



INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE
NATIONAL RESEARCH INSTITUTE
Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka w Boninie,
<http://www.ihar.edu.pl>, <http://ziemniak-bonin.pl>,
REGON 000079480, NIP 529-000-70-29, KRS 0000074008
Nr konta: BZ WBK III O/Koszalin 36 1500 1096 1210 9002 5721 0000

dr hab. Krzysztof Treder
Z-ca Kierownika Oddziału
IHAR-PIB w Boninie,
Bonin 3 76-009 Bonin
e-mail: k.treder@ihar.edu.pl
tel. 94 342-30-31 w. 207

Bonin, 15.01.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Brody

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

Uzasadnienie wykonania recenzji

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Michała Brody została wykonana w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technicznym w Szczecinie w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii pod opieką promotora - Pana prof. dr. inż. Karola Fijałkowskiego oraz promotor pomocniczej - Pani dr inż. Anny Żywickiej. Recenzję wykonałem w związku z powołaniem mojej osoby na recenzenta uchwałą nr 29 Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technicznego w Szczecinie z dnia 25.10.2023 r, o czym zostałem poinformowany przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny - Panią dr hab. inż., Małgorzatę Ozgo pismem z dnia 26 października 2023, L.dz: WBiHZ/RDZiR/159/2023.

Jednocześnie oświadczam, że tematyka rozprawy jest zgodna z moją specjalizacją naukową, nie jestem współautorem prac naukowych Doktoranta, nie prowadziłem i nie prowadzę wspólnie prac naukowych i jak dotąd nie brałem udziału w postępowaniach o awans naukowy Doktoranta.

Formalna ocena rozprawy

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Michała Brody liczy 218 stron, włączając w to kartę tytułową, informację o źródle dofinansowania i podziękowania, po których zaczyna się spisem

treści właściwa część rozprawy. Jest ona złożona z trzynastu rozdziałów, z których część zawiera podrozdziały pierwszego i drugiego rzędu. Struktura dysertacji obejmuje Streszczenie w (1) języku polskim i (2) angielskim (3) Wstęp, (4) Przegląd piśmiennictwa złożony z siedemnastu podrozdziałów pierwszego rzędu, (5) Hipotezy, (6) Cele badawcze wraz podrozdziałem opisującym cele szczegółowe, (7) Materiały i metody podzielone na dziewiętnaście podrozdziałów, z których niektóre również zawierają podrozdziały drugiego rzędu, (8) Wyniki i Dyskusję złożone z piętnastu podrozdziałów, z których jeden zawiera podrozdziały drugiego rzędu, (9) Wnioski, (10) Piśmiennictwo obejmujące zarówno spis pozycji literatury jak i wykorzystanych do rozprawy stron internetowych, (11) Wykaz tabel, (12) Wykaz rycin, (13) Aneks zawierający opis dorobku Doktoranta.

Rozdziały od Streszczenia po Piśmiennictwo stanowią właściwą dysertację, w której mieści się 25 tabel i 65 rycin. Autor w trakcie prac nad rozprawą skorzystał z 330 pozycji literaturowych i sześciu stron internetowych, dla których podaje adresy i czas dostępu. Strukturę rozprawy uważam za logiczną, przejrzystą i bardzo dobrze przemyślaną, z wyjątkiem połączenia Wyników i Dyskusji w jeden rozdział. *Osobiście uważam, że osobne opisanie wyników i ich późniejsze przedyskutowanie w świetle literatury jest optymalną formułą w pracach naukowych i takiej brakuje mi w tej rozprawie.* Jednak zastosowany przez Doktoranta format bieżącego dyskusowania opisywanych wyników jest dopuszczalny i stosowany w rozprawach doktorskich i innych formach publikacji naukowych. Należy podkreślić, że rozprawa jest napisana bardzo dobrze stylistycznie, czyta się ją z dużą przyjemnością, jednocześnie język jest jasny, klarowny i spełnia rygor obiektywnej i logicznej narracji naukowej. Rozprawa jest bogato ilustrowana, co uatrakcyjnia jej lekturę i ułatwia zrozumienie treści.

Doktorant w **Streszczeniu** krótko omawia tematykę badań i najważniejsze osiągnięcia uzyskane w trakcie realizacji rozprawy. Podane pod nim słowa kluczowe dobrze oddają zakres tematyczny badań. **Abstract** stanowi anglojęzyczne tłumaczenie Streszczenia. We **Wstępie** Kandydat zwięźle wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy, pokrótce opisując charakter chemiczny, biosyntezę i unikalne właściwości celulozy bakteryjnej (CB), warunkujące jej wysoką przydatność biotechnologiczną, definiuje koszt pożywki jako główną przyczynę wciąż niewielkiego wykorzystania tego bio-nanomateriału, przedstawia zalety obniżenia tego kosztu poprzez wykorzystanie odpadów rolno-spożywczych i proponuje sok z ziemniaka, jeden z istotnych odpadów przemysłu skrobiowego, jako materiał do opracowania taniej pożywki do produkcji CB, podkreślając proekologiczne zalety takiego rozwiązania. W końcowej części Wstępu pokrótce omawia zakres wykonanych prac i przyjęte założenia, pokrywające się ze

zdefiniowanymi w dalszej części rozprawy celami pracy.

Mocno rozbudowaną część rozprawy stanowi rozdział **Przegląd piśmiennictwa**, w którym na trzydziestu sześciu stronach i w siedemnastu podrozdziałach, Kandydat wykorzystując bogatą literaturę przedmiotu, bardzo szczegółowo rozwija wszystkie zagadnienia wprowadzone wcześniej we wstępie. Rozdział ten jest bogato ilustrowany poglądowymi rycinami wykonanymi przez Kandydata, w których często istotnym elementem edukacyjnym są wysokiej jakości zdjęcia obrazujące omawiane zagadnienia, wykonane przez Doktoranta. Świadczy to o dużym talencie edukacyjnym Kandydata, który potrafi często suchą wiedzę literaturową przedstawić żywym językiem i za pomocą ciekawych ilustracji.

Kolejny rozdział to **Hipotezy**, zawierający siedem hipotez badawczych sformułowanych przez Doktoranta, oraz Cel badawczy, w którym Kandydat przedstawia główny cel rozprawy oraz cele szczegółowe, wynikające ściśle z postawionych hipotez.

W dalszej części rozprawy Doktorant omówił metodykę badań na trzydziestu stronach w rozdziale **Materiały i metody**, który podzielił na dziewiętnaście podrozdziałów, opisujących szczegółowo część doświadczalną rozprawy. Następnie w liczącym osiemdziesiąt osiem stron i bogato ilustrowanym w ryciny i tabele rozdziale **Wyniki i Dyskusja** Doktorant opisał w piętnastu podrozdziałach uzyskane wyniki, które w większości dyskutował w świetle aktualnego stanu wiedzy bezpośrednio po ich opisie. W niektórych podrozdziałach przeważa element dyskusji, w innych opis wyników. W rozdziale **Wnioski** podsumował wyniki z opisanych w rozprawie badań w dziesięciu trafnie sformułowanych wnioskach, które mają duży potencjał wdrożeniowy i nie są pozbawione charakteru poznawczego. **Literatura** obejmuje 330 pozycji, z których większość (ponad 93%) to publikacje anglojęzyczne. Ponad połowę literatury stanowią pozycje (54%), które ukazały się w ciągu ostatnich dziesięciu lat, a około 87% w ciągu ostatniego dwudziestolecia. Niski udział publikacji starszych świadczy o tym, że tematyka, którą zajął się Kandydat jest bardzo aktualna i w swoich badaniach korzystał przede wszystkim z najnowszej literatury przedmiotu. Bogactwo źródeł literaturowych i ich dobór, świadczą o tym, że Doktorant dokonał gruntownego przeglądu literatury obejmującej kluczowe aspekty badawcze, związane z przedmiotem rozprawy doktorskiej.

W mojej opinii, praca doktorska Pana mgr inż. Michała Brody, ma przejrzystą strukturę i jest przygotowana bardzo starannie z dużą dbałością o szczegóły. **Pozytywnie oceniam rozprawę pod względem formalnym.**

Ocena merytoryczna

Zasadność podjęcia tematu. Celuloza bakteryjna (CB) pomimo tego, że jest chemicznie tożsama z celulozą roślinną, z uwagi na dużą czystość, budowę molekularną i wynikające z niej unikatowe właściwości, stanowi znacznie bardziej wartościowy materiał do zastosowań przemysłowych i biotechnologicznych. Kandydat właściwie definiuje główną przyczynę wciąż zbyt niskiego stopnia wykorzystania CB w przemyśle i biotechnologii, którą jest wysoki koszt pożywki syntetycznej stosowanej do hodowli bakterii wytwarzających CB. Dlatego głównym celem Jego rozprawy jest ich obniżenie przez zastosowanie soku z bulw ziemniaka, który jest również odpadem w przemyśle krochmalniczym. Taki pomysł jest bardzo atrakcyjny zarówno pod względem ograniczenia kosztów produkcji CB, jak i z powodu jego pro-środowiskowego potencjału, wpisującego się w strategię zielone rozwoju. Ponadto Doktorant przeprowadził badania nad wdrożeniem CB wytworzonej na opracowanej przez niego pożywce jako materiału do immobilizacji probiotycznych bakterii. Jego oryginalną propozycją, również stanowiącą wdrożeniowy aspekt rozprawy doktorskiej jest wykorzystanie CB jako czynnika żelującego pożywkę MS do hodowli roślin *in vitro*. **Z przyczyn opisanych wyżej oraz z uwagi na wysoki potencjał aplikacyjny wykonanych badań wdrożeniowych podjęcie omawianej tematyki przez Doktoranta uważam za niezwykle cenne i zasadne.**

W pierwszej części **Wstępu** Autor opisuje chemiczną i strukturalną budowę CB, proces jej biosyntezy, czynniki wpływające na jej właściwości, oraz wynikające z nich zalety tego biomateriału i definiuje wysoki koszt syntetycznej pożywki jako główną przyczynę wciąż niskiego wykorzystania CB pomimo tych zalet. Krótko omawia rozwiązania pozwalające na obniżenie kosztów produkcji łączące dodatkową korzyść w postaci zagospodarowania odpadów przemysłu rolno-spożywczego. Następnie opisuje zalety bulw ziemniaka jako źródła przyswajalnych składników odżywczych i wpływ różnych czynników na ich zawartość. Wskazuje na to, że głównym przemysłowym wykorzystaniem ziemniaka jest produkcja skrobi, w trakcie której dochodzi do powstania odpadów produkcyjnych w postaci miazgi i soku komórkowego, których utylizacja jest problematyczna. W dalszej części wstępu Kandydat opisuje i uzasadnia podjęte w rozprawie cele badawcze, zaczynając od celu głównego, którym jest opracowanie taniej pożywki do hodowli bakterii produkujących CB, poprzez wykorzystanie soku z bulw odmian ziemniaka optymalnych pod kątem produkcji CB oraz z soku stanowiącego odpad przemysłu skrobiowego. Opisuje również planowane badania nad wdrożeniem wyprodukowanej w oparciu o sok ziemniaczany CB do immobilizacji bakterii probiotycznych oraz jako czynnik żelujący pożywkę MS do hodowli roślin *in vitro*. **W mojej**

opinii, ta część rozprawy doktorskiej w sposób zwięzły wprowadza czytelnika zarówno w tematykę podjętych badań, jak i w założone cele.

Kolejny rozdział to **Przegląd piśmiennictwa**, który stanowi logiczne rozwinięcie Wstępu, Oba rozdziały wzajemnie się uzupełniają i w połączeniu stanowią mocną podstawę uzasadniającą konieczność podjęcia badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej Kandydata. W przeglądzie, Doktorant w oparciu o bardzo bogatą i aktualną literaturę wchodzi głęboko we wszystkie zagadnienia, w które pokrótce wprowadzał we Wstępie. W pierwszym podrozdziale szczegółowo omawia budowę CB. Wskazuje na fakt, że w przeciwieństwie do celulozy roślinnej, CB jest produkowana przez bakterie w czystej postaci, bez lignin, hemiceluloz, pektyn i innych polimerów i biocząstek wchodzących obok celulozy w skład ścian komórkowych roślin. W dalszej części opisuje bakterie zdolne do biosyntezy CB, skupiając się szczególnie mocno na rodzaju *Komagataeibacter*, obejmującym gatunki najwydajniej produkujące CB, w tym wykorzystywany w produkcji celulozy *K. xylinus*. Opisuje szlaki biochemiczne prowadzące do biosyntezy CB, szerzej przedstawiając szlak kodowany przez operon cbsABCD i omawiając mechanizm indukcji syntazy celulozy oraz rolę pozostałych białek tego operonu. Na pochwałę zasługuje jasny opis złożonych procesów molekularnych i biochemicznych prowadzących do powstania CB. W podrozdziale opisującym strukturę CB, Autor wykazuje, że jest naturalnym nanomateriałem z uwagi na strukturę molekularną włókien, które mają średnicę tysiąc razy mniejszą od roślinnych. ***W tym miejscu na stronie 20 wkradł się chyba błąd, Doktorant definiuje: „nanofibryle to struktury składające się z uporządkowanych łańcuchów celulozowych, które są ze sobą silnie powiązane. Z kolei głównym składnikiem nanofibryli jest polisacharyd β -1,4-glukan.” Chodzi chyba o mikrofibryle w pierwszym zdaniu i o nanofibryle w drugim? Na stronie 21 na rycinie 5 powinno być chyba Nanofibryla a nie Nanofibryl?*** Dyskutuje właściwości CB, takie jak wysoki stopień krystalizacji, małą średnicę porów, dzięki której ma ona dużą powierzchnię wewnętrzną, zapewniającą wysoką chłonność i hydrofilność, powodujące w stanie uwodnienia żelowy charakter biopolimeru. Autor wskazuje, że z tych samych przyczyn CB jest też wytrzymała mechanicznie, sprężysta i zapewnia dobrą wymianę gazową. Nie wykazuje cytotoksyczności dla ludzkich komórek i nie wywołuje alergii. Omawia też czynniki wpływające na te właściwości oraz możliwość modyfikacji CB. Po szczegółowym omówieniu budowy, opisuje metody jej wytwarzania, i oczyszczania, by ponownie wrócić do właściwości CB – skupiając się tym razem na wpływie wody. ***Tu moim zdaniem bardziej zasadne byłoby, gdyby ten podrozdział (4.8) był umieszczony bezpośrednio po podrozdziale omawiającym strukturę CB (4.5).*** Dalej Autor bardzo ciekawie i szczegółowo omawia zastosowanie CB

w medycynie, w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, papierniczym, elektronicznym, chemicznym, włókienniczym i budowlanym, jak również w rolnictwie, zarówno jako materiał membranowy, jak i wypełniacz polepszający trwałość, jakość, właściwości mechaniczne i chłonne końcowych produktów. Kolejna część przeglądu opisuje standardowo stosowane i alternatywne pożywki do hodowli bakterii syntetyzujących CB. Autor opisuje w tej części literaturowe próby wykorzystania odpadów rolniczych i przemysłu spożywczego do wytworzenia tanich alternatyw dla komercyjnej pożywki, wskazując pro-ekologiczny charakter takich działań. Za wartościowe uważam zestawienie danych literaturowych na ten temat w czytelnej tabeli (tabela 1). W dalszych podrozdziałach Autor omawia najważniejszą dla jego rozprawy doktorskiej roślinę uprawną – ziemniak. Podaje krótką informację na temat historii tej rośliny, omawia wartości odżywcze oraz bardzo szczegółowo podaje informacje na temat uprawy ziemniaka w Polsce na przestrzeni kilku ostatnich lat, podając dla każdego z omawianych okresów szczegółowo informację na temat arealu uprawy i plonu. *W tej części (str. 39, wiersze 1-18), Autor odszedł od ciekawego języka, opisuje poszczególne lata w sposób iteracyjny, co powoduje że jest to najslabsza część rozprawy. W tym miejscu wystarczyłaby w zupełności informacja zawarta w podsumowaniu plus wykres obrazujący zmiany w areale i plonie zachodzące w czasie.* W kolejnym podrozdziale, Autor szczegółowo przedstawia jak wygląda proces produkcji skrobi z ziemniaków, wskazując na generowane przez przemysł skrobiowy trudne do zagospodarowania odpady w postaci miazgi i soku z bulw ziemniaka. Podrozdział zawiera czytelny schemat, ułatwiający szybkie zrozumienie całego procesu. W dalszej części przeglądu Autor przechodzi do omówienia mikroorganizmów probiotycznych i znanych z literatury sposobów immobilizowania probiotyków za pomocą naturalnych i syntetycznych nośników. prób wykorzystania CB do ich immobilizacji, skupiając się pod koniec podrozdziału na znanych przykładach zastosowania CB w tym celu. W dwóch końcowych podrozdziałach przedstawione są informacje wprowadzające czytelnika szczegółowo w proces produkcji roślin ziemniaka techniką *in vitro* oraz czynników żelujących stosowanych do przygotowania podłoży stałych stosowanych do hodowli roślin *in vitro*.

Bardzo wysoko oceniam jakość, ilość i czytelność informacji podanych w Przeglądzie piśmiennictwa. Pomimo zrozumiałych przy tak szerokiej tematyce nielicznych potknięć, stanowi on przejrzysty przegląd wiedzy, wprowadzający czytelnika w tematykę badawczą rozprawy poprzez podanie bardzo szczegółowych informacji dotyczących wszystkich aspektów związanych z tematyką rozprawy. Ponadto to szczegółowe omówienie mocno uzasadnia podjęcie badań wykonanych przez Doktoranta.

Kolejny rozdział rozprawy to **Hipotezy**, zawierający siedem hipotez badawczych. W mojej

opinii są one poprawnie sformułowane i w pełni weryfikowalne. W rozdziale **Cel badawczy**, Doktorant definiuje główny cel badań, którym jest opracowanie sposobu wytwarzania CB z wykorzystaniem pożywki opartej na soku ziemniaka i wdrożeniu wytworzonej CB do immobilizacji bakterii probiotycznych oraz jako materiału żelującego pożywkę MS w hodoli roślin *in vitro*. W podrozdziale drugiego rzędu Kandydat opisuje siedem celów szczegółowych, których realizacja jest konieczna dla osiągnięcia celu głównego i których celem jest także weryfikacja każdej z postawionych w poprzednim rozdziale hipotez. **W mojej opinii zarówno hipotezy jak i cele są poprawne, logiczne, weryfikowalne i wykonalne.**

Kolejny rozdział to **Materiały i metody**, opisane w dziewiętnastu podrozdziałach. Autor szczegółowo opisuje doświadczenie polowe z roku 2019, w którym przygotował bulwy pięciu odmian różniących się zawartością skrobi do doświadczeń wstępnych oraz właściwe dwuletnie doświadczenie polowe, wykonane w latach 2020 i 2021 na grupie 25 odmian, z których w obu latach zachował dwanaście jadalnych i dziesięć skrobiowych. Pozostałe trzy (jedna jadalna i dwie skrobiowe) zostały w drugim roku doświadczenia zastąpione z uwagi na wyniki uzyskane dla nich w pierwszym roku. Odmiany są wymienione w tabeli 2, a w tabeli 3 można zapoznać się z ich charakterystyką. W dalszym opisie i tabelach opisane jest wykonanie doświadczeń polowych, stosowany program nawożenia i ochrony, warunki pogodowe w poszczególnych sezonach wegetacyjnych i metodyka wyznaczania zawartości skrobi w zebranych bulwach. Następnie Doktorant opisuje materiały wykorzystywane w pracy i sposób ich pozyskania włączając w to zarówno sok odpadowy z produkcji skrobi, wykorzystane w pracy mikroorganizmy, nasiona trzech badanych gatunków roślin uprawnych, rośliny *in vitro* z banku genów ziemniaka. W kolejnym podrozdziale przedstawia procedury przygotowania pożywek, dedykując każdej osobny podrozdział drugiego rzędu. Opis przygotowania pożywki na bazie soku z bulw ziemniaka jest bardzo klarowny i opatrzony ilustracją, którą Autor przygotował wykorzystując własne zdjęcia poszczególnych etapów – od mycia i obierania ziemniaków po gotową do użycia, sterylną pożywkę uzyskaną z soku z bulw. Następnie opisuje procedurę przygotowania pożywki syntetycznej H-S (nie zapominając o opisie modyfikacji, koniecznych do badania wpływu różnych źródeł węgla na wydajność produkcji CB) do hodowli wykorzystywanej w rozprawie bakterii syntetyzującej CB - *K. xylinus*, oraz pożywki MRS, którą wykorzystywał do prac z bakteriami probiotycznymi. W dalszej części Autor opisał sposób przygotowania pożywek do hodowli roślin *in vitro*, w tym standardową pożywkę MS, badane warianty pożywek z wykorzystaniem

CB w formie membrany oraz w formie pulpy, które stosował w badaniach wstępnych z wykorzystaniem nasion ogórka, pomidora i ziemniaka oraz warianty pożywki opartej na pulpie CB do badań nad jej zastosowaniem do roślin *in vitro* ziemniaka. Dalej szczegółowo opisana jest metodyka badania zmian biochemicznych zachodzących w badanych pożywkach za pomocą chromatografii cieczowej i tandemowej spektrometrii mas. Dla metod oznaczania białka i skrobi podane zostały jedynie odnośniki literaturowe, z uwagi na to, że są to standardowe, powszechnie stosowane metody. Następnie Autor szczegółowo opisuje w jaki sposób przechowywał bakterie stosowane w badaniach i jak przygotowywał inokulum bakteryjne zarówno dla *K. xylinus*, jak i dla bakterii probiotycznych. Równie skrupulatnie opisane są rodzaje i etapy hodowli stosowane do wytworzenia CB oraz w jaki sposób Autor oceniał efektywność biosyntezy CB. **Jednak w tym miejscu (str. 72) zabrakło informacji o stężeniu wodnego roztworu NaOH, wykorzystywanego do oczyszczania uzyskanej CB.** Szczegółowo i czytelnie opisana jest metodyka charakteryzowania właściwości celulozy bakteryjnej takich jak współczynnik pęcznienia (SR), współczynnik pojemności wodnej (WHC), składu chemicznego, indeksu krystaliczności, czy stopnia polimeryzacji CB. Równie szczegółowo opisano sposób określenia liczby i żywotności komórek *K. xylinus* w pożywce produkcyjnej i w wyprodukowanych przez nie membranach CB. **Tutaj mam uwagę, w przypadku policzalnych obiektów biologicznych określamy liczbę, nie ilość – np., liczba saren, drzew, komórek bakterii.** Bardzo szczegółowo opisane są doświadczenia nad wykorzystaniem CB jako nośnika do immobilizacji bakterii probiotycznych, należy podkreślić, że wykonana przez Autora ilustracja obrazująca ten proces jest bardzo pomocna i pozwala go niejako „zobaczyć”. Również metody wizualizacji rozmieszczenia immobilizowanych komórek na powierzchni i wewnątrz CB czy sposób symulowania wpływu soku żołądkowego i soków żółciowych na bakterie probiotyczne i badanie ochronnej roli CB wobec nich opisane są bardzo czytelnie. W opisie doświadczeń z wykorzystaniem CB do hodowli roślin z nasion, jak również wykorzystania pulpy CB jako czynnika żelującego pożywkę MS do hodowli *in vitro* roślin ziemniaka metodyka opisana jest starannie i czytelnie. Również tu bardzo cenne dla szybszego zrozumienia metod są ilustracje wykonywanych doświadczeń przygotowane przez Autora w oparciu o wykonane przez niego zdjęcia (rycina 21 dla nasion i rycina 22 dla roślin *in vitro*).

Najbardziej obszernym rozdziałem rozprawy są **Wyniki i Dyskusja**. W pierwszym etapie badań Doktorant z dwunastu badanych wyselekcjonował cztery szczepy *K. xylinus* prowadzące najbardziej wydajną biosyntezę CB na pożywce H-S, w której źródłem węgla była glukoza. Najwyższą wydajność zarówno w hodowli stacjonarnej jak i wytrząsanej wykazał szczep

ATCC 53524 zarówno w pożywkach H-S, w których glukoza była jedynym źródłem węgla, jak i w tych zawierających kombinację cukrów. W dalszej części rozprawy Doktorant wykazał że, również ten szczep najwydajniej produkował CB na pożywce z soku ziemniaka (PZ, rycina 25 na stronie 95). Również w obu typach hodowli najlepszym źródłem węgla dla wydajności produkcji CB były glukoza, następnie fruktoza, sacharoza, ksyloza i maltoza. Ważną obserwacją było również to, że dziewięć szczepów wytwarzała porównywalne ilości CB w obecności fruktozy, a szczepy ATCC 14851 oraz ATCC 700178, także w obecności sacharozy. Wszystkie badane cukry występują w soku ziemniaka i wyniki Doktoranta udowodniły, że szczepy *K. xylinus* potrafią je metabolizować i wytwarzać CB. Jednocześnie żaden z badanych szczepów nie wytworzył CB, gdy źródłem węgla była skrobia. W kolejnym etapie Doktorant wykonał optymalizację przygotowania pożywki z soku z bulw ziemniaka. Opracowana procedura jest prosta, polega na umyciu i obraniu bulw, zmieleniu i odcisnięciu soku na sokowirówce, dekantacji skrobi, rozcieńczeniu 1:1 wodą, sterylizacji w autoklawie i uzupełnieniu etanolem do stężenia optymalnego dla danego szczepu *K. xylinus*. Tak przygotowana pożywka z ziemniaka (PZ) umożliwiała wysokowydajną produkcję CB. Największą wydajność produkcji CB na pożywce PZ.

Dalsze części rozprawy opisujące wpływ pogody, analizę potencjału plonotwórczego badanych odmian, wpływu odmian na wydajność uzyskiwanego z ich bulw soku, jak również na wydajność produkcji CB przez bakterie, koncentracji cukrów i białek, różnic w pH soku z różnych odmian, są bardzo ciekawe pod względem naukowym i mają wymiar praktyczny, pod kątem selekcji odmian, które miałyby być uprawiane w celu przemysłowej produkcji pożywki do hodowli *K. xylinus*. Jednak za najbardziej wartościowe uważam przygotowanie pożywki do produkcji CB na bazie soku stanowiącego odpad przemysłu skrobiowego i wykazanie, że nawet po odzyskaniu białka przez przedsiębiorstwo produkujące skrobię, taki sok posiada odpowiednie pH, wystarczającą koncentrację cukrów jako źródła węgla, oraz białka jako źródła azotu by zapewnić produkcję CB przez różne szczepy *K. xylinus* na poziomie porównywalnym (większość szczepów) lub wyższym (szczep ATCC 53524) w porównaniu z syntetyczną pożywką H-S. Bardzo istotne jest również to, że CB produkowana na pożywce PZ miała podobne właściwości strukturalne i fizykochemiczne jak CB z pożywki syntetycznej oraz to, że nie wykazywała właściwości cytotoksycznych. Ważnym elementem przedstawionych wyników jest analiza ekonomiczna pokazująca szacunkowe obniżenie kosztu produkcji CB przy zastosowaniu soku z optymalnych odmian ziemniaka o nawet 85-87% i nawet więcej stosując sok odpadowy z produkcji skrobi. Biorąc pod uwagę potencjał aplikacyjny CB, takie obniżenie kosztów jej produkcji będzie miało znaczący wpływ na wzrost

wykorzystania tego nanomateriału w biotechnologii i przemyśle. Ponadto Doktorant wykazał, że CB produkowana w opracowany przez niego sposób na PZ jest równie dobrym materiałem do immobilizacji bakterii probiotycznych jak ta uzyskana na pożywce syntetycznej, bez istotnych różnic w proliferacji tych bakterii czy ich uwalnianiu z CB uzyskanej na obu rodzajach pożywek. Doktorant wykazał również, że immobilizacja probiotyków na CB uzyskanej na pożywce PZ chroni te bakterie przed działaniem symulowanego soku żołądkowego (średnia przeżywalność 20% bakterii immobilizowanych względem 9% dla wolnych komórek) i zwiększa nieco przeżywalność w kwasach żółciowych, które generalnie w małym stopniu obniżają żywotność wolnych komórek (średnia przeżywalność 92% dla immobilizowanych i 86% dla wolnych komórek).

Sukcesem zakończyły się również badania prowadzone przez Doktoranta nad możliwością wykorzystania CB produkowanej na pożywce PZ do przygotowania podłoża stałego do wzrostu roślin z nasion i do hodowli *in vitro* roślin ziemniaka. W tym przypadku optymalna jako czynnik żelujący podłoże MS okazała się nie forma membrany lecz pulpy uzyskanej po zmieleniu CB. W obu przypadkach uzyskano prawidłowy wzrost roślin, porównywalny do uzyskanego na pożywce MS z agarem jako czynnikiem żelującym. Ponadto Doktorant udowodnił, że podłoże MS wykorzystujące CB jako czynnik żelujący pozwala również na porównywalną z podłożem MS i agarem produkcję minibulw. Świadczy to o tym, że koszt zarówno roślin *in vitro* jak i bezpośrednich materiałów nasiennych, jakie stanowią minibulwy można obniżyć zastępując agar pulpą CB.

W rozdziale **Wnioski** Doktorant podsumował wyniki z opisanych w rozprawie badań w dziesięciu trafnie sformułowanych wnioskach, które mają duży potencjał wdrożeniowy. Pod względem aplikacyjnym za szczególnie ważne uważam wnioski nr 1 i 2, ze wskazaniem na ten ostatni. Znaczące obniżenie kosztów produkcji CB już za pomocą dedykowanej produkcji soku ziemniaczanego z optymalnie dobranych odmian ziemniaka może przyczynić się do zwiększenia wykorzystania CB w szeroko rozumianym przemyśle. Biorąc pod uwagę, że w omawianych w rozprawie badaniach bardzo dobrym źródłem pożywki do wydajnej produkcji CB był sok odpadowy z przemysłu skrobiowego, wydaje się że właśnie taki materiał powinien być docelowo proponowany do taniej produkcji CB na dużą skalę, tym bardziej, że jego koszt jest znacznie niższy niż koszt soku z odmian ziemniaka celowo uprawianych pod tym kątem. Należy podkreślić, że wnioski 3-5 są bardzo wartościowe pod względem naukowym i również niosą w sobie potencjał wdrożeniowy pod kątem wariantu z dedykowaną uprawą optymalnych odmian jako źródła soku do produkcji CB. Pozostałe wnioski mają bardzo wysoki potencjał wdrożeniowy.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest dowodem na to, że Doktorant posiada umiejętności niezbędne do planowania badań naukowych, doboru właściwych materiałów i metod, analizy i prezentacji wyników oraz ich dogłębnej dyskusji w świetle dobrze dobranej literatury prowadzącej do stawiania ciekawych hipotez wyjaśniających uzyskane wyniki i prowadzących do stawiania trafnie sformułowanych wniosków, co zostało odzwierciedlone w ocenianej przeze mnie pracy.

Podczas czytania nasunęły mi się pewne pytania, które mają charakter dyskusyjny i chętnie bym poznał odpowiedź Doktoranta na nie w trakcie publicznej obrony rozprawy doktorskiej:

1. W rozprawie doktorskiej zbrakło porównania właściwości fizykochemiczne celulozy bakteryjnej uzyskanej z wykorzystaniem soku odpadowego z przemysłu skrobiowego z CB wytworzoną na pożywcze z soku wybranych odmian opisanych w tabeli 24. Czy wg Doktoranta będą one podobne, czy może istnieje ryzyko, że wystąpiłyby istotne różnice? Jeżeli tak, jak mogłyby wpłynąć na potencjał aplikacyjny takiej CB?
2. Czy wydajność produkcji CB w oparciu o sok stanowiący odpad przemysłu skrobiowego jest porównywalna z wydajnością uzyskaną na pożywkach z soku z bulw odmian wybranych jako optymalne do produkcji CB?
3. Czy Doktorant jest w stanie określić w jakim stopniu wykorzystanie soku odpadowego z przemysłu skrobiowego może obniżyć koszty produkcji CB, czy rzeczywiście może to być spadek kosztów bliski 100%, jak to przedstawia Doktorant we wniosku nr 2?
4. We wnioskach nr 4 i 5 Doktorant stwierdza, że wydajność wytwarzania CB z wykorzystaniem pożywki PZ zależy zarówno od odmiany jak i od szczepu bakterii *K. xylinus*. Czy taka zależność, nie wpływa negatywnie na potencjał wdrożeniowy opracowanego przez Doktoranta sposobu produkcji CB?
5. Czy Doktorant widzi inne potencjalne zastosowania CB w uprawie roślin, poza badanymi przez niego w rozprawie doktorskiej?

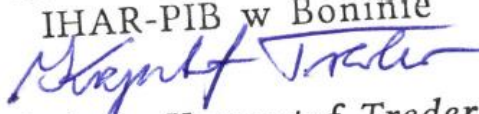
Ocena końcowa

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje bardzo obszerne i pracochłonne badania, które miały na celu opracowanie sposobu produkcji celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem soku z bulw pozyskiwanego z dedykowanych odmian ziemniaka lub z soku odpadowego z przemysłowej produkcji skrobi oraz wdrożenie wyprodukowanej w ten sposób celulozy bakteryjnej jako materiału do immobilizacji bakterii probiotycznych, chroniącego je

przed niekorzystnym działaniem soku żołądkowego i kwasów żółciowych, oraz jako substancji żelującej w podłożach do hodowli roślin *in vitro*. Wyniki pracy mają bardzo wysoki potencjał wdrożeniowy i mogą istotnie wpłynąć na znaczące wykorzystanie innowacyjnego nanomateriału biologicznego jakim jest celuloza bakteryjna w szeroko pojętym przemyśle.

Na podstawie pracy doktorskiej Doktoranta mogę stwierdzić, że prezentuje on bardzo dobrą znajomość tematu, potrafi znaleźć luki w obecnym stanie wiedzy, wykazał umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, dysponuje niezbędnym ku temu warształem metodycznym i posiada umiejętności konieczne do planowania, analizowania, interpretowania i dyskusowania uzyskanych wyników. Dysertacja doktorska Pana mgr inż. Michała Brody wnosi istotny wkład w rozwój nauk rolniczych w obrębie dyscypliny Zootechnika i Rybactwo i ma charakter wdrożeniowy.

W mojej opinii, rozprawa doktorska mgr inż. Michała Brody pt. „Proces wytwarzania celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem medium produkcyjnego na bazie ziemniaków oraz analiza możliwości wykorzystania uzyskanego biomateriału” spełnia wymagania ustawy o stopniach i tytule naukowym. W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr inż. Michała Brody do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z-ca Kierownika Oddziału
IHAR-PIB w Boninie

dr hab. Krzysztof Treder