

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

Recenzja

**rozprawy doktorskiej pt. "Otrzymywanie kwasu cytrynowego z udziałem
Aspergillus niger metodą hodowli węgłnej na podłożach z glicerolem"
wykonanej przez mgr inż. Ewelinę Ewę Dymarską**

Poszukiwanie nowych możliwości wykorzystania drobnoustrojów w biosyntezie ważnych metabolitów należy do znaczących zadań biotechnologii przemysłowej. Istotne miejsce zajmuje w tym zakresie biosynteza kwasów organicznych. Jednym z nich jest kwas cytrynowy, stosowany w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym lub chemicznym. Aplikacyjna atrakcyjność jego właściwości funkcjonalnych powoduje, że jego produkcja w skali światowej systematycznie wzrasta.

Prowadzenie biosyntezy kwasu cytrynowego wymaga doboru określonego szczepu drobnoustrojów, a także ustalenia optymalnego składu podłoża i warunków procesu. Sprzyja temu między innymi postęp wiedzy z obszarów: mikrobiologii, biotechnologii, bioinżynierii oraz bioinformatyki.

Wśród drobnoustrojów predysponowanych do biosyntezy kwasu cytrynowego dominują grzyby strzępkowe, a spośród nich najczęściej stosowane są szczepy z gatunku *Aspergillus niger*. W produkcji kwasu cytrynowego ważne są koszty stosowanych składników podłoża. W celu ich obniżenia zwraca się uwagę na komponenty niekonwencjonalne. Ostatnio obiektem zainteresowań jest glicerol odpadowy powstający w dużych ilościach przy produkcji biodiesla. Zastosowanie glicerolu odpadowego jako składnika podłoża do biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger* wymaga prowadzenia badań dotyczących oceny jego przydatności biotechnologicznej, w tym głównie ustalenia jego

stężenia w podłożu oraz warunków prowadzenia procesu. Znalazło to potwierdzenie w treści ocenianej pracy dyplomowej.

Ocena pracy z uwzględnieniem wymagań formalnych

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Analizy Żywności Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Pietkiewicza. Opracowanie obejmuje 170 stron w tym 13 z wykazem 262 pozycji cytowanego piśmiennictwa. W treści rozprawy wydzielono 6 rozdziałów oraz oddzielnie wykaz stosowanych symboli, wstęp oraz spis 41 tabel i 43 rysunków, a także streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, które w mojej ocenie powinny być zamieszczone na początku pracy. Dyskusyjnym jest sposób podzielenia całości opracowania na część doświadczalną i teoretyczną.

Zaproponowany tytuł rozprawy nie w pełni odzwierciedla cel i zakres przeprowadzonych badań.

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

Ocena rozprawy z uwzględnieniem wymagań merytorycznych

W początkowym fragmencie pracy Doktorantka najpierw skrótowo we wstępie, a następnie bardzo szeroko na podstawie literatury uzasadniła problematykę badań oraz ich cel i zakres. Dokładnie opisała właściwości kwasu cytrynowego oraz kierunki jego zastosowania. W ocenianej części pracy na uwagę zasługuje opis czynników technologicznie istotnych w biosyntezie kwasu cytrynowego. Szczególną uwagę zwróciła na znaczenie doboru składu podłoża, w tym źródła węgla, a także metod hodowli drobnoustrojów z uwzględnieniem ich oddziaływania na wydajność procesu. Do interesujących zaliczam informacje o substratach stosowanych w biosyntezie kwasu cytrynowego (tabela 5) oraz podanie przykładów zastosowania w tym celu odpadów przemysłu rolno-spożywczego (tabela 6). W mojej ocenie kontrowersyjnym jest wskazanie torfu jako substratu w biosyntezie kwasu cytrynowego. Merytorycznie istotne są zamieszczone w tabelach 7 i 8 przykłady

wykorzystania glicerolu w mikrobiologicznej syntezie przemysłowo ważnych metabolitów, w tym kwasu cytrynowego w hodowli *Aspergillus niger*.

Przedstawione w ocenianej części rozprawy informacje literaturowe oceniam pozytywnie i stwierdzam, że Doktorantka dobrze opanowała wiedzę dotyczącą biotechnologicznych uwarunkowań efektywnej biosyntezy kwasu cytrynowego. Znalazło to potwierdzenie w sformułowanym celu oraz sześćoetapowego zakresu badań.

W opisie części doświadczalnej Autorka na 27 stronach przedstawiła charakterystykę stosowanych w pracy materiałów i metod badawczych. Dokładnie opisała komponenty podłoży stosowanych w biosyntezie kwasu cytrynowego ze szczególnym uwzględnieniem glicerolu bezwodnego i odpadowego. Ważne miejsce w ocenianym rozdziale zajmuje opis aparatury oraz procedur biotechnologicznych, w tym metod prowadzenia hodowli drobnoustrojów z przekonywującą ich ilustracją na rysunkach 4 i 5. Z opisu sposobu prowadzenia hodowli grzybów wynika, że jako środek odpieniający stosowano olej rzepakowy, który mógł stanowić konkurencyjne źródło węgla. Proszę o wyjaśnienie moich wątpliwości z tym związanych. Na wysoką ocenę zasługuje dobór metod analitycznych i obliczania wartości parametrów kinetycznych hodowli ważnych w bioinżynierijnej charakterystyce procesu biosyntezy. Podobnie należy ocenić wskazanie parametrów optymalizacji składu podłoża z udziałem glicerolu. Doktorantka w tym celu wybrała: maksymalizację końcowego stężenia produktu, szybkość biosyntezy kwasu cytrynowego oraz uzyskanie najwyższej wartości współczynnika efektywności jego biosyntezy. Opis stosowanej procedury optymalizacyjnej dobrze uzupełniają informacje na rysunkach 6 i 7 oraz w tabelach 17 i 20. Dopełnieniem zastosowanej procedury optymalizacyjnej jest przeprowadzenie analizy statystycznej i określenie wartości optymalnych zmiennych wejściowych oraz ich wzajemnych interakcji, a także zaproponowanie modelu matematycznego w postaci funkcji opisującej zależności końcowych wartości zmiennych wyjściowych od parametrów metody.

Po zapoznaniu się z treścią rozdziału 3 stwierdzam, że Doktorantka dobrze zaplanowała i przeprowadziła eksperymenty i prawidłowo dobrała metody analityczne. W ocenianym rozdziale zauważyłem kilka niefortunnych sformułowań oraz niejasności. Do nich zaliczam: różnice w opisie jednostki parametru „szybkość dopływu powietrza” w tabeli 14 i w p.3.9.3., a także mało precyzyjne sformułowanie podpisu pod rysunkiem 3, na którym przedstawiono schemat bioreaktora, a nie bioreaktor. Dyskusyjnym jest użycie pojęcia „struktura biosyntezy kwasu cytrynowego” w podpisie rysunków 6 i 7.

W rozdziale 4 na 50 stronach Doktorantka przedstawiła wyniki badań. Ich omówienie jest bardzo szerokie i dotyczy wszystkich elementów przeprowadzonych eksperymentów. W pierwszej kolejności poinformowała o wynikach dotyczących wyboru szczepu *Aspergillus niger* PD-66, który spośród 19 tu testowanych najlepiej spełniał kryteria selekcji. Dalsze fragmenty ocenianego rozdziału dotyczą opisu wyników pracochłonnej i merytorycznie wartościowej wielokryterialnej optymalizacji składu podłoża z glicerolem bezwodnym, a następnie z glicerolem odpadowym. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA z wykorzystaniem testu Fishera wykazała statystycznie istotny wpływ badanych czynników z tym, że zakres zmian był różny. Wartościowym dopełnieniem procedury optymalizacyjnej jest zastosowanie równania regresji pozwalające na obliczenie współczynnika efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego. Wyniki przeprowadzonej optymalizacji umożliwiły na dokładne ustalenie składu podłoża hodowlanego z glicerolem bezwodnym, a także z glicerolem odpadowym. Między innymi dlatego można je zaliczyć do aplikacyjnie wartościowych.

W opisie wyników dotyczących optymalizacji składu podłoża hodowlanego na uwagę zasługuje zaprezentowanie ich w tabelach oraz na rysunkach. Graficzna prezentacja wyników ułatwia moim zdaniem ich interpretację, a także porównanie oddziaływań analizowanych zmiennych.

W kolejnym fragmencie rozdziału 4-go Doktorantka przedstawiła wyniki badań, w których prowadzono hodowle wstępne *Aspergillus niger* na podłożu o ustalonym wcześniej składzie i oceniano wpływ początkowego stężenia glicerolu na szybkość i efektywność biosyntezy kwasu cytrynowego. Uzyskane wyniki potwierdziły, że najkorzystniejsze wartości parametrów kinetycznych opisujących proces biosyntezy kwasu cytrynowego zapewnia prowadzenie hodowli *A. niger* na podłożu o zoptymalizowanym składzie. W ten sposób Autorka rozprawy udowodniła, że w mikrobiologicznej syntezie metabolitów niezbędne jest ustalenie składu podłoża z zastosowaniem współcześnie dostępnych procedur i metod analitycznych.

Do interesujących zaliczam wyniki uzyskane w kolejnym etapie badań, w których oceniano wpływ dodatku sacharozy do podłoża hodowlanego na szybkość i efektywność biosyntezy kwasu cytrynowego w okresowych hodowlach wstępnych. W ocenianych badaniach Doktorantka potwierdziła, że 10% dodatek sacharozy do podłoża z udziałem

glicerolu odpadowego sprzyja intensyfikacji procesu i pozwala zwiększyć wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego.

Mniej satysfakcjonujące, aczkolwiek ważne ze względów poznawczych i aplikacyjnych, są moim zdaniem wyniki badań dotyczących oceny wpływu początkowego stężenia glicerolu oraz momentu zasilania podłoża glicerolem na szybkość i efektywność biosyntezy kwasu cytrynowego w hodowlach zasilanych.

Przedmiotem treści kolejnego rozdziału jest dyskusja wyników badań własnych z wynikami innych autorów co umożliwiło Doktorantce wskazanie ich wartości poznawczej i praktycznej. W ocenianym rozdziale do interesujących zaliczam interpretację znaczenia optymalizacji składu podłoża w procesach mikrobiologicznych. Wysoko oceniam interpretację mechanizmu oddziaływania dodatku sacharozy na efekty biosyntezy kwasu cytrynowego na podłożu z glicerolem z uwzględnieniem wiedzy o katabolizmie alternatywnego źródła węgla.

W przeprowadzonej dyskusji wyników Doktorantka wskazała na potrzebę kontynuacji badań z uwzględnieniem pogłębienia wiedzy o szlakach metabolicznych ważnych w biokonwersji glicerolu przez *Aspergillus niger*. Potwierdziła w ten sposób swoją dojrzałość naukową.

W treści rozdziałów 4 i 5 zauważyłem drobne usterki stylistyczne, które zaznaczyłem w ocenianym egzemplarzu pracy oraz niefortunnie dobrane sformułowania np. tytuły tabel 23, 25, 27, 30, 32, 34, które ilustrują wyniki analizy wariancji, a nie analizę. Zauważyłem także brak konsekwencji w nazwie glicerol/gliceryna (str. 83).

W końcowej części pracy Autorka sformułowała 10 wniosków, których treść dobrze informuje o założeniach i zakresie przeprowadzonych badań, a także o wartości merytorycznej uzyskanych wyników.

Podsumowanie. Wniosek końcowy

Ocenianą rozprawę doktorską zaliczam do interesujących i wartościowych opracowań naukowych w obszarze nauk o żywności. Przedstawiono w nim przekonywująco uzasadnione hipotezy badawcze. Dobrze zaplanowano i przeprowadzono szeroki zakres badań. Zastosowano prawidłowo dobrane metody analityczne, procedury optymalizacyjne

i biotechnologiczne. Otrzymane wyniki potwierdzają słuszność założeń badawczych. Większość z nich ma wartość aplikacyjną w biotechnologii przemysłowej.

Rozprawę napisano poprawnym językiem i dość przystępnie. Występują w niej nieliczne usterki stylistyczne oraz niefortunnie dobrane sformułowania.

Stwierdzam, że praca pt. "Otrzymywanie kwasu cytrynowego z udziałem *Aspergillus niger* metodą hodowli wgłębnej na podłożach z glicerolem" przygotowana przez mgr inż. Ewelinę Ewę Dymarską spełnia warunki określone w art.13 Ustawy Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 14 marca 2002r. (Dz.U. nr 595 z późniejszymi zmianami) stawiane rozprawom dysertacyjnym na stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

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

Biorąc pod uwagę interesującą problematykę badań, ich szeroki zakres oraz pracowitość, a także wartość merytoryczną i aplikacyjną uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie Autorki pracy odpowiednią nagrodą.

Olsztyn 17.09.2017r.

