

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

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Anny Marii Kot  
pt. „Biosynteza tłuszczu oraz karotenoidów przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* w  
podłożach z ziemniaczaną wodą sokową”**

Obecnie wielkie nadzieje wiąże się z zastosowaniem drobnoustrojów, dotychczas stosowanych głównie do produkcji żywności i komponentów używanych do żywności, również w procesach biokonwersji surowców ubocznych i odpadowych.

W procesie produkcji biodiesla odpadem poprodukcyjnym jest glicerol, który przy opracowaniu odpowiednich biotechnologicznych metod jego konwersji może być źródłem cennych produktów, obniżając koszty produkcji biodiesla. Jednocześnie podczas przetwarzania biotechnologicznego minimalizuje się zagrożenie ekologiczne – ściekowe. Jednocześnie do produkcji biomasy z glicerolu niezbędne jest dostarczanie do biosyntezy biomasy mikrobiologicznej źródła przyswajalnego azotu. W recenzowanej pracy przedstawiono bardzo ciekawy i pomysł, polegający na zastosowaniu obu przemysłowych produktów ubocznych jako podłoża do produkcji biomasy drożdżowej z jednoczesną perspektywą obniżenia ich szkodliwości dla środowiska.

W ostatnich latach produkcja biodiesla w zwiększała się, stąd pojawił się problem zagospodarowania produktu ubocznego z tego procesu produkcji - glicerolu. Wzrost produkcji biodiesla w Europie można zaobserwować corocznie od 2010 roku. Również produkcja w Polsce w tych latach po 2010 roku się podwoiła. Co prawda wydaje się, że taka tendencja nie utrzyma się długo i możemy się spodziewać obniżenia wielkości produkcji i wzrostu cen również glicerolu odpadowego, jednak proces ten może być długofalowy. Natomiast ziemniaczana woda sokowa otrzymywana w procesie produkcji skrobi z ziemniaków jest produkowana corocznie w podobnych ilościach i stanowi duży problem ekologiczny dla wytwórni krochmalu. Jest to z punktu widzenia ścieku (nawet po powszechnie stosowanym w polskich zakładach ziemniaczanych procesie oddzielania białka metodą termiczno-kwasową) bardzo wysoko obciążony i trudny do biodegradacji produkt. Problemem jest to, że jego produkcja jest kampanijna i występuje tylko przez kilka miesięcy w roku.

Pani mgr Anna Kot w swojej pracy doktorskiej podjęła się zadania wyboru szczepów drożdży z rodzaju *Rhodotorula* i oceny wpływu różnych parametrów podłoża i hodowli na możliwości skojarzonego zastosowania glicerolu odpadowego i ziemniaczanej, odbiałczonej wody sokowej, do biosyntezy biomasy w kierunku otrzymywania produktu o znaczącej zawartości białka, tłuszczu i karotenoidów. Wysokie koszty mikrobiologicznej biosyntezy lipidów i karotenoidów przez drożdże ograniczają perspektywy tych technologii w użyciu w produkcji przemysłowej. Jednak zastosowanie tanich źródeł węgla i azotu do biosyntezy może takie wykorzystanie urealnić. Uważam, że idea ta jest bardzo ciekawa i perspektywiczna i bardzo dobrze wpisuje się w potrzeby gospodarki polskiej i europejskiej. Szczególnie bliskie, są mi osobiście, zagadnienia dotyczące ekologii i ochrony środowiska związane z przemysłową produkcją żywności. Zakłady przemysłu spożywczego generują produkty uboczne i ścieki o wysokim stopniu obciążenia dla środowiska i prace zmierzające do rozsądnego ekonomicznie, obniżenia ryzyka niewłaściwego oddziaływania zakładów przemysłowych tego sektora na środowisko mają, w moim przekonaniu, poważne znaczenie.

Dla mnie jako badacza, który w ramach grantu europejskiego (V-ty program Ramowy UE) pracował nad wysokotemperaturową biologiczną biodegradacją ścieków z przemysłu ziemniaczanego, a także nad biosyntezą białka grzybowego na bazie wody sokowej, bardzo ważną jest opracowana i badana przez zespół prof. dr hab. Błazejaka, koncepcja wykorzystania odpadowej ziemniaczanej wody sokowej jako źródła azotu i w ograniczonym zakresie węgla, w biosyntezie szeregu składników żywności (glukany, lipidy, selenobiałka) na drodze wykorzystania drożdży i glicerolu. W ten nurt badań wpisuje się niniejsza praca doktorska

Celem pracy pt. „Biosynteza tłuszczu oraz karotenoidów przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* w podłożach z ziemniaczaną wodą sokową” było opracowanie efektywnej metody produkcji biomasy drożdżowej o znaczącej zawartości lipidów i karotenoidów. Cel ten realizowany był w pięciu etapach dobrze przemyślanych i konsekwentnie realizowanych. Dla recenzenta dodatkowym atutem tej pracy było podzielenie przez autorkę opisu i dyskusji wyników na pięć wyraźnie oddzielonych części, kompatybilnych z pięcioma zaplanowanymi etapami pracy, w dodatku podsumowanych konkluzjami z poszczególnych etapów, co znacząco ułatwiło śledzenie bardzo bogatej dokumentacji

W ramach niniejszej pracy wykazano, w pierwszym etapie badań, w ciekawych mikrofermentacjach prowadzonych na aparacie Bioscreen C, że istnieje możliwość wykorzystania przez zastosowane drożdże z rodzaju *Rhodotorula* glicerolu odpadowego i odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej dla uzyskania dobrego wzrostu mikroorganizmów.

Największy plon biomasy (*R.glutinis*, *R.mucilaginosa*) sięgnął w następnych etapach badań, 30 g s.s przy zastosowaniu 5 i 10% dodatku glicerolu.

Natomiast najwyższy stopień redukcji wskaźnika ChZT (ok 80%) otrzymano w hodowlach wykorzystujących 3% dodatku glicerolu. Badane drożdże wytwarzały wewnątrzkomórkowe tłuszcze ale ich poziom nie osiągnął oczekiwanych przez autorkę 20% zawartości w s.s biomasy. Następowła również synteza karotenoidów jednak nie przekroczyła poziomu 230 mikrogramów w 1 g s.s. biomasy. Stosując dość arbitralnie wybrane warunki stresowe w hodowlach prowadzonych z użyciem kolb wstrząsanych, stwierdzono, że obniżenie temperatury do 20<sup>0</sup>C może intensyfikować proces biosyntezy lipidów i karotenoidów. W ostatnim etapie prowadzono biosyntezę drożdży w bioreaktorze laboratoryjnym stosując temperaturę 20<sup>0</sup>C. Najwyższy plon biomasy uzyskano po 72 godzinach hodowli, zawartość tłuszczu była najwyższa w trzeciej i czwartej dobie procesu, a biosynteza karotenoidów przebiegała aż do 120 godziny jednak procesy degradacji biomasy spowodowały, że najwyższą wartość objętościowej wydajności biosyntezy tych związków stwierdzono w 96 godzinie hodowli.

Reasumując udowodniono, że możliwa jest wydajna biosynteza drożdży (wybrano *R.gracilis*), które stanowiąc mogą źródło tłuszczu mikrobiologicznego i karotenoidów a jednocześnie jest to hodowla ograniczająca znacząco szkodliwość, użytych jako składnik podłoża, produktów ubocznych przemysłów biopaliwowego i krochmalniczego.

### **Ocena formalnej strony pracy**

Praca doktorska pani mgr inż. Anny Kot jest bardzo obszerna i liczy 282 strony, z czego na wstęp i przegląd literatury przypada 49 stron, cel pracy, uzasadnienie podjętej tematyki i część opisująca materiały i metody badań obejmuje 27 stron, a część zawierająca omówienie i dyskusję oraz podsumowanie wyników wraz z wnioskami jest najobszerniejsza i zajmuje aż 95 stron. Pozostałe części to: spis literatury, bardzo obszerny aneks zawierający 139 tabel oraz wykaz osiągnięć doktorantki. Wyniki opisane i dyskutowane w części „Omówienie i dyskusja wyników” przedstawiono w 21 tabelach i na 42 rysunkach. Trzeba podkreślić staranność w doborze 277 pozycji literaturowych i właściwej pisowni literatury. Chciałem podkreślić, że w recenzjach pochwalamy korzystanie z literatury z ostatnich lat, ja tutaj szczególnie chciałbym podkreślić to, że autorka pracy nie wahała się cofnąć do starszych prac (często trudniej dostępnych) jeśli taka była potrzeba, i poczytam to jako zaletę pracy.

Trzeba również podkreślić, że wprowadzenie przez mgr Annę Kot podziału tak kompleksowych, bogatych w wyniki i bardzo wnikliwie analizowanych danych w pięć etapów zakończonych podsumowaniem ułatwiło sprawne poruszanie się w tym ogromie danych. Taki układ pracy (wcześniej przeze mnie nie spotykany) spowodował, że mimo że praca jest tak obszerna, znalazłem ją jako logiczną i przejrzystą, odpowiednią dla opisu prac empirycznych, co po pierwszym przeglądnięciu pracy wcale nie wydało mi się takie oczywiste.

Zaletami pracy są bardzo przemyślana i ciekawie napisana część literaturowa dająca dobrą podstawę do sformułowania tezy pracy, oraz wzorowo przeprowadzona obszerna dyskusja z wykorzystaniem wielu właściwych dla danego zagadnienia pozycji literaturowych. Język w pracy jest bardzo dobry, 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 (również z dodatkowych pozycji).

Tak jak to jest nieuniknione w tak obszernej pracy skrupulatny recenzent wyszukał kilka drobnych usterek i niedoskonałości językowych, które musi z obowiązku recenzenta odnotować. Dyskusyjne wydaje mi się używanie naprzemiennie nazewnictwa surowiec odpadowy i produkt uboczny dla zastosowanych w pracy surowców. Mimo nazwy 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. Na str 42 (wiersz 7 od dołu) „cząsteczka glicerolu wynika do komórek”. Str 55: metodykę opracowano na podstawie etapów procesu technologicznego (pewnie z pewnością byłoby: na podstawie przebiegu poszczególnych etapów procesu technologicznego). Str 96 (w.14 od dołu) powinno być polega ono *na* wystąpieniu...Str 99 (w 3 od góry) -zwiększenie pH to skrót myślowy. W tytule niektórych tabeli (np. tab. 12 pojawiła się niezręczna literówka pomijająca „na” w zwrocie „w przeliczeniu na związki”.

Reasumując trzeba jednak zdecydowanie podkreślić, że praca była bardzo uważnie napisana, a zauważone usterki były nieliczne co dało mocne odczucie dobrego i solidnego przygotowania edycji pracy.

## Ocena merytoryczna pracy

W części literaturowej pracy autorka przedstawiła charakterystykę drożdży z rodzaju *Rhodotorula*, opisała ważne drobnoustroje olejogenne i mechanizmy biosyntezy lipidów i karotenoidów w komórkach drożdży, szczegółowo analizując mechanizmy biochemiczne ich powstawania. Opisała także zastosowanie frakcji glicerynowej z produkcji biodiesla i ziemniaczanej wody sokowej oraz inne możliwości zastosowania tych produktów ubocznych w różnych przemysłach. Zabrakło mi w tej części, analizy wpływu różnych czynników stresowych na proces biosyntezy lipidów i karotenoidów, dlatego odczułem wybór dokonany przez autorkę jako dość arbitralny. Proszę o wyjaśnienie przyczyn dokonanego wyboru czynników stresowych.

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.

Rozdział: „Materiały i metody badań” jest dobrze i szczegółowo opracowany, a dobrane metody właściwe i wielu wypadkach, nowoczesne. Nie mam uwag co do zastosowanych metod. Pewien niedosyt czuję w kwestii optymalizacji hodowli bioreaktorowych, ale ogrom pracy składający się na tę pracę i jej kompleksowość, nie pozwala mi na poczytanie tego za błąd, raczej rozpatrywał bym ten aspekt w kwestii indywidualnych wyborów : co dla mnie jest najważniejsze, najciekawsze itp.

Chciałbym podzielić się moim odczuciem, że praca ma wyjątkowo solidny charakter. Liczba i zakres przeprowadzonych hodowli i ich ocena analityczna jest imponująca. Jednak najbardziej ujął mnie bardzo szczegółowy i dojrzały sposób prowadzenia dyskusji wyników i rozsądna, merytoryczna dyskusja z doniesieniami literaturowi. Wyjaśnienia niektórych, często niespodziewanych wyników, są bardzo merytoryczne i oparte na analizie ewentualnie możliwych oddziaływań biochemicznych. Uważam dyskusje wyników za jedną z najmocniejszych stron tej pracy. Nie mam też zastrzeżeń do sposobu przedstawienia wyników i ich analizy statystycznej (dobrze, że znalazły się w aneksie).

Forma przedstawienia wniosków w postaci 7 konkretnych zagadnień wzbogaconych dodatkowymi stwierdzeniami i konkluzja końcowa odpowiada mi jako forma odpowiednia dla tak rozbudowanej i wielowynikowej pracy.

## **Wniosek końcowy**

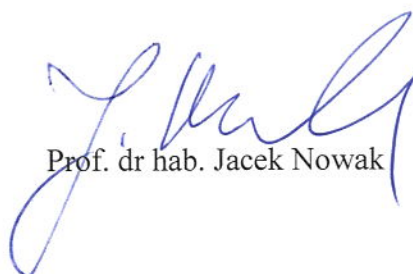
W mojej opinii przedstawiona do recenzji praca prezentuje bardzo dobry poziom naukowy i wysoki poziom możliwości publikacyjnych. Charakteryzuje się właściwie zaplanowanym i przeprowadzonym postępowaniem badawczym, którego finał owocuje taką efektywnością procesów prowadzonych w laboratoryjnej skali bioreaktorowej, która daje nadzieję na zastosowania przemysłowe po uzupełnieniu w proponowane w końcowej konkluzji badania wraz z badaniami optymalizacyjnymi procesu hodowli.

W pracy zamieszczono wyjątkowo bogaty i dobrze przedstawiony materiał faktograficzny. Wyniki badań noszą znamiona oryginalności i nowości naukowej. Odnosi się to szczególnie do udowodnienia możliwości otrzymania cennych żywieniowo składników i jednoczesnym obniżeniu szkodliwości ekologicznej zastosowanych produktów ubocznych.

Mogę więc stwierdzić jednoznacznie, że przedstawiona do oceny praca pani mgr inż. Anny Marii Kot odpowiada wymaganiom ustawowym stawianym rozprawom na stopień doktorski i proszę Wysoką Radę Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

W związku z tym, że chciałbym wnioskować o wyróżnienie tej pracy dołączam osobny wniosek w tej sprawie.

Poznań, 29.10.2018



Prof. dr hab. Jacek Nowak

Poznań, 29.10.2018

**Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr inż. Anny Marii Kot  
pt. „Biosynteza tłuszczu oraz karotenoidów przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* w  
podłożach z ziemniaczaną wodą sokową”**

Uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego o rozpatrzenie możliwości nagrodzenia autorki powyższej pracy w odpowiednim trybie.

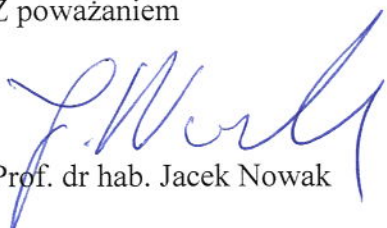
Pani mgr Anna Kot w swojej pracy doktorskiej podjęła się zadania oceny możliwości skojarzonego zastosowania glicerolu odpadowego i ziemniaczanej wody sokowej (a więc uciążliwych przemysłowych produktów ubocznych) do biosyntezy biomasy w kierunku otrzymywania produktu o znaczącej zawartości białka, tłuszczu i karotenoidów. Wysokie koszty mikrobiologicznej biosyntezy lipidów i karotenoidów przez drożdże ograniczają ich perspektywy w zastosowaniu w produkcji przemysłowej, jednak zastosowanie tanich źródeł węgla i azotu do biosyntezy może takie wykorzystanie urealnić. Uważam, że idea ta jest bardzo ciekawa i perspektywiczna i bardzo dobrze wpisuje się w potrzeby gospodarki polskiej i europejskiej.

Praca doktorska Pani Anny Kot cechuje się nie tylko wysoką jakością naukową ale i bardzo dobrym przygotowaniem edycyjnym. Przede wszystkim chciałem jednak zwrócić uwagę na dojrzałość naukową i merytoryczną z jaką została przeprowadzona dyskusja naukowa uzyskanych wyników.

Przedstawiona do recenzji praca ma niezaprzeczalne walory naukowe, i publikacyjne, które jak zauważyłem, zostały już w części wykorzystane (spis publikacji doktorantki). W związku z tym, że na reprezentowanym przez mnie Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu jest to element niezbędny do wyróżnienia pracy, zwracam na to uwagę Wysokiej Rady.

Bardzo proszę Wysoką Radę o rozpatrzenie mojego wniosku.

Z poważaniem

  
Prof. dr hab. Jacek Nowak