



Dr hab. Mariusz Trytek, prof. uczelni
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS
mariusz.trytek@mail.umcs.pl

Lublin, 24.08.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Kaczmarek

pt. „Enzymatyczna funkcjonalizacja bakteryjnej nanocelulozy”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Aneta Białkowskiej, prof. uczelni i dr inż. Karoliny Ludwickiej
w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Celuloza bakteryjna to niezwykle hydrokoloidowy egzopolisacharyd o wyjątkowych właściwościach fizyko-chemicznych i mechanicznych. Polimer ten jest obecnie wykorzystywany jako substytut celulozy roślinnej, m.in. w medycynie i w przemyśle spożywczym, ale może służyć także jako wszechstronny prekursor do otrzymywania nowych kompozytowych biomateriałów funkcjonalnych do zastosowania w przemyśle biotechnologicznym, kosmetycznym i farmaceutycznym. Jednak pewnym ograniczeniem takiego rozwiązania jest koszt produkcji celulozy i konieczność modyfikacji jej struktury celem wprowadzenia odpowiednich grup chemicznych poszerzających możliwości dalszej funkcjonalizacji biopolimeru. Do funkcjonalizacji celulozy powszechnie wykorzystuje się metody chemiczne i fizyczne, które jak wiadomo nie są selektywne, nierzadko wymagają użycia szkodliwych dla środowiska związków chemicznych i agresywnych warunków reakcji (ponadto negatywnie wpływają na cytotoksyczność i immunogenność otrzymanego materiału).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Kaczmarek odpowiada na rosnące zainteresowanie, jakim cieszy się dziedzina tzw. „zielonych polimerów”. Zakres tematu pracy znacznie wykracza poza technologię produkcji celulozy mikrobiologicznej wkraczając w obszar badań nad poprawą i poszerzeniem właściwości użytkowych tego polimeru. Badania nad łagodnymi, specyficznymi i przyjaznymi dla środowiska metodami enzymatycznej obróbki biopolimerów, prowadzone są od kilkunastu lat, lecz ich wydajność i efektywność jest niezadawalająca, zaś liczba użytecznych tu enzymów jest



ograniczona do kilku białek z klasy hydrolaz i oksydoreduktaz. Wśród tych ostatnich znajdują się, polisacharydowe monooksygenazy (LPMO), zdolne do oksydacyjnego rozszczepienia wiązań β -1,4-glikozydowych polisacharydów. Jednak, ze względu na fakt, że badania nad tymi enzymami rozpoczęły się relatywnie niedawno, praktyczne implikacje ich użycia w procesie biotransformacji celulozy bakteryjnej są mało poznane. To stanowiło motywację dla Doktorantki do podjęcia badań, które w mojej ocenie można zaliczyć do nowatorskich i znajdujących się w czołowie kluczowych zagadnień współczesnej biotechnologii, i nie tylko, gdyż wytwarzanie cennych biopolimerów i biokompozytów z naturalnych zasobów to gorący temat, który szybko ewoluje w naukach o polimerach organicznych. Cieszy również to, że badania nad otrzymywaniem celulozy bakteryjnej, zainicjowane na tym Wydziale przez zespół prof. Stanisława Bieleckiego są kontynuowane i rozwijane z sukcesem w Polsce przez młodsze pokolenia.

Formalny opis rozprawy

Oceniana rozprawa doktorska liczy łącznie 174 strony. Autorka podzieliła dysertację na 6 głównych części, w ramach których wydzieliła 11 podrozdziałów. Praca zawiera streszczenie w j. polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów i symboli. Część „*Wstęp literaturowy*” poprzedzony jest dwustronicowym *Wprowadzeniem*, zawiera najważniejsze informacje wprowadzające w problematykę badawczą podjętą w rozprawie. W liczącej 34 stron „*Części doświadczalnej*” zawarto łącznie *Cel i zakres pracy* oraz opis *Materiałów i Metod badawczych* podzielonych na 9 głównych podrozdziałów. Trzystronicowy opis *Celu i zakresu pracy* zilustrowano dodatkowo schematem etapów badań realizowanych w doktoracie. W dalszej części omówiono *Wyniki badań* (47 stron) oraz przeprowadzono oddzielnie *Dyskusję* liczącą 19 stron. Prace kończą: mające charakter podsumowania *Wnioski końcowe*, opis dorobku naukowego Doktorantki, *Bibliografia* (zawierająca 246 pozycji literaturowych). Układ, struktura podziału treści, kolejność rozdziałów pracy są poprawne i typowe dla pracy eksperymentalnej. Tutaj nie mam istotnych uwag, z wyjątkiem jednej – Doktorantka mogła zamieścić Bibliografię przed opisem swojego *Dorobku naukowego*.

Ocena merytoryczna rozprawy

Praca jest przejrzysta, napisana poprawnym językiem naukowym, rzeczowo przedstawione są zagadnienia teoretyczne, cel, jak i wyniki badań.

Wstęp literaturowy jest interesujący, oparty na aktualnych zagadnieniach i ściśle związany z tematyką pracy. Zawiera wszystkie potrzebne informacje, które są niezbędne dla zrozumienia omawianego tematu oraz właściwej interpretacji otrzymanych rezultatów. Autorka przedstawiła liczne argumenty przemawiające za podjęciem badań. Lektura Wstępu nie pozostawia wątpliwości co do rozległej wiedzy Doktorantki. Z drugiej strony, zabrakło mi klarownego podkreślenia co wymaga jeszcze dopracowania jeśli chodzi o poprawę finalnych parametrów funkcjonalnych biomateriałów i jakie wyzwania stoją przed naukowcami w dziedzinie chemicznej i enzymatycznej modyfikacji celulozy roślinnej i bakteryjnej.

Choć Wstęp literaturowy czyta się z zainteresowaniem, nie jestem przekonany co do zasadności dokonanego w podrozdziale 2 („*Funkcjonalizacja bakteryjnej nanocelulozy*”) podziału enzymatycznej modyfikacji celulozy na metody bezpośrednie i metody pośrednie. Te drugie dotyczą immobilizacji enzymów na powierzchni celulozy jako matrycy do unieruchamiania białek, a nie modyfikacji enzymatycznej w chemicznym rozumieniu tego słowa. Dyskusyjne są także niektóre stwierdzenia, jak np. to o wysokiej reaktywności chemicznej celulozy (str. 23).

Cel badań jest przedstawiony logicznie i adekwatnie do zawartości rozprawy, zawiera ponadto zwięzły opis zakresu pracy oraz schematyczne przedstawienie pięciu głównych etapów doświadczeń. Jako główny cel pracy Doktorantka postawiła sobie „*ukierunkowaną enzymatyczną modyfikację bakteryjnej celulozy, prowadzącą do funkcjonalizacji tego mikrobiologicznie syntezowanego materiału*”. Dodatkowym celem było przeprowadzenie charakterystyki strukturalnej i morfologicznej zmodyfikowanego przy użyciu LPMO biomateriału, a także „*weryfikacja jego potencjału aplikacyjnego jako skutecznego nośnika do unieruchamiania enzymów*” w kontekście wykorzystania takiego biokompozytu w nowatorskich systemach przechowywania produktów spożywczych, czy do zastosowań medycznych. Pomimo szeroko sformułowanego celu badań, zawiera on informacje, które nie zostały jednak doprecyzowane, np. co Doktorantka miała dokładnie na myśli pisząc o ukierunkowanej modyfikacji i funkcjonalizacji celulozy? Z kolei informację, o tym, że dobierała i opracowywała „*metodę kwantyfikacji stopnia utlenienia BNC*” traktuję jako niefortunne sformułowanie, gdyż stosowała tylko jedną metodę z kwasem bicinechinowym.

Materiały i Metody budowlane

Opis zastosowanych technik i metod badawczych pozwala na odtworzenie przeprowadzonych doświadczeń. Wszystkie dane eksperymentalne zostały poddane szeroko zakrojonej analizie statystycznej, co uwiarygadnia informacje zawarte we wnioskach rozprawy doktorskiej.

Doktorantka wykorzystwała w swojej pracy spektroskopię absorpcyjną UV-Vis, spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR), skaningową mikroskopię elektronową (SEM) i dyfraktometrię rentgenowską (XRD). Wybrane metody pozwoliły na zobrazowanie topografii powierzchni utlenionego biopolimeru, określenie zmian powstałych w strukturze morfologicznej włókien celulozowych, i ocenę stopnia jej krystaliczności BNC, jednak moim zdaniem nie do końca pomogły w identyfikacji charakterystycznych grup funkcyjnych powstałych po reakcji utlenienia celulozy. Może w wyniku dokładniejszej analizy widm FTIR po dekonwolucji pasm, otrzymano by więcej dowodów potwierdzających obecność utlenionych grup w celulozie. Na uwagę zasługuje bardzo przystępny opis przeprowadzonego modelowania i optymalizacji enzymatycznego utleniania celulozy z wykorzystaniem metodologii powierzchni odpowiedzi (w skrócie znanej jako RSM) oraz zwięzła charakterystyka użytych technik mikroskopowych i spektroskopowych, ułatwiająca analizę otrzymanych wyników.

Poszczególne etapy badań i eksperymenty przedstawione w dysertacji zostały zaplanowane logicznie,

uważam, że badania były ambitne oraz zostały prawidłowo i konsekwentnie przeprowadzone. Do tej części mam tylko kilka pytań i uwag o charakterze rekomendacji.

W podrozdziale 6.3 opisującym kinetykę wiązania enzymu LPMO z BNC zabrakło odnośnika do krzywej wysycenia enzym-substrat oraz informacji, że oznaczenia wolnego enzymu wykonywano w różnych odstępach czasowych. Te informacje pojawiają się dopiero w podrozdziale 6.5 dotyczącym utleniania BNC przez LPMO, co moim zdaniem zaburza nieco porządek przekazywanych treści. Tytuł podrozdziału 6.4 „*Lityczna polisacharydowa monooksygenaza*” jest niejasno i zbyt ogólnie sformułowany, ponadto na podstawie opisu stwierdzam, że powinien być umieszczony w całości przed podrozdziałem „6.3. *Badanie kinetyki wiązania LPMO-BNC*”. Z kolei podrozdział „*Badanie zdolności absorpcji barwnika*” bardziej pasowałby do podrozdziału poświęconego „*Ocenie potencjału aplikacyjnego utlenionej BNC*”.

W celu uzupełnienia informacji zawartych w tej części dysertacji proszę Doktorantkę o odpowiedź na kilka pytań:

1. Z uwagi na mechanizm działania LPMO wskazujący na oksydatywne rozszczepienie wiązań glikozydowych, chciałbym zapytać, czy oprócz oceny stopnia utlenienia, była brana pod uwagę ocena stopnia depolimeryzacji celulozy po obróbce enzymatycznej? Czy był określany spadek masy po działaniu LPMO?
2. Zastanawiam się dlaczego nie określono wstępnie optymalnego pH i temp. dla działania litycznej monooksygenazy *NcLPMO9C* w procesie utleniania otrzymywanych w tej pracy materiałów celulozowych, tylko arbitralnie przyjęto wartości (pH 6, temp. 30°C) na podstawie danych literaturowych. Czy badania takie zostały już przeprowadzone wcześniej w ramach współpracy z ośrodkiem zagranicznym? Jak należy rozumieć w tym kontekście zawartą na str. 55 informację „*Na podstawie obszernej analizy literatury przedmiotu oraz szeregu przeprowadzonych eksperymentów wstępnych opracowano nowatorską reakcję enzymatycznego, oksydacyjnego rozszczepiania opornych, nierozpuszczalnych błon biocelulozy*”?
3. W mojej opinii wpływ wartości pH środowiska powinien być także uwzględniony w badaniach dotyczących efektywności immobilizacji lizozymu na celulozie bakteryjnej.
4. W jakiej formie używano substrat celulozowy do reakcji enzymatycznego utleniania i do badania kinetyki wiązania enzymu LPMO? Czy miał on formę zawiesiny koloidalnej, kawałków czy skrawków błon? Przed suszeniem przeprowadzono homogenizację materiału, czy zatem po liofilizacji substrat stosowano w postaci proszku? Proszę o wyjaśnienie tych kwestii.
5. Ponadto dlaczego do reakcji utlenienia i hydrolizy enzymatycznej zastosowano ponad dwukrotnie większą dawkę celulozy merceryzowanej w porównaniu do celulozy natywnej (BNC)?
6. Reakcję utlenienia celulozy prowadzono w dwóch wariantach z użyciem tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru. W jaki sposób dostarczano tlen do układu reakcyjnego i czy usuwano lub

ograniczano jego dostęp przed dozowaniem H_2O_2 ?

7. Proszę o wyjaśnienie na jakiej podstawie założono, że stężenie cukrów redukujących odpowiada liczbie wygenerowanych miejsc utlenień po oksydacyjnym rozszczepieniu wiązań glikozydowych przez enzym LPMO? Czy metoda, która wykorzystano w pracy do oznaczenia stopnia utlenienia celulozy, uwzględnia wszystkie miejsca redukujące łącznie z oligomerami nierozpuszczalnymi w wodzie, czy tylko uwolnione jednostki cukrowe rozpuszczalne w wodzie?
8. Jaką wartość maksymalnego stężenia glukozy (jako 100% konwersji BC) przyjęto do obliczania stopnia degradacji materiałów celulozowych (str. 66)?

Wyniki

Pierwsza część tego rozdziału dotyczy badań nad doбором metody wstępnej obróbki celulozy bakteryjnej. Spośród różnych form celulozy do dalszych badań wybrano celulozę wysuszoną metodą liofilizacji. Jednak tutaj chciałbym aby Doktorantka wyjaśniła dlaczego nie zdecydowała się na homogenat celulozy, który zarówno w teście na wiązanie enzymu LPMO, jak pod względem liczby wygenerowanych miejsc utlenień okazał się lepszy od celulozy liofilizowanej. Widać, że Doktorantka miała z tym pewien dylemat, ponieważ na str. 78 podaje dwa sprzeczne stwierdzenia na temat największej podatności na enzymatyczne utlenienie obu form celulozy. Jeśli zależało jej na zachowaniu odpowiedniej trójwymiarowej struktury nanofibrylarniej, to czy nie mogła zliofilizować również homogenatu celulozy? Poza tym proszę o potwierdzenie, czy do doświadczeń optymalizacyjnych reakcji utleniania celulozy używano liofilizatu BNC - nie jest to jasno napisane. Modelowanie i optymalizację warunków enzymatycznego utleniania BNC przeprowadzono przy użyciu metody RSM. Zoptymalizowano stężenie H_2O_2 , czas trwania reakcji utlenienia i ilość enzymu LPMO. Określone matematycznie optymalne warunki tego procesu zostały zweryfikowane badaniami eksperymentalnymi. Prognozowana wartość liczby miejsc utlenień była prawie identyczna z wartością otrzymaną eksperymentalnie, co potwierdza wiarygodność opracowanego modelu matematycznego. Tę część badań uważam za bardzo wartościową, niemniej jednak uwzględnienie innych czynników (np. temperatury) na etapie selekcji zmiennych istotnych statystycznie, jeszcze bardziej podniosłoby wartość aplikacyjną wyników pracy. Na wykresach 5 zabrakło odpowiednich oznaczeń istotności statystycznej, które ułatwiłyby zrozumienie podstawy późniejszego wyznaczenia zakresów zmienności badanych parametrów wejściowych.

W kolejnej części pracy Pani mgr Monika Kaczmarek dobrała stężenie NaOH do merceryzacji celulozy i przeprowadziła analizę wpływu tego procesu na wydajność utlenienia, morfologię powierzchni, rozkład średnicy włókien i wielkości porów, oraz stopień krystaliczności w biomateriale. Wyniki zestawiła dla natywnej i utlenionej celulozy. W dalszej kolejności dokonała oceny podatności tych materiałów na degradację w glebie i hydrolizę enzymatyczną przy użyciu preparatu celulolitycznego.

Porównując wartości indeksów krystaliczności wydaje się, że 20% stężenie NaOH byłoby lepszym

wyborem do alkalicznej obróbki celulozy niż stężenie 15%. Wprawdzie, jak słusznie zauważa Doktorantka, zbytne obkurczenia się materiału traktowanego 20% NaOH może prowadzić „do nadmiernego zbitcia (upakowania) materiału, mogącego ograniczyć dostępność enzymów do jego powierzchni”, jednak sądzę, że problem ten można było spróbować rozwiązać poprzez poddanie celulozy pęcznieniu w odpowiednim roztworze wodnym przed użyciem jej do kolejnych zastosowań.

Co do uwag krytycznych, trudno zgodzić się ze stwierdzeniem, że „analiza organoleptyczna” natywnych i merceryzowanych celuloz „umożliwiła określenie zmian zaistniałych w strukturze BNC na skutek jej obróbki alkalicznej”. Pozwoliła ona raczej porównać zmiany w wyglądzie i kształcie, co przedstawia Rys. 20. Doktorantka wykazała, że merceryzacja bakteryjnej celulozy umożliwia czterokrotne zwiększenie jej enzymatycznego utlenienia. Warto byłoby sprawdzić, czy podczas samego procesu merceryzacji nie dochodzi do częściowego generowania miejsc utlenień w celulozie i jej częściowej depolimeryzacji – wskazują na to pewne podobieństwa zmian na widmach FTIR celulozy utlenianej enzymatycznie i traktowanej NaOH (np. spadek intensywności pasm w obszarze 1160 cm^{-1} wskazujący na rozerwanie wiązań C-O-C β -1,4-glikozydowych). Jeśli wyniki te nie były jeszcze publikowane w naukowych czasopismach, zalecałbym zweryfikowanie niektórych wniosków dotyczących analiz ATR-FTIR; zwłaszcza tych wyników, które dały podstawy do wyliczeń indeksów krystaliczności i potwierdzenia obecności odpowiednich grup funkcyjnych w utlenionej i/lub merceryzowanej celulozie. Warto przyrzeć się jeszcze raz intensywnościom i przesunięciom pasm w zakresach charakterystycznych liczb falowych po nałożeniu początków linii bazowych i wykonaniu dekonwolucji widm. Obecnie trudno jest jednoznacznie stwierdzić, czy zmiany w intensywności niektórych pasm wynikają z częściowej depolimeryzacji celulozy i jednoczesnego tworzenia się utlenionych miejsc. Przykładowo na widmie FTIR (Rys. 23) niewidoczny jest wzrost sygnału przy liczbie falowej 3240 cm^{-1} , po enzymatycznym utlenieniu celulozy (natywnej i merceryzowanej).

W dalszej części Doktorantka prezentuje wyniki prac nad zdolnością celulozy do adsorpcji barwnika (Czerwieni Kongo), immobilizacji lizozymu i następnie ocenia właściwości użytkowe biokompozytów: aktywność hydrolityczną, przeciwdrobnoustrojową i antyoksydacyjną. Wartym odnotowania osiągnięciem tej pracy jest wykazanie, że utlenienie celulozy bakteryjnej przyczynia się do istotnego wzrostu wydajności immobilizacji lizozymu w porównaniu z celulozą niemodyfikowaną. Duże znaczenie praktyczne ma wyższa stabilność enzymu związanego z utlenioną celulozą niż enzymu w stanie wolnym, co z nawiązką kompensuje spadek jego aktywności hydrolitycznej po procesie immobilizacji. Na uwagę zasługują również wyniki pokazujące, że taki kompozyt charakteryzuje się wyższą aktywnością przeciwbakteryjną i antyoksydacyjną w porównaniu do celulozy natywnej i enzymu w stanie wolnym. W tym miejscu prosiłbym o doprecyzowanie, czy ilość wolnego enzymu ($0,1\text{ mg/ml}$) użytego do oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej i do określenia właściwości antyoksydacyjnych opowiadała ilości białka związanego

na nośnikach celulozowych, czy odnosiła się do ich aktywności katalitycznej? Ponadto chciałbym skierować do Doktorantki inne pytania i prosić o ustosunkowanie się do następujących uwag:

9. Tytuł podrozdziału 11 sugeruje, że immobilizację lizozymu prowadzono tylko na utlenionej celulozie, jednak wykres 14 przedstawia również dane dla natywnej (nieutlenionej) celulozy. W związku z tym proszę o doprecyzowanie, dla której celulozy (utlenionej czy natywnej) przedstawiono wyniki na wykresie 13 pokazującym wpływ stężenia enzymu, czasu i temperatury na wydajność immobilizacji lizozymu?
10. Jak Doktorantka zinterpretowałaby ubytek suchej masy celulozy po obróbce alkalicznej (Tab. 12) oraz obserwowany spadek jej biodegradowalności (Wykres 9) i zdolności adsorpcyjnej (Wykres 11) po merceryzacji, pomimo wzrostu amorficzności materiału po tym procesie?
11. Czy kontrolowano w jakiś sposób desorpcję lizozymu z matrycy celulozowej w trakcie przeprowadzania testów aktywności antybakteryjnej?
12. Na podstawie jakich zmian dyfraktometrycznych stwierdzono, że po merceryzacji nastąpiła, cytując *„całkowita konwersja polimorficzna celulozy I w celulozę II”*?
13. Na str. 111 stwierdzenie, że obniżenie temperatury do 15°C *„powodowało spadek ilości unieruchomionego lizozymu do nawet 20%”* jest sprzeczne z wynikami przedstawionymi na wykresie 13 a.

W podsumowaniu mojej opinii o tej części pracy stwierdzam, że jest ona bardzo dobrze przygotowana, czyta się ją z zainteresowaniem, niepotrzebnie tylko powtarzane są szczegółowe informacje zawarte wcześniej w *Materialach* i *Metodach badawczych*.

Dyskusja

Dyskusję przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej pani mgr Kaczmarek oceniam jednoznacznie pozytywnie. Odnosi ona uzyskane wyniki do istniejącego stanu wiedzy. Praktyczne konsekwencje zastosowania wyników badań zostały dobrze przedstawione we *Wnioskach*. Mój szacunek budzi klarowna konfrontacja osiągnięć pracy Doktorantki z wynikami innych grup badawczych. W tabeli zestawiono wydajności reakcji enzymatycznego utlenienia różnych substratów celulozowych katalizowanych przez lityczne polisacharydowe monooksygenazy, co znacznie ułatwia śledzenie i porównywanie danych. Szkoda tylko, że w tekście nie wspomniano, że część substratów jest pochodzenia roślinnego. Można było na tej podstawie uzupełnić dyskusję o wskazanie zalet stosowania celulozy bakteryjnej w procesie oksydatywnej modyfikacji polisacharydów i/lub ograniczeń przeprowadzonych przez Doktorantkę badań.

Dyskusja wyników jest niezbędnym elementem każdego tekstu naukowego, nie jest łatwo ją przygotować jeśli badania, takie jak te opisane w niniejszej dysertacji, mają charakter interdyscyplinarny. W tej części, z recenzenckiego punktu widzenia, chciałbym zwrócić uwagę na inne wątki, które mogły być uwzględnione w dyskusji:

- zabrakło uzasadnienia wyższej oporności celulozy merceryzowanej na degradację glebową i hydrolizę enzymatyczną w porównaniu do natywnej BNC; to zaskakujące gdyż wzrost liczby obszarów amorficznych powinien prowadzić do zwiększenia podatności takiego materiału na degradację.
- kolejna kwestia to gorsze zdolności adsorpcyjne celulozy merceryzowanej (w wiązaniu barwnika i enzymu LPMO) w porównaniu z natywną BNC; być może wtórne uwodnienie zbitej struktury włókien tego materiału poprawiłoby te właściwości, skoro jak wykazała Doktorantka, uwodnione próbki wiązały lepiej enzym LPMO niż zliofilizowana, sucha celuloza.
- różnice w zdolności sorpcyjnej (barwnika i enzymów) materiałów celulozowych merceryzowanych i natywnych oraz ich utlenionych odpowiedników można było odnieść do różnic w oznaczonej porowatości tych materiałów, uwzględniając także stopień ich uwodnienia i retencję wody.
- choć prawdą jest, że cytuję „jednym z ważniejszych czynników determinujących maksymalną zdolność wiązania (B_{max}), (...) jest wielkość powierzchni właściwej substratu” to jednak nie można tego stwierdzić na podstawie danych zawartych w Tabeli 21.
- nie zgodzę się ze stwierdzeniem zawartym w ostatnim akapicie dyskusji, że „Przedkładana dysertacja doktorska dostarczyła wielu informacji na temat specyficzności działania litycznej polisacharydowej monoooksygenazy, *NcLPMO9C*”

Z czystej ciekawości chciałbym zapytać o ekonomikę procesu modyfikacji celulozy. Jaka jest opinia Doktorantki na temat opłacalności enzymatycznej metody jej funkcyjnalizacji w porównaniu z metodami chemicznymi? Czy znane są może jakieś opracowania przedstawiające porównanie kosztów obu metod?

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Rozprawa doktorska została przygotowana starannie pod względem edytorskim, jest napisana zrozumiałym językiem. Doktorantka swobodnie i poprawnie posługuje się terminologią naukową w przedmiotowym zakresie. Tabele, ryciny i wykresy są czytelne, chociaż przy niektórych rysunkach (szczególnie przedstawiających widma FTIR), Autorka mogła zadbać o dodanie stosownych powiększeń pozwalających na ocenę badanych zmian przez czytelnika (np. dotyczy to pasm przypisanych do regionów krystalicznych i amorficznych w cząsteczce celulozy).

W trakcie lektury dysertacji natknąłem się na nieliczne błędy o charakterze edytorskim i stylistycznym. Można mieć pewne zastrzeżenia co do niektórych sformułowań i wyrażeń w rozprawie. Z recenzenckiego obowiązku przytoczę kilka przykładów:

- jednym z rażących błędów pracy jest używanie słowa ilość zamiast liczba w odniesieniu do „miejsc utlenień” jako obiektów policzalnych;
- nieprawidłowe moim zdaniem są sformułowania, takie jak *eksprymacja genu* (powinno być ekspresja genu), czy spolszczenie *grafting polimerowy*, który w istocie odnosi się do modyfikacji powierzchni cząstek łańcuchami polimerowymi;

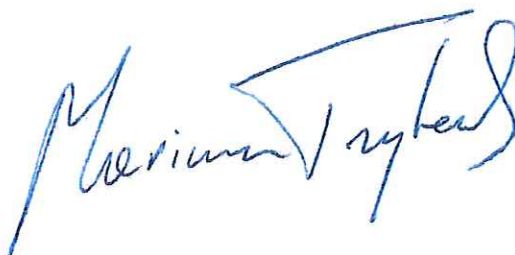
- na str. 17, użyto skrótu ESP a powinno być EPS;
- na str. 30 jest „do hydrofobizacja”;
- W Tabeli 2 na str. 36 pojawia się termin „sukcynylowana BNC”
- użycie określenia „stanu spoczynkowego Cu(II)” w kontekście redukcji miedzi z II stopnia na I stopień utlenienia jest nieprawidłowe;
- brak odnośnika do Rys. 13 w tekście;
- na stronie 45, widnieje zapis „(2,5-<10% (aep) aktywnego białka enzymatycznego)”, który jest niejasny;
- w sekcji przygotowania form substratu, Doktorantka wyszczególniła *homogenat, błony mokre, suche i liofilizowane*; zwracam uwagę, że błony po liofilizacji także można uznać za „suche”.
- w Tabeli 3 (str. 54) błędnie podany jest numer podpunktu, jest „2.2.1.5” a powinno być 5.5;
- w kontekście omawiania wiązania się enzymu do materiału celulozowego, bardziej właściwe byłoby określenie powinowactwo niż „dostępność enzymów do jego powierzchni”;
- na słabe wiązanie się enzymu z membranami wskazuje nie „niższa” lecz wyższa „wartość stałej dysocjacji” (str. 123);
- według mnie „skryning czynników istotnych statystycznie” jest niewłaściwym określeniem, ponieważ w badaniu istotności parametrów wejściowych użyto *a priori* tylko trzech parametrów.

Pomimo pewnych uchybień oraz moich krytycznych uwag, które mają przede wszystkim charakter polemiczny i nie pomniejszają bardzo dużej wartości poznawczej i aplikacyjnej pracy, uważam, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr inż. Monikę Kaczmarek prezentuje bardzo dobry poziom merytoryczny i naukowy. Została prawidłowo zaplanowana i konsekwentnie zrealizowana. Stanowi oryginalne rozwiązanie podjętego problemu naukowego i wnosi oryginalny wkład do wiedzy o biomateriałach funkcjonalnych. W mojej opinii, wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej są przekonujące i świadczą o rzetelnym i dokładnym przeprowadzeniu zaplanowanych badań, które umożliwiły osiągnięcie celu pracy. Podkreślić należy szeroki zakres wykonanych eksperymentów, który wskazuje na ogrom pracy włożonej w przeprowadzenie: biosyntezy celulozy, jej modyfikację, charakterystykę strukturalną i dodatkowo zbadanie otrzymanych kompozytów pod kątem różnych zastosowań. Doktorantka umiejętnie posługuje się technikami mikrobiologicznymi oraz metodami analizy instrumentalnej jako narzędziami niezbędnymi do ilościowej i jakościowej charakterystyki produktów, zaś otrzymane wyniki interpretuje prawidłowo. Należy dodać, że uczestniczyła ona w projektach badawczych, wygłaszała komunikaty na międzynarodowych konferencjach naukowych i jest współautorką dwóch publikacji w czasopismach z $IF > 5$.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Kaczmarek jest wartościowym dziełem naukowym, zawiera elementy nowatorskie, a przedstawione w niej wyniki mają wyraźny charakter aplikacyjny. Niniejsze badania wskazują na możliwość zastosowania otrzymanych,

kompozytów w przemyśle spożywczym w celu zwiększenia bezpieczeństwa żywności oraz przedłużenia jej okresu trwałości.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona przez mgr inż. Monikę Kaczmarek rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, wnosząc znaczny wkład w dziedzinę nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. **Biorąc pod uwagę powyższe oraz uwzględniając bardzo wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej, jak również możliwość praktycznego zastosowania jej wyników, zwracam się do Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Kaczmarek oraz wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**





Dr hab. Mariusz Trytek, prof. uczelni
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS
mariusz.trytek@mail.umcs.pl

Lublin, 24.08.2023 r.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Kaczmarek
przygotowanej pod kierunkiem dr hab. inż. Aneta Białkowskiej, prof. uczelni (promotor)
i dr inż. Karoliny Ludwickiej (promotor pomocniczy) w Instytucie Biotechnologii
Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr inż. Moniki Kaczmarek pt. „Enzymatyczna funkcjonalizacja bakteryjnej nanocelulozy”, uwzględniając bardzo wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej, innowacyjność, jak również możliwość praktycznego zastosowania jej wyników, wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Kaczmarek.

Z poważaniem,

