

Prof. dr hab. Roman A. Grzybowski
ul. Nowoursynowska 129/1
02-797 Warszawa

Ocena

Pracy mgr. Macieja Kluza pt. **”Optymalizacja procesów produkcji ryboflawiny / witaminy B₂ / przez zrekombinowane szczepy drożdży *Candida famata*”**, wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Uniwersytetu Rzeszowskiego pod kierunkiem **prof. dr. hab. Andrzeja Sybirnego** .

Witamina B₂ / ryboflawina/ jest substancją niezbędną do prawidłowego funkcjonowania organizmów. Jednocześnie występuje powszechnie w przyrodzie; w produktach mięsnych, rybnych, mlecznych i zbożowych. Zapotrzebowanie na nią jest tak duże, że dietę trzeba wzbogacać przez dodawanie witaminy otrzymywanej na drodze produkcji przemysłowej.

Prowadzona początkowo synteza chemiczna RF okazała się mniej konkurencyjna w porównaniu z biosyntezą mikrobiologiczną. Ryboflawinę wytwarza szereg mikroorganizmów bakteryjnych */Bacillus subtilis, Clostridium acetobutylicum/* albo grzybowych */Ashbya gossypii, Eremothecium ashbyii, Candida famata, Pichia guilliermondii/*.

Drobnoustroje są potencjalnie nieprzebranym źródłem różnych metabolitów, z których człowiek korzystał przez tysiąclecia nieświadomie, a od ponad stu lat świadomie.

Najpierw selekcionując ze środowiska szczepy o przydanych właściwościach, a następnie wraz z rozwojem nowych technik badawczych, konstruując nowe szczepy o szczególnych właściwościach.

Idąc tym tropem Pan mgr inż. Maciej Kluz włączył się w badania nad mikrobiologicznym pozyskiwaniem ryboflawiny, a wyniki tych prac przedstawił w recenzowanym opracowaniu.

Formalna ocena pracy

Otrzymana do recenzji praca zawiera 174 numerowane strony, w tym 20 tabel, 81 rysun

ków /z tego 4 w przeglądzie literatury/.

Opracowanie ma układ typowy dla dysertacji doktorskich.

Przegląd literatury 30 str.

Cel pracy 1str.

Materiały i metody 14 str.

Omówienie wyników 79 str.

Dyskusja 6 str.

Wnioski 1 str.

Literatura 17 str.

Za dyskusyjne i rzadko spotykane można uznać zamieszczenie streszczenia przed wykonaniem pracy oraz brak podsumowania zamieszczanego zwykle na końcu pracy.

W wymienionym spisie literatury – 218 pozycji- w rzeczywistości jest ich 214, bowiem powtarzają się pozycje 35 i 36 , 73 i 75, 112 i 113, 174 i 177.

Literatura z ostatnich 10 lat stanowi ok. 53% całości zamieszczonych w spisie pozycji.

Nie jestem przekonany, że w pracy doktorskiej należy umieszczać pozycje podręcznikowe /poz.12,21,23/ lub bardzo leciwe ; z 1950r./poz. 57/, z 1957r./poz.60/, z 1968r.

/poz.103/, z 1963r. /poz.127/, z 1946r./poz.140/, z 1939r. ! /poz.181/, z 1956r./poz.211/ tym bardziej, że nie wszystkie są cytowane, np. pozycje 21,57,140,181.

Nie da się nie zauważyć, że w spisie literatury znajduje się 57 pozycji /ok.26%/ niecytowanych / poz.4,13,21,22,28,32,33,38,39,43,49,50,52,53,57,58,68,70,78,79,91,92,93, 107,108,111,114,116,117, 119,124,128,133,134,135,136,137,140,141,147,149,152,153, 156,163,164,167,168,169,176,178,179,181,191,192,195,196/.

Być może, że kilka tytułów pominąłem i będę rad jeśli Autor wykaże, że się mylę.

A może było to zamierzone tylko recenzent tego nie zrozumiał.

Inny aspekt związany ze spisem literatury dotyczy sposobu zapisu. W wielu pozycjach praktykowany jest zapis bez pełnego wykazu autorów. To nie jest przeoczenie bo takich przypadków jest co najmniej 35 /ok. 16%/.

Ponadto wskazane byłoby zamieszczać pozycje tego samego autora w porządku chronologicznym. Są to drobiazgi, ale wpływają na przystępność pracy.

I wreszcie, żeby zakończyć sprawę literatury, zwracam uwagę, że są w tekście odnośniki do pozycji literaturowych, których nie ma w spisie /14/. Są to: s. 18-Siddiq i Khan,1982; Terrade et al.2009, s. 21.-Plaut et al.,1978, s.22- Forn i Brown,1975 ; Nielsen i Bacher,

1978, s.27- Mitsuda et al. 1973; Efimoy et al. 1998 /również na s.28/, s.35-Sahm et al., 2013, s.48/Tab.1/- Dmytruk et al. 2001, s.52- Lowry,1951, s.53- Shavlowsky et al.,1980, s.144- Krishna Rao et al.,2008 ; Yan et al. 2005 ; Zafar et al.,2012.

I jeszcze jedna uwaga; gdy w spisie literatury są dwie pozycje np. 164 i 165 odpowiadające jednemu odnośnikowi Schmidt et al.1996 /s.35/, należy je odpowiednio odróżnić np. „a” i „b”.

Ocena merytoryczna

Odnosząc się do źródłowej literatury przedmiotu, Autor charakteryzuje znaczenie ryboflawiny w organizmach zwierzęcych, występowanie w przyrodzie oraz wytwarzanie jej przez organizmy roślinne i zwierzęce. Omawia budowę i właściwości tego związku oraz szlak biochemiczny syntezy RF.

Szczegółowo referuje doniesienia piśmiennictwa z zakresu biosyntezy i degradacji FMN / mononukleotyd flawinowy/ i FAD / dinukleotyd adeninoflawinowy/. Są to bardzo interesujące informacje, które, mam nadzieję, będą przydatne w planowaniu i wykonaniu pracy.

Przemysłowa produkcja RF przy udziale mikroorganizmów wyparła syntezę chemiczną, gdyż ta pierwsza okazała się mniej kosztowna i bardziej przyjazna dla środowiska. Wykorzystywano w tym celu wspomniane wcześniej *Eremothetium asbyii* i *Ashbya gossypii*. W przypadku tego ostatniego organizmu stosowano, w produkcji przemysłowej, odpady zwierzęce jako źródło aminokwasów, oraz olej sojowy jako źródło węgla.

Warto takie przypadki odnotować ,mając w perspektywie przemysłowe zastosowanie wyników recenzowanej pracy

W literaturze odnotowano prace z wykorzystaniem grzybów *Candida famata* i *Pichia guilliermondii*. Podkreślam z „wykorzystaniem grzybów”, bowiem w przeglądzie literatury /s.39/ jest fraza „u bakterii, drożdży i grzybów”. Jaka jest różnica między drożdżami a grzybami ? Czy drożdże to nie grzyby?

Na tej samej stronie /39./ zapisano „rozpad grzybn i wytwarzanie przetrwalników”. Czy nie lepiej „przetrwalniki” zarezerwować dla form spoczynkowych bakterii ?

Znaczną część /7 s./ przeglądu literatury zajmują „wybrane zagadnienia z projektowania procesów biotechnologicznych”. Temat sam w sobie bardzo ciekawy i przydatny w planowanym procesie hodowli badanych drożdży. Tyle tylko, że nie jest to przegląd literatury lecz streszczenie opracowania / Chmiel,1988/, bez żadnych nowości z ostatnich 18 lat.

Dość łatwawiernie przyjmuje Autor tezę, że optymalna temperatura hodowli drożdży wynosi ok. 30⁰. Dla biotechnologa nie jest tajemnicą, że inna jest optymalna temperatura dla drożdży piwowarskich, inna dla winiarskich, a jeszcze inna dla gorzelniczych /s.44/.

Czy Doktorant zgadza się ze stwierdzeniem, że dużo ciepła dostarczają procesy życiowe, a w mniejszym stopniu proces mieszania / s.44/. Czy nie podano jaki jest mechanizm wpływu mieszania na dostarczanie ciepła ? To może być interesujące bo w ocenianej pracy , środowiska hodowlane będą poddawane procesowi mieszania z różną intensywnością.

Przegląd literatury pozwolił Autorowi postawić cel pracy, którym jest optymalizacja procesu syntezy RF przez zrekombinowane szczepy drożdży *Candida famata*.

Do realizacji tego zadania Autor zastosował odpowiednie mikroorganizmy, metody genetyczno-molekularne i biochemiczne oraz podłoża hodowlane i metody hodowli. Z uznaniem odnoszę się do przewidywanego zakresu badań i związanej z tym liczby analiz.

Do badań wybrano dwa szczepy drożdży *Candida famata*, # 3 i # 91 i zoptymalizowano skład podłoża do ich hodowli.

Jako źródła węgla badano glukozę, ksylozę, sacharozę , L-arabinozę i mannitol. Hodowlę prowadzono w kolbach i bioreaktorach. Maksymalne ilości biomasy drożdży i RF uzyskiwano po 96 godz., na podłożach z glukozą lub sacharozą.

Recenzent nie znalazł uzasadnienia wyboru w/w źródeł węgla. Szczególnie ksylozy, L-arabinozy czy mannitolu. Jakie są potencjalne źródła tych związków w planowanej produkcji przemysłowej ? Na s.55 Autor rezygnuje ze skrobi „ ponieważ jest to wielocukier praktycznie nierozpuszczalny w wodzie”. Czy nie ma form rozpuszczalnych w wodzie ? Może większą barierą jest niedostępność skrobi dla enzymatycznego aparatu drożdży ?

Warto zauważyć, że skrobia jest cukrem występującym powszechnie i w znacznej obfitości w przyrodzie.

Dlaczego nie zwrócono uwagi na laktozę występującą jako cukier odpadowy w produktach przemysłu mleczarskiego / serwatka/.

Jako źródło azotu zastosowano siarczan amonu w stężeniu 0,5; 1,5; 3 g/L. w takim samym stężeniu fosforan amonu oraz mocznik w stężeniu 1; 1,5; 2; 2,5 g/L.

Najbardziej zachęcające wyniki uzyskano w przypadku siarczanu amonu dla szczepu # 91 i mocznika dla szczepu # 3.

Jako źródło fosforu zastosowano diwodorofosforan potasu / KH_2PO_4 / i wodorofosforan di potasu / K_2HPO_4 / w założonych stężeniach. Najbardziej przydatne stężenia zastosowane w hodowli to 0,2g KH_2PO_4 /L dla szczepu # 91 i 1,2g K_2HPO_4 /L dla szczepu # 3.

Brak uzasadnienia stosowano właśnie takie dawki. Czy w literaturze nie było wskazówek? Z przedstawionych danych nie wynika, że np. dawka wyższa niż 3g siarczanu amonu/L nie dałaby wyższych wyników.

Znacznie lepsze wyniki hodowli uzyskano w bioreaktorach niż w kolbach. Brak w tym przypadku naukowego zadziwienia, refleksji czy komentarza; dlaczego?

Następnie Autor podjął próbę optymalizacji podłoża hodowlanego Op5m posługując się systemem analizy statystycznej wg Placketta-Burmana.

W rezultacie otrzymał skład podłoża opisany na s.106. Zaskakujące jest, że skład tego podłoża był podany w rozdziale 6.6,7. Materiały i metody /s.56/, z tym, że ten ze s.106 jest bogatszy o mikroelementy, ale za to uboższy o wodę destylowaną w porównaniu z podłożem ze s.56.

W następnym eksperymencie Autor porównał przyrost biomasy drożdży i syntezę RF w hodowli szczepów # 3 i #91 na podłożu bogatym YPD i podłożu optymalnym Op5m, w hodowlach okresowych w kolbach i w fermentorach szklanych o poj. 1,3 L.

W hodowli okresowej na podłożu YPD większe ilości biomasy i RF wytwarzał szczep #3. Na podłożu Op5m lepsze wyniki otrzymano w przypadku szczepu #91.

W hodowli okresowej w bioreaktorach, na obydwu podłożach, obydwa szczepy wykazywały podobną, ale zdecydowanie wyższą wydajność niż w hodowli okresowej w kolbach. I tu znów brak refleksji i komentarza jak te wyniki wykorzystać.

Do dalszych badań nad optymalizacją hodowli wybrano szczep # 91.

W tym eksperymencie badano wpływ różnych warunków hodowli.

Wpływ temperatury badano w zakresie 26-30^o. Najlepsze wyniki przyrostu biomasy drożdży i RF uzyskano w temp. 28 i 29^o C, przy czym w bioreaktorach kilkakrotnie wyższe.

Najkorzystniejszym odczynem środowiska było pH w zakresie 5,0-5,5 /te badania prowadzono tylko w bioreaktorze, brak wyjaśnienia dlaczego ?/

Przy stosowanych szybkościach obrotu mieszadła w bioreaktorze / od 600 do 1200 rpm/ najlepsze rezultaty uzyskano przy 1000 rpm.

Badając wpływ szybkości napowietrzania środowiska hodowlanego /vvm/ stwierdzono najlepsze rezultaty przy 1 vvm.

Ponadto najwyższe przyrosty biomasy drożdży #91 i syntezy RF stwierdzono przy 40% nasycenia podłoża tlenem i zastosowaniu 20% inoculum.

Rodzaj stosowanego odpieniacza nie miał większego znaczenia.

Na s.121 Autor stwierdza, że stężenie RF było „zależne od szybkości obrotów mieszadła czyli od natlenienia podłoża”. Czy nie sugerowało to powiązania szybkości mieszania z szybkością napowietrzania i stopniem nasycenia podłoża tlenem ?

Podsumowaniem badań nad otrzymywaniem RF była hodowla wybranego szczepu #91 w zoptymalizowanych warunkach czyli na wcześniej zbadanym podłożu Op5m w optymalnych parametrach natlenienia, temperatury i pH. Hodowlę prowadzono w bioreaktorach o poj. 1,3 i 7,0 L. Zdecydowanie lepsze wyniki uzyskano w bioreaktorze 7,0 L.

W dyskusji zreferowano wyniki uzyskane podczas badań, porównując je do niektórych danych literaturowych. Podkreślono przydatność otrzymanego szczepu #91 do przemysłowej produkcji RF, jako stabilnego genetycznie. Nie zauważyłem /może przez nieuwagę/ na jakiej podstawie tę stabilność genetyczną stwierdzono.

Prace podsumowuje 5 wniosków przywołujących ważniejsze wyniki badań.

Uwagi szczegółowe

W przypadku upowszechniania wyników tej pracy proponowałbym poprawki redakcyjne.

Na Ryc. 15-54, myślę, że dobrze byłoby w opisie podać miano np. g/L. Te dane są w tekście, ale po uzupełnieniu Ryc. będą bardziej czytelne.

Czy poprawny jest zapis /s.51/ „że „komórki drożdży dekantowano przy 4000 obr/min”, Dekantacja to coś innego niż wirowanie.

Należałoby odróżnić „ilość” od „liczby”

Byłbym ostrożniejszy w używaniu słowa „posiadać”, tam gdzie można zastosować mniej urzędowe określenia; mieć, wykazywać, zawierać itp.

Niezgrabne jest sformułowanie /s.11/ „dalszej kontynuacji” /pleonazm/, zjawisko z dziedziny tautologii.

Pewnie przez niedopatrzenie korektorskie znalazło się słowo /s.21/ „nie dawno” pisane rozłącznie.

Pod rozważanie poddaję często używane określenie „produkowany”. Drobnoustroje swoje metabolity raczej wytwarzają lub syntetyzują. Czy nie lepiej słowem „produkcja” określać działalność technologiczną i ekonomiczną aranżowaną przez człowieka z wykorzystaniem organizmów syntetyzujących pożądaną substancję?

Na s.37 znalazło się stwierdzenie: „będącego również flawinogennym drożdżem”.

Jaka jest forma mianownika lp tego rzeczownika?

Dopełniacz lm rzeczownika „podłoże” brzmi „podłoży”, a nie „podłoż” jak na s.142.

Przypomnę na koniec /choć od tego może powinienem zacząć/, że skrót od „doktor” tylko w mianowniku zapisuje się /w polskim języku/ bez kropki „dr”. W innych przypadkach np. doktora, doktorowi, z doktorem skrót pisze się „dr.” z kropką, ponieważ „r” nie jest ostatnią literą wyrazu. To samo dotyczy skrótów od „magister”.

Ocena ogólna

Pan mgr inż. Maciej Kluz wykonał dużą pracę, zarówno pod względem przeglądu literatury jak i badań własnych.

Spełnił założone zadania, choć można by dyskutować, czy w pełni. Czy można uznać badania za optymalizację? Co to jest optymalizacja? Badano wpływ poszczególnych czynników /składu pożywki i warunków hodowli/ na biosyntezę RF. Ale przecież poszczególne czynniki mogą być wzajemnie powiązane. Np. pH i temperatura hodowli. Stężenie cukru i natlenienie. Źródła węgla w kontekście innych składników.

Czy Autor może uzasadnić jak wykorzystał /jeśli miał taki zamiar/ wyniki rozdziału 7.4. „Dobór składników podłoża”, w dalszych badaniach np. przy konstruowaniu podłoża

optymalnego Op5m.

Recenzent zdaje sobie sprawę, że nie można zrobić wszystkiego, dlatego proszę uwagi te traktować jako dyskusyjne i ewentualne wskazówki na przyszłość.

Z uznaniem odnoszę się do nakładu pracy i umiejętności organizacji badań przez Autora.

Proponowałbym tylko na przyszłość, bardziej skrupulatną i wnikliwą korektę tekstu przed wydrukowaniem / komputer też się myli/.

Wniosek końcowy

Doceniam dojrzałość naukową Doktoranta, umiejętność korzystania z literatury i stawiania hipotezy naukowej, dlatego w oparciu o ocenę pracy mgr.inż. Macieja Kluza pt. „Optymalizacja procesów produkcji ryboflawiny /witaminy B₂/ przez zrekombinowane szczepy drożdży *Candida famata*” stwierdzam, wypełnia ona wymagania ustawy o stopniach naukowych z dnia 14 marca 2002r. /Dz. U. 65 poz.595 z późn. zmianami/ i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, o dopuszczenie Autora do publicznej obrony.

Warszawa, dnia 10.03.2016r.

