

Prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski
Katedra Biotechnologii Żywności
Uniwersytet Warmińsko –Mazurski
w Olsztynie

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt. „Wytwarzanie dihydroksyacetonu przez bakterie octowe w podłożu zawierającym odpadowy glicerol z produkcji biopaliw” przygotowanej przez mgr inż. Katarzynę Górską

Postęp w biotechnologii przemysłowej w dużym stopniu związany jest z doskonaleniem procesu biokatalizy. Stosuje się w tym celu oczyszczone preparaty enzymatyczne lub komórki drobnoustrojów w postaci wolnej lub immobilizowanej. Poznanie specyfiki mikroorganizmów oraz aktywności wewnątrzkomórkowych enzymów jest jednym z kryteriów oceny ich przydatności do biokonwersji określonego substratu do oczekiwanego produktu. W tym celu niezbędna jest pogłębiona wiedza o szlakach metabolicznych z udziałem enzymów.

Możliwości zastosowania wybranych drobnoustrojów w procesie biokonwersji wykorzystwała Autorka ocenianej rozprawy. W oparciu o znajomość szlaków metabolicznych oraz biokatalitycznego znaczenia dehydrogenazy glicerolowej wybrała szczep bakterii octowych zdolny do biokonwersji glicerolu do dihydroksyacetonu, aplikacyjnie wartościowego związku o szerokim spektrum zastosowania np. w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym. Proponowana procedura biotechnologiczna jest alternatywą dla procesu chemicznego, sprzyjająca poprawie jakości gotowego produktu. W celu jej upowszechnienia niezbędne jest eksperymentalne poszukiwanie możliwości minimalizacji kosztów zastosowania procesów biotechnologicznych w produkcji dihydroksyacetonu. W tym zakresie ważnym kierunkiem badań jest między innymi ocena przydatności tanich źródeł substratów np. produktów ubocznych, do których zaliczyć można glicerol odpadowy pozostający po produkcji biodiesla. O jego przydatności jako komponentu podłoży w procesach mikrobiologicznych dość szeroko informuje dostępna literatura z tym, że tylko nieliczne zespoły próbowały go stosować jako surowiec w pozyskiwaniu dihydroksyacetonu. Wyzwanie to jest przedmiotem studiów literaturowych oraz głównym celem badań, których wyniki są zaprezentowane w ocenianej rozprawie doktorskiej.

Ocena rozprawy z uwzględnieniem wymagań formalnych

Recenzowana rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Analizy Żywności, Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. inż. Zbigniew Gancarek, a promotorem pomocniczym dr inż. Małgorzata Janczar-Smuga.

Całość ocenianego opracowania obejmuje 151 stron, w tym 21 z wykazem 224 pozycji cytowanego piśmiennictwa.

Układ treści rozprawy jest dość typowy. Wydzielono w niej 6 rozdziałów oraz oddzielnie wykaz stosowanych skrótów i symboli; wstęp; wykaz piśmiennictwa, a także tytułów zamieszczonych w pracy tabel - 14 oraz rysunków - 31.

Streszczenie pracy w języku polskim oraz angielskim zamieszczono w jej końcowej części pracy mimo, że zwyczajnie edytorskie zalecają, aby poprzedzało ono treść opracowań naukowych.

Zaproponowany tytuł rozprawy w stopniu zadowalającym odzwierciedla cel i zakres przeprowadzonych badań. Szkoda, że zabrakło w nim pojęcia kluczowego jakim jest biokonwersja glicerolu do dihydroksyacetonu.

Stwierdzam, że oceniana praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom dysercacyjnym na stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Ocena wartości merytorycznej rozprawy

Zgodnie z przyjętymi zasadami przygotowania opracowań naukowych Autorka rozprawy w krótkim wstępie, a następnie bardzo szeroko na podstawie cytowanego piśmiennictwa uzasadniła problematykę, cel oraz zakres przeprowadzonych badań.

Dość szczegółowo przedstawiła właściwości dihydroksyacetonu oraz wskazała kierunki jego zastosowania. Następnie opisała metody jego pozyskiwania. Zwróciła uwagę na niedoskonałości procesu chemicznego i uzasadniła szanse i możliwości stosowania w tym celu procesów biotechnologicznych.

Do merytorycznie wartościowych zaliczam opis mechanizmu mikrobiologicznej konwersji glicerolu do dihydroksyacetonu. Interesujący jest także opis metod modyfikacji genetycznych bakterii octowych oraz możliwości ich immobilizacji.

Ważne miejsce w ocenianym rozdziale zajmują informacje o znaczeniu warunków namnażania bakterii octowych np. dostęp tlenu, kwasowość środowiska itp. oraz doboru składu podłoża z uwzględnieniem jego wpływu na wydajność procesu. Dotyczy to przede wszystkim jakości i stężenia stosowanego substratu tj. glicerolu.

Po zapoznaniu się z treścią ocenianej części pracy stwierdzam, że Doktorantka dobrze opanowała wiedzę dotyczącą problematyki przeprowadzonych badań. Znalazło to potwierdzenie w sformułowanym celu oraz zakresie badań. Zaznaczam jednocześnie, że występują w niej sformułowania mało precyzyjne, niefortunnie dobrane np. „Badania nad otrzymywaniem dihydroksyacetonu na drodze biokonwersji (czego?) przez bakterie octowe” s.10. Czytającego

pracę razi częste powtarzanie pojęcia „otrzymywanie dihydroksyacetonu na drodze biokonwersji glicerolu” (niekiedy kilka razy na jednej stronie).

Opis części doświadczalnej Autorka rozpoczyna prezentacją stosowanych w pracy materiałów oraz 7 czystych kultur bakterii octowych (z różnych Kolekcji), z których wybrano szczep *Gluconobacter oxydans* LMG 1385. Dokładnie opisała procedury przygotowania stosowanych podłoży oraz ich komponentów w tym charakterystykę 3 partii odpadowego glicerolu różniących się składem chemicznym (tabela 6). Szkoda, że zabrakło w niej informacji: o kwasowości, a także o tym, którą z trzech partii glicerolu stosowano w początkowym etapie badań. Brakuje także informacji czy w ustalaniu wielkości dodatku odpadowego glicerolu do podłoża przeliczano dawkę na zawartość czystego glicerolu? Brakuje jednoznacznego rozróżnienia pojęć surowiec tj. odpadowy glicerol oraz substrat tj. glicerol jako komponent w/w surowca. Znalazło to odzwierciedlenie w dalszej części pracy np. w opisie procedury chromatograficznego oznaczania zawartości glicerolu w analizowanych próbkach, a także w obliczaniu parametrów wydajności procesu biokonwersji, w omawianiu wyników oraz w tabelach.

W ocenianym rozdziale Autorka opisała stosowaną w badaniach aparaturę oraz procedury prowadzenia hodowli wgłębnych z uwzględnieniem metod kontroli ich przebiegu. W prezentacji stosowanych metod analitycznych szczegółowo opisała warunki oznaczania dihydroksyacetonu i glicerolu metodą HPLC. Wysoko oceniam zastosowane metody obliczania wartości parametrów kinetycznych hodowli ważnych w charakterystyce procesów biotechnologicznych. Pozytywnie oceniam zastosowane metody optymalizacji składu podłoża oraz analizy statystycznej uzyskanych wyników.

Po zapoznaniu się z treścią rozdziału 3 stwierdzam, że Doktorantka dobrze zaplanowała i przeprowadziła eksperymenty i prawidłowo dobrała metody analityczne.

W rozdziale czwartym Autorka pracy przedstawiła wyniki przeprowadzonych badań, a także ich omówienie. Rozpoczyna go od opisu wyników optymalizacji warunków wgłębnych hodowli okresowych wybranego szczepu bakterii octowych prowadzonych w kolbach metodą wstrząsaną. Następnie zaprezentowała interesujące i aplikacyjnie ważne wyniki dotyczące oddziaływania składu podłoża w tym stężenia glicerolu, a także makro- i mikroskładników na efektywność procesu biokonwersji glicerolu do dihydroksyacetonu.

W kolejnej części ocenianego rozdziału rozprawy (r.4.2) Doktorantka zaprezentowała wyniki badań uzyskanych podczas optymalizacji warunków okresowych hodowli *Gluconobacter oxydans* LMG 1385 prowadzonych metodą wgłębną w bioreaktorze. W tym etapie badań oceniano efektywność biokonwersji glicerolu do dihydroksyacetonu w zależności od początkowego stężenia glicerolu w podłożu w zakresie od 40 do 100 g/dm³, a także od kwasowości podłoża. Uzyskane wyniki zamieszczone w tabelach oraz zilustrowane na rysunkach przekonująco potwierdzają te zależności.

Do interesujących, głównie ze względów aplikacyjnych, zaliczam wyniki uzyskane w optymalizacji warunków zasilanych wgłębnych hodowli okresowych bakterii *Gluconobacter oxydans* prowadzonych w bioreaktorze. Eksperymentalnie wykazano, że stosując je można uzyskać wyższe stężenie produktu końcowego niż w tradycyjnych hodowlach okresowych.

Opracowane parametry biotechnologiczne Autorka zastosowała w końcowym etapie badań, których celem była ocena wpływu składu surowca (trzech partii) różniących się zawartością glicerolu - substratu na przebieg i wydajność procesu jego biokonwersji.

Wyniki zestawione w tabeli 14 wskazują, że najkorzystniejsze stężenie dihydroksyacetonu w podłożu - 175,8 g/dm³ uzyskano stosując w hodowli bakterii jako składnik podłoża surowiec - Partia I, w którym rzeczywista zawartość glicerolu/substratu była najniższa. W pracy nie znalazłem interpretacji uzyskanych wyników badań. Zabrakło także graficznej ilustracji przebiegu tej hodowli. Proszę o wyjaśnienie, jak ustalano wielkość dodatku glicerolu do podłoża? Czy wartość początkowego stężenia – 70 g/dm³ dotyczy surowca (glicerol odpadowy) czy substratu (glicerol w surowcu)? Które wartości stosowano w obliczaniu parametrów opisujących proces. Mam także wątpliwości dotyczące celowości obliczania wyników średnich (tabela 14).

W rozdziale piątym Doktorantka przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników badań własnych z wynikami innych autorów zajmujących się podobną problematyką wskazując, że nie stanowią Oni licznej grupy. Do wartościowych ze względów merytorycznych i praktycznych zaliczam te fragmenty dyskusji, w których Autorka interpretuje znaczenie inhibicji procesu biokonwersji wywoływanej nadmiarem substratu oraz stężeniem produktu. Wysoko oceniam wyjaśnienia przyczyn zmniejszenia aktywności wewnątrzkomórkowej dehydrogenazy glicerolowej powodowane wysokim stężeniem dihydroksyacetonu co utrudnia transport substratu - glicerolu do wnętrza komórek bakterii. Interesująca jest także interpretacja wyników badań własnych dotycząca optymalizacji składu podłoża oraz warunków hodowli stosowanych bakterii octowych.

W treści rozdziałów czwartego i piątego zauważyłem powtarzające się niefortunne sformułowania, o których informowałem wcześniej. Dyskusyjnym jest stosowanie pojęcia „w badaniach prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy”.

W rozdziale szóstym Autorka przedstawiła 10 wniosków, których treść dobrze informuje o zakresie przeprowadzonych badań oraz o wartości merytorycznej wyników.

Uważam, że niektóre z nich to raczej stwierdzenia np. wniosek 7. Będąc zwolennikiem problemowego formułowania wniosków sugeruję połączenie treści wniosków 8 i 9.

Podsumowanie oceny. Wniosek końcowy

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską zaliczam do typowych opracowań naukowych. W jego treści uzasadniono postawione interesujące hipotezy badawcze. Dobrze i precyzyjnie zaprezentowano cel i szeroki zakres badań. Poprawnie wykonano eksperymenty, prawidłowo dobrano metody analityczne i optymalizacyjne. Zrealizowano wszystkie zaplanowane zadania badawcze. Otrzymane wyniki potwierdziły trafność postawionych tez badawczych. Interpretacja większości wyników świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym oraz o dojrzałości badawczej Doktorantki. Znacząca część z otrzymanych wyników ma znaczenie praktyczne, głównie w biotechnologii przemysłowej.

Rozprawę napisano poprawnie i dość przystępnie. Występują w niej usterki stylistyczne i niefortunnie dobrane sformułowania. Większość z nich zaznaczyłem w ocenianym egzemplarzu pracy.

Stwierdzam, że praca pt. „Wytwarzanie dihydroksyacetonu przez bakterie octowe w podłożu zawierającym odpadowy glicerol z produkcji biopaliw” przygotowana przez mgr inż. Katarzynę Górską spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 14 marca 2003 r (Dz.U.nr 595 z późniejszymi zmianami) stawiane rozprawom dysercacyjnym na stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologii żywności i żywienia.

Na tej podstawie proponuję Radzie Wydziału Inżynieryjno –Ekonomicznego Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu dopuszczenie Autorki rozprawy do jej publicznej obrony.

Olsztyn 30.01.2018r.

