

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

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Joanny Bodakowskiej-Boczniewicz
pt. „Badania nad otrzymywaniem i unieruchamianiem naringinazy z *Aspergillus niger*”**

Procesy produkcji enzymów są jednym z ważniejszych i bardzo ciekawych technologicznie biosyntez z użyciem grzybów strzępkowych, cechującymi się możliwością wytworzenia preparatów o zróżnicowanych cechach w sposób na tyle tani, aby mogły znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym, który rzadko sięga po kosztowne preparaty enzymatyczne. Mimo bogatej historii badań naukowych nad produkcją naringinazy sięgającej połowy lat 50-tych ubiegłego wieku, zastosowanie jej w przemyśle jest ograniczone i w Europie taki preparat komercyjny nie jest dostępny. Postęp naukowy i technologiczny daje nam do ręki nowe możliwości kształtowania zawartości, w produktach uzyskanych w hodowli drobnoustrojów, składników o wysokiej i cennej aktywności biologicznej. Wymaga to jednak dalszego postępu w badaniach. Pracownicy Instytutu Chemii i Technologii Żywności Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu od lat odnoszą sukcesy zarówno naukowe jak i komercjalizacyjne w dziedzinie użycia grzybów strzępkowych do otrzymywania cennych produktów, szczególnie tych o ważnych zastosowaniach również w przemyśle spożywczym (np. kwasów organicznych).

Jest więc wielce zrozumiałe i bardzo cenne, że w ten ważny naukowo i komercyjnie kierunek badań, wpisuje się praca doktorska pani mgr inż. Joanny Bodakowskiej-Boczniewicz pt. „Badania nad otrzymywaniem i unieruchamianiem naringinazy z *Aspergillus niger*” przygotowana pod kierunkiem profesora Zbigniewa Garncarka. Celem pracy było otrzymanie aktywnego enzymu naringinazy w procesie biosyntezy wybranego, z kolekcji własnej Instytutu, szczepu grzybów strzępkowych *Aspergillus niger* w warunkach hodowli laboratoryjnej i jej unieruchomienie na nośniku, który zapewniłby perspektywy zastosowań w przemyśle owocowo-warzywnym. Kierunki wykorzystania naringinazy są wielorakie, jednak sprawdzenie działania uzyskanego preparatu w postaci enzymu unieruchomionego na magnetycznym, polisacharydowym nośniku, z użyciem soku grejpfruta, wyraźnie na zastosowanie w technologii żywności wskazuje.

W ramach niniejszej pracy dokonano bardzo pracochłonnego i wymagającego zastosowania metod hodowli wspomaganych metodą matematycznego planowania doświadczeń opracowania. Taki sposób prowadzenia badań jest coraz częściej stosowany, szczególnie do optymalizacji procesów biosyntezy z udziałem drobnoustrojów. Dzięki takiemu postępowaniu udało się doktorantce zrealizować bardzo wiele postawionych sobie zadań, które obejmowały:

- a) określenie wpływu źródła węgla, azotu oraz induktora naringinazy w procesie biosyntezy,
- b) ocenę wpływu temperatury hodowli na końcową aktywność enzymu,
- c) otrzymanie preparatu i optymalizacja składu podłoża hodowlanego,
- d) wyprodukowanie magnetycznych nośników polisacharydowych i adsorpcja na nich naringinazy,
- e) próby zwiększenia stabilności wiązania enzymu z nośnikiem za pomocą aldehydu dekstranowego,
- f) określenie optymalnej temperatury, pH i stabilności formy wolnej i związanej enzymu w zależności od pH i temperatury,
- g) określenie parametrów kinetycznych: maksymalnej szybkości reakcji oraz stałej Michaelisa–Menten wolnej, unieruchomionej i stabilizowanej naringinazy oraz podjednostek: α -L-ramnozydazy i β -D-glukozydazy, energii aktywacji i okresu półtrwania, a także energii aktywacji procesu dezaktywacji wszystkich form enzymu,
- h) wybór temperatury ciągłego procesu hydrolizy naringiny przez stabilizowaną naringinazę w oparciu o potencjalną produktywność enzymu z uwzględnieniem wymagań technologicznych pracy z sokami,
- i) badanie stabilności operacyjnej takiej formy preparatu,
- j) i jako podsumowanie – zastosowanie stabilizowanej naringinazy do hydrolizy naringiny w świeżym i modelowym soku grejpfrutowym.

Tak szeroko zaplanowane i przeprowadzone badania, nie tylko przyniosły wiele informacji o enzymie i zmianach parametrów w czasie unieruchamiania, ale pozwoliły uzyskać stabilny preparat o przesuniętej z 60 do 65⁰C optymalnej temperaturze działania oraz zwiększonej stabilności przy zmianach pH. Wybrany nośnik cechował się łatwą możliwością usunięcia ze środowiska reakcyjnego. Uzyskano więc, w tak precyzyjnie zaplanowanych badaniach sukces, który stworzył z jednej strony pole do dalszych badań

w skali wielkolaboratoryjnej, a w dalszej perspektywie możliwość zastosowań komercyjnych.

Ocena formalnej strony pracy

Praca doktorska pani mgr inż. Joanny Bodakowskiej-Boczniewicz liczy 160 stron, z czego na wstęp i przegląd literatury przypada 33 strony, cel pracy i część metodyczna obejmuje 23 strony, część nazwana „Wyniki badań i ich omówienie” liczy 43 strony, a oddzielnie w rozdziale „Dyskusja” autorka przeprowadziła rozbudowaną (25 stron) dyskusję swoich wyników z rezultatami innych badaczy. Wyniki przedstawiono w 19 tabelach i na 24 rysunkach. Zazwyczaj autorzy prac doktorskich jednocześnie omawiają wyniki i je dyskutują, ale wydaje mi się, że w przypadku tak rozbudowanej i wielowątkowej pracy zabieg rozdzielenia tych rozdziałów dobrze wpłynął na komunikatywność tekstu i ułatwił czytelnikowi podążanie za dyskusją wyników poszczególnych etapów pracy, zresztą bardzo szczegółowo porównywanymi z wynikami przedstawionymi w publikacjach. Autorka bardzo starannie dobrała 231 pozycji literaturowych, choć nie ustrzegła się drobnych błędów, które z obowiązku skrupulatnego recenzenta przytaczam (poz.14 Przemysł Chemiczny, poz.120 Journal of Food Science, poz.131 Bioresource Technology, poz.167 jaka National Academy..., poz.191 Biotechnology Letters). Na końcu pracy umieszczono również przydatny wykaz tabeli i rysunków, oraz streszczenia napisane w języku polskim i angielskim. Układ pracy jest logiczny i przejrzysty, odpowiedni dla prac o charakterze empirycznym.

Zaletą pracy jest bardzo dobrze i ciekawie napisana część literaturowa, w której autorka zawarła wszystkie przydatne dla prowadzenia pracy informacje, bardzo szczegółowo cytując wyniki poszczególnych badaczy, którzy zajmowali się zbliżonymi do zaplanowanych w pracy zagadnieniami. Mam wrażenie, że materiał ten składa się na doskonałą pracę przeglądową i proszę o przemyślenie czy nie warto napisać takiej pracy przeglądowej do czasopisma z wysokim IF.

Część literaturowa bez wątpliwości wskazuje na dobrą znajomość przez doktorantkę literatury i umiejętność korzystania z tych informacji w trakcie dyskusji wyników własnych badań. Część metodyczna pracy jest zwarta i informatywna. Chciałem zapytać na jakiej podstawie autorka wybrała temperaturę 50⁰C dla oceny aktywności naringinazy (p.3.2.2) i czy uważa, że to była słuszna decyzja. Zwracam też uwagę, że używany w pracy chromatograf HPLC to Perkin Elmer (str. 49). Moim zdaniem, szkoda też, że nie podani zostali producenci i miejsca produkcji wielu stosowanych urządzeń. Na tej samej stronie (49) nie scharakteryzowano też

wystarczająco stosowanej albuminy wołowej. Recenzent nie ma większych zastrzeżeń do tej części, chociaż bardzo uważnie trzeba śledzić jakie temperatury hodowli i inkubacji otrzymanego enzymu stosowano w poszczególnych etapach pracy. Niezrozumiałe jest ostateczne zdanie tej części pracy na str. 62.

W ocenie formalnej części pracy muszę zwrócić uwagę na to, że w części opisującej wyniki nie została opisana rzędna i odcięta prezentowanych chromatogramów, nie jestem też przekonany o właściwym doborze planu eksperymentu (tabela 11, najlepsze wyniki dla wariantu 32). Dość zaskakująco w tabelach 26 i 27 zastosowano stopnie Kelvina, podczas gdy w całej pracy posługiwano się stopniami Celsjusza (proszę to wyjaśnić). Na ostatnim rysunku (nr 30) chochlik edytorski pojawił się w opisie rzędnej. Są to drobne uwagi, które nie wpływają na generalnie wysoką ocenę jakości tej części pracy.

Jak już wyżej wspominałem przeprowadzona w oddzielnym rozdziale dyskusja jest dzięki temu łatwa w zrozumieniu i interpretacji, a zarazem bardzo obfita w informacje i szczegółowa. Autorka w sposób bardzo uczciwy nie pomija badań, które w niektórych elementach (ale nielicznych), prezentują lepsze wyniki niż jej własne doświadczenia. Kilka drobnych niezręczności językowych nie wpływa na bardzo pozytywny odbiór tej części.

Do wniosków chciałbym się odnieść w części następnej poświęconej ocenie merytorycznej pracy.

Ocena merytoryczna pracy

Jak już napisałem, część literaturowa jest bardzo mocną stroną pracy. Przegląd literatury daje odczucie bardzo dobrej znajomości literatury dotyczącej zagadnień poruszanych w pracy i stanowi dobrą podstawę do sformułowania celów i następnie do bardzo dogłębnej dyskusji wyników pracy.

Metody dobrano właściwie, a sposób realizacji zadań optymalizacyjnych jest zakrojony szeroko. Liczba stosowanych współczynników opisujących uzyskane formy enzymu więcej niż wystarczająca. Wiele z zastosowanych metod analitycznych to metody nowoczesne.

Zastosowano również nowoczesne narzędzia matematyczne dla procesów optymalizacyjnych i dobrze je wykorzystano.

W rozdziale „Wyniki badań i ich omówienie” autorka w sposób jasny i logiczny omawia wyniki badań, a przygotowane tabele i rysunki dają przekonującą podstawę do ich przyjęcia. Rozdział ten jest bardzo dobrze przygotowanym rozdziałem i mimo dość rozbudowanego planu badań nie daje się zagubić recenzentowi w trakcie śledzenia wyników poszczególnych etapów postępowania.

Mimo, że autorka z dużą skromnością ustosunkowuje się do sukcesów uzyskanych w realizacji swojej pracy to należy podkreślić parę elementów nowości naukowej, takich jak zastosowanie albedo owoców cytrusowych jako składnika podłoża hodowlanego w produkcji naringinazy z użyciem *Aspergillus niger*, przeprowadzenie optymalizacji procesu unieruchomienia naringinazy na aktywnych polisacharydowych nośnikach, ocena aktywności podjednostek naringinazy w zależności od pH środowiska, czy wpływu inkubacji w roztworach o zróżnicowanym pH, na aktywność immobilizowanej naringinazy. W ramach niniejszej pracy wykazano też, że podjednostki naringinazy: α -L-ramnozydaza i β -D-glukozydaza wykazywały maksymalną aktywność w tej samej temperaturze (60°C), a w wyniku unieruchomienia wartość ta dla obu enzymów podniosła się do 65°C. W kontekście ewentualnych zastosowań przemysłowych sukcesem była stabilizacja aldehydem dekstranowym preparatu naringinazy, powodująca lepszą stabilność termiczną niż wykazywały inne formy. Bardzo ważna z punktu widzenia naukowego i dalszych prac w większej skali, jest przeprowadzona pełna charakterystyka enzymu i obliczenie parametrów kinetycznych enzymu, jego preparatów i podjednostek. Nową informacją jest wykazanie wyższej wartości maksymalnej szybkości dla α -L-ramnozydazy niż β -D-glukozydazy co wskazuje, że β -D-glukozydaza jest głównym czynnikiem hamującym szybkość hydrolizy naringiny przez naringinazę.

Niezaprzeczalnym sukcesem pracy jest to, że unieruchomiona przez doktorantkę naringinaza wykazuje lepszą stabilność w niskim pH i niskich temperaturach niż inne formy preparatu, co jest wielce korzystne z punktu widzenia jej zastosowania w procesach technologicznych usuwania gorzkiego smaku soku grejpfrutowego (niskie pH, konieczność ochrony termolabilnych związków bioaktywnych).

W pracy sformułowano 12 wniosków, z których moim zdaniem wniosek nr 1 nie znajduje bezpośredniego potwierdzenia w badaniach tej pracy (substancje stymulujące). Nie jest precyzyjne sformułowanie we wniosku nr 7, że usieciowane unieruchomionej naringinazy podnosi jej stabilność w zależności od pH i temperatury środowiska. Proszę o ustosunkowanie się do mojej uwagi. Wniosek nr 10 jest raczej stwierdzeniem niż udowodnionym wnioskiem.

Podsumowując, recenzowana praca ma charakter bardzo kompleksowej pracy wykonanej w skali laboratoryjnej. Daje nie tylko zaawansowany technicznie preparat o dużej stabilności i możliwości szybkiego i łatwego usunięcia ze środowiska reakcyjnego, ale przynosi wiele nowych danych o charakterze badań podstawowych.

Precyzyjnie nakreślony plan został w pełni i z sukcesem zrealizowany, a otrzymany preparat ma duże perspektywy aplikacyjne. Dlatego po przemyśleniu zalet i wad (głównie drobne

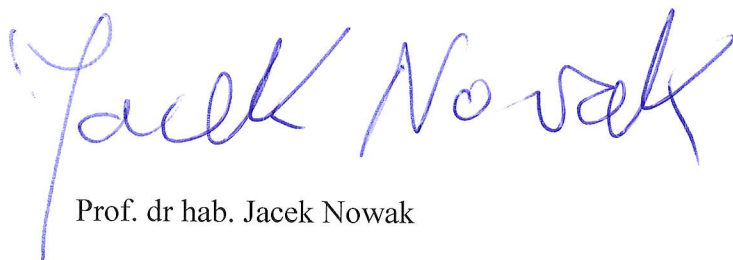
niedociągnięcia edycyjne) zdecydowałem zwrócić się do Rady Wydziału Inżynieryjno-Ekonomicznego z wnioskiem o wyróżnienie niniejszej pracy.

Wniosek końcowy

W mojej opinii przedstawiona do recenzji praca prezentuje bardzo dobry poziom naukowy. Charakteryzuje się właściwie zaplanowanym i przeprowadzonym postępowaniem naukowym, które znajduje finał w uzyskaniu preparatu o bardzo wysokich możliwościach zastosowań przemysłowych. W pracy zamieszczono bogaty i dobrze przedstawiony materiał faktograficzny. Wyniki badań noszą znamiona oryginalności i nowości naukowej. Odnosi się to szczególnie do przeprowadzonych prac optymalizacyjnych i badań nad wpływem cech środowiska reakcyjnego na aktywność i stabilność różnych form naringinazy. O możliwościach komercjalizacyjnych końcowej formy preparatu jednoznacznie przekonują końcowe badania nad zastosowaniem dla modyfikacji soku grejpfrutowego i jego cechy praktyczne.

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

Poznań, 29.07.2019



Prof. dr hab. Jacek Nowak