych. Również, w rozdziale 8.3. „Wytypowanie szczepów bakteryjnych *Komagataeibacter xylinus* do dalszych etapów badań” Doktorant nie poddał dostatecznej dyskusji otrzymanych wyników. Tym bardziej, że zastosowane szczepy były testowane przez innych autorów również z wykorzystaniem odpadowych źródeł węgla. Ponadto, w rozdziale 8.7. „Ocena pH oraz składu cukrowo-białkowego pożywki na bazie soku komórkowego otrzymywanego z bulw ziemniaków różnych odmian” Doktorant stwierdził, że początkowa wartość pH w pożywce dla *K. xylinus* optymalna do przeprowadzenia procesu produkcji celulozy bakteryjnej powinna wynosić od 4,0 do 6,0. Wspomniał również, że według niektórych autorów przedział ten wynosi od 3,0 do 7,0. Natomiast nie podał odniesienia literaturowego dla powyższego stwierdzenia. Szczególnie interesujące wyniki uzyskano opracowując metodykę przygotowania pożywki hodowlanej na bazie soku ziemniaczanego pozyskanego z dwóch niezależnych zakładów przemysłu krochmalniczego. Analiza profilu cukrowego powyższego produktu odpadowego wykazała, że dominującym cukrem w większości analizowanych prób była glukoza. Jednakże, sok pozyskany z zakładu w Łobzie w 2020 roku charakteryzował się przewagą sacharozy. W jakim stopniu powyższa niejednorodność składników medium hodowlanego może wpłynąć na produkcję celulozy bakteryjnej do celów wdrożeniowych? Ponadto, Doktorant powinien skonfrontować uzyskane wartości uzysku celulozy bakteryjnej w pożywkach na bazie odpadów z przemysłu krochmalniczego z wynikami otrzymanymi przez innych autorów. W opisie Ryciny 40 brakuje opisu symboli oznaczających różnice istotne statystycznie. Co najważniejsze, Doktorant wielokrotnie wspomina o aspekcie ekonomicznym procesu produkcji celulozy bakteryjnej, jednakże nie oszacował w pracy korzyści finansowych wynikających z zastosowania pożywki na bazie soków komórkowych z analizowanych odmian ziemniaków oraz odpadów z przemysłu krochmalniczego. Ponadto, należałoby również podjąć próbę kalkulacji wykorzystania celulozy bakteryjnej jako składnika żelującego w pożywkach do hodowli tkankowych roślin *in vitro*, tym bardziej, że zgodnie z treścią rozprawy trwają prace wdrożeniowe mające na celu stopniowe zastępowanie agaru celulozą pochodzenia bakteryjnego. W moim odczuciu doktorat wdrożeniowy

powinien zawierać odrębny rozdział, w którym powinna zostać przeprowadzona analiza ekonomiczna proponowanego rozwiązania oraz próba oszacowania kosztów bioproduktu końcowego jakim jest celuloza bakteryjna.

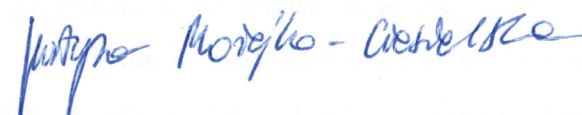
Na podstawie uzyskanych wyników badań w rozdziale „Wnioski” Doktorant wyciągnął 10 wniosków obrazujących najważniejsze osiągnięcia przedłożonej do oceny rozprawy. W mojej opinii wnioski w większości są poprawne. Jedyne zastrzeżenie budzi treść drugiego wniosku dotyczącego kosztów żywności. Doktorant stwierdził, że wykorzystanie soku komórkowego z bulw ziemniaków, w tym w szczególności w postaci odpadu z przemysłu krochmalniczego, umożliwia istotne zmniejszenie kosztów żywności produkcyjnej (nawet 10-krotnie w przypadku zastosowania soku komórkowego z bulw ziemniaków i blisko 100% w przypadku wykorzystania odpadu z przemysłu krochmalniczego). Powyższy wniosek nie został poparty wynikami analizy ekonomicznej. Ponadto, „zmniejszenie kosztów o blisko 100%” wydaje się stwierdzeniem niepoprawnym, biorąc pod uwagę m.in. koszty transportu powyższego odpadu do zakładu, w którym byłby stosowany jako składnik medium hodowlanego.

4. Podsumowanie i konkluzja końcowa

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pana mgra Michała Brody uważam, że uzyskane wyniki należy uznać za wartościowe. Stanowią one nie tylko wartość poznawczą, ale również mają charakter aplikacyjny. Przedstawione uwagi krytyczne nie umniejszają wartości naukowej oraz wdrożeniowej rozprawy doktorskiej. Pytania opisane powyżej, które nasunęły mi się po lekturze monografii wydają się być dobrym punktem do rozpoczęcia dyskusji podczas obrony dysertacji. W mojej ocenie Doktorant wykazał umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest dowodem jego odpowiedniego przygotowania merytorycznego i warsztatowego.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgra 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.).

W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.



Dr hab. inż. Justyna Mozejko-Ciesielska, prof. uczelni