

Prof. dr hab. Jacek Nowak,
Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Zakład Fermentacji i Biosyntezy
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Katarzyny Górskiej
pt. „Wytwarzanie dihydroksyacetonu przez bakterie octowe w podłożu zawierającym
odpadowy glicerol z produkcji paliw”**

W związku z rosnącą produkcją biodiesla w Europie (szacunki mówią o tym, że w 2017 roku w Europie wyprodukowano 14,155 milionów litrów) pojawił się problem zagospodarowania produktu ubocznego z tego procesu produkcji - glicerolu. Wzrost produkcji biodiesla można zaobserwować corocznie od 2010 roku (10,707 milionów litrów). Również produkcja w Polsce w tych latach prawie się podwoiła. Produktem ubocznym w otrzymaniu biodiesla jest glicerol odpadowy również otrzymywany w coraz większych ilościach. Zastosowanie go do syntez mikrobiologicznych może iść w różnych kierunkach. Jednym z najbardziej obiecujących, z uwagi na duże zapotrzebowanie na rynku, jest produkcja dihydroksyacetonu. Dihydroksyaceton znajduje zastosowanie między innymi w przemyśle kosmetycznym, w medycynie, rośnie również perspektywa zwiększenia jego zastosowania w produkcji żywności jako substancji słodzącej, suplementu diety, emulgatora czy plastyfikatora.

Pani mgr Katarzyna Górka w swojej pracy doktorskiej podjęła się zadania wyboru szczepu bakterii octowych i optymalizacji procesu produkcji dihydroksyacetonu poprzez biologiczną konwersję odpadowego glicerolu. Jest to, jak się wydaje, najbardziej perspektywiczny kierunek przemysłowej produkcji tego produktu.

Pracownicy obecnego Instytutu Chemii i Technologii Żywności Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu od lat odnoszą sukcesy zarówno naukowe, jak i komercjalizacyjne w dziedzinie badania i aplikacji wielu syntez mikrobiologicznych. Wieloletnie doświadczenia badawcze były więc dobrą podstawą do podjęcia badań nad maksymalnie efektywną, biologiczną metodą wytwarzania dihydroksyacetonu. Badania te prowadzone pod kierunkiem profesora UE, dr hab. Zbigniewa Garncarka wpisują się w problematykę naukową Instytutu w zakresie biosyntezy ważnych produktów, mających zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Celem pracy pt. „Wytwarzanie dihydroksyacetonu przez bakterie octowe w podłożu zawierającym odpadowy glicerol z produkcji paliw” było opracowanie efektywnej metody otrzymywania dihydroksyacetonu na drodze fermentacyjnej poprzez wybór szczepu bakterii octowych, charakteryzujący się wysoką wydajnością biokonwersji, prowadzonej z dużą szybkością i wysokim końcowym stężeniem produktu. Dla wybranego szczepu przeprowadzono optymalizację składu podłoża fermentacyjnego, optymalnego poziomu pH procesu w hodowlach wgłębnych okresowych w warunkach kolb wstrząsanych, w bioreaktorze, a także zasilanych hodowlach okresowych prowadzonych w bioreaktorze. Dla scharakteryzowania procesów zastosowano szereg, dobrze dobranych, parametrów oceny przebiegu procesu.

W ramach niniejszej pracy doboru szczepu dokonano spośród siedmiu szczepów, trzech szczepów *Gluconobacter oxydans* i czterech szczepów *Gluconobacter xylinus* wybranych z różnych kolekcji szczepów. Trochę brakowało recenzentowi w czasie studiowania pracy, informacji co do uzasadnienia takiego wyboru. Wstępne badania dotyczące oceny przydatności tych szczepów do biosyntezy dihydroksyacetonu z wybranego surowca ubocznego wykonano w warunkach hodowli wstrząsanych. Oceniano stężenie produktu w podłożu hodowlanym, stężenie biomasy bakterii octowych, wydajność produkcji dihydroksyacetonu w odniesieniu do wprowadzonego surowca, szybkość objętościową biokonwersji glicerolu i współczynnik efektywności produkcji dihydroksyacetonu. Te parametry procesy w sposób nie budzący wątpliwości pozwoliły dokonać wyboru najefektywniejszego szczepu, którym okazał się *Gluconobacter oxydans* LMG 1385 pochodzący z Belgijskiej Kolekcji Drobnoustrojów, wyizolowany z suszonych owoców. Następnie przeprowadzono dla tego szczepu badania wpływu stężenia substratu w podłożu hodowlanym na efektywność biokonwersji, stosując stężenia pomiędzy 10 a 200 g glicerolu na dm^3 . Analiza uzyskanych w hodowlach wgłębnych wstrząsanych pozwoliła na dobór stężenia 70.0 g/dm^3 uzyskując końcowe stężenie produktu 53.7 g/dm^3 . Bardzo interesujące wyniki uzyskano w następnym etapie optymalizacji prowadzonej tą samą metodą hodowli, dotyczącej wyboru źródła azotu (w stężeniu 1.0 g/dm^3). Otóż bardzo zbliżone do najczęściej używanego w literaturze źródła azotu jakim jest ekstrakt drożdżowy wyniki, uzyskano dla siarczanu amonu (szczególnie z punktu widzenia końcowego poziomu produktu - około 52 g/dm^3 – brak różnic istotnie statystycznych). Standardową metodę badania wpływu składników podłoża na efektywność procesu zastąpiono, w optymalizacji stężenia makroelementów w podłożu hodowlanym, zdecydowanie mniej pracochłonnym i czasochłonnym sposobem dzięki wyznaczeniu wariantów hodowlanych z użyciem

centralnego planu kompozycyjnego Boxa-Wilsona. Uzyskane wyniki (często wydajność w wybranych tym sposobem hodowlach była bardzo niska) analizowano używając analizy statystycznej wariancji w celu wyznaczenia współczynników regresji i opisano powierzchnię odpowiedzi wyznaczonego modelu. Okazało się jednak, że w optymalnym punkcie, określonym tą metodą, uzyskano końcowe stężenie dihydroksyacetonu o ponad 20% niższe niż w przypadku stosowania ekstraktu drożdżowego, a nie optymalizowanego siarczanu amonu (wzbogaconego $MgSO_4$ i KH_2PO_4) oraz stężenie biomasy 75% niższe. Autorka, co wywołało u mnie pewne odczucie niedosytu co do możliwości dalszego badania przydatności siarczanu amonu, wybrała do dalszych badań ekstrakt drożdżowy, z uwagi na zdecydowanie wyższą szybkość objętościową konwersji oraz efektywność produkcji. Ciekawe jakie rzędu oszczędności w kosztach podłoża można by uzyskać stosując nieorganiczne źródło azotu.

Wykonując optymalizację wgłębnych hodowli okresowych prowadzonych w fermentorze laboratoryjnym wykorzystano bioreaktor BIOMER 10 skonstruowany wcześniej w Instytucie. Najpierw oceniano wpływ początkowego stężenia odpadowego glicerolu na efektywność biokonwersji, uzyskując identyczny z wynikami z hodowli wstrząsanych optymalny poziom substratu na początku hodowli tzn. 70 g glicerolu na 1 dcm³. Dobierając pH podłoża hodowlanego stosowano poziomy 4.0; 5.0 i 6.0. Poziom pH miał szczególnie istotny wpływ na wzrost bakterii, ponieważ wraz ze wzrostem pH rosła szybkość objętościowa wzrostu i stężenie biomasy w płynie pohodowlanym. Finalnie najwyższe końcowe stężenie dihydroksyacetonu zaobserwowano w hodowli prowadzonej w pH 5.0 (67.0 g/dcm³), choć w pH=4.0 było ono bardzo zbliżone (66.7 g/dcm³). Analiza przebiegu tych fermentacji skłoniła autorkę do sięgnięcia po technikę fermentacji dużo trudniejszą, szczególnie w sterowaniu procesem, a mianowicie po zasilaną wgłębną hodowlę okresową. Podstawową tezę tego zadania było bardziej efektywne użycie bioreaktora poprzez lepsze wykorzystanie aparatu enzymatycznego drobnoustrojów (potencjału metabolicznego już namnożonych komórek).

Ponownie przeprowadzono dobór pH podłoża fermentacyjnego w takim samym zakresie co dla hodowli okresowych, ale prowadzono także hodowle ze zmiennym pH. Najwyższe końcowe stężenie dihydroksyacetonu zaobserwowano we wgłębnej zasilanej hodowli okresowej o pH regulowanym na poziomie 5.0 (175.8 g/dcm³). Badając wpływ stężenia glicerolu na efektywność produkcji dihydroksyacetonu w takich warunkach procesu stwierdzono, że poziom 70 g/l, podobnie jak w przypadku hodowli wstrząsanych prowadzonych w kolbach, daje najlepsze wyniki. Pracę zakończono oceną przebiegu zasilanych wgłębnych hodowli okresowych stosując podłoża zawierające zróżnicowane partie odpadowego glicerolu z produkcji biopaliw. Średnie końcowe stężenie, mimo oczywistych

różnic było nadal wysokie i sięgało 160 g dihydroksyacetonu w 1 dcm³ płynu pofermentacyjnego.

Ocena formalnej strony pracy

Praca doktorska pani mgr inż. Katarzyny Górskiej liczy 149 stron tekstu, z czego na wstęp i przegląd literatury przypada 31 stron, cel pracy i część metodyczna obejmuje 24 strony, a część zawierająca omówienie i dyskusję oraz podsumowanie wyników wraz z wnioskami jest najobszerniejsza i zajmuje 55 stron. Pozostałe części to: spis literatury, spis tabel i rysunków oraz streszczenie w języku polskim. Moje zdziwienie wywołało bark streszczenia w języku angielskim co jest standardem w tego typu pracach doktorskich. Wyniki przedstawiono w 6 tabelach i 21 rycinach. Trzeba podkreślić staranność w doborze 224 pozycji literaturowych i właściwej pisowni literatury. Na początku pracy umieszczono również przydatny wykaz skrótów i symboli, bardzo pomocny, choć zabrakło w tym spisie skrótu MONG (Matter Organic Non Glycerol) z tabeli 6. Nie znalazłem też w pracy opisu lub definicji tego parametru. Trzeba jednak przyznać bez wątplenia, że układ pracy jest logiczny i przejrzysty, odpowiedni dla prac o charakterze empirycznym.

Zaletami pracy są bardzo przemyślana i ciekawie napisana część literaturowa dająca dobrą podstawę do sformułowania tezy pracy, oraz wzorowo przeprowadzona obszerna (19 stron) dyskusja z wykorzystaniem wielu aktualnych pozycji literaturowych. W części literaturowej przeprowadzono między innymi bardzo skrupulatną analizę literatury dotyczącą stosowanych w hodowlach tego typu źródeł i form związków wchodzących w skład podłoża hodowlanego, jak i suplementacji podłoża np. witaminami. Język w pracy jest bardzo zwięzły i komunikatywny co ułatwia znacząco lekturę całości tekstu.

Wracając do części literaturowej i dyskusji trzeba stwierdzić, że wyraźnie wskazuje na dobrą znajomość przez autorkę literatury i umiejętność korzystania z tych informacji w trakcie dyskusji wyników własnych badań.

W pracy pojawiło się kilka drobnych usterek i niedoskonałości językowych, które muszą z obowiązku recenzenta odnotować. W spisie treści w części nazw pododdziałów znajdują się symbole prowadzonych hodowli a w części nie (np. p.4.4). Podobnie w opisach rysunków (np. rys.12 i 13). Trochę brakowało mi również wyjaśnienia zastosowanych dla tychże procesów skrótów. Na przykład symbol FBC opisany jest jako zasilana wgłębna hodowla okresowa (rozumiem, że skrót pochodzi od angielskiego Fed Batch Culture). Dyskusyjne wydaje mi się używanie nazewnictwa odpadowy glicerol, ja wolę traktować go

jako produkt uboczny, ale myślę, że nazewnictwo takie wynika ze stopnia problemów z zagospodarowaniem tego surowca w danej branży. Bardzo sympatyczna, choć nieprzekonująca, jest nazwa „kołderka z waty” jako zamknięcie kolb wstrząsanych, ponieważ dotychczas spotykałem się tylko z nazwą: korki z waty. Proszę nie używać słowa najbardziej optymalne (str. 109) bo coś jest optymalne (najlepsze) albo nie. Błędów stylistycznych znalazłem niewiele jak na tak obszerną pracę, choć nie mogę się zgodzić z wyrażeniem „podobne wnioski zaobserwowano” (str. 109), czy „zasadniczą rolę dla szybkości” (str. 110). Reasumując praca była bardzo uważnie napisana, a zauważone usterki nie umniejszają odczucia dobrego i solidnego przygotowania edycji pracy.

Ocena merytoryczna pracy

W części literaturowej pracy autorka przedstawiła szczegółowo zarówno różne aspekty otrzymywania dihydroksyacetonu na drodze biokonwersji z udziałem drobnoustrojów jak i zagadnienie zastosowania tego produktu w różnych przemysłach. Jak już wspomniałem wcześniej, bardzo użyteczną częścią tego przeglądu literatury jest analiza substratów i innych składników podłoża, stosowanych w hodowlach bakterii kwasu octowego prowadzonych dla otrzymania dihydroksyacetonu. Analiza literatury skłoniła zapewne autorkę do zrezygnowania z prac z unieruchomionymi bakteriami. Jest to zrozumiałe bo w świetle analizowanej literatury wyniki tego kierunku badań nie są perspektywiczne. Natomiast uderzył mnie w analizie literatury brak oceny wpływu temperatury na wydajność procesu. Również w części optymalizacyjnej pracy zrezygnowano z oceny wpływu temperatury hodowli na efektywność procesu. Bardzo proszę o wyjaśnienie tego podejścia.

Założony cel pracy i sposób jego realizacji przedstawiłem dość szczegółowo w części wstępnej, dlatego ograniczę się tylko do stwierdzenia, że cel został sformułowany prawidłowo a zakres prac logicznie zaplanowany. Chciałbym podzielić się też moim odczuciem, że praca ma solidny charakter, a założenia planu optymalizacji są w pełni zrozumiałe (z wyjątkiem sprawy temperatury hodowli). Sposób realizacji zadania optymalizacyjnego jest właściwie sprofilowany, a liczba stosowanych współczynników opisujących hodowlę znaczna, co być może utrudnia czasami studiowanie pracy, jednak zdecydowanie poszerza wiedzę na ten temat badanych zależności .

Rozdział: „Materiały i metody badań” zawiera kilka podrozdziałów poświęconych przedstawionym w tytule zagadnieniom. Uważam, że charakterystyka drobnoustrojów i stosowanych podłoży hodowlanych, metody badań oraz logika kolejności postępowania

została przedstawiona jasno i wyczerpująco. Brakuje mi wyjaśnienia, dlaczego w fazie doboru szczepu zdecydowano się aż na 4 szczepy *Gluconobacter xylinus*. Chciałem także prosić o wyjaśnienie, jak duże są różnice w wynikach uzyskiwanych z zastosowaniem oznaczania stężenia dihydroksyacetonu metodą kolorymetryczną w stosunku do metody chromatograficznej.

W rozdziale „Wyniki badań i ich omówienie” autorka w sposób jasny i logiczny omawia wyniki badań. Rozdział ten, w moim odczuciu, jest bardzo dobrze przygotowanym rozdziałem. Przedstawienie rezultatów głównie w postaci wykresów słupkowych ułatwia analizę wyników, szczególnie śledzenie zmian sporej liczby zastosowanych wskaźników.

Dyskusja wyników z danymi literaturowymi (zamieszczona w rozdziale „Dyskusja ”) jest następną silną stroną pracy. Dyskusja ta jest w pełni merytoryczna, dokumentuje szeroką wiedzę autorki w zakresie realizowanych zagadnień i umiejętność wykorzystania tej wiedzy w interpretacji uzyskanych rezultatów. Brakowało mi jedynie wyjaśnienia decyzji o rezygnacji z uwzględnienia temperatury procesu w procesie optymalizacyjnym, o czym wspominałem już uprzednio.

Następujące po tej części pracy wnioski sformułowano prawidłowo.

Z mojego punktu widzenia w pracy za mało wyeksponowane zostały sukcesy procesu optymalizacji i zastosowanej drogi zmian technik fermentacji. Uzyskane wyniki, zarówno w prowadzeniu hodowli wgłębnych bioreaktorowych, jak i szczególnie zasilanych, są bardzo dobre. Bardzo często uzyskane końcowe stężenie dihydroksyacetonu jest wyższe niż w badaniach innych badaczy. Jest to dowodem na to, że autorka właściwie dobrała stężenia surowców i warunki prowadzenia procesu, a także, co nie jest łatwe w tego typu hodowlach prowadzonych w bioreaktorach laboratoryjnych, dobrze opanowała technikę prowadzenia takich procesów i ich sterowania. Rezultatem są wyniki (potwierdzone na różnych partiach surowca, co wymaga podkreślenia) o wysokich perspektywach aplikacyjnych. Dają bowiem mocne podstawy do kontynuowania badań w kierunku izolowania produktu z podłoża i powiększenia skali produkcji

Wniosek końcowy

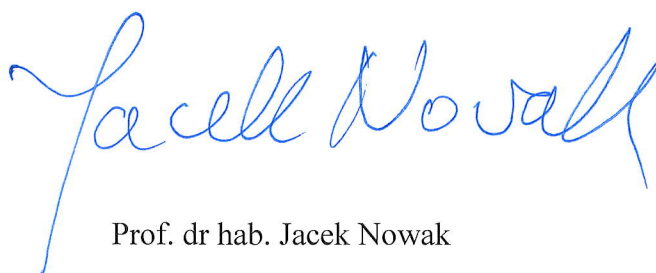
W mojej opinii przedstawiona do recenzji praca prezentuje dobry poziom naukowy i wysoki poziom perspektyw komercjalizacji proponowanej technologii. Charakteryzuje się właściwie zaplanowanym i przeprowadzonym postępowaniem optymalizacyjnym, którego

final owočuje bardzo dobrymi wynikami efektywności procesów prowadzonych w laboratoryjnej skali bioreaktorowej.

W pracy zamieszczono bogaty i dobrze przedstawiony materiał faktograficzny. Wyniki badań noszą znamiona oryginalności i nowości naukowej. Odnosi się to szczególnie do spektakularnego zwiększenia końcowego stężenia produktu w zaproponowanej metodzie hodowli w głębszej zasilaniem.

Mogę więc stwierdzić jednoznacznie, że przedstawiona do oceny praca pani mgr inż. Katarzyny Górskiej odpowiada wymogom ustawowym stawianym rozprawom na stopień doktorski i proszę Wysoką Radę Wydziału Inżynieryjno-Ekonomicznego o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Poznań, 31.01.2018



Prof. dr hab. Jacek Nowak