

dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska

Łódź, 5.11.2018

Ocena

pracy doktorskiej **mgr Kamila Piwowarka**

nt. „**Wykorzystanie wytlóków jabłkowych w procesie fermentacji propionowej prowadzonej przy użyciu wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Propionibacterium***”

wykonanej

w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności na Wydziale Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Promotor: dr hab. Edyta Lipińska

Promotor pomocniczy: dr inż. Elżbieta Hać-Szymańczuk

Podstawa formalna

*Recenzję, której przedmiotem jest rozprawa doktorska nt. „Wykorzystanie wytlóków jabłkowych w procesie fermentacji propionowej prowadzonej przy użyciu wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Propionibacterium*” wykonano na zlecenie Dziekana Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 21 września 2018 roku, która powołała mnie na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Kamila Piwowarka.*

Wybór i znaczenie tematu

Zbiór jabłek w Europie w roku 2018 osiągnął rekordowy poziom 12,6 mln ton, przy 36% wzroście w porównaniu z rokiem poprzednim. Obecnie, Polska jest liderem wśród europejskich producentów jabłek. Równocześnie, nasz kraj jest największym w Europie i drugim na świecie producentem skoncentrowanego soku jabłkowego, wytwarzając do 300 tys. ton rocznie koncentratu soku jabłkowego. Ta niezachwiana od kilku lat pozycja Polski jako producenta jabłek i ich przetworów skutkuje nie tylko dochodami w sferze

gospodarczej, ale również rodzi konieczność zagospodarowania odpadów poprodukcyjnych w postaci wyłoków jabłkowych. Jednym z najprostszych sposobów utylizacji wyłoków jest ich dodatek do pasz dla zwierząt, w postaci suszonych płatków lub granulatu, wchodzących w skład mieszanek pełnoporcjowych dedykowanych dla wszystkich grup wiekowych bydła. Wyłoki stosowane są też w formie świeżej lub w postaci kiszzonek. Wykorzystywanie wyłoków jabłkowych jako zamiennika pasz objętościowych energetycznych oraz włóknistych nie stanowi jednak rozwiązania wobec wielkości ich podaży. Ze względu na cenne składniki (cukry, pektyny, polifenole, kwasy organiczne, mikroelementy i witaminy), wyłoki są dobrym materiałem do przetwarzania w procesach biotechnologicznych. Chociaż pomysł wykorzystania wyłoków jabłkowych w procesach fermentacyjnych nie jest nowością, to zwykle rozważany jest w kontekście produkcji biopaliw II generacji, których wytwarzanie stanowi wyzwanie technologiczne i finansowe. Propozycja prowadzenia fermentacji propionowej opartej na biomase odpadowej jabłek przemysłowych jest interesująca, a otrzymywany kwas propionowy i witamina B12 stanowią substancje o wysokiej wartości komercyjnej. Pomimo, że biotechnologiczna produkcja kwasu propionowego nadal nie jest ekonomicznie konkurencyjna w stosunku do jego syntezy chemicznej, to wartość dodaną stanowi tu dywersyfikacja surowców, znaczące obniżenie obciążenia środowiska naturalnego odpadami poprodukcyjnymi oraz bezpieczeństwo produktów, wynikające ze statusu GRAS (generally recognized as safe wg US FDA), czy QPS (qualified presumption of safety wg EFSA) bakterii *Propionibacterium freudenreichii*. W tym kontekście, wybór tematyki pracy doktorskiej uważam za w pełni uzasadniony i wpisujący się we współczesne trendy nurtu „białej biotechnologii”. Podjęty przez Pana mgr Kamila Piwowarka temat utylizacji wyłoków jabłkowych z udziałem bakterii fermentacji propionowej ukierunkowanej na pozyskanie konkretnych metabolitów jest próbą zaprojektowania procesu biotechnologicznego poprzez dobór szczepu bakterii i świadome modelowanie środowiska hodowlanego w celu zmaksymalizowania wydajności produkcji określonych związków.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny praca obejmuje 278 stron, przy czym 181 stron to tekst pracy, 37 stron wykazu literatury oraz aneks zawierający 54 strony, na których zestawiono szczegółowe wyniki w postaci 149 tabel. Ostatnie 6 stron zawiera spis osiągnięć naukowych Doktoranta. Dokumentacja w formie graficznej umieszczona w tekście obejmuje 41 rysunków i 40 tabel. W rozprawie wydzielono 8 głównych rozdziałów: Wstęp, Przegląd literatury, Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej, cel i zakres pracy, Materiał i metodyka pracy, Omówienie i dyskusja wyników, Podsumowanie wyników badań, stwierdzenia i wnioski, Spis literatury oraz Aneks. Poszczególne rozdziały pracy stanowią spójne jej elementy, a każdy

rozdział zawiera zwięzłe podsumowanie, uzasadniające przejście do kolejnego etapu badań. Taki układ jest bardzo przejrzysty i znacząco ułatwia czytelnikowi śledzenie toku badań, co nie jest łatwe przy tak obszernej pracy eksperymentalnej. W opisie etapów badań Pan mgr Kamil Piwowarek przedstawia wyniki przeprowadzonych badań, plasując je na tle obszernie przytaczanych danych literaturowych. Doktorant szczegółowo analizuje rozbieżności pomiędzy wynikami własnych eksperymentów i danymi źródłowymi, wskazując na przypuszczalne przyczyny różnic. Tak rzetelna i dogłębnie przeprowadzana analiza świadczy zarówno o wiedzy mgr Kamila Piwowarka w zakresie badanego tematu, jak i pasji naukowej oraz chęci poznania i zrozumienia, co jest niezwykle cenne u młodych badaczy. Tekst rozprawy jest bardzo starannie przygotowany pod względem edytorskim. Błędy literowe są nieliczne i nie rzutują na odbiór oraz wartość naukową pracy. Styl opisu jest zwięzły i klarowny, a jedyna moja uwaga w tym zakresie dotyczy wtrącania określeń żargonu laboratoryjnego.

Ocena merytoryczna pracy

Przegląd literatury obejmuje 38 stron i pomimo, że jest precyzyjnie związany z tematem pracy, wyczerpująco przedstawia problematykę badawczą. Pan mgr Kamil Piwowarek sprawnie porusza się w obszarze zagadnień fizjologii i metabolizmu bakterii propionowych, ze zrozumieniem wskazując na możliwe interakcje pomiędzy środowiskiem i odpowiedzią populacji bakterii z rodzaju *Propionibacterium*. W tej części pracy znajduje się również szeroko przedstawione tło dotychczasowych badań nad pozyskiwaniem kwasu propionowego i witaminy B12 na drodze biotechnologicznej, z wykorzystaniem drobnoustrojów. Zawarte tu przykłady wcześniejszych badań obejmują także dane ilościowe i ich porównanie. Szczegółowa analiza szlaków metabolicznych bakterii syntezujących kwas propionowy (*Clostridium propionicum*, *Bacteroides ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*, *Roseburia inulinivorans* czy *Propionibacterium* sp.) oraz uwarunkowań środowiskowych produkcji tego kwasu wskazuje na świadomy dobór organizmu eksperymentalnego. Wybór surowca, jakim są wytloki jabłkowe, ma również swoje uzasadnienie już w części teoretycznej pracy. Autor nie tylko analizuje skład tego odpadu poprodukcyjnego w aspekcie jego przydatności jako podstawowego składnika podłoża mikrobiologicznego, ale wskazuje na rozmiar produkcji tego odpadu w Polsce i na świecie oraz dotychczasowe sposoby jego wykorzystania. To kompleksowe ujęcie zagadnienia dobrze wprowadza czytelnika w podjęty w badaniach w temat, wskazując równocześnie nową drogę jego wykorzystania.

Cel i zakres pracy zostały właściwie sformułowane i w pełni przedstawiają koncepcję pracy doktorskiej. Chociaż nie brakuje tu oceny ekonomiki produkcji kwasu propionowego z wykorzystaniem wytlóków jabłkowych, to Autor podkreśla wartość dodaną realizacji takiego

procesu biotechnologicznego. W pełni zgadzam się z Panem Kamilem Piwowarkiem, że nawet kosztochłonne procesy biotechnologiczne mają szansę realizacji, jeśli są przyjazne dla środowiska i wiążą się ze zmniejszeniem jego zanieczyszczenia, czy wytwarzaniem bioproduktów bezpiecznych dla konsumenta. Etapowe ujęcie zakresu pracy pokazuje nie tylko jej przebieg, ale również sekwencyjne podejście do badań, gdzie wyniki poszczególnych etapów determinują kolejne decyzje badacza. Za dodatkowy walor pracy uważam zsekwencjonowanie genomu szczepu *Propionibacterium freudenreichii* T82.

Podkreślam wielość i różnorodność stosowanych metod oraz przemyślany dobór składu pożywek hodowlanych w warunkach modelowych. Należy zwrócić uwagę, że chociaż zdefiniowanie pożywek wydaje się być zadaniem metodycznym, to ich skład jakościowy i ilościowy powinien być dostosowany do profilu chemicznego utylizowanego surowca. W opisie materiału biologicznego brakuje mi szerszej charakterystyki źródła izolacji szczepów *Propionibacterium freudenreichii* T82 oraz *Propionibacterium thoenii* T117. Rozważenie środowiska bytowania tych bakterii mogłoby stanowić wskazówki w doborze szczepów do badań, zatem proszę o uzasadnienie wyboru tych właśnie szczepów. Wartość pracy podnosi zastosowanie statystycznej oceny wyników badań. Wielowariantowe eksperymenty z kilkoma zmiennymi parametrami, które zostały zrealizowane w ramach przedstawionej do oceny pracy, są niezwykle trudne w interpretacji. Wykorzystanie metody planowania doświadczeń *Design of Experiment* oraz odpowiednio dobranych narzędzi statystycznych (simpleksowe plany dla mieszanin trójskładnikowych, czy ocena istotności modeli), umożliwiło stworzenie modeli matematycznych wiążących istotne składniki pożywek ze wzrostem bakterii. Umiejętność stosowania technik analizy prognostycznej w planowaniu procesu biotechnologicznego, którą prezentuje Pan mgr Kamil Piwowarek jest niezwykle cenna.

Zastosowanie wielowariantowych mikrohodowli bakterii w 10 pożywkach modelowych jest ciekawym rozwiązaniem, pozwalającym na sprawną i wiarygodną optymalizację składu chemicznego środowiska hodowli dla trzech szczepów bakterii propionowych. Przy wyborze modelu najlepiej opisującego wzrost bakterii w zależności od składu jakościowego i ilościowego cukrów wykorzystano trzy plany doświadczeń: simpleksowo-kratowy, simpleksowo-centroidowy i simpleksowo-rozszerzony. Obrazowanie odpowiedzi populacji bakterii przedstawiono na wykresach poziomicowych i wykresach Pareto, co znacznie ułatwia analizę wyników. Zgodnie z założeniami potwierdzono wiarygodność wybranego modelu w pożywce z dodatkiem ekstraktu z wyłoków jabłkowych jako źródła węgla, zawierających w puli cukrów 53% fruktozy. Starannie zaplanowany i przeprowadzony etap modelowania środowiska, zależnie od uzdolnień metabolicznych szczepu bakterii, został zakończony wyborem do dalszych badań szczepu *Propionibacterium freudenreichii* T82 i

wykazał jego predyspozycje metaboliczne do wzrostu w pożywce z dodatkiem ekstraktu z wyłoków jabłkowych. W tej części opisu wyników mam niewielkie zastrzeżenia do legend dokumentacji graficznej i tabelarycznej, gdzie stosowane skróty lub brak opisu warunków dokładnie identyfikujących eksperyment utrudnia czytelnikowi odbiór. Zgodnie z zasadą „*self-reading*” opis dokumentacji powinien być wystarczająco precyzyjny dla zidentyfikowania poszczególnych eksperymentów.

Drugi etap badań, to zwiększenie skali procesu z ok. 350 µl do 500 cm³ nadal w pożywkach modelowych. Doktorant przeprowadził analizę przebiegu fermentacji propionowej, modelując środowisko zróżnicowaniem ilościowym i jakościowym źródeł węgla oraz monitorując wzrost bakterii, wykorzystanie cukrów oraz produkcję i proporcje wytwarzanego kwasu propionowego i octowego. Kolejny etap obejmował badania w tej samej skali, ale w pożywce zawierającej ekstrakt z wyłoków jabłkowych. Tu zakres badań był nie mniej szeroki i dotyczył 9 wariantów pożywki. Ponadto, jako czynniki modelujące kierunek i wydajność fermentacji propionowej wybrano źródła azotu, witamin i soli fosforanowych. Optymalizowano również stosunek ilościowy węgla do azotu (C/N) w pożywce, dodatek biotyny, częstość zubożniania hodowli w czasie fermentacji oraz temperaturę. W mojej opinii Pan mgr Kamil Piwowarek rozważył wpływ wszystkich istotnych chemicznych i fizycznych czynników środowiska hodowli na wydajność procesu produkcji kwasu propionowego. Sposób opisu wyników i dyskusja świadczy o świadomości występowania interakcji różnych czynników na poziomie metabolizmu komórki oraz konieczności zachowania równowagi pomiędzy szlakami przemian konkretnych związków. Doktorant podjął próbę modelowania procesu wytwarzania kwasu propionowego oraz witaminy B12 poprzez regulację poziomu substratów w pożywce oraz optymalizację czynników fizycznych środowiska hodowli.

Zwieńczeniem badań jest zwiększenie skali fermentacji do objętości 4 dm³, prowadzonej w bioreaktorze w pożywce z dodatkiem ekstraktu z wyłoków jabłkowych i o optymalnym składzie chemicznym i ustalonej temperaturze i pH pożywki. Dyskusyjna wydaje się być ocena Doktoranta skali tego procesu jako półtechniczna. Uważam, że jest to ocena zawyżona. Proszę o uzasadnienie takiej klasyfikacji. Również na tym etapie badań została przeprowadzona szczegółowa analiza zużycia substratów i wydajności produkcji kwasu propionowego i octowego. Na podkreślenie zasługuje umiejętność mgr Kamila Piwowarka krytycznej oceny wyników badań własnych oraz wskazanie przypuszczalnych przyczyn rozbieżności. O technologicznym podejściu do procesu, świadczy fakt, że podczas modelowania jego przebiegu, Autor bierze pod uwagę również aspekt ekonomiczny, uwzględniając potencjalne zwiększenie do skali przemysłowej. Aspekt ekonomiczny w

badaniach o charakterze aplikacyjnym jest bardzo istotny, aczkolwiek rzadko poruszany w rozprawach doktorskich.

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej mgr Kamila Piwowarka zawierają elementy inżynierii metabolicznej. Doktorant podczas badań nie zapomina, że pracuje z żywym organizmem, o określonym profilu metabolicznym i wrażliwym na szeroko pojęte czynniki stresu środowiskowego. Zatem, nie dziwi mnie podjęcie trudu zsekwencjonowania genomu bakterii *Propionibacterium freudenreichii* T82. Praca zawiera opis i analizę funkcjonalną genomu tego szczepu, co może być pomocne przy ewentualnych próbach modyfikacji jego cech.

Uważam, że wyniki badań zostały opisane prawidłowo i poparte właściwie przygotowaną dokumentacją. Czasem opis jest prowadzony zbyt drobiazgowo, z podaniem liczbowych danych szczegółowych, co jednak nie zakłóca zrozumienia przekazu pracy. Sposób prowadzenia dyskusji lokuje wyniki nie tylko w przedmiotowym obszarze wiedzy, ale również wyjaśnia zjawiska na poziomie przemian zachodzących w komórce bakterii. Konkluzje pracy to 10 obszernych wniosków, zawierających liczne dane liczbowe, które były już wcześniej przytoczone w pracy w formie podsumowania kolejnych rozdziałów. W mojej opinii wnioski powinny być bardziej ogólne i przedstawiać kierunki modelowania środowiska.

Praca zawiera bogatą bibliografię, na którą składa się 376 pozycji. Niemal jedną czwartą piśmiennictwa stanowią pozycje pochodzące z ostatnich pięciu lat. Spis literatury został przygotowany starannie, a drobne uchybienia edycyjne czy niejednolite formatowanie nie wpływają na identyfikację cytowanych źródeł.

Uwagi szczegółowe

Przedstawione poniżej uwagi nie umniejszają wartości pracy i przytaczam je z obowiązku recenzenta.

- Zwracam uwagę na często stosowane w pracy określenia żargonowe, używane w codziennej pracy laboratoryjnej, np. „słabsza szybkość wzrostu” (s. 27), „przyrost bakterii”, czy „ w hodowli kolbowej” (s.158), „hodowli bioreaktorowej” (s. 161).
- Proszę o unikanie personifikacji bakterii, np. „bakterie są w stanie” (s. 14, 34), czy szczep... „jest w stanie wytwarzać witaminę B12” (s. 181), czy „bakterie z rodzaju *Propionibacterium* są dość wybredne jeśli chodzi o zadane warunki hodowlane” (s. 156).
- Proszę o wyjaśnienie sformułowania „ekstrakcja kwasu propionowego drogą destylacji” (s.16). Czy nie są to dwa różne procesy?

- Proszę o wyjaśnienie sformułowania „klasyczne, jak i skórne bakterie z rodzaju *Propionibacterium*” (s. 40).
- Czy zamieszczone na s. 72 określenie „wymagania hodowlane” dotyczą wymagań pokarmowych?

Powyżej przytoczone usterki nie wpływają na zrozumienie i nie zakłócają odbioru pracy.

Konkluzje recenzji

Podsumowując, stwierdzam że cel pracy został w pełni zrealizowany. Przedstawione badania należą do pionierskich, prowadzonych w obszarze utylizacji wyłoków jabłkowych na drodze fermentacji propionowej. Praca istotnie poszerza stan wiedzy w również obszarze badań nad bakteriami z rodzaju *Propionibacterium*. Podkreślam walor aplikacyjny pracy, a jej wyniki mogą stanowić podstawy do opracowania założeń technologicznych np. procesu fermentacji wyłoków jabłkowych wzbogaconych odpadami produkcji rolnej-spożywczej bogatymi w związki azotu.

Stwierdzam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa Pana mgr Kamila Piwowarka spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami (Dz. U. 2016, poz. 882) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2016 poz. 1586) i przedkładałam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Kamila Piwowarka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na kompleksowe, analityczne podejście do postawionego celu badań, szeroki warsztat badawczy oraz umiejętność stosowania technik analizy prognostycznej w planowaniu procesu biotechnologicznego, rozprawę doktorską mgr Kamila Piwowarka oceniam jako wyróżniającą się. Wniosek o wyróżnienie wraz z jego szczegółowym uzasadnieniem przedstawiam w osobnym piśmie.

Anna Cielęcka-Szymajewska

dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska

Łódź, 5.11.2018

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Kamila Piwowarka

nt. „Wykorzystanie wytlóków jabłkowych w procesie fermentacji propionowej prowadzonej przy użyciu wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Propionibacterium*”

wykonanej

w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności na Wydziale Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Promotor: dr hab. Edyta Lipińska

Promotor pomocniczy: dr inż. Elżbieta Hać-Szymańczuk

Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z wnioskiem o wyróżnienie niniejszej pracy. W mojej opinii praca zasługuje na wyróżnienie z następujących powodów:

- Praca stanowi próbę modelowania metabolizmu bakterii z rodzaju *Propionibacterium* dedykowanych do utylizacji wytlóków jabłkowych.
- Kompleksowe, analityczne podejście do postawionego celu badań, szeroki warsztat badawczy oraz umiejętność stosowania technik analizy prognostycznej w planowaniu procesu biotechnologicznego.
- Ponad przeciętny dorobek naukowy Doktoranta, oraz znaczący progres publikacyjny w ciągu ostatnich dwóch lat.

Alina Kunicka-Styczyńska