

Prof. dr hab. inż. Edmund Cibis
Katedra Inżynierii Bioprocessowej
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Kamila Piwowarka
pt. „Wykorzystanie wytlóków jabłkowych w procesie fermentacji propionowej prowadzonej
przy użyciu wybranych szczepów z rodzaju *Propionibacterium*”

Dobór i znaczenie tematu

Ograniczone zasoby ropy naftowej, a także troska o stan środowiska naturalnego, każą poszukiwać, alternatywnych dla ropopochodnych, surowców do produkcji kwasów organicznych. Tak jak w przypadku substytucji paliw transportowych pochodzenia chemicznego paliwami produkowanymi z surowców odnawialnych, także w przypadku produkcji wspomnianych kwasów, szczególnie tych stosowanych w przemyśle spożywcym, surowce wywodzące się z paliw kopalnych zastępuje się, bądź też próbuje się zastąpić, surowcami odnawialnymi, a produkcję prowadzi się z wykorzystaniem drobnoustrojów. Chcąc obniżyć koszty surowca, a jednocześnie dbając o środowisko naturalne, poszukując surowców odnawialnych, badacze kierują się w stronę odpadowych produktów przemysłu spożywczego. Stosowany m. in. do utrwalania żywności i pasz kwas propionowy produkuje się obecnie w skali przemysłowej wyłącznie na drodze chemicznej poprzez karboksylowanie etylenu. Ale trwają zakrojone na szeroką skalę badania naukowe dotyczące wytwarzania kwasu propionowego na drodze mikrobiologicznej z wykorzystaniem przede wszystkim bakterii z rodzaju *Propionibacterium* oraz rozmaitych odpadów przemysłu spożywczego jako surowców.

Autor niniejszej rozprawy podjął się badań nad możliwością zastosowania wytlóków jabłkowych do otrzymywania tego kwasu, wykorzystując w tym celu dwa szczepy *Propionibacterium freudenreichii* oraz jeden szczep *Propionibacterium thoenii*, dochodząc po I etapie badań do słusznego wniosku, że w dalszej części pracy należy się skoncentrować wyłącznie na szczepie *Propionibacterium freudenreichii* T82. W świetle podanych wyżej faktów podkreślić należy, że wybór powyższej tematyki badawczej przez Doktoranta jest jak najbardziej uzasadniony. Praca ma zarówno wysokie walory poznawcze jak i aplikacyjne.

Głównym efektem jego badań, było opracowanie optymalnych warunków prowadzenia procesu biosyntezy kwasu propionowego z wytlóków jabłkowych z wykorzystaniem wspomnianego

szczepu *Propionibacterium freudenreichii* T82, gdy podstawowym kryterium maksymalizacji była wysokość produkcji tego kwasu.

Ocena formalnej strony pracy

Praca doktorska mgra Kamila Piwowarka liczy 278 stron. Z czego na część literaturową przypada 39 stron, na rozdział Materiał i metodyka pracy – 18 stron, a na rozdział Omówienie i dyskusja wyników – 98 stron. Uzasadnienie tematyki badawczej, cel i zakres pracy przedstawiono na 2 stronach, Wstęp także na 2 stronach, a Podsumowanie wyników badań, stwierdzenia i wnioski – na 4 stronach. Doktorant zamieścił w pracy także 54 stronicowy Aneks, w którym w 149 tabelach i na 2 rysunkach przedstawił źródłowe wyniki swoich analiz chemicznych i obliczeń. Zasadnicza część pracy doktorskiej zawiera 40 tabel oraz 41 rysunków. Spis literatury zawiera 378 pozycji, w tym 5 powołań na źródła internetowe. Podkreślić należy, że jedynie 7% pozycji literaturowych, to prace polskojęzyczne publikowane w źródłach nierejestrowanych w bazie World of Science. Cytowana literatura jest też stosunkowo nowa – 78% pozycji zostało wydanych w latach 2000-2018, a 34% w obecnej dekadzie. Na ostatnich 6 stronach (w Części B) Doktorant przedstawił wykaz swoich osiągnięć naukowych, które budzą uznanie co do ich jakości i liczby i zdecydowanie przewyższają wymagania ustawowe w tym zakresie.

Szata edytorska nie budzi istotnych zastrzeżeń. Zauważono jedynie w kilkunastu wyrazach przedstawione, pominięte lub przypadkowe litery, co przy obecnych możliwościach edytorów tekstu powinno być mało prawdopodobne.

Ocena merytoryczna pracy

Rozdział 1. Wstęp

We Wstępie Doktorant bardzo przystępnie wprowadza czytelnika w problematykę, której dotyczy jego praca doktorska. Błędnie tylko przytoczył tonaż wytlóków jabłkowych wytwarzanych rocznie na świecie, co zostało uzasadnione w następnym punkcie recenzji.

Rozdział 2. Przegląd literatury

Przegląd literatury w pracy doktorskiej przedłożonej do recenzji świadczy o tym, że Autor ma rozległą i głęboką wiedzę w zakresie problematyki, w której prowadził badania. W szczególności dotyczy to głównej części przeglądu, odnoszącej się do metabolizmu bakterii propionowych oraz podpunktu 2.6.2., w którym Doktorant prezentuje próby biotechnologicznego zagospodarowania

wytłoków jabłkowych. Porusza się On bardzo swobodnie m.in. w zagadnieniach z zakresu enzymologii, biologii molekularnej i genetyki. W tej części przeglądu literatury dostrzeżono jedynie dwa przypadki budzące wątpliwości. Pierwszym z nich jest fragment tekstu na str. 35, w podpunkcie 2.4.3., gdzie Autor odsyła czytelnika do tabeli 2 sugerując, że znajdują się w niej odwołania m.in. do pozycji literaturowych Trojanowska i Czaczyk, 1996 oraz Seidametova i wsp., 2004, a okazuje się, że w tabeli takie odwołania nie występują. Drugi przypadek dotyczy także zawartości tabeli 2. Nosi ona tytuł „Produkcja witaminy B12 z surowców odpadowych z wykorzystaniem bakterii z rodzaju *Propionibacterium*”. Doktorant przytacza w tej tabeli 7 pozycji literaturowych, w których rzekomo przedstawiona jest produkcja tej witaminy z surowców odpadowych. W rzeczywistości dotyczy to tylko 4 pozycji literaturowych. Autorzy pozostałych 3 publikacji stosowali w badaniach czystą glukozę. Doktorant, co prawda informuje w odpowiedniej kolumnie tabeli, że wykorzystywano w tym przypadku do syntezy witaminy B12 glukozę, jednak tytuł tabeli sugeruje czytelnikowi, że była to glukoza odpadowa.

W podrozdziale 2.6 Doktorant charakteryzuje zarówno światowy jak i krajowy rynek jabłek oraz wytłoków jabłkowych. Nie ustrzegł się tutaj jednak pewnych pomyłek, czy też niedociągnięć. Na stronie 42, powołując się na źródła literaturowe, Doktorant podaje, że w sezonach handlowych 2016/2017 oraz 2017/2018 światowa produkcja jabłek wynosiła po niespełna 80 mln ton oraz na następnej stronie, że wytłoki stanowią około 20% masy jabłek. Z kolei na stronie 44 czytelnik, również odsyłany do źródła literaturowego, dowiaduje się, że w 2013 roku powstało na świecie 80 mln ton wytłoków. Z kontekstu można się domyślać, że chodzi o wytłoki jabłkowe. W rzeczywistości, według tego źródła, to światowa produkcja jabłek wynosiła w 2013 r. 80 mln ton. Nieprecyzyjnie jest też opisana tabela 4 znajdująca się ww. podrozdziale. Autor przedstawia w niej skład i wybrane parametry fizykochemiczne wytłoków jabłkowych według 5 różnych źródeł literaturowych. Nie informuje jednak, że w dwóch przypadkach wyniki dotyczą wytłoków suszonych, a w 3 wytłoków niesuszonych.

Rozdział 3. Uzasadnienie tematyki badawczej, cel i zakres pracy

Uzasadnienie tematyki badawczej jest przedstawione przekonująco. Cel pracy jest jasno określony, a jej zakres przedstawiony precyzyjnie.

Rozdział 4. Materiał i metodyka pracy

W tym rozdziale Doktorant wyczerpująco opisuje stosowane podłoża hodowlane i odczynniki, warunki prowadzenia hodowli, metody analityczne, metody statystyczne i sposób sekwencjonowania genomu szczepu *Propionibacterium freudenreichii* T82. Biorąc jeszcze pod uwagę sposób prezentacji zakresu pracy, czytelnik otrzymuje klarowny opis programu badań i sposobu ich realizacji. Nie ustrzegł się jednak Autor w tym rozdziale kilku pomyłek. W podpunkcie 4.5.5. dotyczącym oznaczania suchej substancji znajduje się informacja, że „Suchą substancję obliczono odejmując masę szalki Petriego z wysuszonymi wytlókami od masy szalki z mokrą biomasą” (str. 61-62). W ten sposób otrzymuje się masę odparowanej wody, a nie suchą substancję. Oczywiście nie sądzę, aby błąd ten wynikał z niewiedzy Autora. Myślę, że raczej z niestarannej korekty tego fragmentu testu, tym bardziej, że sucha substancja została w pracy prawidłowo oznaczona. Następną pomyłkę zauważono w podpunkcie 4.5.9. dotyczącym oznaczania zawartości białka ogółem i azotu metodą Kjeldahla. Na stronie 65 Doktorant pisze, że przy miareczkowaniu, które jest jednym z etapów tej metody, 1 cm³ 0,1 M HCl odpowiada 0,00014 g N, w rzeczywistości odpowiada on 0,0014 g N. Ostatnim z dostrzeżonych niedociągnięć w tym rozdziale jest błędnie sformułowana, w tabeli 12 na stronie 69, jednostka zawartości witaminy B12 w roztworach wzorcowych. Zbędny jest w niej czynnik cm⁻³.

Rozdział 5. Omówienie i dyskusja wyników

Praca doktorska mgra Kamila Piwowarka ma dobry, logicznie ułożony program badań. Podkreślić należy, że program ten jest bardzo szeroki. Ponadto Doktorant każdą partię otrzymanych wyników opracował statystycznie. Stosując m.in. analizę wariancji oraz metodę planowania eksperymentu. Badając wpływ składu podłoży modelowych na wzrost bakterii propionowych oraz na produkcję kwasu propionowego i octowego, Doktorant słusznie wybrał plany simpleksowe, gdyż skład pożywki w każdym doświadczeniu dobierał tak, aby suma stężeń fruktozy, glukozy i sacharozy była stała, a właśnie m. in. do takich celów te plany służą.

Moim zdaniem należało jednak wyjaśnić dlaczego zarówno w procesach prowadzonych z użyciem podłoży modelowych, jak i z użyciem podłoży wytlókowych, początkową zawartość cukrów ogółem dobierano na poziomie 25 g/dm³, a nie na poziomie ok. 50 g/dm³, czyli zbliżonym do zawartości cukrów ogółem w ekstrakcie z wytlóków jabłkowych. Prawdopodobną przyczyną była obawa przed inhibicją, ale Autor powinien jednak w pracy o tym wspomnieć.

W podrozdziale 5.1. nie znaleziono w tekście żadnych elementów budzących wątpliwości. Znaleziono je natomiast w podrozdziale 5.2. Na stronie 74 Doktorant pisze, że „Najdłuższa lag faza miała miejsce w podłożach nr V, VI i X (7 godzin)”, natomiast z danych przedstawionych w tabeli

14 (strona 75) wynika, że trzecim podłożem, w którym lag faza trwała 7 godzin było podłoże nr IX. W tym samym podrozdziale, w tytule tabeli 17 przedstawiającej wyznaczone modele wzrostu użytych do badań szczepów bakterii z rodzaju *Propionibacterium*, Autor błędnie nazywa te modele liniowymi. Są to zredukowane modele kwadratowe, albo też inaczej zredukowane wielomiany drugiego stopnia. W następnej tabeli, 18, Doktorant już swój błąd skorygował i nazywa te modele kwadratowymi. Natomiast pewnej korekty wymaga tytuł tej tabeli. Jego początek zamiast „Współczynniki modeli...” powinien mieć brzmienie „Współczynniki determinacji modeli...”. Złe nazewnictwo wyznaczonych modeli matematycznych występuje również w podrozdziale 5.3. w tabeli 26, na stronie 103. Podobnie jak wcześniej są one nazywane modelami liniowymi, podczas gdy pierwszy z nich jest zredukowanym wielomianem niepełnego trzeciego stopnia, a drugi, tak jak w tabeli 18, zredukowanym modelem kwadratowym. Trochę inaczej, ale prawidłowo są nazwane te modele w tabeli 25, odpowiednio: specjalny kubiczny oraz kwadratowy. Podobnie jak zasugerowano dla tabeli 18, początek tytułu tabeli 25 powinien brzmieć: „Współczynniki determinacji modeli...”.

W podrozdziale 5.4. sporo wątpliwości budzi tabela 27 (strona 109). Autor podał stężenie azotu oraz cukrów w procentach. Nie precyzując do czego te procenty się odnoszą. Mnożąc jednak stężenie molowe przez masę molową, można się domyślać, że jest to tzw. procent masowo-objętościowy. Ponadto analizując kolumny 4 i 5 w tej tabeli, okazuje się, że stosunek molowy C/N nie był obliczany jako iloraz liczby moli węgla i liczby moli azotu lecz jako stosunek łącznej liczby moli sacharozy, glukozy i fruktozy do liczby moli azotu. Tak samo były obliczane wartości stosunku C/N przedstawione w tabeli 30 na stronie 117. Nadmienić też należy, że w porównaniu do tabeli 7, w tabeli 30 zamienił Doktorant miejscami podłoża VIIIA i IXA, ale dalsze omówienie wyników i dyskusję kontynuował już konsekwentnie według uporządkowania podłoży w tabeli 30. W ostatnim zdaniu na stronie 128 podrozdziału 5.4 Autor błędnie odsyła czytelnika do rysunku 29, zamiast do rysunków 26-28.

W podrozdziale 5.5.3. Doktorant podjął się także porównania wysokości kosztów produkcji kwasu propionowego w zależności od wybranych składników podłoża. Tabelaryczne zestawienie (tab. 38) prezentujące te koszty zostało wykonane prawidłowo. Nie ustrzegł się jednak Autor pewnych nieścisłości podczas omówienia wyników. Informuje czytelnika, że wytworzenie kwasu propionowego z azotu kosztuje 2,59 zł/kg, a wytworzenie kilograma kwasu propionowego przy użyciu NaOH może kosztować 1,22 zł. Precyzyjniej należało napisać, że udział azotu i NaOH w kosztach wytworzenia 1 kg kwasu propionowego wynosi odpowiednio 2,59 zł oraz 1,22 zł.

Rozdział 6. Podsumowanie wyników badań, stwierdzenia i wnioski

Ten rozdział nie budzi żadnych zastrzeżeń. Doktorant precyzyjnie redaguje wszystkie wnioski do których dochodził zgodnie z chronologią prowadzonych badań.

Rozdział 7. Spis literatury

Niektóre pozycje literaturowe, np. 55, 73, 83, 84, 348 nie zostały uporządkowane w kolejności alfabetycznej.

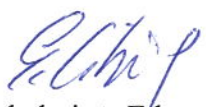
Aneks

Wątpliwości dotyczą jedynie tabel 22A, 43A, 48A, a dokładniej kolumn **p** w tych tabelach, gdyż litera **p** sugeruje, że są to wartości prawdopodobieństwa, a pojawiają się tam zarówno liczby ujemne, jak i większe od 1.

Wniosek końcowy

Uważam, że przedłożona mi do oceny praca mgra Kamila Piwowarka przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest wykorzystanie wytlóków jabłkowych w procesie fermentacji propionowej prowadzonej przy użyciu wybranych szczepów z rodzaju *Propionibacterium*. Na podstawie ocenianej pracy można stwierdzić, że Doktorant ma rozległą wiedzę z nauk rolniczych, a w szczególności z zakresu technologii żywności i żywienia. Potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe i dojrzałe redagować tekst naukowy. 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. Wnoszę więc o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgra Kamila Piwowarka i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologii żywności i żywienia.

Wrocław, 06.11.2018


Prof. dr hab. inż. Edmund Cibis