

dr hab. Janina Piekutin
Katedra Technologii w Inżynierii
I Ochronie Środowiska
Politechnika Białostocka
15-315 Białystok
ul. Wiejska 45 a

Białystok, 20. 02. 2017r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr inż. Natalii Kujawskiej

pt.: *Wytwarzanie kwasu dokozaheksaenowego przez mikroglony z rodzaju *Schizochytrium sp.* z wykorzystaniem gliceryny technicznej*
wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Marcina Dębowskiego, prof. UWM

Podstawa formalna opracowania oceny

Podstawą formalną opracowania oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalia Kujawska jest uchwała rady Wydziału Nauk o Środowisku, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 20.01.2017.

Ogólna charakterystyki rozprawy doktorskiej

Biomasa mikroglonów jest źródłem cennych substancji, które mogą być wykorzystywane w medycynie i innych gałęziach przemysłu. Dzięki temu, że mikroalgi z rodzaju *Schizochytrium sp.* zdolne są do wzrostu na różnorodnych źródłach węgla, istnieje możliwość opracowania metody ich hodowli z wykorzystaniem odpadowego glicerolu. Szczególnie, że są zdolne do wytwarzania kwasów DHA stanowiących produkt o wysokiej wartości przemysłowej. Problemy z zastosowaniem mikroglonów w przemyśle wynikają głównie z ekonomicznych rozwiązań technologicznych, ponieważ do produkcji biomasy mikroglonów potrzebne są chemiczne komponenty medium hodowlanego, co znacznie podraża produkcję. Wykorzystanie odpadowego glicerolu jako źródła węgla w procesie heterotroficznej hodowli mikroalg może zdecydowanie ograniczyć koszty eksploatacyjne i nakłady ponoszone na produkcję biomasy. Glicerol, alkohol trójwodorotlenowy, stanowi

produkt uboczny przy wytwarzaniu tzw. biodiesla. Przy przewidywanym wzroście produkcji biodiesla będzie też rosnąć ilość pozostającego do rozdysponowania glicerolu.

Wydaje się, że problem zagospodarowania glicerolu będzie narastał wraz z intensyfikacją produkcji biopaliw. Wysoka podaż tego surowca odpadowego, stanowi obciążenie dla środowiska. Wobec powyższego podjęcie badań w tym zakresie uważam za celowe i w pełni uzasadnione.

Treść rozprawy koresponduje z jej tytułem, a tekst w większości jest zrozumiały i czytelny. Sprawia to, że studiuje się ją z dużym zainteresowaniem.

Konstrukcja pracy

W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej złożonej ze 103 stron maszynopisu zostały opisane syntetyczne zagadnienia związane z postawionym do rozwiązania w tytule i celu pracy problemem naukowym. Praca jest zilustrowana 20 tabelami i 25 rysunkami. Bibliografia obejmuje 206 pozycji w tym większość angielskojęzycznej.

Dysertacja napisana jest wg klasycznego układu, poprawnie stylistycznie z zastosowaniem profesjonalnego języka. Składa się z dwóch głównych części literaturowej i badawczej. Rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Kujawskiej składa się z siedmiu rozdziałów, ósmym jest spis literatury, a na końcu zamieszczono aneks zawierający spis rysunków i tabel. Pierwszy rozdział to wstęp, następny to przegląd piśmiennictwa, trzeci rozdział to: cel, tezy i zakres badań. Fundament rozprawy doktorskiej stanowią rozdziały od czwartego do siódmego to część badawcza składająca się z metodyki badań, opisu wyników badań, dyskusji, podsumowania i wniosków. Rozdziały: przegląd piśmiennictwa, metodyka badań i wyniki badań podzielone zostały na podrozdziały pierwszego i drugiego rzędu. Całość zakończona jest krótkim podsumowaniem i ośmioma wnioskami. Praca uzupełniona jest o streszczenie w języku polskim i angielskim, a także wykaz skrótów i symboli.

Ocena merytoryczna rozprawy

Recenzowana rozprawa posiada znaczną wartość naukową, poznawczą i oraz praktyczną. Dotyczy ważnego zagadnienia związanego z wykorzystaniem odpadowej frakcji glicerynowej jako głównego, zewnętrznego źródła węgla w hodowli mikroglonów z rodzaju *Schizochytrium sp.* zdolnych do wytwarzania kwasów DHA.

Na podstawie analizy literaturowej opartej o liczne publikacje innych badaczy zajmujących się problemami wykorzystania gliceryny technicznej do wzrostu biomasy

mikroglonów i wytworzenie przez nich kwasów tłuszczowych szczególnie kwasu dokozaheksaenowego (DHA) Autorka zaplanowała badania naukowe wpisujące się w współczesne trendy badań. Celem badań było określenie wpływu parametrów technologicznych na proces wytwarzania kwasu dokozaheksaenowego (DHA) przez mikroglony z rodzaju *Schizochytrium sp.* z wykorzystaniem odpadowej gliceryny technicznej pochodzącej z produkcji biodiesla.

Cel badań został zrealizowany poprzez logiczne zaplanowanie i wykonanie szeroko zakrojonych, interdyscyplinarnych badań obejmujących:

- określenie wpływu parametrów technologicznych na wydajność hodowli *Schizochytrium sp.* oraz efektywność wytwarzania DHA,
- określenie profilu kwasów tłuszczowych produkowanych przez *Schizochytrium sp.* przy wykorzystaniu gliceryny technicznej jako źródła węgla,
- zweryfikowanie efektywności technologicznej procesu produkcji biomasy *Schizochytrium sp.* w hodowli okresowej, z zasilaniem oraz ciągłej,
- określenie stopnia zmetabolizowania gliceryny technicznej oraz końcowego stężenia kwasu DHA uzyskanego z biomasy w zależności od sposobu prowadzenia hodowli,
- określenie efektywności hodowli w zależności od zastosowanej wartości objętościowego współczynnika wnikania tlenu (kLa),
- określenie charakterystyki Zewnątrzkomórkowych Substancji Polimerycznych (EPS) produkowanych przez *Schizochytrium sp.* oraz ich wpływu na lepkość hodowli oraz produkcje kwasu DHA.

W rozdziale „Metodyka badań” mamy dokładny opis stosowanych substratów, technologii, procedur badawczych i analitycznych oraz planowane statystyczne przetworzenie danych.

Do badań wykorzystano olejodajne mikroglony *Schizochytrium sp.* i glicerynę techniczną jako jedyne źródło węgla. Pierwszy podrozdział zawiera ogólną koncepcję pracy badawczej. Proces badawczy podzielono na cztery etapy. W etapie I przeprowadzono hodowlę okresową i dobór kluczowych parametrów technologicznych wpływających na proces wytwarzania kwasu DHA przez *Schizochytrium sp.* z wykorzystaniem gliceryny technicznej jako zewnętrznego źródła węgla. Plan eksperymentu oparto na planie eliminacyjnym 2-wartościowym Placketta-Burmana oraz metodzie powierzchni odpowiedzi. W etapie II proces hodowli biomasy i wytwarzania kwasu DHA przez *Schizochytrium sp.* prowadzono w hodowli okresowej, okresowej ze zmiennym zasilaniem oraz ciągłej. Hodowle

okresową i okresową z zasilaniem prowadzono przez 120 godzin. Czas ten wynikał z rDCW – szybkość przyrostu biomasy mikroglonów, i rDHA – szybkość wytwarzania kwasu DHA. W hodowli ciągłej badania prowadzono zwracając uwagę na dobór współczynnika rozcieńczenia utrzymując komórki w fazie intensywnego wzrostu. W tym etapie do badań laboratoryjnych wykorzystywano bioreaktor o pojemności roboczej 2 dm³. III etap to określenie efektywności przyrostu biomasy oraz wytwarzania kwasu dokozaheksaenowego przez *Schizochytrium sp.* w hodowli prowadzonej na bazie gliceryny technicznej w skali pilotażowej. Badania te zostały przeprowadzone w większej skali wykorzystując do tego bioreaktor o objętości całkowitej 20 dm³. Powiększenie skali oparte było na badaniach przeprowadzonych w etapie II uzyskując najwyższe efekty w hodowli okresowej z zasilaniem. Badania w skali pilotażowej pokazały również pojawianie się problemów technologicznych typu pienienie się pożywki. Stosując środki antypieniące możemy wpłynąć niekorzystnie na przebieg hodowli, zanieczyszczać produkty procesu oraz zmniejszać szybkość absorpcji tlenu. W etapie IV analizowano wpływ EPS (zewnątrzkomórkowe substancje polimeryczne) na efektywność produkcji kwasu DHA. Badania w tym etapie prowadzono dla hodowli okresowej z zasilaniem. Celem tych badań było określenie współczynnika wnikania tlenu wynikające z lepkości medium w hodowli *Schizochytrium sp.* Wykazano, że współczynnik wnikania tlenu można zwiększyć gdy zmniejsza się lepkość medium poprzez zwiększenie prędkości mieszania i natężenia przepływu powietrza. W podrozdziale „Metody analityczne i statystyczne” przedstawiono metodykę oznaczenia glicerolu i lipidów w medium hodowlanym, analizę jakościową gliceryny technicznej, monomerów sacharydów, analizę jakościową i ilościową kwasów tłuszczowych oraz lepkość hodowli i oznaczenie współczynnika wnikania tlenu. Wszystkie uzyskane wyniki badań zostały opracowane za pomocą programu STATSTICA 12.

Rozdział „Wyniki Badań” podzielono na cztery części, analogicznie do czterech etapów badań. Zawiera on zestawienia tabelaryczne i rysunki uzyskanych rezultatów. Rozdział ten merytorycznie został starannie i rzetelnie opracowany. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat wykorzystania technicznej gliceryny do produkcji kwasu DHA z użyciem mikroglonów z rodzaju *Schizochytrium sp.* W podrozdziałach 5.1.1 - 5.1.3 omawiane są wytypowane parametry fizykochemiczne hodowli przez programy statystyczne i potwierdzone eksperymentalnie. Metoda powierzchni odpowiedzi została wykorzystana do ustalenia najistotniejszych parametrów hodowli okresowej do uzyskania najwyższego stężenia DHA i DCW (sucha masa komórek). Dane eksperymentalne i wartości przewidywane są zbliżone. Najwyższe odchylenie zaobserwowano w przypadku stężenia

DHA i DCW (tab. 14) i wykazuje, że w zależności od głównego celu przeprowadzanej hodowli, a mianowicie zwiększenia efektywności przyrostu biomasy lub przyrostu stężenia DHA, konieczny jest dobór odmiennych wartości najistotniejszych parametrów hodowli. Wykazano, że w jednej hodowli nie uda się uzyskać wysokiego stężenia komórek i kwasu DHA. Podrozdział 5.2.1 przedstawia typową okresową hodowlę gdzie wzrost mikroorganizmów przechodzi kilka etapów od adaptacji do zamierania. Najważniejszym etapem jest przyspieszenie wzrostu i wzrost wykładniczy (zwany czasami logarytmicznymi). W tym przypadku okres hamowania wzrostu biomasy następował w 60 godzinie, natomiast stężenie DHA rosło do 80 godziny trwania procesu (rys. 11). Zużycie gliceryny technicznej było całkowicie zależne od zmieniającego się stężenia DCW. Szybkość zużycia tego substratu wynosiła $1,17 \text{ g/dm}^3 \times \text{h}$. W tym podrozdziale przedstawiono również uzyskane wyniki z okresowej hodowli z zasilaniem i hodowli ciągłej. W okresowej hodowli ze zmiennym zasilaniem uzyskano przedłużenie czasu związanego z utrzymywaniem stale wysokiego stężenia DHA i DCW, jednak wymagało to zwiększenia ilości technicznej gliceryny. W hodowli ciągłej obserwowano efektywność przyrostu biomasy *Schizochytrium sp.*, wytwarzania lipidów oraz kwasu DHA w zależności od doboru współczynnika rozcieńczenia. Do tego posłużono się podstawowym równaniem stosowanym w hodowlach ciągłych. Najwyższe stężenie DCW wynoszące $51,9 \text{ g/dm}^3$ zanotowano dla współczynnika rozcieńczenia $D = 0,2 \text{ 1/doba}$, natomiast najniższa wartość równa $16,02 \text{ g/dm}^3$ dla $D = 0,8 \text{ 1/doba}$ (rys. 13). Szybkość przyrostu biomasy była zależna od dobranego współczynnika rozcieńczenia. Najniższa wartość $rDCW$ wynosząca $10,38 \text{ g/dm}^3 \times \text{doba}$ zanotowano dla współczynnika $D = 0,2 \text{ 1/doba}$, natomiast najwyższa wartość $rDCW = 17,63 \text{ g/dm}^3 \times \text{doba}$ dla $D = 0,4 \text{ 1/doba}$. W prowadzonych badaniach wykazano że, kwasami tłuszczowymi o największym udziale się we frakcji lipidowej, niezależnie od typu hodowli, były nasycony kwas palmitynowy (C 16:0) oraz nienasycony kwas dokozaheksaenowy (C 22:6) należący do grupy Omega-3. W III etapie określano efektywność przyrostu biomasy oraz wytwarzania kwasu dokozaheksaenowego (DHA) przez *Schizochytrium sp.* w hodowli prowadzonej na bazie gliceryny technicznej w skali pilotowej poprzez charakterystykę wzrostu biomasy mikroglonów i stopnia kumulacji lipidów oraz kwasu DHA oraz porównano wskaźniki efektywności hodowli w skali laboratoryjnej i pilotażowej. W skali pilotażowej nastąpiło przesunięcie czasowe przy wzroście lipidów ponieważ zawartości lipidów w zaobserwowano między 40 a 100 h hodowli w przypadku skali laboratoryjnej czas ten był krótszy i kończył się na 80 godzinie procesu. Po 60 h inkubacji w skali pilotażowej obserwowano przejście biomasy do fazy stacjonarnej. W hodowli prowadzonej w skali laboratoryjnej faza stacjonarna

następowała 20 h później. Po 120 h hodowli w skali pilotażowej uzyskano 103,44 g /dm³ biomasy mikroglonów, co stanowiło o 24% niższy przyrost w porównaniu z hodowlą w skali laboratoryjnej. W IV etapie Doktorantka określiła efektywność produkcji DHA przez *Schizochytrium sp.* pod wpływem Zewnątrzkomórkowych Substancji Polimerycznych. Uzyskane wyniki (rys.20, 21) lepkości i stężenia biomasy to wartości rosnące systematycznie a zależność pomiędzy lepkością i wzrostem stężenia biomasy od 80 godzin procesu do 120 są prawie identyczne i jest zależnością liniową. Frakcja polisacharydowa EPS to w znacznej mierze glukoza, zdecydowanie niższe stężenie dotyczy galkatozy, mannozy, fukozy i ksylozy. Istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność technologiczną w hodowli jest stopień wnikania tlenu i tu przeprowadzone badania przy trzech różnych współczynnikach wnikania tlenu 150 l/h, 500 l/h i 750 l/h wykazały, że czym wyższy współczynnik tym wyższe stężenie biomasy, lipidów i DHA.

Szczegółową interpretację uzyskanych danych podczas badań w kontekście faktów znanych z piśmiennictwa znajdujemy w rozdziale „Dyskusja wyników badań”. Doktorantka świadoma ważności tego rozdziału bardzo merytorycznie przygotowała tę część rozprawy. Tutaj zostały omówione wyniki umieszczone w tle danych z szeroko cytowanego piśmiennictwa. Rozdział ten moim zdaniem jest napisany niezwykle starannie i rzetelnie. Nie zawiera zbędnych szczegółów ani długich nie merytorycznych wywodów przez co tworzy spójną i rzeczową dyskusję świadczącą o biegłości Doktorantki w literaturze przedmiotu, wnikliwości interpretacyjnej i dużej swobodzie poruszania się w wielu dziedzinach biochemii, mikrobiologii, biotechnologii medycznej. Chciałabym również pochwalić bardzo dobrą estetykę pracy doktorskiej, w szczególności to, że Doktorantka zastosowała starą maksymę chińską mówiącą, że „jeden obrazek jest wart stu słów”.

Podsumowaniem całej rozprawy jest osiem wniosków, sformułowanych w ostatnim rozdziale pracy, które w pełni dowodzą tezę.

Tematyka pracy stanowi szeroki zakres zagadnień, doktorantka uwzględniła wiele różnych czynników, mogących mieć wpływ na efektywność technologiczną wytwarzanie kwasu dokozaheksaenowego przez mikroglony z rodzaju *Schizochytrium sp.* z wykorzystaniem gliceryny technicznej. Z pewnością olbrzymia ilość danych uzyskanych w wyniku badań mogła przyczynić się do faktu, iż Autorce nie udało się uniknąć pewnych usterek. Zestawione poniżej uwagi edytorskie i redakcyjne, krytyczne oraz sugestie lub uwagi stanowiące podstawy do dyskusji, mogą w przypadku opublikowania dzieła w postaci monografii lub publikacji przyczynić się do poprawy jego jakości.

Uwagi edytorskie i redakcyjne

1. Cytowanie więcej niż dwóch pozycji literaturowych w tekście powinno wykazywać porządek alfabetyczny lub wg roku wydania.
2. Na rysunku nr 1 brak odpowiedniego indeksu przy rodniku w triglicerydzie, MeOH w chemii nieorganicznej to wodorotlenek metalu, unikałabym takiego skrótu.
3. Opis rysunków i tabel bardzo wyprzedza ich graficzne przedstawienie. W następnym akapicie po wystąpieniu powołania powinna znajdować się tabela lub rysunek. Można to jednak wytłumaczyć tym, iż Doktorantka nie jest na stałe związana ze środowiskiem naukowym.
4. Kilka pozycji literaturowych w bibliografii nie znajduje odpowiedników w tekście.
5. Brak powołania w tekście na rysunki 5, 8, tabelę 11.
6. Niezręczne sformułowanie kwaśny metanol, stężenie źródła azotu.

Uwagi, dotyczące zawartości merytorycznej rozprawy doktorskiej

1. W pracy wkradły się nieścisłości, ponieważ w zakresie podano, że określano wpływu parametrów technologicznych takich jak, prędkość mieszania, poziom zasolenia, stężenie makroelementów, stężenie mikroelementów, stężenie witamin na wydajność hodowli *Schizochytrium sp.* oraz efektywność wytwarzania DHA, w pracy brak jednak takich danych.
2. Czym kierowano się wybierając metodę Placketta-Burmana a nie metodę np. Boxo-Wilsonsą czy sieci neuronowe.
3. Czym wyjaśnić kontrolę stężenia technicznego glicerolu co 5 godzin w hodowli okresowej z zasilaniem i czy można było założyć, że w tym czasie jego stężenie obniża się do 60 g/dm³. Wobec tego było to zasilanie o stałym natężeniu czy zmiennym. Na rysunku 12 zaś jest, że dawkowano techniczną glicerynę co 4 godziny.
4. Prezentowane wartości na rysunku 16 nie odpowiadają omówionym wynikom.
5. Proszę o wyjaśnienie stężenie dodanej gliceryny technicznej podczas całego procesu w hodowli okresowej wyniosło 416,23 g/dm³ rysunek 12.
6. Bardzo ważnym elementem w takiej produkcji jest analiza ekonomiczna technologii o której Doktorantka wspomina we wstępie, w pracy zaś nie przedstawiono żadnych danych dotyczących analizy ekonomicznej. Jak ma się do pozyskiwania kwasu DHA w stosunku do ryb? Proszę o wyjaśnienie.

7. Optymalna temperatura wzrostu biomasy różni się od optymalnej temperatury wytwarzania DHA wobec tego jak rozwiązać te efektywnie.
8. W skali pilotażowej pojawiło się pienienie pożywki i dodano Anitofam. Czy wpłynął on na przebieg hodowli, szybkość wnikania tlenu.

Recenzowana rozprawa doktorska **mgr inż. Natalii Kujawskiej** prezentuje interesujące i cenne wyniki badań, zarówno wybrana tematyka, zastosowana metodyka, przeprowadzenie badań doświadczalnych z wykorzystaniem skali laboratoryjnej i pilotażowej oraz wnioski są poprawne i na dobrym poziomie merytorycznym a wszystko to świadczy o dużych umiejętnościach Doktorantki. Przedstawione uwagi w większości mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają one wartości rozprawy. Treść ocenianej pracy kwalifikuje **mgr inż. Natalię Kujawską** do ubiegania się o stopień doktora w dziedzinie nauk technicznych w dyscyplinie inżynieria środowiska.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymaganiom określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule sztuki (Dz. U. Nr.65 poz. 595) . Stawiam wniosek o przyjęcie pracy **mgr inż. Natalii Kujawskiej p.t. „Wytwarzanie kwasu dokozaheksaenowego przez mikroglony z rodzaju *Schizochytrium sp.* z wykorzystaniem gliceryny technicznej”** jako rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Autorki do publicznej obrony.

Manina Piękuhn