

prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska,
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Bodakowskiej- Boczniewicz
pt. „**Badania nad otrzymywaniem i unieruchamianiem naringinazy z *Aspergillus niger***”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Zbigniewa Garncarka, prof. UE
na Wydziale Inżynieryjno-Ekonomicznym, Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu

I. Dobór i znaczenie tematu

Obecnie wiele uwagi poświęca się realizacji procesów technologicznych w sposób efektywny oraz przyjazny dla środowiska. Trwają, zakrojone na szeroką skalę, poszukiwania stabilnych i wydajnych katalizatorów, które poprzez przyspieszanie reakcji chemicznych umożliwiają obniżenie kosztów ich prowadzenia. Szczególną uwagę zwracają enzymy, naturalne biokatalizatory procesów zachodzących w organizmach żywych, pozwalające na wielokrotne zwiększenie szybkości przemiany. Białka te odznaczają się wysoką specyficznością oraz selektywnością i tym samym znajdują coraz szersze zastosowanie w wielu różnych dziedzinach życia codziennego, nauki oraz przemysłu.

Preparaty enzymatyczne stanowią nieodłączną część nowoczesnego przetwórstwa żywności. Ułatwiają one otrzymanie pożądaných zmian surowca, poprawę jakości produktu gotowego oraz zmniejszenie kosztów produkcji. Na skalę przemysłową otrzymuje się enzymy, wykorzystując do tego celu mikroorganizmy. Preparaty enzymatyczne pochodzenia mikrobiologicznego są lepszymi biokatalizatorami dla różnych zastosowań przemysłowych niż ich odpowiedniki pozyskane z tkanek roślinnych lub zwierzęcych. Procesy biosyntezy enzymów rozwijają się dynamicznie głównie dzięki możliwości wykorzystania inżynierii genetycznej do modyfikacji organizmów oraz nowych rozwiązań konstrukcyjnych bioreaktorów. Głównym ograniczeniem stosowania biokatalizatorów jest znaczące obniżenie ich aktywności katalitycznej oraz niska stabilność poza warunkami naturalnego występowania. Trudności te powodują, że opracowanie metod poprawiających ich właściwości jest wysoce pożądane. Jedną z takich technik, obecnie najpowszechniej stosowaną, jest immobilizacja. Jej zadanie polega na zwiększeniu stabilności oraz

wydłużeniu aktywności unieruchomionego enzymu. Następstwem przyłączenia enzymu do nierozpuszczalnego nośnika na drodze immobilizacji jest powstanie zupełnie nowego preparatu charakteryzującego się odmiennymi właściwościami, w porównaniu z natywnym białkiem.

Badania prowadzone przez Doktorantkę doskonale wpisują się w ten obszar badawczy. W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Joanna Bodakowska-Boczniewicz prowadziła badania nad otrzymywaniem i unieruchomieniem naringinazy z *Asprgillus niger* na magnetycznych, polisacharydowych nośnikach. Naringinaza może być wykorzystana przede wszystkim w przetwórstwie owoców cytrusowych do zmniejszenia ich gorzkiego smaku czy do wzmacniania aromatu win i soków owocowych. W warunkach praktycznych preparat handlowy nie jest dostępny stąd opracowanie technologii biosyntezy i immobilizacji stabilnego enzymu naringinazy o wysokiej aktywności jest niezwykle cennym osiągnięciem naukowym istotnym dla rozwoju technologii żywności i żywienia.

II. Ocena formalna pracy.

Praca obejmuje 160 stron maszynopisu w tym 20 rysunków oraz 28 tabel. Struktura pracy jest typowa dla rozpraw naukowych i obejmuje następujące części: spis treści, wstęp, część teoretyczną, hipotezę badawczą, cel pracy, materiały i metody badań, wyniki badań i ich omówienie, dyskusja i wnioski, literaturę, spis tabel oraz rysunków. Na końcu pracy znajduje się streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozprawa została przygotowana z należytą starannością i wskazuje na dobrą orientację Doktorantki w obszarze poruszanych zagadnień. Autorka wykorzystała 231 pozycji literatury. Spośród literatury naukowej 95,3% (220) stanowią pozycje anglojęzyczne, 4,7% (11) polskojęzyczne. Literatura naukowa z ostatnich 5 lat stanowi 27% (62). Mając na uwadze dużą ilość prac naukowych z podjętego zakresu badawczego, należy stwierdzić że, dobór bibliografii jest odpowiedni i obejmuje najważniejsze pozycje literatury z ostatnich lat. Z obowiązku Recenzenta muszę jednak wspomnieć, w spisie literatury pozycje 14, 120, 144, 149, 183, 191, 216 wymagają korekty edytorskiej.

III. Ocena merytoryczna pracy

Tytuł pracy koresponduje z jej treścią. Przegląd literatury jest ściśle związany z tematyką badań. Doktorantka przedstawiła w nim szczegółową charakterystykę i budowę naringinazy. Omówiła najważniejsze źródła jej występowania oraz warunki biosyntezy. Scharakteryzowała drobnoustroje produkujące ten enzym oraz kluczowy skład podłoża.

Ponadto Autorka dokładnie opisała metody immobilizacji oraz wpływ tego procesu na optymalne parametry aktywności naringinazy. Przegląd literatury jest bardzo ciekawy i wieloaspektowy. Autorka zebrała w nim ważne merytorycznie informacje, udokumentowane pozycjami literatury, co wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki w zakresie realizowanego tematu. Stanowi też dobre wprowadzenie do kolejnych rozdziałów pracy, jest spójny i dobrze przemyślany. Treść tego rozdziału jest przygotowana z należytą starannością edytorską. Poziom merytoryczny tego rozdziału oceniam bardzo wysoko, jest przygotowany w oparciu o bardzo bogaty materiał bibliograficzny, w sposób przemyślany i bardzo dojrzały.

W oparciu o dokonany przegląd piśmiennictwa Autorka sformułowała cel badań, którym była immobilizacja naringinazy z hodowli wstrząsanej *Aspergillus niger* KMS, na magnetycznym, polisacharydowym nośniku. Realizacja celu głównego wymagała wykonania szczegółowych badań, których zakres był bardzo szeroki, pomimo tego został precyzyjnie i czytelnie przedstawiony przez Doktorantkę. Uzupełnieniem celu było sześć tez badawczych. Cel i tezy badawcze zostały sformułowane poprawnie.

W kolejnym rozdziale „Materiały i metody badań” Autorka przedstawiła materiał biologiczny, opisała podłoża hodowlane, przebieg prowadzonych prac eksperymentalnych oraz zastosowane metody analityczne. Jako materiał biologiczny wybrała szczep *Aspergillus niger* KSM pochodzący z kolekcji drobnoustrojów Katedry Biotechnologii i Analizy Żywności Instytutu Chemii i Technologii Żywności UE we Wrocławiu. Proszę Doktorantkę o uzasadnienie wyboru tego szczepu do badań spośród innych wymienionych na str. 44 szczepów z kolekcji.

Na podkreślenie zasługuje bardzo szeroki zakres realizowanych zadań badawczych. Obejmował on:

- Biosyntezę naringinazy w hodowli *Aspergillus Niger*, w tym: dobór źródła węgla, azotu i składników stymulujących biosyntezę naringinazy, dobór temperatury oraz optymalizację składu podłoża do biosyntezy tego enzymu z wykorzystaniem metody czynnikowo-gradientowej Boxa i Wilsona.
- Immobilizację naringinazy, w tym: otrzymanie nośnika poprzez pokrycie magnetytu polisacharydem, jego aktywację, adsorpcję naringinazy na nośniku, optymalizację immobilizacji (pH, temperatura, stężenie białka, czas), stabilizację wiązania enzymu z nośnikiem za pomocą aldehydu dekstranowego.

- Charakterystykę unieruchomionej i stabilizowanej naringinazy, w tym: wpływ pH i temperatury na aktywność i stabilność enzymów, określenie parametrów kinetycznych, energii aktywacji, określenie stabilności operacyjnej.
- Zastosowanie uzyskanego stabilizowanego preparatu do hydrolizy naringiny zawartej w świeżym i modelowym soku grejpfrutowym.

Oceniając tę część pracy podkreślam po raz kolejny szeroki zakres wykonanych badań oraz wykorzystanie nowoczesnych narzędzi analitycznych. Układ doświadczenia jest bardzo dobrze zaplanowany, właściwie przemyślany i opisany. Doktorantka prawidłowo dobrała metody analityczne. Przyjęte metody i analizy badawcze zostały przedstawione i opisane precyzyjnie.

Jedynie, celem uzupełnienia proszę o informacje jaki był czas suszenia cząstek owoców grejpfruta czerwonego (str.45). Czy w uzyskanych suszach sprawdzano zawartość suchej masy?. Czy w warunkach laboratoryjnych przygotowano również preparaty z grejpfruta białego, pomarańczy czy pameło opisywanych w p.3.1.2.3 (str.45). Jak prowadzono proces filtracji preparatu naringinazy (str. 52, p.3.5).

Przedstawione powyżej uwagi mają charakter uzupełniający bądź redakcyjny i nie mają zasadniczego wpływu na bardzo dobrze zaplanowane doświadczenia i prawidłowo dobrane metody analityczne.

Rezultaty przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła w kolejnym rozdziale „Wyniki badań i ich omówienie” w postaci 19 tabel i 24 rysunków prezentując obszerny materiał badawczy w formie uporządkowanej, przejrzystej i zrozumiałej dla czytelnika. Dokumentacja jest przygotowana z należytą starannością i bardzo dobrze uzupełniają treść pracy doktorskiej. Drobne uwagi dotyczą braku opisu osi na rys. 11 i 28, zaś w tabelach 27 i 28 podano temperaturę w innych jednostkach niż w pozostałej części pracy.

W efekcie realizacji pierwszego etapu badań Doktorantka dobrała skład podłoża do biosyntezy naringinazy z *Aspergillus niger* KMS. Na podstawie przeprowadzonych testów jako źródło węgla wybrała ramnozę, źródło azotu: ekstrakt drożdżowy i azotan (V) sodu. Induktorem procesu biosyntezy była naringinina oraz sproszkowane albedo, flawedo i błony segmentowe grejpfruta czerwonego. Zastosowanie tych produktów ubocznych było ciekawym i nowatorskim pomysłem. Na podkreślenie zasługuje również wykorzystanie nowoczesnych narzędzi matematycznych, dzięki którym Autorka dokonała optymalizacji składu podłoża hodowlanego. W efekcie uzyskała preparat enzymatyczny naringinazy o wysokiej aktywności. Ważną częścią pracy było opracowanie procesu immobilizacji enzymu. Spośród wielu przetestowanych nośników najlepszym okazała się guma karobowa aktywowana

polietylenoiminą. Co ważne adsorpcja enzymu na tym nośniku była odwracalna. Sukcesem Doktorantki było zwiększenie siły wiązania unieruchomionej na nośniku naringinazy poprzez dodatkowe pokrycie aldehydem dekstranowym, co wpłynęło także na lepszą stabilność termiczną enzymu. W efekcie szeroko zakrojonych badań Doktorantka uzyskała stabilny enzym naringinazy o najwyższej aktywności w niskim pH 3,5 i temperaturze 65°C, odporny na kwaśne środowisko i wysokie temperatury. Na podkreślenie zasługuje bogaty materiał dotyczący charakterystyki wolnej, unieruchomionej i stabilizowanej naringinazy i jej podjednostek α -L-ramnnozydazy i β -D-glukozydazy. Określenie wpływu m.in.: pH i temperatury na aktywność i stabilność enzymów, określenie parametrów kinetycznych, energii aktywacji, określenie stabilności operacyjnej.

Zwieńczeniem badań była ocena możliwości praktycznego zastosowania otrzymanego preparatu naringinazy. Autorka zweryfikowała jego efektywność prowadząc hydrolizę naringininy zawartej w świeżym i modelowym soku z grejpfruta.

Podsumowując, przedkładana dysertacja doktorska dostarcza wielu informacji na temat biosyntezy i immobilizacji enzymu naringinazy z *Asprgillus niger* na magnetycznych, polisacharydowych nośnikach. Istotne znaczenie w tej pracy mają badania związane z doбором rodzaju nośnika oraz wpływu warunków procesu na stabilność i aktywność katalityczną unieruchomionych enzymów, a także analizy mające na celu wskazanie potencjalnych kierunków zastosowań otrzymanej naringinazy.

Uzyskane wyniki niewątpliwie stanowią dużą wartość pracy. Zakres prowadzonych badań był szeroki, a jego wykonanie pracochłonne. Pomimo tak szerokiego zakresu badań Doktorantka przedstawiła analizę wyników w sposób bardzo czytelny i uporządkowany. Poszczególne części pracy kończą się krótkimi podsumowaniami z których wynika wybór wariantu do dalszych etapów pracy, czyni to pracę bardzo czytelną i łatwą w odbiorze pomimo szerokiego zakresu badań. Doktorantka bardzo dobrze posługuje się odnośnikami dzięki czemu łatwo można poruszać się po pracy i śledzić jej etapy.

Na podkreślenie zasługuje bardzo obszerna dyskusja wyników. Autorka umiejętnie dobrała literaturę i poprawnie dokonała interpretacji własnych wyników badań zestawiając je z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Świadczy to o umiejętności analizy i interpretacji własnych wyników badań w świetle osiągnięć przedstawionych w literaturze przedmiotu oraz dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz otrzymanych wyników Autorka sformułowała 12 wniosków. Świadczą one o realizacji wyznaczonego celu badań. W badaniach Doktorantka nie oceniała składu proszku z grejpfruta czerwonego więc nie

powinna umieszczać we wnioskach pierwszego punktu. We wniosku 4 należy podać pełną nazwę szczepu *Aspergillus niger* KMS.

Oceniana praca doktorska jest niewątpliwie oryginalnym dziełem naukowym, w którym Doktorantka wykazała dobre przygotowanie teoretyczne, samodzielność w prowadzeniu badań naukowych, umiejętność posługiwania się nowoczesnymi metodami analitycznymi. Określony w pracy cel badawczy został zrealizowany. Na podkreślenie zasługuje po raz kolejny szeroki zakres badań i bardzo wysoki poziom merytoryczny całej pracy oraz jej potencjał aplikacyjny. Zawarte w recenzji uwagi mają charakter głównie redakcyjny i dyskusyjny, nie mają wpływu na ocenę końcową przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę całokształt pracy doktorskiej, jej wysoką wartość merytoryczną składam do Rady Wydziału Inżynieryjno-Ekonomicznego, Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Bodakowskiej-Boczniewicz.

Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Bodakowskiej - Boczniewicz spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom na stopień doktora. Rozszerza wiedzę na temat biosyntezy i unieruchamiania naringinazy z *Aspergillus niger*. Uzyskany przez Doktorantkę preparat enzymatyczny wykazuje wysoki potencjał aplikacyjny. Recenzowana praca wykazuje elementy nowości naukowej, świadczy o dobrym opanowaniu przez Autorkę zasad i metod pracy naukowej. Charakteryzuje się oryginalnością naukową i jednocześnie łączy aspekty naukowe z praktycznymi. Sposób realizacji pracy wskazuje, że Doktorantka jest bardzo dobrze przygotowana do prowadzenia badań naukowych. Oceniana rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim przez aktualną ustawę o stopniach i tytule naukowym. Na tej podstawie wnioskuję do Rady Wydziału Inżynieryjno-Ekonomicznego, Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Joanny Bodakowskiej-Boczniewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, dnia 27.08.2019 r.

Joanna Kawa-Rygielska