Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii

Centrum Dydaktyczno-Badawcze Nanotechnologii
Al. Piastów 45
70 – 311 Szczecin, Polska

tel. (091) 449 67 14
e-mail: karol.fijalkowski@zut.edu.pl

dr hab. inż. Karol Fijałkowski, prof. ZUT

Szczecin, dn. 04/11/2022

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Karoliny Szacherskiej
pt. "Short and medium chain fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production" wykonanej w Katedrze Mikrobiologii i Mykologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
pod opieką naukową dr hab. inż. Justyny Możejko-Ciesielskiej, prof. UWM
oraz prof. dr hab. inż. Piotra Oleśkowicza-Popiela

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowią cztery, stanowiące spójną całość artykuły naukowe opublikowane w latach 2021 i 2022, z których jeden jest pracą przeglądową, a trzy pozostałe publikacjami o charakterze eksperymentalnym:

Szacherska K., Oleskowicz-Popiel P., Ciesielski S., Mozejko-Ciesielska J. 2021. Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production. *Polymers*. 13, 321. DOI: 10.3390/polym13030321.

Szacherska K., Moraczewski K., Rytlewski P., Czaplicki S., Ciesielski S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Polyhydroxyalkanoates production from short and medium chain carboxylic acids by *Paracoccus homiensis*. *Scientific Reports*. 12, 7263. DOI: 10.1038/s41598-022-11114-x.

Szacherska K., Moraczewski K., Czaplicki S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Conversion of short and medium chain fatty acids into novel polyhydroxyalkanoates copolymers by *Aeromonas* sp. AC_01. *Materials*. 15, 4482. DOI: 10.3390/ma15134482.

Szacherska K., Moraczewski K., Czaplicki S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Effect of short- and medium-chain fatty acid mixture on polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas* strains grown under different culture conditions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10, 951583. DOI: 10.3389/fbioe.2022.951583.

Liczba punktów Ministra Edukacji i Nauki (na podstawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z dnia 1 grudnia 2021 r.) za publikacje składające się na rozprawę doktorską wynosi 480, natomiast Impact Factor (IF) wynosi

19,14. Wszystkie artykuły stanowiące rozprawę doktorską opublikowane zostały w czasopismach reprezentujących wysoki poziom naukowy.

Badania eksperymentalne wchodzące w skład recenzowanej pracy zostały wykonane przez Doktorantkę w ramach kilku projektów naukowych, wymienionych zarówno w części opisowej rozprawy doktorskiej, jak i w poszczególnych publikacjach naukowych. Projekty te finansowane były przez Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Politechnikę Poznańską oraz Ministerstwo Edukacji i Nauki (projekt "Regional Initiative of Excellence"). Niestety, Autorka rozprawy nie precyzuje roli jaką pełniła w powyższych projektach.

Zgodnie z informacjami zawartymi w rozprawie doktorskiej, Pani mgr Karolina Szacherska prowadziła swoje badania we współpracy z naukowcami z różnych Wydziałów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie oraz z innych uczelni, w tym z Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy i Politechniki Poznańskiej. Dlatego w tym zakresie, chciałbym docenić umiejętności Doktorantki w prowadzeniu badań i przygotowywaniu publikacji naukowych we współpracy z innymi naukowcami.

Dobór problematyki badawczej i tematu rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest ciekawą i nowatorską pracą przedstawiającą, w sposób kompleksowy i szczegółowy zagadnienia związane z możliwościami wykorzystania syntetycznych i pochodzących z kwaśnej serwatki krótko i średnio łańcuchowych kwasów tłuszczowych (SMCFA) jako źródeł węgla do wytwarzania polihydroksyalkanianów (PHA) w procesach prowadzonych przez różne mikroorganizmy. Ponadto, Autorka podjęła się trudu określenia właściwości fizykochemicznych otrzymanych PHA oraz optymalizacji produkcji tych biopolimerów, biorąc pod uwagę różne gatunki i szczepy bakteryjne, a także różne rodzaje pożywek produkcyjnych, źródeł węgla, jak i warunków procesu produkcyjnego.

W mojej opinii wybór tematu recenzowanej rozprawy należy uznać za trafny i dotyczący aktualnego, niedostatecznie zbadanego zagadnienia, a ponadto w znacznym stopniu wychodzącego naprzeciw oczekiwaniom praktyki. Negatywny wpływ tworzyw sztucznych pochodzenia petrochemicznego na środowisko spowodował wzrost zainteresowania biodegradowalnymi materiałami pochodzenia biologicznego. W tym kontekście PHA syntetyzowane przez różne mikroorganizmy, zwłaszcza wykorzystując produkty uboczne i odpady przemysłu rolno-spożywczego, ciszą się coraz większym zainteresowaniem jako biopolimery o dużym potencjale w zastosowaniach biomedycznych, rolniczych i przemysłowych. Wynika to z ich unikalnych właściwości materiałowych, takich jak biodegradowalność, nietoksyczność, biokompatybilność oraz podobieństwo ich właściwości fizycznych do polimerów syntetycznych. Niemniej jednak komercjalizacja PHA na rynku światowym jest obecnie ograniczona, głównie ze względu na ich wysokie koszty produkcji w porównaniu z polimerami syntetycznymi. Szacuje się, że są one kilkunastokrotnie droższe niż polimery ropopochodne. W tym kontekście należy zauważyć, że do 50% całkowitych kosztów produkcji PHA przypada na substraty wykorzystywane jako źródło węgla do hodowli mikroorganizmów. W związku z tym istnieje rosnąca potrzeba opracowania nowych procesów mikrobiologicznych z wykorzystaniem niedrogich surowców, np. bogatych w węgiel odpadów przemysłowych.

Reasumując, zagadnienia których dotyczy recenzowana rozprawa doktorska są ciekawe i wpisują się w tematykę nurtu badań związanych z wykorzystaniem drobnoustrojów w biotechnologicznych procesach produkcji biopolimerów, stanowiących obiecującą alternatywę dla konwencjonalnych tworzyw sztucznych.

Ocena formalno-redakcyjna pracy

Praca doktorska Pani Karoliny Szacherskiej, wliczając artykuły naukowe i oświadczenia współautorów liczy 137 stron. Układ pracy oraz kolejność rozdziałów jest poprawna i typowa dla dysertacji doktorskich opartych na cyklu spójnych tematycznie publikacjach naukowych. Załączone kopie publikacji stanowiące zasadniczą część rozprawy doktorskiej poprzedzone zostały krótkim opisem (tzw. autoreferatem). Rozprawę doktorską rozpoczyna informacja o projektach, w ramach których finansowane były badania, spis treści, spis publikacji stanowiących rozprawę doktorską, a także spis skrótów. W dalszej kolejności Autorka zamieściła streszczenie w języku polskim i angielskim. Zasadnicza część dysertacji podzielona została na rozdziały: Wprowadzenie, Cel i zadania („Aim and objectives"), Materiały i metody, Wyniki, Wnioski oraz Bibliografię. Na ostatnią część rozprawy składają się załączniki (również w języku angielskim i polskim) zawierające oświadczenia współautorów poszczególnych publikacji. Z wyjątkiem streszczeń i oświadczeń współautorów, które przygotowane zostały w języku polskim i angielskim, pozostała część rozprawy napisana jest w języku angielskim.

Oceniając pracę pod względem redakcyjnym uważam, że zasadniczo jest ona napisana jasnym, zrozumiałym i w większości poprawnym językiem. Część opisowa rozprawy doktorskiej nie zawiera elementów graficznych, natomiast strona graficzna poszczególnych publikacji jest przygotowana starannie i moim zdaniem jest w pełni poprawna. Informacje teoretyczne (w przypadku artykułu przeglądowego), jak i wyniki (w przypadku prac eksperymentalnych) przedstawione w tabelach, wykresach i diagramach są czytelne i logiczne. Należy jednak zaznaczyć, że publikacje stanowiące podstawę dysertacji zostały już wcześniej ocenione i zredagowane przez recenzentów i zespół redakcyjny. Ponadto manuskrypty poszczególnych publikacji musiały zostać dostosowane do wymogów redakcyjnych, które narzucały styl poszczególnych prac.

Nie mniej jednak, w mojej opinii, jednym z przeoczeń, które ogranicza płynność opisów i czytelność omawianych zagadnień, jest niekonsekwentne stosowanie terminologii i skrótów związanych z wykorzystywanymi substratami stanowiącymi źródło węgla dla hodowanych bakterii. Jako przykład, w streszczeniu Autorka posługuje się skrótem SMCFA, ale jego wyjaśnienie pojawia się dopiero po dwukrotnym użyciu tego terminu (analogiczna sytuacja dotyczy skrótu 3HV). Następnie, przez dalsze części pracy, Doktorantka używa różnych wyrażeń tworzonych w oparciu o skrót SMCFA lub pełną nazwę tego substratu. Chociaż Autorka odnosi się do tego samego produktu odpadowego, jego terminologia nie jest ujednolicona, np. „$SMCFAs_{extracted}$-rich stream", "waste-derived SMCFAs", "SMCFAs derived from the anaerobic mixed culture fermentation of acid whey", "SMCFAs-rich residual stream", "bioprocess-derived SMCFAs", "SMCFAs from whey wastewater biodigestion effluent". Podobna niekonsekwencja dotyczy substratów syntetycznych, m.in. "$SMCFAs_{synthetic}$-rich stream", "SMCFAs that mimicked the effluent from whey wastewater anaerobic fermentation", "synthetic mixture of SMCFAs", "synthetic SMCFAs". W tym wypadku, uważam, że korzystne byłoby sformułowanie po jednym terminie i skrócie dla każdego z substratów, a następnie ich konsekwentne stosowanie we wszystkich częściach dysertacji. Ponadto sformułowane terminy powinny zostać wyjaśnione w Wykazie skrótów.

Podobnie, również w publikacjach Autorka stosuje różnorodną terminologię dotyczącą użytych substratów. Jako przykład, w jednej z prac Autorka definiuje substraty jako: short and medium chain carboxylic acids (CAs), podczas gdy w innej pracy jako short and medium chain fatty acids (SMCFAs). W takim przypadku, ewentualne różnice lub podobieństwa w stosowanej

terminologii (wynikające np. z komentarzy recenzentów) powinny zostać wyjaśnione w części opisowej rozprawy doktorskiej i/lub w Wykazie skrótów.

We wszystkich publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Karolina Szacherska jest pierwszą Autorką, co świadczy o jej wiodącej roli w przeprowadzanych eksperymentach. Wkład Doktorantki w przygotowanie artykułów naukowych o charakterze doświadczalnym polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu hodowli bakteryjnych i ekstrakcji PHA, jak również na współudziale w opracowaniu wyników, ich wizualizacji oraz udziale w przygotowaniu i redagowaniu manuskryptów. Natomiast w przypadku artykułu przeglądowego, wkład Autorki wiązał się z jej zaangażowaniem w opracowaniu koncepcji, oraz współudziale w przygotowaniu, a także technicznej redakcji manuskryptu. Wkład Doktorantki, jak i poszczególnych autorów prac opisany w Oświadczeniach współautorów jest zgodny z informacjami przedstawionymi w publikacjach naukowych (rozdziały „Authors' contributions"). W mojej opinii zaangażowanie Doktorantki w przeprowadzenie eksperymentów i przygotowanie publikacji stanowiących rozprawę doktorską jest odpowiednie i pomimo kilkuosobowego zespołu autorów poszczególnych prac z łatwością można wyodrębnić jej udział w każdym z artykułów.

Ocena merytoryczna pracy

W Streszczeniu Doktorantka syntetycznie przedstawiła uzasadnienie podjętego tematu badawczego, cel badań, zarys wykorzystywanych metod i materiałów oraz najważniejsze wyniki. W mojej opinii, ta część dysertacji jest przygotowana w sposób prawidłowy, który pozwala czytelnikowi zrozumieć najważniejsze założenia pracy i docenić najistotniejsze wyniki przeprowadzonych badań i analiz.

We Wstępie, Autorka przedstawia najważniejsze zagadnienia bezpośrednio związane z problematyką pracy doktorskiej. Moim zdaniem cennym uzupełnieniem tego rozdziału jest również publikacja przeglądowa, zaliczona do cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską. W tym kontekście artykuł przeglądowy przedstawia potencjał SMCFA jako źródła węgla do produkcji PHA w procesach mikrobiologicznych. Ponadto publikacja przeglądowa dostarcza informacji dotyczących czystych i mieszanych kultur drobnoustrojów zdolnych do wytwarzania PHA przy użyciu SCMFA jako substratów. W kolejnych rozdziałach pracy przeglądowej, Doktorantka opisuje wyzwania i perspektywy związane z biosyntezą PHA z wykorzystaniem surowców na bazie SMCFA. Autorka wskazuje również i uzasadnia możliwości obniżenia kosztów produkcji PHA poprzez wykorzystanie surowców odpadowych i produktów pofermentacyjnych, w tym zawierających SMCFA.

Podsumowując, w mojej opinii wszystkie rozdziały części teoretycznej, a w szczególności publikacja przeglądowa, stanowią dużą wartość naukową oraz świadczą o wiedzy i dobrym przygotowaniu Autorki do podjętego problemu badawczego. Rozdział ten podaje jasno i wyczerpująco informacje niezbędne dla zrozumienia i docenienia wyników prezentowanych w dalszej części pracy oraz w publikacjach o charakterze eksperymentalnym. W mojej opinii, w artykule przeglądowym na szczególne docenienie zasługuje dokładna charakterystyka wytwarzania PHA przez czyste i mieszane kultury drobnoustrojów z wykorzystaniem lotnych kwasów tłuszczowych. Na podkreślenie i uznanie zasługuje również starannie wykonana oprawa graficzna tej publikacji.

Do tej części pracy chciałbym zadać pytanie, o hipotezę jaką sformułowałby Doktorantka dla wykonanych badań w świetle dostępnych danych literaturowych przedstawionych w rozdziale

Wstęp. Pytanie to ma również związek z kolejnym rozdziałem, w którym Autorka przedstawia podstawowy cel swoich badań, jak również cele szczegółowe, natomiast w żadnej części pracy nie odnajduję sformułowania, które można byłoby uznać za hipotezę.

Przedstawione przez Doktorantkę cele pracy są ambitne i w mojej opinii, w większości sformułowane zostały w prawidłowy sposób i uporządkowane w logiczny ciąg. Podstawowy cel rozprawy doktorskiej koncentruje się na ocenie syntetycznych i pochodzących z kwaśniej serwatki SMCFA jako źródeł węgla do produkcji PHA przez różne gatunki i szczepy bakterii, w tym *Paracoccus homiensis, Aeromonas* sp. AC_01 oraz trzy szczepy z rodzaju *Pseudomonas* (*Pseudomonas* GL01, *Pseudomonas* GL06 i *Pseudomonas antarctica*). Oprócz głównego celu, Doktorantka sformułowała również cztery cele szczegółowe, określone jako "The scope of the thesis". Niemniej jednak, po dokładnej lekturze pracy, a przede wszystkim biorąc pod uwagę liczbę i szczegółowość wyciągniętych wniosków uważam, że Autorka mogła spróbować sformułować więcej celów szczegółowych (alternatywnie zakres pracy powinien być bardziej rozbudowany i przedstawiony w bardziej szczegółowy sposób). Na przykład, w rozdziale tym można było uwzględnić następujące aspekty: wpływ niezrównoważonych warunków wzrostu, a także wpływ różnych warunków hodowli (np. bioreaktor vs. kolby, rodzaj podłoża vs. źródło węgla) lub zależności międzygatunkowych i międzyszczepowych na syntezę i akumulację PHA.

Chciałbym również zaznaczyć, że ostatni, czwarty cel szczegółowy, "detailed characterization of the extracted PHAs", moim zdaniem jest zbyt ogólny. Można również zauważyć, że w poprzedzającym, trzecim celu szczegółowym, Autorka podaje informacje o metodach, które zastosowano do oceny składu monomerycznego PHA. Dlatego uważam, że podobny zakres informacji należało również uwzględnić formułując kolejny, czwarty cel szczegółowy np. charakterystyka wyekstrahowanych PHA z wykorzystaniem techniki DSC i TG.

Ponadto, odnosząc się do sformułowanych wniosków, uważam, że dwa ostatnie cele powinny być dodatkowo doprecyzowane informacją "depending on the bacterial strain and the type of the carbon source used". Powyższa uwaga wiąże się również z faktem, że cele szczegółowe zostały uogólnione do wszystkich publikacji (Autorka nie sformułowała osobnych celów dla każdej z publikacji cyklu). Ponadto skrót PHA użyty w celach szczegółowych powinien zostać sformułowany w liczbie mnogiej (w recenzowanej pracy jest 2/2).

Powyższe uwagi dotyczą części opisowej dysertacji, natomiast cele sformułowane w poszczególnych publikacjach składających się na rozprawę doktorską, w mojej opinii, zostały sformułowane poprawnie i są adekwatne do zakresu prowadzonych analiz oraz uzyskanych wyników.

Kolejny rozdział dysertacji, Doktorantka poświęciła opisowi materiałów i metod wykorzystywanych podczas prowadzonych badań. Rozdział ten, zarówno w części opisowej rozprawy doktorskiej, jak i w poszczególnych publikacjach zawiera informacje o szczepach bakteryjnych użytych w trakcie badań, charakterystykę źródeł węgla, a następnie metod stosowanych do analiz składu chemicznego PHA i właściwości fizykochemicznych tych biopolimerów. Rozdział ten kończy się informacjami o przeprowadzonych analizach statystycznych.

Uważam, że rozdział Materiał i Metody jest napisany w prawidłowy sposób (poza wspomnianą wcześniej, chaotyczną terminologią związaną ze stosowanymi podłożami produkcyjnymi), który przede wszystkim pozwala na odtworzenie doświadczeń na podstawie przedstawionych opisów. Zastosowane metody zostały właściwie dobrane do realizacji założonych celów badawczych. W mojej opinii, metodyczne zróżnicowanie wykonanych badań naukowych

oraz ich prawidłowe dostosowanie do postawionego celu badawczego świadczy o profesjonalnym i wszechstronnym przygotowaniu Autorki do samodzielnego wykonywania części doświadczalnej pracy.

Zauważyłem jednak, że chociaż we wszystkich publikacjach Autorka podaje informacje o sposobie przygotowania inokulum i jego objętości, która została użyta do przygotowania hodowli produkcyjnych, to gęstość użytej zawiesiny bakterii nie jest określona w żadnej z części dysertacji. Dlatego chciałbym zapytać, czy Autorka dokonywała pomiarów gęstość bakterii w inokulum, a jeśli tak, to jaką metodę zastosowała do tego celu. Chciałbym również poprosić o wyjaśnienie, czy różnice w gęstości inokulum mogą wpływać na wydajność syntezy PHA. Ostatnie pytanie dotyczy różnic pomiędzy wielkością inokulum użytego do hodowli prowadzonych przez Doktorantkę w kolbach Erlenmeyera i bioreaktorze (5 vs 10%). W tym kontekście proszę o doprecyzowanie skąd wynikały te różnice i czy mogły one mieć wpływ na uzyskiwane wyniki.

Kolejny rozdział recenzowanej dysertacji dotyczy prezentacji i dyskusji uzyskanych wyników. W moim przekonaniu jest to bardzo dobrze napisany rozdział, a szerokie wykorzystanie metod badawczych i różnych szczepów drobnoustrojów pozwoliło Autorce na zebranie ważnych informacji i znaczne poszerzenie wiedzy na temat wytwarzania PHA z wykorzystaniem SMCFA pochodzących z produktów odpadowych. Uzyskane wyniki są niewątpliwie cenne i dostarczają ważnych informacji o znaczeniu nie tylko poznawczym, ale również praktycznym.

W wyniku przeprowadzonych badań i analiz Doktorantka potwierdziła, że wszystkie wybrane do badań mikroorganizmy mogą wykorzystywać źródło węgla na bazie SMCFA, zarówno pochodzenia syntetycznego, jak i z kwaśniej serwatki do wytwarzania PHA. Jednocześnie, jak ustaliła Autorka, rodzaj i stężenie użytych substratów wpływał na ilość, skład monomeryczny oraz właściwości materiałowe wytwarzanych biopolimerów. Dodatkowo Doktorantka potwierdziła, że skład monomeryczny wyekstrahowanych PHA różnił się w zależności od szczepu bakteryjnego i zastosowanych warunków hodowlanych. Ponadto Autorka wykazała, że wykorzystywane przez nią mikroorganizmy są obiecującymi kandydatami do prowadzenia bioprocesów wytwarzania PHA z zastosowaniem substratów na bazie SMCFA, a otrzymywane biopolimery charakteryzują się korzystnymi właściwościami pod względem zastosowań przemysłowych. Niemniej jednak, jak zauważa Autorka, w przypadku bakterii *Paracoccus homiensis* i *Aeromonas* sp. AC_01, substraty na bazie SMCFA pochodzące z kwaśnej serwatki mogą wywierać negatywny wpływ na efektywność procesu wytwarzania PHA. Kolejnym znaczącym osiągnięciem prac badawczych prowadzonych prza Doktorantkę była ekstrakcja nowych kopolimerów scl-mcl z hodowli *Aeromonas* sp. AC_01 i *Pseudomonas* sp. GL06.

W przypadku publikacji naukowych stanowiących rozprawę doktorską, opisy uzyskiwanych wyników zostały przedstawione w połączeniu z częścią stanowiącą ich dyskusję, co jest obecnie powszechną praktyką w wielu czasopismach naukowych. Pomimo dużej liczby wyników uzyskanych przez Autorkę, zostały one przedstawione w sposób staranny, logiczny i spójny z odniesieniami do aktualnej literatury cytowanej w bibliografii. Ponadto opis wyników jest konsekwentnie ułożony w sekwencję ilustrującą dążenie Autorki do rozwiązania problemu badawczego i osiągnięcia wcześniej sformułowanych celów naukowych. Przedstawione w publikacjach wyniki zostały również uporządkowane za pomocą dobrze zaprojektowanych tabel i rycin.

Generalnie można zauważyć, że we wszystkich publikacjach Autorka przyjęła podobny schemat badawczy, który determinował sposób przedstawienia rezultatów przeprowadzonych analiz. Na wstępie opisy wyników dotyczą wpływu poszczególnych syntetycznych SMCFA na

analizowane parametry, w tym ilość biomasy i efektywność procesu wytwarzania PHA. Następnie prezentacja wyników koncentruje się na ocenie wpływu na proces wytwarzania PHA mieszanin syntetycznych SMCFA oraz SMCFA pochodzących z kwaśnej serwatki. W ostatnich częściach rozdziału Wyniki, Autorka przedstawia skład chemiczny i właściwości fizykochemiczne wyekstrahowanych PHA ustalone z wykorzystaniem różnorodnych technik, w tym m.in. GC-MS, ATR-FTIR, DSC, TG.

Z kolei, w części opisowej rozprawy doktorskiej, Autorka przestawia uzyskane wyniki oddzielnie dla każdej publikacji. Kolejne podrozdziały, każdy poświęcony innej publikacji, zawierają informacje o celu badań oraz podsumowanie najważniejszych wyników. W tym kontekście uważam, że bardziej uzasadnione dla zrozumienia i docenienia osiągnięć Doktorantki przedstawionych w poszczególnych artykułach naukowych, byłoby opisane wszystkich wyników w ramach jednego rozdziału. Po pierwsze, wyniki zostały już zaprezentowane oddzielnie, w poszczególnych publikacjach stanowiących rozprawę doktorską. Po drugie, publikacje wchodzące w skład dysertacji powinny stanowić spójną całość, a więc przygotowanie jednego rozdziału ułatwiłoby całościową ocenę osiągnięcia oraz zrozumienie kolejnych problemów badawczych, które w ramach cyklu prac Doktorantka podejmowała się rozwiązać.

W tej części pracy nie znajduje również uzasadnienia dla ponownego formułowania celów; informacją tym poświęcony został osobny rozdział. Z drugiej strony, cele sformułowane w ramach rozdziału Wyniki są bardziej szczegółowe niż cele sformułowane w dedykowanym rozdziale. Dlatego uważam, że informacje te należało przedstawić jako cele szczegółowe i umieścić we wspomnianym, dedykowanym rozdziale, na przykład z odniesieniem do konkretnej publikacji.

Do tej części pracy chciałbym zadać pytanie dotyczące użytego podłoża produkcyjnego. Autorka podaje informację o składzie SMCFA pochodzących z kwaśnej serwatki, który był jednakowy we wszystkich przeprowadzanych eksperymentach. Chciałbym jednak zapytać, jakiej różnicy w składzie można się spodziewać pomiędzy analogicznymi podłożami (substratami), ale uzyskanymi w różnym czasie lub z różnych procesów technologicznych. W tym kontekście chciałbym również poprosić o wyjaśnienie, jaka może być oczekiwana konsekwencja potencjalnych różnic jakościowo-ilościowych pomiędzy substratami na efektywność procesu produkcji PHA, zwłaszcza przy zastosowaniu tego samego szczepu bakteryjnego.

Chciałbym również poprosić o wskazanie gatunków lub szczepów bakterii spośród drobnoustrojów, jakie Doktorantka wykorzystała podczas badań, które w jej opinii mogą być szczególnie dedykowane do procesu wytwarzania PHA z wykorzystaniem substratów na bazie SMCFA pochodzących z produktów odpadowych.

W kolejnej części rozprawy zatytułowanej Wnioski, Doktorantka przedstawiła najważniejsze osiągnięcia swojej pracy oraz konkluzje płynące z przeprowadzonych badań. Wnioski sformułowane w publikacjach oparte są na wynikach i znajdują odzwierciedlenie w sformułowanych celach. Z kolei niektóre z wniosków sformułowanych w części opisowej rozprawy mają bardziej charakter dość szczegółowego podsumowania uzyskanych wyników, niż typowych wniosków o nieco większym stopniu uogólnienia (np. wniosek szósty, ósmy i dziewiąty). Ponadto, w mojej opinii wniosek trzeci i siódmy nie znajdują odzwierciedlenia w celach sformułowanych w rozdziale Cele i zadania (w zakresie niezrównoważonych warunków wzrostu i rodzaju podłoża hodowlanego). Z kolei wnioski ósmy i dziewiąty powinny zostać doprecyzowane o informację o składzie nowych kopolimerów, które zostały wyekstrahowane w trakcie prowadzonych badań. Podobnie doprecyzowania wymaga sformułowanie „obiecujące właściwości termiczne”.

Do tej części rozprawy chciałbym zadać następujące pytania. Odnośnie pierwszego wniosku: według Doktorantki, wszystkie bakterie zastosowane w doświadczeniach wykazują zdolność metabolizowania SMCFA (zarówno syntetycznych, jak i pochodzących z odpadów) do PHA. Jednakże, proszę o doprecyzowanie czy proces wytwarzania PHA można uznać za efektywny w przypadku wszystkich wykorzystywanych przez Doktorantkę mikroorganizmów?

Odnośnie drugiego wniosku: według Doktorantki, stężenie SMCFA wpływa m.in. na ilość i produktywność PHA („PHA concentration and productivity"). Proszę o doprecyzowanie jakie stężenie SMCFA można uznać za optymalne dla produkcji PHA i jaka jest różnica pomiędzy parametrami określonymi jako „PHA concentration" i „PHA productivity".

Rozprawę kończy rozdział Bibliografia. Do zredagowania części opisowej rozprawy oraz poszczególnych publikacji eksperymentalnych Autorka wykorzystała 30-40 pozycji literaturowych, natomiast w przypadku publikacji przeglądowej 102 pozycje literaturowe. W znakomitej większości cytowane prace ukazały się w ostatnich latach oraz w prestiżowych czasopismach naukowych.

Podsumowanie i konkluzja końcowa

Całościowa ocena recenzowanej pracy doktorskiej przygotowanej przez Panią mgr Karolinę Szacherską jest w pełni pozytywna. Przedstawione przeze mnie drobne uwagi nie zmieniają mojej bardzo wysokiej oceny recenzowanej pracy. Zamieszczone komentarze i pytania nie pomniejszają osiągnięć Doktorantki, co do uzyskanych wartościowych wyników, lecz wynikają z ciekawości naukowej i mają być pomocnymi wskazówkami w realizacji przyszłych przedsięwzięć naukowych.

Doktorantka udowodniła, że dysponuje dobrym warsztatem badawczym, który umożliwił jej uzyskanie oryginalnych wyników o dużej wartości, zarówno w aspekcie teoretycznym, jak i aplikacyjnym, w szczególności w kontekście poszerzenia wiedzy na temat syntezy PHA z wykorzystaniem SMCFA syntetycznych jak i pochodzących z produktów odpadowych. Do najważniejszych mocnych stron dysertacji należy zaliczyć trafny i aktualny dobór problematyki badawczej, kompleksowy program badań empirycznych, biegłe posługiwanie się literaturą przedmiotu oraz umiejętne prowadzenie analizy uzyskanych wyników. Natomiast prezentacja osiągnięć naukowych, w formie publikacji, w których Doktorantka występuje jako pierwszy autor i które opublikowane zostały w wysokiej jakości czasopismach naukowych świadczy o jej dojrzałości i samodzielności oraz podkreśla wartość naukową uzyskanych wyników.

Reasumując, Doktorantka udowodniła swoją dojrzałość intelektualną jako młody badacz i naukowiec oraz w mojej opinii jest w stanie podjąć się kolejnych wyzwań naukowych. Rozprawa doktorska pt. "Short and medium chain fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production" wykonana przez Panią mgr Karolinę Szacherską w Katedrze Mikrobiologii i Mikologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod opieką naukową dr hab. inż. Justyny Możejko-Ciesielskiej, prof. UWM i prof. dr hab. inż. Piotra Oleśkowicza-Popiela spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). Biorąc powyższe pod uwagę zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Szacherskiej oraz dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Doceniając duży zakres i złożoność badań prowadzonych przez Panią mgr Karolinę Szacherską, wysoką wartość naukową i aplikacyjną uzyskanych przez nią wyników opublikowanych w czasopismach reprezentujących wysoki poziom naukowy, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Karol Fijałkowski

dr hab. inż. Karol Fijałkowski, prof. ZUT

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii

Centrum Dydaktyczno-Badawcze Nanotechnologii
Al. Piastów 45
70 – 311 Szczecin, Polska

tel. (091) 449 67 14
e-mail: karol.fijalkowski@zut.edu.pl

dr hab. inż. Karol Fijałkowski, prof. ZUT

Szczecin, dn. 04/11/2022

Review of the doctoral dissertation by MSc Karolina Szacherska entitled "Short and medium chain fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production" prepared at the Department of Microbiology and Mycology Faculty of Biology and Biotechnology University of Warmia and Mazury in Olsztyn under the supervision of dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. UWM and prof. dr hab. inż. Piotr Oleśkowicz-Popiel

The Ph.D. thesis is based on four, constituting a coherent whole scientific articles published in 2021 and 2022, one of which is a review, and three are original research papers:

Szacherska K., Oleskowicz-Popiel P., Ciesielski S., Mozejko-Ciesielska J. 2021. Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production. *Polymers*. 13, 321. DOI: 10.3390/polym13030321.

Szacherska K., Moraczewski K., Rytlewski P., Czaplicki S., Ciesielski S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Polyhydroxyalkanoates production from short and medium chain carboxylic acids by *Paracoccus homiensis*. *Scientific Reports*. 12, 7263. DOI: 10.1038/s41598-022-11114-x.

Szacherska K., Moraczewski K., Czaplicki S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Conversion of short and medium chain fatty acids into novel polyhydroxyalkanoates copolymers by *Aeromonas* sp. AC_01. *Materials*. 15, 4482. DOI: 10.3390/ma15134482.

Szacherska K., Moraczewski K., Czaplicki S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Effect of short- and medium-chain fatty acid mixture on polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas* strains grown under different culture conditions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10, 951583. DOI: 10.3389/fbioe.2022.951583.

The number of points of the Minister of Education and Science (based on the ministerial List of scientific journals from December 2021) for the publications that constitute the doctoral

dissertation is 480, whereas the impact factor (IF) is 19.14. All of the above articles were published in high-rated journals.

The doctoral research was carried out as part of several scientific projects listed in the Ph.D. thesis and accompanying publications. The projects were granted by the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, the Poznan University of Technology, and the Ministry of Education and Science (project "Regional Initiative of Excellence"). Unfortunately, the Author of the dissertation does not specify her role in the projects mentioned above.

According to the information provided in the doctoral dissertation, Karolina Szacherska performed her analyzes in cooperation with scientists from different Faculties of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn as well as from other Universities, including Kazimierz Wielki University and Poznan University of Technology. Therefore, it is also worth emphasizing the ability of the Ph.D. student to conduct research and prepare scientific publications in cooperation with other scientists.

Selection of research problems and the topic of the dissertation

The doctoral dissertation constitutes an interesting and scientifically valuable work that can also find practical applications. It demonstrates the possibility of using synthetic and acid whey-derived short- and medium-chain fatty acids (SMCFAs) as substrates for different microorganisms' production of polyhydroxyalkanoates (PHAs). In addition, the Ph.D. student assessed the physicochemical properties of the obtained PHAs and attempted to optimize the production of these biopolymers, taking into account different bacterial strains as well as various types of culture medium, carbon sources, and production process conditions.

In my opinion, the selected Ph.D. research topic should be considered justified. The negative impact of non-degradable petrochemical plastics on the environment has prompted a growing interest in environmentally friendly alternative materials. In this context, PHAs synthesized by different microorganisms, especially using various renewable resources, attract growing attention as "green plastics" with high potential in biomedical, agricultural, and industrial applications. This is due to their unique material properties, such as biodegradability, non-toxicity, biocompatibility, and the similarity of their physical properties to those of synthetic polymers. Nevertheless, the commercialization of PHAs in the world market is currently limited, mainly due to the high production costs compared to synthetic polymers. For example, they are estimated to be about 15 times more expensive than petroleum-derived polymers. In this context, it should be emphasized that up to 50% of the entire production costs of PHAs are assigned to the substrates added as a carbon source for microbial growth. Consequently, there is a growing need to develop novel microbial processes using renewable and inexpensive carbon sources, e.g., carbon-rich industrial wastes.

Summarizing, the subject of the dissertation fits into the research line related to the use of microorganisms in the biotechnological production of biopolymers, constituting promising alternatives for conventional plastics. Therefore, it should undoubtedly be considered very valuable in terms of the cognitive aspects and relevant to applicability.

Formal and editorial evaluation of the work

Karolina Szacherska's doctoral thesis consists of 137 pages, including copies of the scientific articles and the statements of the co-authors. In my opinion, the layout of the whole dissertation and the sequence of chapters is correct and typical for doctoral dissertations based on scientific publications. The enclosed copies of publications constituting a part of the doctoral dissertation are preceded by a short description, which includes the information on the funds granted for the realization of the study, table of contents, list of publications included in the doctoral thesis, list of abbreviations, and the following chapters: Abstracts (in English and Polish), Introduction, Aim and objectives, Materials and Methods, Results, Conclusions and References. The last part of the dissertation contains the attachments (also in English and Polish) consisting of statements from the publication's co-authors. Except for the Abstract and Attachments (co-authors' statements), which are prepared in Polish and English, the rest of the dissertation is written in English.

All parts of the dissertation are written in the clear, understandable, and correct language. The descriptive part of the doctoral dissertation does not include any graphics, whereas the illustrations included in the publications are prepared carefully and, in my opinion, are entirely correct. The theoretical information (in the case of the review article) and results (in the case of the experimental works) presented in tables, graphs, and diagrams, are interesting and informative. However, it should be noted that the publications have already been assessed by reviewers and the editor. Moreover, the Author had to adapt the whole structure of the manuscripts to the editorial requirements, which imposed the style and design of the individual works.

However, in my opinion, one of the oversights which reduce the fluency of descriptions within a doctoral dissertation is the inconsistent use of terminology and abbreviations associated with the substrates. For example, in the Abstract, the Author uses the abbreviation SMCFAs, but its explanation appears after it has already been used twice (the same applies to the abbreviation 3HV). Then, throughout the work, the Ph.D. candidate uses various phrases based on the SMCFAs abbreviation or its full name. Although the Author refers to the same substrate, its terminology is not uniform, e.g., "$SMCFAs_{extracted}$-rich stream", "waste-derived SMCFAs", "SMCFAs derived from the anaerobic mixed culture fermentation of acid whey", "SMCFAs-rich residual stream", "bioprocess-derived SMCFAs", "SMCFAs from whey wastewater biodigestion effluent". A similar inconsistency applies to the synthetic substrates, e.g., "$SMCFAs_{synthetic}$-rich stream", "SMCFAs that mimicked the effluent from whey wastewater anaerobic fermentation", "synthetic mixture of SMCFAs", "synthetic SMCFAs". Furthermore, the abbreviations related to the synthetic and waste-derived SMCFAs could also be explained in the Abbreviations list.

Similarly, also in the publications, the Author uses different terminology for the substrate used. For example, in one of the works, the Author defines the substrate as short and medium chain carboxylic acids (CAs), while in another work as short and medium chain fatty acids (SMCFAs). In this case, any differences or similarities in the terminology used (which, for example, results from the comments of the editors or reviewers) could also be explained in the descriptive part of the doctoral dissertation or the Abbreviations list.

In all publications included in the doctoral dissertation, MSc Karolina Szacherska is the first Author, which proves her leading role in the experiments presented as part of the doctoral dissertation. Her contribution to the preparation of original research articles consisted primarily of participation in the study's design, performing cultivations and PHA extractions, involvement in data processing and analysis of results, visualization of data, participation in writing, and technical

editing of the manuscript. Whereas, in the case of the review article, her contribution consisted of involvement in the conceptualization, participation in writing, and technical editing of the manuscript. The contribution of the Ph.D. candidate and individual Authors confirmed by the attached statements is consistent with the information presented in each publication (sections “Authors' contributions”). Therefore, I consider the involvement of the Ph.D. student in conducting the experiments and preparing the publications as appropriate.

Substantive evaluation of the work

In the Abstract, the Ph.D. student synthetically presents a short introduction and justification of the research topic undertaken, the primary aim of the research, an outline of the methodology, and the most important results obtained in the conducted analysis. I think this part of the work is prepared in an informative way that allows the reader to understand the most critical assumptions and appreciate the research's most important results.

In the following Introduction chapter, the Author presents synthetically the most important information based on a thorough review of the literature related to the analyzed issues. In my opinion, a valuable introduction to the research topic is also a review publication included in the doctoral dissertation. In this context, the review article introduces the potential of using SMCFAs as carbon sources to produce PHAs in microbial processes. Furthermore, the review publication provides information regarding pure and mixed microbial cultures capable of producing PHAs using SCMFAs as the substrates. Moreover, it describes the challenges and future perspectives in synthesizing PHAs using SMCFAs. Finally, it also demonstrates and justifies the possibility of reducing PHAs' production costs by using waste feedstocks and their post-fermentation products, such as SMCFAs.

In my opinion, all chapters of the theoretical part of the thesis, and in particular the review publication, prove the knowledge and good preparation of the Author for the research problem undertaken. Furthermore, the introduction chapters of the descriptive part of the dissertation and the individual publications, including the review article, provide clear and comprehensive information necessary for understanding and appreciating the results presented in the next part of the dissertation. In this chapter, I especially appreciate the detailed description of the production of PHAs by pure and mixed microbial cultures using volatile fatty acids. Furthermore, the graphic design of the review publication also deserves noting.

For this part of the thesis, I would like to ask a question about the hypotheses that the Ph.D. student would formulate, considering the current state of knowledge presented in the Introduction and the objectives stated in the next paragraph.

After the Introduction, the Author presents the purpose of her research, which primarily focuses on evaluating synthetic and acid whey-derived short- and medium-chain fatty acids (SMCFAs) as feedstocks for PHAs production by different microorganisms, including, *Paracoccus homiensis*, *Aeromonas* sp. AC_01, and three strains of the genus *Pseudomonas* (*Pseudomonas* GL01, *Pseudomona*s GL06, and *Pseudomonas antarctica*. Except for the main goal, the Ph.D. student also formulated four specific aims, listed after the phrase "The scope of the thesis".

The research goals presented by the Ph.D. student are ambitious and, in my opinion, mainly formulated correctly. Nevertheless, after a thorough reading of the work, and above all, taking into account the number and detail of the conclusions drawn, I think that the Author could try to

formulate more specific goals (alternatively, the description of the scope of the work should be more detailed). For example, the following aspects could be included: the effect of unbalanced growth conditions on the PHAs synthesis and accumulation, the influence of different culture conditions (e.g., bioreactor v. flasks, type of the medium v. carbon source), or the interspecies and interstrain dependencies.

I would also like to point out that the last specific aim, "detailed characterization of the extracted PHAs", in my opinion, is too general. It can also be noticed that in the previous goal, the Author provides information about the methods that were used for the evaluation of PHA monomeric composition. Therefore, I think that a similar scope of information should also be given for another goal, e.g., the characterization of the extracted PHAs using DSC and TG methods.

Furthermore, referring to the formulated conclusions, I think the last two aims should be further precise with the information "depending on the bacterial strain and the type of the carbon source used". The above remark is also related to the fact that the specific goals apply to all publications (the Author did not formulate individual goals for each publication). Moreover, the PHA abbreviations should rather be written in the plural for each purpose (there are 2/2 in the aims section).

On the other hand, the aims formulated in the individual publications constituting the doctoral dissertation, in my opinion, have been formulated correctly and are adequate to the scope of the analysis as well as the results obtained.

The next chapter briefly describes the materials and methods used by the Ph.D. candidate during her research. This chapter, both in the descriptive part of the doctoral dissertation and in individual publications, includes information about the bacterial strains used during the study, description of the carbon sources, and then explanation of the methods used for the analyses of the chemical composition of PHAs and their physicochemical properties. Finally, this section ends with information concerning the statistical analyses performed.

I think the Materials and Methods section is written correctly (apart from the previously mentioned, a bit chaotic explanation of the substrates), which primarily allows for the repetition of the subsequent experiments. Moreover, in my opinion, all of the methods used by the Author were adequately selected to achieve all research goals. The properly selected methodology and the variety of analyses proved a comprehensive approach to solving the research problems.

However, I noticed that although in all publications, the Author provides information on the inoculum preparation method and the volume that was used to prepare the production culture, the bacterial density is not specified. Therefore, I would like to ask if the Author measured the density of the bacteria in inoculums and, if yes, what method was used for this purpose. Furthermore, I would also like to ask whether the inoculum density may affect the efficiency of the PHAs synthesis. The last question concerns the differences between the inoculum size used for the cultures performed in the Erlenmeyer flasks and the bioreactor (5 vs. 10%).

The next chapter involves the presentation and discussion of the obtained results. In my opinion, this is a very well-written chapter. The extensive use of research methods and various strains of microorganisms allowed the Author to gather important information and significantly expand the knowledge of PHAs production using waste-derived SMCFAs. The obtained results are undoubtedly valuable and bring important information not only of cognitive but also of practical importance.

As a result of the conducted research and analysis, the Ph.D. candidate confirmed that all the microorganisms selected for the study could metabolize synthetic and waste-derived SMCFAs into

valuable PHAs. At the same time, as determined by the Author, the type and concentration of the SMCFAs influence the concentration, monomeric composition, and material properties of the PHAs. Additionally, the Ph.D. student confirmed that the monomeric composition of the extracted PHAs varied depending on the bacterial strain. Moreover, she also showed that the microorganisms are promising candidates for the biotechnological production of PHAs from SMCFAs with beneficial properties for industrial applications. However, as noted by the Author, in the case of *Paracoccus homiensis* and *Aeromonas* sp. AC_01, acid whey-derived SMCFAs can cause an inhibitory effect on the PHAs production process. Another significant achievement of the research work was the extraction of novel copolymers of scl-mcl PHAs from the culture of *Aeromonas* sp. AC_01 and *Pseudomonas* sp. GL06.

In the case of the articles, the Results section is combined with the Discussion, which is currently the common practice in many scientific journals. Despite the large number of results obtained by the Author, they were presented in a careful, logical and coherent manner with references to the current and relevant literature cited in the bibliography. Moreover, the description of the results is consistently arranged in a sequence that illustrates the Author's efforts to solve the research problem and achieve the previously formulated scientific goals. The results presented in the publications were also arranged with well-designed tables and figures.

Generally, it can be noticed that in all publications, the Author adopted a similar research scheme, which then determined the manner of describing the obtained results. In the beginning, the description of results concerns the impact of individual synthetic SMCFAs on the analyzed parameters (e.g., biomass concentration and PHAs production). Next, the presentation of the results focuses on the influence of different substrates containing mixed and complex compounds, including SMCFAs derived from acid whey. In the last parts of the Results chapter, the Author characterizes the chemical composition and physicochemical properties of the extracted PHAs using GC-MS, ATR-FTIR, DSC, TG techniques.

In the descriptive part of the doctoral dissertation, the Author describes the obtained results separately for each publication. The subsequent subchapters, each dedicated to a particular article, contain information about the aim of the study and a summary of the most important results. In this context, I think that it could be more valuable to understand and appreciate the obtained results if they are described within one chapter. Firstly, they were already presented separately in the publications. Secondly, they should constitute a thematically related cycle, so preparing one chapter would facilitate the assessment of what the achievement consisted of and what are its subsequent stages.

Moreover, I think formulating the aims is unnecessary in the Results section since the previous chapters were devoted to it. On the other hand, the goals formulated within the Results are more specific than those formulated in the Aims and objectives section. Therefore, I think they should be rather presented as specific goals in the Aims chapter, for example, with references to the particular publication.

For this part of the thesis, I would like to ask a question regarding the substrate used. The Author provided information about the composition of SMCFAs derived from acid whey, which was the same in all experiments. However, I would like to ask what difference in the chemical composition can be expected between analogous substrates but obtained at different periods or from various processes. In this context, I would also like to ask what can be the expected consequence of the potential differences between substrates on the effectiveness of PHAs production process, especially when the same bacterial strain is used.

I would also like to ask the Ph.D. candidate to indicate bacterial species or strains among microorganisms she used during the study, which could be especially recommended for PHA synthesis using waste-derived SMCFAs.

The Conclusions chapter constitutes the next part of the dissertation. The conclusions formulated in the publications are based on the results and reflected in the formulated goals. On the other hand, some conclusions formulated in the descriptive part of the doctoral dissertation constitute a rather detailed summary of the obtained results than the typical conclusions with a slightly greater degree of generalization (e.g., the sixth, eighth and ninth conclusion). Moreover, it can be noted that the third and seventh conclusions are not reflected in the goals formulated in the Aims and objectives section (in terms of the unbalanced growth conditions and the type of the culture medium).

In turn, the eighth and ninth conclusions could be more specific. In this context, it is worth providing information on the novel copolymers extracted during the study and clarifying the promising thermal properties.

For this part of the dissertation, I would like to ask the following questions.

Regarding the first conclusion: according to the Ph.D. candidate, all the bacteria used during the doctoral study have the ability to metabolize both synthetic and waste-derived SMCFAs into valuable PHAs. However, can the PHAs synthesis process be considered effective for all these microorganisms?

Regarding the second conclusion: according to the Ph.D. candidate, the concentration of the SMCFAs affects PHA concentration and productivity. Therefore, please, specify, what SMCFAs concentration can be considered optimal for PHAs production, and what is the difference between the “PHA concentration” and “PHA productivity”?

The whole dissertation ended with the chapter References. In the descriptive part of the achievement and the individual experimental publications, the Author cites 30-40 literature items, while in the case of the review publication, 102 items. To a large extent, the cited reports were published in recent years and in prestigious journals.

Summary and final conclusion

I would like to emphasize that I highly appreciate the Ph.D. thesis of MSc Karolina Szacherska. The minor comments and questions do not diminish the Ph.D. student's achievements in terms of the obtained results but are intended to be helpful guidelines in the implementation of future scientific undertakings. The obtained results are valuable and meaningfully expand our knowledge about the synthesis of PHAs using synthetic and waste-derived SMCFAs. The most important strengths of the dissertation include the accurate and up-to-date selection of the research topic, the application of the properly selected methodology, fluent use of the literature on the subject, and skillful analysis of the obtained results. The Ph.D. candidate proved to have a suitable research workshop, which allowed her to obtain original valuable results, both in theoretical and application aspects. Moreover, the publication of the results, as the first Author, in high-rated journals proves the maturity and independence of the Ph.D. candidate as well as the scientific value of the obtained results.

In my opinion, the Ph.D. thesis entitled "Short and medium chain fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production" performed by MSc Karolina Szacherska in the Department of Microbiology and Mycology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of

Warmia and Mazury in Olsztyn under supervision of dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. UWM and prof. dr hab. inż. Piotr Oleśkowicz-Popiel meets the requirements specified in Art. 187 of the Act of July 20, 2018 The Law on Higher Education and Science (uniform text: Dz. U. from 2022, item 574, as amended). Therefore, I would like to ask the Scientific Council of the Discipline of Biological Sciences of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn to admit MSc Karolina Szacherska to further stages of the doctoral dissertation.

Appreciating the large scope and complexity of the research carried out by MSc Karolina Szacherska and the exceptional value of the obtained results published in high-quality scientific journals, I would like to submit the request to the Scientific Council of the Discipline of Biological Sciences of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn to award this doctoral dissertation.

Karol Fijałkowski

dr hab. inż. Karol Fijałkowski, prof. ZUT