

Wrocław, dnia 29.10.2018 r.

Ocena
pracy doktorskiej mgr inż. Anny Marii Kot pt.: **Biosynteza tłuszczów i karotenoidów przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* w podłożach z ziemniaczaną wodą sokową i glicerolem**, zrealizowanej pod kierunkiem prof. dra hab. inż. Stanisława Błażejaka oraz dr inż. Iwony Gientki jako promotora pomocniczego

Aktualnie obserwuje się rosnące zainteresowanie tłuszczami pochodzenia mikrobiologicznego oraz rozpuszczonymi w nich związkami karotenoidowymi. Dotyczy to m.in. biosyntezy β -karotenu przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula*. Substancja ta, znana jako prowitamina A wykazuje także silne właściwości przeciwutleniające i jest na nią szerokie zapotrzebowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Jednak poważnym ograniczeniem wykorzystania tego procesu na skalę przemysłową są wysokie koszty, na które znaczny wpływ mają ceny surowców. W związku z tym autorka zaproponowała, by przetestować na skalę laboratoryjną możliwość wykorzystania jako substratów w tym procesie znacznie tańszej odpadowej wody sokowej z przemysłu ziemniaczanego oraz odpadowego glicerolu z produkcji biodiesla. Ta oryginalna idea ma nie tylko spory potencjał poznawczy, ale także aplikacyjny. W związku z tym mogła być atrakcyjnym przedmiotem badań w ramach pracy doktorskiej.

Autorka skonstruowała ją w sposób typowy dla prac naukowych, a jej treść, bez uwzględniania „Aneksu” oraz „Wykazu osiągnięć doktoranta”, zamieściła na 190 stronach.

Interesująca dla mnie była lektura dość obszernego rozdziału poświęconego przeglądowi piśmiennictwa. Zdecydował o tym staranny dobór literatury z punktu widzenia jej zharmonizowania z przedmiotem badań. Jest w niej m.in. dotychczasowa wiedza o taksonomii, fizjologii i morfologii drożdży z rodzaju *Rhodotorula* oraz o tłuszczach i karotenoidach pochodzenia mikrobiologicznego. Uwzględnia ona także charakterystykę ziemniaczanej wody sokowej i odpadowego glicerolu z produkcji biodiesla oraz kierunki wykorzystania tych ścieków/odpadów w biotechnologii. Niektóre fragmenty prezentowanych w literaturze przedmiotu osiągnięć naukowych autorka przedstawiła bardzo szczegółowo. Dotyczy to m.in.

biochemicznych mechanizmów biosyntezy lipidów i karotenoidów w komórkach drożdży, co bardzo mi się podobało. Bogaty w informacje i starannie napisany „Przegląd literatury” świadczy o tym, że doktorantka dobrze zna zagadnienia, którym poświęciła swoją pracę, i z łatwością w nich się porusza. W tej części ocenianej pracy mam zastrzeżenia tylko do dwóch sformułowań. W zdaniu na str. 14: „Optymalna wartość pH środowiska hodowlanego dla większości gatunków mieści się w zakresie 5,0 – 6,0” nie wiem, co autorka miała na myśli używając terminu „optymalna”. Gdyby dopisała w tym zdaniu np. „...dla wzrostu...”, tej wątpliwości bym nie miał, bo wiedziałbym, że termin ten oznacza maksymalizację wzrostu drobnoustrojów. Druga uwaga dotyczy zdania na str. 22: „W wyniku procesu uzyskano 45% redukcję wskaźnika chemicznego zapotrzebowania na tlen”. Ja na pewno nie użyłbym określenia: „...uzyskano 45% redukcję ChZT...”.

Przyjęty cel zakładał określenie zdolności wybranych szczepów drożdży z rodzaju *Rhodotorula* do biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu i rozpuszczonych w nim karotenoidów w podłożach zawierających odpadowy glicerol z produkcji biodiesla, a także odbiałczoną, ziemniaczaną wodę sokową. Ponadto obejmował ocenę możliwości jednoczesnej biodegradacji obydwu tych składników podłoża. W świetle dotychczasowych osiągnięć oraz dostępnej literatury przedmiotu uważam, że tak sformułowany cel był interesujący i realny do osiągnięcia. Po zapoznaniu się z całą pracą sądzę, że w formule jej celu powinna się znaleźć fraza: „...poziomu lub stopnia biodegradacji...” zamiast „...możliwości jednoczesnej biodegradacji...”. Nie mam uwag krytycznych ani do zakresu badań ani do planu eksperymentów.

W kolejnym rozdziale szczegółowo zapoznano ze stosowanym materiałem biologicznym, odczynnikami chemicznymi i podłożami hodowlanymi, a także pochodzeniem i składem chemicznym odbiałczonej, ziemniaczanej wody sokowej oraz odpadowego glicerolu z produkcji biodiesla. Precyzyjnie opisano sposoby hodowli biomasy drożdży, metody analityczne, stosowaną aparaturą naukową oraz metody statystycznej analizy wyników badań. Jedną z zalet tej części pracy było zamieszczenie w niej rysunków i dobrze skonstruowanych tabel ułatwiających jej analizę i ocenę. Przyjęte metody badawcze, analityczne oraz statystyczne są typowe dla tego rodzaju badań i dają solidną podstawę do stwierdzenia, że otrzymane z ich pomocą wyniki są wiarygodne.

Wyniki poszczególnych etapów badań, ich analizę i dyskusję zamieszczono w rozdziale 4. W dwóch początkowych etapach badań pozytywnie zweryfikowano przydatność odpadowego glicerolu z produkcji biodiesla oraz odbiałczonej, ziemniaczanej wody sokowej jako składników podłoży wzrostowych dla trzech szczepów drożdży z rodzaju *Rhodotorula*. Dokumentują to rezultaty zamieszczone w tab. 8 oraz zilustrowane graficznie na rys. 14A-C, a szczegółowe dane charakteryzujące te dwa etapy badań zamieszczono w aneksie. Najważniejszym osiągnięciem I i II etapu badań było wykazanie zasadności stosowania obydwu testowanych produktów odpadowych jako ważnych i wzajemnie komplementarnych (uzupełniających się) składników podłoży dla wzrostu stosowanych szczepów drożdży. Otworzyło to drogę do kontynuowania prac prowadzących do zrealizowania zamierzenia wytyczonego w celu pracy. Przykładem zauważonych przeze mnie mankamentów o charakterze redakcyjnym w tym fragmencie pracy doktorskiej była niepoprawna jednostka wskaźnika ChZT w tab. 7 (powinno być $\text{mg O}_2 \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz niefortunnie sformułowane zdania: „Krzywe wzrostu badanych szczepów uzyskane w podłożu kontrolnym...” na str. 86 (nie podoba mi się stwierdzenie „krzywe uzyskane”) oraz „Spośród badanych szczepów, najwyższy wzrost...” na str. 87 (w tym zdaniu występuje błąd składni).

W kolejnym etapie doświadczeń prowadzonych na wstrząsarce poszerzono spektrum analizowanych wskaźników o zmiany w trakcie hodowli pH oraz zawartości w podłożu związków redukujących, glicerolu i azotu ogólnego. W biomacie drożdży oznaczano ogólną zawartość tłuszczu i karotenoidów, a także skład kwasów tłuszczowych i profil syntezowanych karotenoidów. A dzięki rozszerzonej palecie indykatorów chemicznych obliczano wskaźniki kinetyczne charakteryzujące efektywność biosyntezy tłuszczu oraz karotenoidów. Oznaczano ponadto chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT), by ocenić stopień rozkładu ładunku zanieczyszczeń chemicznych podłoża wniesionych przez dodawane do niego produkty odpadowe. Syntetyczne wyniki badań zamieszczono w tabelach nr 8-12 oraz zilustrowano graficznie na rys. od nr 15 A-C do nr 23 A-C. Podobnie jak wcześniej, szczegółowe dane charakteryzujące ten etap badań są w aneksie. Analiza tych wyników sugeruje, że oczekiwania autorki określone w celu pracy stały się realne, ale na tym etapie badań były jeszcze niezadawalające. Przykładem dostrzeżonych przeze mnie błędów

redakcyjnych jest zdanie: „Podczas pierwszej doby hodowli...” na str. 96 (zamiast „cukrów redukujących” powinno być „substancji redukujących”).

W następnym etapie badań podjęto próby poprawy wskaźników kinetycznych biosyntezy tłuszczu i karotenoidów modyfikując warunki hodowli wstrząsanych. Zmiany polegały na dodatku do podłoża chlorku sodu i/lub nadtlenu wodoru, obniżeniu temperatury hodowli i jej naświetlaniu. Globalne wyniki badań w ramach IV etapu zamieszczono w tabelach nr 13, 14, 15 i 16 oraz zobrazowano na rys. od nr 24 A-C do nr 32 A-C. I w tym przypadku w aneksie można znaleźć szczegółowe dane charakteryzujące ten etap doświadczeń. Stwierdzono, że stosowane szczepy drożdży odmiennie reagowały na zmianę warunków środowiskowych, a biorąc pod uwagę cel pracy, najkorzystniejszym okazał się szczep *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788. W biomacie tego szczepu uzyskanej podczas hodowli w temperaturze 20°C wykazano najwyższą zawartość tłuszczu ogółem, w którym udział kwasów: oleinowego, linolowego i linolenowego wynosił odpowiednio: 50,48%, 23,22% i 5,56%. Zaś frakcja karotenoidowa tej biomasy zawierała 68,18% β -karotenu oraz 30,38% torulenu. Te wskaźniki, lepsze w porównaniu z wcześniejszymi etapami badań, budziły nadzieję na dalszą ich poprawę w skutek powiększenia skali i kolejnej modyfikacji parametrów środowiskowych. W tej części pracy mam zastrzeżenia do stwierdzenia na str. 143/144: „Dopiero po zapewnieniu stabilności, ekspresja genów odpowiedzialnych za syntezę enzymów katalizujących biosyntezę karotenoidów powróciła do pierwotnego poziomu”, które, moim zdaniem, jest raczej spekulacją. Być może jest to prawda, ale autorka tego w swojej pracy nie badała.

W ostatnim etapie planu badań hodowle szczepu *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 prowadzono w bioreaktorze BioFlo 3000 o pojemności roboczej 4 dm³ zachowując warunki, które okazały się najkorzystniejsze we wcześniejszych eksperymentach. Wyjątek stanowiło napowietrzanie, które można było regulować w odróżnieniu od hodowli wstrząsanych. W tym etapie badań wydłużono listę oznaczanych wskaźników o zawartość białka i sacharydów w biomacie drożdży. Generalne wyniki tego etapu badań zamieszczono w tab. nr 17-21 i zilustrowano graficznie na rys. nr 33-42. Konsekwentnie kompletne dane charakteryzujące ten etap badań podano w aneksie. Okazało się, że hodowle w bioreaktorze zdynamizowały wzrost biomasy, co było korzystne i można było tego się spodziewać. Ale nie poprawiły się kinetyczne wskaźniki biosyntezy tłuszczu i karotenoidów.

Ponadto zmieniła się struktura zarówno kwasów tłuszczowych jak i karotenoidów. Niejasne jest ostatnie zdanie na str. 168, w którym nie wyjaśniono, co należy rozumieć pod pojęciem „optymalizacji składu biomasy”.

Dyskusję, podobnie jak inne fragmenty tej pracy, czyta się i odbiera bardzo dobrze. Jest ona rzeczowa i świadczy o umiejętności ostrożnej, krytycznej analizy i interpretacji własnych wyników badań w świetle osiągnięć przedstawionych w literaturze przedmiotu. Pracę kończą wnioski, które są dobrze zredagowane i udokumentowane. Dobrze brzmi też konkluzja końcowa, stanowiąca osobisty komentarz autorki do uzyskanych wyników.

Cytowana literatura jest źródłem obszernej wiedzy dobrze nawiązującej do pracy, a okazały „Aneks”, stanowiący integralną część pracy, dał mi okazję (rzadko spotykaną w pracach doktorskich) poznania jej „kuchni naukowej”, jak również zaznajomienia się z ogromem pracy włożonej do jej powstania. Z satysfakcją odnotowałem także zamieszczenie „Wykazu osiągnięć doktorantki”, który zawiera pokaźną listę opublikowanego przez autorkę niniejszej pracy dorobku naukowego oraz udziału w grantach i konferencjach naukowych.

Na zakończenie chciałbym podzielić się z doktorantką jeszcze jedną uwagą. Chociaż wyznaczony cel pracy został osiągnięty, to jestem przekonany, że w przyjętym planie badań nie wyczerpano jeszcze wszystkich rezerw w poprawianiu pożądanych wyników badanego procesu. Tkwią one m.in. w optymalizacji warunków środowiskowych.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Anny Marii Kot jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego polegającego na określeniu zdolności wybranych szczepów drożdży z rodzaju *Rhodotorula* do biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu i karotenoidów w podłożach zawierających odpadowy glicerol z produkcji biodiesla, a także odbiączoną, ziemniaczaną wodę sokową oraz oceny stopnia biodegradacji obydwu tych składników podłoża. Recenzowana praca dowodzi, że doktorantka ma ogólną wiedzę z nauk rolniczych i potrafi samodzielnie prowadzić pracę naukową, analizować i interpretować jej wyniki oraz je redagować. Posiadanie tych umiejętności spełnia wymienione w Ustawie o zmianie ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz niektórych innych ustaw (Dz. U. poz. 859, art. 1, pkt 1, lit. a z dnia 21 kwietnia 2017 r., która weszła w życie z dniem 29 kwietnia 2017 r.)

wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Anny Marii Kot do dalszych etapów przewodu doktorskiego prowadzącego do otrzymania stopnia naukowego dra nauk rolniczych i dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Jednocześnie proponuję wyróżnić tę pracę. Przemawia za tym nie tylko oryginalny i wysoki poziom naukowy przedstawionych w niej badań. Pracę wyróżnia także bardzo dobra redakcja i zawarta w niej kompletna, szczegółowa dokumentacja.

