

Streszczenie

Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie możliwości wykorzystania enzymów immobilizowanych na membranach z celulozy bakteryjnej (CB) jako czynników degradujących polisacharydowe składniki macierzy biofilmu *P. aeruginosa* oraz wspomagających proces antybiotykoterapii.

W ostatnich latach nastąpił znaczący postęp w wykorzystaniu zarówno naturalnych, jak i syntetycznych polimerów jako materiałów biomedycznych. Wśród naturalnych polimerów szczególnym zainteresowaniem cieszy się celuloza bakteryjna, która jest syntetyzowana przez wiele szczepów bakterii z rodzaju *Komagataeibacter*. Biopolimer ten charakteryzuje się unikalnymi właściwościami materiałowymi, takimi jak wysoka krystaliczność czy wytrzymałość mechaniczna, co predysponuje CB do zastosowań w aplikacjach biomedycznych jako doskonały materiał opatrunkowy lub nośnik dla różnego rodzaju substancji aktywnych. Mimo to, nadal istotnymi czynnikami ograniczającymi powszechne wykorzystanie CB jest kosztowny proces jej wytwarzania oraz brak właściwości bakteriobójczych i antybiofilmowych.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zbadano potencjał polieteru silikonowego jako dodatku do medium hodowlanego Hestrin–Schramm (HS), w celu podniesienia efektywności produkcji CB przez szczep *Komagataeibacter xylinus*. Modyfikacja właściwości fizykochemicznych medium poprzez znaczące obniżenie jego napięcia powierzchniowego wpłynęła korzystnie na wydajność procesu syntezy CB. Otrzymany z wykorzystaniem modyfikowanego medium hodowlanego biopolimer charakteryzował się lepszymi parametrami wodnymi, a także nie wykazywał cytotoksyczności względem komórek eukariotycznych, co potwierdziło jego przydatność w zastosowaniach biomedycznych.

W niniejszej pracy udowodniono również, że immobilizacja na powierzchni membran CB hydrolazy glikozydowej PelA_h lub liazy alginianowej, enzymów mających zdolność do degradacji kluczowych elementów polisacharydowych macierzy biofilmowej, może skutecznie destabilizować proces wytwarzania biofilmu przez *P. aeruginosa*. Ponadto wykazano, że unieruchomienie liazy alginianowej na powierzchni CB istotnie zwiększa wrażliwość komórek *P. aeruginosa* na gentamycynę, co umożliwia obniżenie dawki terapeutycznej.

Modyfikacje struktury CB zmieniające jej właściwości fizykochemiczne mogą poszerzyć jej zastosowanie w formie suchej jako nośnika dla substancji aktywnych. W badaniach własnych przeprowadzono modyfikację powierzchni CB niskociśnieniową plazmą argonową, przy użyciu argonu jako gazu roboczego (LPArP). Stwierdzono, że dzięki modyfikacji powierzchni CB z wykorzystaniem LPArP i znajomości właściwości strukturalnych enzymów można kontrolować proces ich uwalniania z powierzchni nośnika. Ponadto, unieruchomienie enzymów PelA_h i PslG_h na modyfikowanej z wykorzystaniem LPArP CB nie wpływa istotnie na zachowanie ich aktywności antybiofilmowej.

Podsumowując, w przeprowadzonych badaniach dowiedziono, że unikalna struktura celulozy bakteryjnej umożliwia jej zastosowanie jako nośnika do immobilizacji specyficznych enzymów, takich jak PelA_h, PslG_h, czy liaza alginianowa, nadających jej właściwości antybiofilmowe. Takie innowacyjne rozwiązanie może wspomóc walkę z zakażeniami ran wywołanych przez *P. aeruginosa*, poprzez hamowanie procesu formowania biofilmu i zwiększenie lekowrażliwości tych patogennych mikroorganizmów.

BA.07-1023

Magdalena Chęć

Abstract

The aim of the doctoral dissertation was to investigate the potential use of enzymes immobilized on bacterial cellulose (BC) membranes as agents for degrading polysaccharide components of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix and supporting the process of antibiotic therapy.

In recent years, there has been significant progress in the utilization of both natural and synthetic polymers as biomedical materials. Among natural polymers, BC has gained particular interest due to its efficient synthesis by various strains of *Komagataeibacter* bacteria. This biopolymer exhibits unique material properties, such as high crystallinity and mechanical strength, which make BC highly suitable for biomedical applications as an excellent wound dressing material or as a carrier for various active substances. However, despite these advantages, the utilization of BC is still limited by its costly production process and the lack of bactericidal and anti-biofilm properties.

During the research conducted in this doctoral thesis, the potential of silicone polyether as an additive to the Hestrin-Schramm (HS) growth medium was examined to enhance the efficiency of BC production by the *Komagataeibacter xylinus* strain. It was shown that the modification of the physicochemical properties of the cultivation medium, achieved by significantly reducing its surface tension, had a beneficial impact on the yield of BC synthesis process. Furthermore, it was demonstrated that the biopolymer obtained using the modified growth medium exhibited improved water parameters and demonstrated non-cytotoxicity towards eukaryotic cells, confirming its suitability for biomedical applications.

This study also demonstrated that the immobilization of glycoside hydrolase PelA_h or alginate lyase, enzymes capable of degrading key polysaccharide components of the biofilm matrix, on the surface of BC membranes can effectively destabilize the process of biofilm formation by *P. aeruginosa*. Furthermore, it was shown that immobilizing alginate lyase on BC significantly increases the sensitivity of *P. aeruginosa* cells to gentamicin, allowing for a reduction in the therapeutic dose and enhancing the safety of the applied antibiotic therapy.

Modifications of the BC structure, altering its physicochemical properties, can expand its application as a dry carrier for delivering active substances. Therefore, in current research the surface modification of BC using low-pressure argon plasma with argon as the working gas (LPArP) was conducted. It was observed that through surface modification with LPArP and understanding the structural properties of enzymes, the release process from the carrier surface can be controlled. Furthermore, it was also demonstrated that the anti-biofilm activity of PelA_h and PslG_h enzymes was not significantly affected by their immobilization on the LPArP-modified BC.

In conclusion, the conducted research has demonstrated that the unique structure of bacterial cellulose enables its use as a carrier for immobilizing specific enzymes, such as PelA_h, PslG_h, and alginate lyase, conferring it with anti-biofilm properties. This innovative approach can potentially aid in combating wound infections caused by *P. aeruginosa* by inhibiting the biofilm formation process and enhancing the susceptibility of these pathogenic microorganisms to antibiotics.

31.07.2023

Magdalena Chaspe



UMCS

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE
Wydział Biologii i Biotechnologii

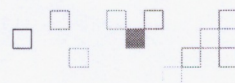
Lublin, 13.11.2023 r.

dr hab. Anna Pawlik

**Katedra Biochemii i Biotechnologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin**

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Charęzy
pt. „Wpływ immobilizacji enzymów mających zdolność do degradacji biofilmów na ich
aktywność katalityczną z wykorzystaniem celulozy bakteryjnej jako nośnika”
wykonanej w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie**

Podstawą formalną wykonania niniejszej recenzji jest pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo **Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie**, Pani dr hab. inż. Małgorzaty Ożgo, prof. ZUT z dnia 20.09.2023 r., w którym zostałam poinformowana, że Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo **Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie** powierzyła mi przygotowanie recenzji rozprawy ww. pracy. Rozprawa doktorska została opracowana pod kierunkiem naukowym dr. hab. Jolanty Kochel-Karakulskiej, prof. ZUT oraz promotora pomocniczego dra inż. Radosława Drozda.



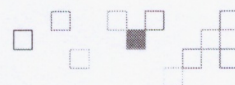
Celowość podjętej tematyki badawczej

W ostatnich latach nastąpił znaczący postęp w wykorzystaniu zarówno naturalnych, jak i syntetycznych polimerów jako materiałów biomedycznych. Celuloza jest najobficiej występującym naturalnym polimerem na Ziemi. Stanowi podstawowy składnik strukturalny ściany komórkowej roślin, natomiast może być również syntetyzowana zewnątrzkomórkowo w formie biofilmu przez mikroorganizmy, min. bakterie z rodzaju *Komagataeibacter*. Celuloza bakteryjna (CB) charakteryzuje się wysoką czystością chemiczną, wysoką krystalicznością i porowatością. Ponadto CB jest materiałem biokompatybilnym i biodegradowalnym o dużej zdolności zatrzymywania wody i wytrzymałości mechanicznej, co sprawia że jest wykorzystywana w wielu gałęziach przemysłu i biomedycynie jako nowoczesny materiał opatrunkowy lub nośnik dla różnego rodzaju substancji aktywnych, w tym enzymów. Pomimo wielu zalet CB i szerokich możliwości jej zastosowania istnieje również szereg ograniczeń związanych z jej wykorzystaniem w skali laboratoryjnej i przemysłowej, do których należy nieefektywność syntezy i wysoki koszt mediów hodowlanych oraz brak właściwości bakteriobójczych i antybiofilmowych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Cheręzy dotycząca możliwości wykorzystania enzymów immobilizowanych na membranach z celulozy bakteryjnej (CB) jako czynników degradujących polisacharydowe składniki macierzy biofilmu *P. aeruginosa* oraz wspomagających proces antybiotykoterapii doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej oraz ocena strony formalnej pracy

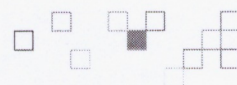
Rozprawa doktorska mgr inż. M. Cheręzy została przedstawiona w formie 4 oryginalnych, wieloautorskich artykułów opublikowanych w latach 2020-2023 w czasopismach z listy Journal Citation Report (JCR) tj.: International Journal of Biological Macromolecules (2022), Carbohydrate Polymers (2020), International Journal of Molecular Sciences (2023) oraz Applied Sciences (2023). Należy podkreślić wysokie parametry bibliometryczne tych prac



(sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor, zgodnie z rokiem publikacji wynosi 25,38), jak również ich spójność tematyczną. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, co wskazuje na Jej znaczący udział w powstaniu każdej pracy. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów prac, Jej udział w powstaniu w/w artykułów jest wiodący i większościowy. Doktorantka uczestniczyła w opracowaniu koncepcji badań oraz we wszystkich etapach eksperymentu, samodzielnie wykonywała część pomiarów, opracowywała uzyskane wyniki, wykonywała analizy statystyczne oraz brała udział w przygotowywaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Kopie prac oraz suplementów publikacji, które stanowią oceniane osiągnięcie naukowe zostały poprzedzone autoreferatem, który zawierał kolejno: streszczenia przygotowane w języku polskim i angielskim, teoretyczne wprowadzenie do tematu rozprawy doktorskiej, hipotezy, cel badawczy, materiały i metody zastosowane w badaniach, uzyskane wyniki, wnioski, opis pracy naukowo-badawczej oraz bibliografię. Doktorantka przedstawiła także oświadczenia współautorów publikacji naukowych wchodzących w skład zaprezentowanego cyklu prac oraz sumaryczne zestawienie dorobku naukowego.

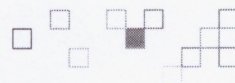
Głównym celem rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy było zbadanie możliwości wykorzystania enzymów immobilizowanych na membranach z celulozy bakteryjnej (CB) jako czynników degradujących polisacharydowe składniki macierzy biofilmu *P. aeruginosa* oraz wspomagających proces antybiotykoterapii. W ramach celu głównego Doktorantka postawiła sobie również cele szczegółowe dotyczące:

- Oceny wpływu modyfikacji medium Hestrin–Schramm polieterem silikonowym na efektywność syntezy celulozy przez szczep *K. xylinus* oraz właściwości fizykochemiczne i parametry wodne uzyskanej CB;
- Oceny cytotoksyczności syntetyzowanych przez *Komagataeibacter xylinus* membran CB względem komórek eukariotycznych;
- Oceny wpływu immobilizacji białka PelAh oraz liazы alginianowej na strukturę biofilmu wytwarzanego przez *P. aeruginosa* na powierzchni membran CB;



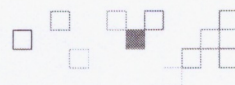
- Oceny wpływu zmian w strukturze biofilmu formowanego przez *P. aeruginosa* na powierzchni CB z unieruchomioną liazą alginianową na zmiany wrażliwości bakterii na genatmycinę;
- Oceny wpływu modyfikacji powierzchni CB przy użyciu niskociśnieniowej plazmy z wykorzystaniem argonu jako gazu roboczego na właściwości fizykochemiczne i morfologiczne oraz profil uwalniania enzymów PelAh i PslGh z powierzchni celulozy;
- Oceny wpływu uwalniania enzymów PelAh i PslGh z powierzchni CB modyfikowanej niskociśnieniową plazmą z wykorzystaniem argonu jako gazu roboczego na formowanie biofilmu przez *P. aeruginosa*.

Pierwsza z zaprezentowanych prac, zatytułowana *Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity* opublikowana w 2022 roku w renomowanym czasopiśmie *International Journal of Biological Macromolecules*. W pracy tej zbadano potencjał polieteru silikonowego (SPS) jako dodatku do medium hodowlanego Hestrin-Schramm (HS), w celu podniesienia efektywności produkcji CB przez szczep *K. xylinus*. We współpracy z naukowcami z Poznańskiego Parku Naukowo - Technologicznego oraz Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu Doktorantka dokonała syntezy oraz charakterystyki SPS. W kolejnym etapie badań Doktorantka wykazała, że modyfikacja właściwości fizykochemicznych medium poprzez znaczące obniżenie jego napięcia powierzchniowego wpłynęła korzystnie na wydajność procesu syntezy CB. Otrzymany z wykorzystaniem modyfikowanego medium hodowlanego biopolimer charakteryzował się lepszymi parametrami wodnymi, a także nie wykazywał cytotoksyczności względem komórek mysich fibroblastów linii L929 oraz nie wpływał na żywotność bakterii *K. xylinus*, co potwierdziło jego przydatność w nowoczesnych terapiach gojenia ran opierających się na wykorzystaniu tzw. mokrych opatrunków. Dodatkowo we współpracy z naukowcami z Zakładu Chemii i Technologii Związków Krzemu Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu Doktorantka przeprowadziła analizę stabilności termicznej CB. Otrzymane wyniki wykazały



brak negatywnego wpływu dodatku SPS na stabilność termiczną otrzymywanej CB, potwierdzając brak oddziaływania analizowanego surfaktantu na strukturę molekularną biopolimeru. Uzyskane wyniki znakomicie wprowadzają w tematykę kolejnych opublikowanych manuskryptów.

Druga z prac *Glycoside hydrolase (PelAh) immobilization prevents Pseudomonas aeruginosa biofilm formation on cellulose-based wound dressing* ukazała się w czasopiśmie *Carbohydrate Polymers* w 2020 roku. Celem badań była immobilizacja na powierzchni CB domeny hydrolitycznej enzymu PelAh, mającej zdolność do rozkładu egzopolisacharydu Pel obecnego w strukturze biofilmu wytwarzanego przez *P. aeruginosa*. We wstępnym etapie badań Doktorantka przeprowadziła heterologiczną syntezę PelAh, przygotowała nośnik (CB), przeprowadziła immobilizację enzymu, a wydajność procesu określiła poprzez analizę *in silico* ładunku na powierzchni białka PelAh. Analiza ta wykazała prawidłową orientację unieruchomionego białka na powierzchni nośnika, zapewniającą dostęp do egzopolisacharydu Pel wydzielanego przez *P. aeruginosa* podczas wytwarzania macierzy biofilmu. Następnie Doktorantka określiła wpływ immobilizacji białka PelAh na formowanie biofilmu przez *P. aeruginosa* na powierzchni nośnika przeprowadzając w tym celu dwuwymiarową analizę korelacyjną widm ATR-FTIR oraz analizę morfologiczną (SEM), które uwiaryściły zmiany w strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmu wytworzonego na powierzchni CB. W kolejnym etapie badań Doktorantka badała wpływ immobilizacji enzymu PelAh na stabilność biofilmu *P. aeruginosa*. Zaprezentowane analizy pozwoliły Jej na stwierdzenie, że ilość uwolnionych komórek bakteryjnych wzrastała proporcjonalnie do ilości PelAh immobilizowanego na powierzchni nośnika, co potwierdza kluczową rolę egzopolisacharydu Pel w początkowych etapach wytwarzania i adhezji biofilmu *P. aeruginosa*. Wykazała również, że zarówno enzym w formie rozpuszczonej, jak i membrany CB z immobilizowanym białkiem PelAh nie był cytotoksyczny względem komórek mysich fibroblastów linii L929.



Trzecia praca *Enhancement of inhibition of the Pseudomonas sp. Biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin* opublikowana w 2023 roku czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences dotyczyła wykazania, że immobilizacja na powierzchni membran CB liazы alginianowej oraz zastosowanie gentamycyny może skutecznie destabilizować proces wytwarzania biofilmu przez *P. aeruginosa*. Doktorantka badania rozpoczęła od przeprowadzenia charakterystyki uzyskanej rekombinowanej liazы alginianowej oraz potwierdzenia efektywność działania enzymu w formie rozpuszczonej wobec biofilmu *P. aeruginosa*. Dodatkowo we współpracy z naukowcami z Katedry Inżynierii Polimerów i Biomateriałów Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie Doktorantka wykazała, że liazа nie wykazuje cytotoksyczności względem komórek mysich fibroblastów tkanki łącznej linii L929. Przeprowadzony w kolejnym etapie badań proces immobilizacji enzymu na membranie CB umożliwił określenie wpływu początkowego stężenia liazы oraz czasu immobilizacji na ilość zaadsorbowanego białka. W celu wyjaśnienia mechanizmu adsorpcji Doktorantka dokonała analiz *in silico*, które wykazały że liazа alginianowa oddziałuje z miejscami adsorpcyjnymi na powierzchni CB tworząc monowarstwę. Natomiast analiza rozkładu ładunku na powierzchni enzymu pozwoliła stwierdzić, że centrum aktywne liazы charakteryzuje się głównie obszarami naładowanymi dodatnio, a pozostała powierzchnia molekularna białka charakteryzowała się głównie obecnością obszarów naładowanych ujemnie. W kolejnym etapie badań Doktorantka wraz z naukowcami z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie zbadała potencjał zeta na powierzchni CB, który okazał się zbyć zależny od wartości pH. Przeprowadzona analiza wpływu adsorpcji liazы alginianowej na formowanie biofilmu przez *P. aeruginosa* na powierzchni CB nie wykazała istotnych różnic, a analiza widm ATR-FTIR pozwoliła stwierdzić, że immobilizacja liazы alginianowej wpływa na destabilizację biofilmu *P. aeruginosa* poprzez zmiany w strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej. Przeprowadzona w ostatnim etapie badań równoczesna immobilizacja na membranach CB liazы alginianowej i gentamycyny istotnie zwiększyła efektywność działania gentamycyny, co objawiało się redukcją żywotności



uwolnionych komórek. Należy podkreślić, że wyniki te mają szczególnie wysoką wartość naukową oraz istotne znaczenie biotechnologiczne ze względu na możliwość wykorzystania ich w biomedycynie.

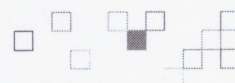
W ostatniej pracy *Evaluation of argon plasma treated bacterial cellulose usability as carrier for controlled releases enzymes PelAh and PslGh able to biofilm eradication*, która ukazała się w 2023 w czasopiśmie Applied Sciences, Doktorantka podjęła się weryfikacji wpływu modyfikacji CB niskociśnieniową plazmą z użyciem argonu jako gazu roboczego (LPArP) na profile uwalniania glikohydrolaz PelAh i PslGh. W tym celu przeanalizowano wpływ ww. modyfikacji na strukturę CB z użyciem techniki XPS, ATR-FTIR oraz SEM i wykazano, że modyfikacja struktury CB niskociśnieniową plazmą przy użyciu argonu jako gazu roboczego pozytywnie wpływa na jej właściwości fizykochemiczne i morfologiczne. Następnie Doktorantka użyła tak scharakteryzowany materiał do immobilizacji enzymu PelAh i PslGh stosując liofilizację jako metodę suszenia zaadsorbowanych glikohydrolaz, która gwarantowała zachowanie aktywności katalitycznej białek. We współpracy z naukowcami z Uniwersytetu Jagiellońskiego Pani mgr inż. M. Charęza przeprowadziła również analizę stabilności białek PelAh i PslGh metodą różnicowej fluorymetrii skaningowej. Wszystkie badane preparaty okazały się być stabilne strukturalnie w temperaturze 4°C przez okres 30 dni. Po wykazaniu braku cytotoksyczności enzymu PslGh względem komórek mysich fibroblastów Doktorantka zbadała wpływ modyfikacji powierzchni struktury CB na proces uwalniania PelAh i PslGh oraz ich zdolność do inhibicji wytwarzania biofilmu przez bakterie *P. aeruginosa*. W wyniku analiz stwierdzono, że modyfikacja struktury CB niskociśnieniową plazmą przy użyciu argonu jako gazu roboczego wpływa na uwalnianie enzymów PelAh (80%) i PslGh (60%) z powierzchni CB. Wskazano również pewne różnice w profilach uwalniania obydwu glikohydrolaz. Stosując analizy *in silico* Doktorantka wykazała, że białka uwalniały się z powierzchni CB na drodze dyfuzji, a wpływ rozkładu potencjału elektrostatycznego na powierzchni molekularnej glikohydrolaz oraz całkowitego ładunku na profil uwalniania białek był porównywalny. Co ciekawe, stwierdzono że obserwowalne różnice w profilach uwalniania PelAh i PslGh z



powierzchni CB niemodyfikowanej jak i modyfikowanej z użyciem LPArP mogą być wynikiem różnic molekularnych. W kluczowym etapie badań poddano ocenie wpływ efektywności immobilizacji PelAh i PslGh na proces hamowania tworzenia biofilmu przez *P. aeruginosa*. W wyniku badań Doktorantka wykazała, że zmiany w profilach uwalniania glikohydrolaz z CB modyfikowanej niskociśnieniową plazmą przy użyciu argonu jako gazu roboczego wpływają na stopień inhibicji wytwarzania biofilmu przez *P. aeruginosa*. Wyniki uzyskane w toku realizacji tych badań oraz zastosowane przez Doktorantkę metody badawcze należy uznać za nowatorskie, co wskazuje na doskonałe przygotowanie praktyczne Pani mgr inż. M. Charezy oraz ogromną wiedzę, kompletny i komplementarny warsztat analityczny całego zespołu badawczego.

Podsumowując tą część rozprawy doktorskiej nie mam uwag krytycznych, co do sposobu zaplanowania i wykonania zaprezentowanych badań jednak w tym miejscu nasuwają się uwagi/komentarze do dyskusji w trakcie obrony pracy doktorskiej:

1. Czy Doktorantka planowała/próbowwała zastosować inne niż adsorpcja metody immobilizacji enzymów?
2. Czy podejmowano próby testowania skuteczność destabilizacji procesu wytwarzania biofilmu wobec innych klinicznych i środowiskowych szczepów *P. aeruginosa*? Niewątpliwie podniosłoby to wagę i wiarygodność uzyskanych wyników.
3. Czy przeprowadzano porównawcze analizy bioinformatyczne sekwencji nukleotydowych genów kodujących PelAh, PslGh i liazę alginianową z sekwencjami dostępnymi dla innych gatunków bakterii? Być może pozwoliłoby to na wytypowanie innych mikroorganizmów, względem których opracowane protokoły badawcze byłyby równie skuteczne lub uzyskanie dodatkowych danych molekularnych.
4. W autoreferacie brakuje opisu dalszego kierunku badań nad podjętym tematem, dlatego też biorąc pod uwagę istotność uzyskanych wyników chciałabym zapytać: Czy planowana jest kontynuacja badań opisanych w rozprawie, w tym badań



wdrożeniowych i rozszerzenie analiz np. o inne antybiotyki? Czy podjęto próby uzyskania ochrony patentowej dla wyników badań?

Rozprawa doktorska została przygotowana w sposób staranny, aczkolwiek w trakcie pisania autoreferatu Doktorantka nie uniknęła kilku błędów językowych oraz interpunkcyjnych np.:

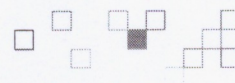
- str. 12 „ligniny czy hemicelulozy Jest również hydrofobowym biopolimerem” powinno być „ligniny czy hemicelulozy. Jest również hydrofobowym biopolimerem”,

- str. 18 „syntetyzowanych przez *K.xylinus* membran CB” powinno być „syntetyzowanych przez *K. xylinus* membran CB”

- str. 37 „testy mające na celu ocenę efektywności immobilizacji PelAh i PslGh na hamowaniu tworzenia biofilmu” powinno być „testy mające na celu ocenę wpływu efektywności immobilizacji PelAh i PslGh na hamowanie tworzenia biofilmu”.

Widoczny jest również brak odnośnika w prezentowanej liście publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej przy nazwisku Szymańska M., który wyjaśniałby, że osoby widniejące pod nazwiskami Charęza i Szymańska to te same osoby.

Po przeczytaniu autoreferatu oraz wszystkich artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego mgr inż. Magdaleny Charęzy mogę stwierdzić, że wyniki i wnioski przedstawione w tych pracach w pełni realizują założenia rozprawy, a Doktorantka ma ugruntowaną wiedzę dotyczącą immobilizacji enzymów. Rozprawa doktorska zawiera wartościowe wyniki dotyczące możliwości wykorzystania modyfikowanej celulozy bakteryjnej do zastosowań biomedycznych. Doktorantka wykazała się dużą umiejętnością planowania i realizacji zadań badawczych z wykorzystaniem zaawansowanych i zróżnicowanych technik, zaprezentowała liczne oryginalne i wartościowe dane, dokonała prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników, jak również ich prezentacji w świetle aktualnego stanu wiedzy. To sprawia, że według mojej oceny rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Charęzy zasługuje na wysoką ocenę.



Wnioski końcowe

Ostatecznie stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy pt. „Wpływ immobilizacji enzymów mających zdolność do degradacji biofilmów na ich aktywność katalityczną z wykorzystaniem celulozy bakteryjnej jako nośnika” spełnia warunki stawiane pracom doktorskim w związku z ubieganiem się o stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie biotechnologia określone w art.13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789), zgodnie z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669)”. W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o przyjęcie tej pracy i dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze bardzo wysoką wartość naukową ocenianej pracy, oryginalny i nowatorski temat wnioskuję do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o jej wyróżnienie. Rozprawa Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy stanowiąc interdyscyplinarne osiągnięcie wnosi nie tylko bardzo dużo do naszej wiedzy nad immobilizacją enzymów, ale ze względu na możliwość wykorzystania wyników badań w biomedycynie ma ogromny potencjał aplikacyjny. Proponowane wyróżnienie jest również wyrazem mojego uznania dla Doktorantki za pracę włożoną w przeprowadzenie badań wyróżniających się oryginalnością zastosowanych metod oraz za umiejętność interpretacji uzyskanych danych, co niewątpliwie świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i wpływa na wysoki poziom naukowy prac wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską.

Anne Rowie





Wrocław, dn. 16.11.2023 r.

Dr hab. inż. Filip Boratyński, prof. uczelni
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Ocena Pracy doktorskiej
Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy

**pt. „Wpływ immobilizacji enzymów mających zdolność do degradacji biofilmów
na ich aktywność katalityczną z wykorzystaniem celulozy bakteryjnej jako nośnika”**

Podstawą wykonania niniejszej recenzji było pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego, dr hab. inż. Małgorzaty Ożgo, prof. ZUT, odnośnie powierzenia mi funkcji recenzenta zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny z dnia 18 września 2023 r.

Praca doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie pod opieką merytoryczną dr hab. Jolanty Kochel-Karakulskiej, prof. ZUT, pełniącej funkcję promotora w przewodzie doktorskim oraz dr. inż. Radosława Drozda, będącego promotorem pomocniczym.

Charakterystyka formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl czterech oryginalnych publikacji naukowych, opublikowanych w latach 2020 - 2023 w zagranicznych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Report* (JCR). W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

1. **Szymańska, M.**, Karakulska, J., Sobolewski, P., Kowalska, U., Grygorcewicz, B., Böttcher, D., Bornscheuer U.T., & Drozd, R. (2020). Glycoside hydrolase (PelAh) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 246, 116625; (IF 9,381, 140 p. MEiN).



2. **Szymańska, M.**, Hoppe, J., Dutkiewicz, M., Sobolewski, P., Palacz, M., Janus, E., Zielińska, B., & Drozd, R. (2022). Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 642-653; (IF 6,953, 100 p. MEiN).
3. **Charęza, M.**, Przygodzka, K., Żywicka, A., Grygorcewicz, B., Sobolewski, P., Mozia, S., Śmiglak, M., & Drozd, R. (2023). Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4740; (IF 6,208, 140 p. MEiN).
4. **Charęza M.**, Ekiert E., Moszyński D., Madej M., Jędrzejczak – Silicka M., & Drozd R. (2023). Evaluation of argon plasma treated bacterial cellulose usability as carrier for controlled releases enzymes PelAh and PslGh able to biofilm eradication. *Applied Sciences*, 13; IF 2,838; 100 p. MEiN).

Wszystkie prace opublikowano w czasopismach o uznanej wartości, które zostały wcześniej poddane recenzji. Łączna liczba punktów obliczona wg daty opublikowania prac wynosi 480 pkt. MEiN, a sumaryczny IF wynosi 25,38. Powyższe dane naukometryczne oceniam bardzo wysoko. Przedstawione prace są opracowaniami zbiorowymi, które mają charakter interdyscyplinarny, dlatego też były wykonywane we współpracy z ekspertami z różnych obszarów nauk inżynierskich, przyrodniczych i medycznych. Nie mniej jednak we wszystkich pracach Pani mgr inż. Magdalena Charęza jest pierwszym autorem. Zgodnie z oświadczeniami wkład Doktorantki w oryginalne prace twórcze był wiodący i polegał na opracowaniu koncepcji, metodologii badań, analizie, interpretacji i opublikowaniu wyników. Tym samym, można uznać przedstawioną rozprawę doktorską za autorskie dzieło Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy.

Rozprawa doktorska liczy 156 stron. Komentarz omawiający cykl czterech publikacji obejmuje łącznie 41 stron, nie wliczając załączonych oświadczeń Doktorantki i współautorów oraz publikacji będących podstawą ubiegania się o stopień doktora. Autoreferat zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wprowadzenie poświęcone zagadnieniom związanym z celulozą bakteryjną (CB), takim jak: struktura chemiczna, zalety i wady stosowania, opis procesu syntezy oraz czynników mających wpływ na jej produkcję, następnie aplikacji medycznej CB z podkreśleniem jej modyfikacji pod kątem właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Kolejno, poruszono kwestię oporności patogenów, szczególnie bakterii z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* ze względu na zdolność do wytwarzania biofilmu. W dalszej części autoreferatu zostały postawione hipotezy oraz wyraźnie zaznaczony cel badawczy z celami szczegółowymi. Kolejny rozdział stanowią materiały i metody wykorzystywane przez Doktorantkę w swoich badaniach. Rozdział ten obejmuje aż 28 podpunktów, co świadczy o dużej różnorodności zastosowanych



technik. W tym obszernym rozdziale przypisanie odniesień w kolejnych podpunktach do poszczególnych publikacji P1-P4 znacząco ułatwia czytelnikowi rozeznanie się w metodach wykorzystywanych w poszczególnych pracach. Kolejne części stanowią omówienie wyników poszczególnych prac wraz z wnioskami. Przedostatni rozdział dotyczy całościowego opisu pracy naukowo-badawczej Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy. Autoreferat kończy wykaz cytowanej literatury zawierający 77 pozycji bibliograficznych, przy czym prawie wszystkie pozycje są z ostatnich lat, po 2010 roku (za wyjątkiem dwóch). Podsumowując, od strony formalnej praca jest starannie przygotowana i nie budzi moich zastrzeżeń.

Merytoryczna ocena

Opracowanie technologii produkcji naturalnych polimerów jest ważną tematyką prowadzonych aktualnie badań naukowych. Ze względu na szereg zalet jakie posiada celuloza pochodzenia bakteryjnego (CB), w tym wysoką krystaliczność, elastyczność, zdolność do zatrzymywania wody, wysoce porowatą strukturę, biodegradowalność i biokompatybilność, stanowi ona atrakcyjny naturalny polimer wykorzystywany w wielu gałęziach przemysłu, np.: spożywczym, kosmetycznym czy elektronicznym. Oceniana przez mnie praca doktorska szczególnie akcentuje możliwość jej zastosowania w biomedycynie do produkcji materiałów opatrunkowych. Głównym problemem w leczeniu ran są zakażenia mikrobiologiczne pojawiające się w opatrunkach medycznych. Obecnie podejmowane są próby modyfikacji CB, aby nadać jej właściwości bakteriobójcze. Rozwijające się bakterie m. in. z rodzaju *Pseudomonas* wykazują coraz większą oporność względem antybiotyków, ze względu na zdolność do wytwarzania biofilmu. Poszukiwane są wciąż nowe rozwiązania, które z jednej strony hamowałyby powstawanie biofilmu, a z drugiej, w przypadku gdyby już się utworzył, umożliwiłyby jego eradykację w celu lepszej dostępności środków bakteriobójczych. Nowatorskim podejściem, które podjęła Pani mgr inż. Magdalena Charęza jest zastosowanie specyficznych enzymów (glikohydrolaz: PelAh i PslGh, liazy alginianowej) w formie immobilizowanej, będących integralną częścią szlaków biosyntezy biofilmu.

Głównym celem tematycznie powiązanych prac było zbadanie możliwości wykorzystania enzymów immobilizowanych na membranach z celulozy bakteryjnej jako czynników degradujących polisacharydowe składniki macierzy biofilmu *P. aeruginosa* oraz wspomagających proces antybiotykoterapii. W swojej pracy, Pani mgr inż. Magdalena Charęza wyróżniła dziewięć celów szczegółowych, które konsekwentnie realizowała stosując różne podejścia metodyczne. O wszechstronności warsztatu eksperymentalnego, jaki Doktorantka opanowała w trakcie realizacji pracy doktorskiej, świadczą techniki stosowane celem syntezy, oczyszczenia, modyfikacji i analizy właściwości fizykochemicznych celulozy bakteryjnej. Inne podejścia metodyczne stosowane przez Doktorantkę to techniki biologii molekularnej, które wykorzystwała do otrzymania wektorów ekspresyjnych, a następnie prowadząc właściwą ekspresję i oczyszczania



białek rekombinowanych. Ponadto Doktorantka opanowała metody immobilizacji enzymów na membranach CB, oznaczania aktywności enzymów i badania wpływu ich uwalniania na inhibicję wytwarzania biofilmu. Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera adekwatne podejście eksperymentalne do postawionych celów szczegółowych.

Znaczące osiągnięcia naukowe

Oceniając wartość merytoryczną pracy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy, do kluczowych osiągnięć naukowych zaliczam:

- wykazanie, że dodatek polieteru silikonowego (SPS), który obniża napięcie powierzchniowe medium hodowlanego (Hestrim-Schramm, H-S), znacznie zwiększa efektywność procesu produkcji CB, a zarazem nie wpływa na właściwości fizykochemiczne uzyskanej CB, polepszając jedynie kluczową jej zdolność do zatrzymywania wody,
- wykazanie braku toksyczności stosowanego medium H-S z dodatkiem surfaktantu SPS względem bakterii *Komagataeibacter xylinus* syntezujących CB, jak również względem komórek mysich fibroblastów linii L929, co jest niezmiernie istotne biorąc pod uwagę potencjalne biomedyczne zastosowanie w materiałach opatrunkowych,
- udowodnienie, poprzez analizę widm ATR-FTIR oraz metodę SEM, istotnego wpływu immobilizacji enzymów (PelAh oraz liazы alginianowej) na powierzchni CB, na destabilizację biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* poprzez zmiany w strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej, szczególnie egzopolisacharydu Pel,
- wykazanie braku toksyczności CB z immobilizowanymi enzymami: PelAh, PslGh jak i liazą alginianową, względem komórek mysich fibroblastów tkanki łącznej L929,
- udowodnienie znaczącego wpływu immobilizacji liazы alginianowej na powierzchni CB na zwiększenie wrażliwości *P. aeruginosa* na działanie antybiotyku (gentamycyny) poprzez destabilizację struktury macierzy biofilmu,
- udowodnienie, technikami ATR-FTIR oraz XPS, zmian właściwości fizykochemicznych powierzchni CB w wyniku działania niskociśnieniową plazmą z użyciem argonu jako gazu roboczego (LPArP), mających wpływ na zmiany w uwalnianiu glikohydrolaz PelAh i PslGh oraz zdolność do inhibicji formowania biofilmu przez *P. aeruginosa*.

Komentarze

Przechodząc do uwag, które wynikają z powierzonej mi roli recenzenta, obok bardzo pozytywnej oceny pracy doktorskiej, pragnę zwrócić uwagę, że zabrakło mi rozdziału, który zawierałaby rekomendacje, co do kierunków dalszych badań. Chciałbym, aby Pani mgr inż.



Magdalena Charęza podczas końcowego etapu przewodu doktorskiego odniosła się do następujących zagadnień:

1. Nie znalazłem w pracy uzasadnienia podziału na poszczególne cztery etapy rozdziału 5. Uzyskane wyniki badań. Rozumiałbym zasadność istnienia takiego podziału jeśli kolejne etapy wynikałyby z poprzednich, przykładowo w etapie 2 (publikacji P2) wykorzystywana byłaby CB modyfikowana surfaktantem SPS stosowanym w etapie 1. Proszę więc o wyjaśnienie czym Doktorantka kierowała się wyróżniając kolejne etapy 1-4, którym odpowiadają poszczególne publikacje P1-P4.
2. Proszę o próbę krytycznej analizy/porównania zastosowanego w badaniach surfaktantu SPS z innymi rodzajami surfaktantów opisanymi w literaturze; jakie są możliwości wykorzystania surfaktantu SPS do modyfikacji CB z przemysłowego punktu widzenia?
3. Chcąc opracować tzw. „inteligentne” opatrunki medyczne, jakie inne enzymy/elementy macierzy biofilmu należałoby wziąć pod uwagę; czy Doktorantka widzi potencjał w synergizmie działania tych czynników?
4. Czy zechciałaby Doktorantka odnieść się do perspektyw i możliwych kierunków dalszych działań w tematyce immobilizacji enzymów na celulozie bakteryjnej?

Podsumowanie

Podsumowując, wszystkie cztery prace wchodzące w skład cyklu charakteryzuje wysoki poziom naukowy, co pozwoliło na ich opublikowanie w bardzo dobrych czasopismach naukowych o uznanej renomie. Pani mgr inż. Magdalena Charęza wykazała się wiedzą teoretyczną oraz umiejętnościami pracy zarówno samodzielnej jak i w zespołach badawczych, w tym międzynarodowych.

Podczas lektury rozdziału poświęconego omówieniu pracy naukowo-badawczej, zwraca uwagę zgromadzony przez Doktorantkę dorobek w postaci aż 14 publikacji naukowych w czasopismach indeksowanych na liście JCR, czterech patentów oraz rozdziału w monografii. Ponadto Pani mgr inż. Magdalena Charęza była wykonawcą w trzech projektach naukowych finansowanych zewnętrznie, odbyła staże zagraniczne w Instytucie Biochemii na Uniwersytecie w Greifswaldzie (Niemcy) oraz na Uniwersytecie Stanowym São Paulo (Brazylia), a także dwa staże krajowe, w Katedrze Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu i w Zakładzie Biochemii i Żywienia Człowieka na Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie.



UNIwersYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

KATEDRA CHEMII ŻYWNOŚCI I BIOKATALIZY

Wniosek końcowy

Uznając oryginalność i wartość merytoryczną ocenianej rozprawy, jako spełniające formalne i zwyczajowe wymagania stawiane dysertacjom doktorskim stwierdzam, że niniejsza rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 13 ust. 1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) z późniejszymi zmianami, i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy, do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Jednocześnie, ze względu na wysoką naukową i aplikacyjną wartość dysertacji, szeroki zakres wykonanych eksperymentów oraz aktywność naukowo-badawczą, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Charęzy.

Felip Boratyński

UCHWAŁA NR 46
Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 20 grudnia 2023 r.
w sprawie nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo
mgr inż. Magdalenie Charęzie

Na podstawie art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.) oraz § 1 ust. 1 pkt 2) uchwały nr 130 Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 29 maja 2023 r. w związku z § 96 ust. 8 Statutu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo uchwala co następuje:

§1

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie po zapoznaniu się z przebiegiem przewodu doktorskiego postanawia nadać stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo mgr inż. Magdalenie Charęzie.

§2

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodnicząca Rady Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo


dr hab. inż. Małgorzata Ożgo, prof. ZUT

Szczecin, dnia 20 grudnia 2023 r.