

Prof. dr hab. Jan Fiedurek
Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej
Zakład Mikrobiologii Przemysłowej
20-033 Lublin, ul. Akademicka 19

Lublin, 10. 02. 2016 r.

R E C E N Z J A

pracy doktorskiej mgr inż. Michała Pałysa

**pt.: „Mikrobiologiczna konwersja sacharydów do kwasu mlekowego przez nowo
wyizolowane szczepy grzybów z rodzaju *Rhizopus*”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Michała Pałysa, została wykonana w Katedrze Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Zdzisław Targoński.

Badania nad kwasem mlekowym mają długą i ciekawą historię. Po raz pierwszy został on odkryty w kwaśnym mleku przez szwedzkiego chemika Schelle w 1780 roku i uznany za składnik mleka. W 1890 roku Lavoisier nazwał ten składnik mleka „*Lactique acide*”, co przyczyniło się do obecnej terminologii kwasu mlekowego. Jednak w 1857 roku Pasteur odkrył, że nie jest on elementem mleka lecz jego metabolitem. W 1839 roku Fremmy otrzymał kwas mlekowy na drodze fermentacji różnych węglowodanów, takich jak sacharoza, laktoza, mannitol, skrobia i dekstryny. Pierwsza mikrobiologiczna komercyjna produkcja kwasu mlekowego rozpoczęła się w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej w 1881 roku.

Kwas mlekowy ma duże zastosowanie w przemyśle chemicznym i spożywczym. Jako chemiczny dodatek do żywności określany jest symbolem E270. Mleczan wapnia służy do produkcji syropów leczniczych i wielu leków oraz jako składnik proszków do pieczenia i pewnych rodzajów wyrobów cukierniczych. W tej formie służy on jako źródło łatwo przyswajalnego dla organizmu wapnia. Dodatek kwasu mlekowego jest korzystny w produkcji chleba typu "Graham" i niektórych innych rodzajów pieczywa pszennego. W przemyśle spożywczym może zastępować w produkcji lemoniad kwas cytrynowy i winowy. Kwas mlekowy używa się też do konserwowania mięsa i przetworów mięsnych oraz roślinnych. W rolnictwie jest wykorzystywany jako dodatek przy sporządzaniu pasz zwierzęcych. Dodatek kwasu

mlekowego do pasz zwierzęcych lub do wody pitnej zwiększa zdrowotność zwierząt, zmniejsza procent upadków, zapobiega biegunkom.

Jest on też używany w garbarstwie do odwapniania skór, w przemyśle włókienniczym służy jako zaprawa przy barwieniu tkanin niektórymi barwnikami. Czysty, bezbarwny kwas mlekowy stosuje się w procesie wyrobu niektórych mas plastycznych, zaś jego polimer daje biodegradowalne tworzywo wykorzystywane w formie opakowań przez przemysł spożywczy.

Mleczan żelazawy stosuje się w przemyśle farmaceutycznym, zaś mleczan sodowy jest używany w medycynie jako lek. Pszczelarze używają go do walki z roztoczem *Varroa destructor*.

Nowoczesne podejście do zagadnienia biotechnologicznej produkcji kwasu mlekowego zakłada zastosowanie produktów odpadowych generowanych przez różne gałęzie przemysłu, głównie spożywczego, jak również produktów rolnych. Do produkcji kwasu mlekowego wykorzystywane są surowce odnawialne tj.: surowce skrobiowe (ziemniaki, pszenica, kukurydza, kassawa, ryż, sorgo, żyto, owies, jęczmień), przemysłowe produkty odpadowe (melasa i serwatka), surowce celulozowe (słoma ryżowa, pszeniczna i kukurydziana) oraz włókna lucerny, drewno odpadowe, makulaturę. W tę tematykę wpisuje się doskonale rozprawa doktorska mgr inż. Michała Pałysa. Warto przy tym zaznaczyć, że podjęcie tego typu badań otwiera drogę do wykorzystania nowych substratów do produkcji kwasu mlekowego oraz opracowania wydajniejszej technologii jego produkcji.

Rozprawa obejmuje 230 stron maszynopisu, w tym 74 tabel i 54 rysunków. Praca jest napisana poprawnym i precyzyjnym językiem. Została zredagowana starannie, choć w tekście występuje wiele usterek językowych. Prezentacja graficzna wyników jest dobrej jakości i łatwa do analizy. Rozprawa ma strukturę typową dla prac doświadczalnych i zawiera komplet rozdziałów oraz odpowiednią dokumentację wynikową. Jest obszernym kilkuwątkowym opracowaniem i zawiera wszystkie wymagane dla rozprawy doktorskiej części, tzn. streszczenie, wstęp, cel pracy, metodykę, wyniki, dyskusję, wnioski, a ponadto spis publikacji oraz wykaz skrótów. Jest to materiał dobrze uporządkowany i dużo w nim praktycznych informacji oraz użytecznych przykładów. Na uznanie zasługuje także umiejętne stosowanie cytowań piśmiennictwa naukowego. W całej rozprawie cytowanych jest 162 prac, w zdecydowanej większości (prawie 73%) opartych na najnowszej literaturze z ostatnich 6 lat.

Rozdział *Wstęp* został napisany poprawnie pod względem formalnym i merytorycznym w oparciu o bogatą literaturę, związaną z problematyką recenzowanej rozprawy doktorskiej. Jest on dobrym uzasadnieniem podjętych zadań badawczych konsekwentnie realizowanych w kolejnych etapach pracy. Pierwszą jego część pracy stanowi przegląd literatury, który oceniam jako bardzo dobry, choć zbyt długi (47 stron). Autor przedstawił w nim takie zagadnienia jak: charakterystykę, wytwarzanie oraz wykorzystanie kwasu mlekowego; charakterystykę grzybów z rodzaju *Rhizopus*, biochemizm fermentacji mlekowej przy udziale tego grzyba, źródła węgla i azotu oraz odpady organiczne i produkty uboczne wykorzystywane do wytwarzania tego kwasu. Interesujące informacje zostały opracowane w rozdziale 2.10. dotyczące wpływu warunków hodowli na morfologię grzybów i wytwarzanie kwasu mlekowego (wartość pH podłoża hodowlanego, wielkość inokulum, napowietrzanie, wytrząsanie i temperatura hodowli). Kolejny rozdział dotyczy określenia wpływu immobilizacji na nośnikach naturalnych i syntetycznych grzybni z rodzaju *Rhizopus* na wytwarzanie kwasu mlekowego. W ostatnim rozdziale został poświęcony doborowi optymalnych warunków hodowli w/w grzybów w procesie wytwarzania kwasu mlekowego. Autor przedstawił tylko klasyczne metody optymalizacyjne, ale nie uwzględnił wszystkich najważniejszych metod wspomaganych techniką komputerową, jak sieci neuronowe, metodę ewolucyjną, systemy logiki rozmytej i algorytmy genetyczne. Niektóre z nich jak np. metoda *simplex* i *modified simplex* są stosunkowo proste i łatwe do użycia, znacząco zmniejszając czasochłonność procesów optymalizacyjnych.

W celu pracy Autor niepotrzebnie zawarł hipotezę, której nie mógł w pełni udowodnić z uwagi na niedostępność szczepów z kolekcji międzynarodowych. Jako cel swoich badań, Autor wyznacza selekcję najaktywniejszego szczepu z rodzaju *Rhizopus* w zakresie syntezy kwasu mlekowego z kolekcji zakładowej, ocenę wpływu źródła węgla i azotu oraz doboru parametrów hodowli (wartość pH podłoża hodowlanego, temperatura, napowietrzanie, obroty mieszadła, inokulum, immobilizacja grzybni). Jest to typowa praca biotechnologiczna związana z procesem mikrobiologicznej syntezy kwasu mlekowego.

W rozdziale *Materiały i metody badań* Autor przedstawił materiał doświadczalny, stosowane podłoża, odczynniki, sprzęt, warunki hodowli oraz metody analityczne. Są one opisane w sposób zwarty, zawiera wszystkie istotne informacje niezbędne do odtworzenia przeprowadzonych doświadczeń. Sposób ich prezentacji świadczy o dobrym warsztacie

biochemicznym i znajomości nowoczesnych metod analitycznych, szczególnie metod chromatograficznych.

Rozdziały *Wyniki badań* oraz *Dyskusja* Doktorant omówił oddzielnie, co nie jest sprawą łatwą w pracy o charakterze wielowątkowym. Nie ustrzegł się przez to konieczności powtórzenia części wyników w dyskusji dla prezentacji kolejnego zadania badawczego. Wyniki przedstawił na 93 stronach. Wszystkie uzyskane wyniki zostały skrupulatnie opisane i udokumentowane w 74 tabelach i 54 rysunkach. W obszernej dyskusji Doktorant kładzie nacisk na porównanie uzyskanych wyników z danymi opisanymi w literaturze. Przedstawia także własne poglądy i rozwiązania, które analizuje w oparciu o cytowane piśmiennictwo.

Wnioski i stwierdzenia (rozdział 7 rozprawy doktorskiej) zostały ujęte w 12 punktów. Mając na uwadze szeroki zakres pracy i ilość uzyskanych wyników, liczba wniosków nie budzi zastrzeżeń, chociaż według mojej oceny są zbyt szczegółowe.

Za najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej mgr Michała Pałysa uważam wykorzystanie po raz pierwszy jabłek, soków owocowych i syropu pszenicznego jako składników podłoża hodowlanego w produkcji kwasu mlekowego przez *Rhizopus oryzae*. Stwarza to możliwość rozszerzenia bazy surowców w procesie produkcji kwasu mlekowego.

Uwagi merytoryczne

- W opinii recenzenta zbędne są podrozdziały 5.2 i 5.3., różniące się tylko stężeniem sacharydów w podłożach (od 50 do 150 g/l);
- cennym uzupełnieniem badań byłoby określenie aktywności enzymów tj.: inwertaza, pektynaz (PG i PE), amylaz (alfa- i glukoamylazy), co pozwoliłoby na określenie korelacji między tymi aktywnościami tych enzymów a aktywnością w zakresie wytwarzania kwasu mlekowego;
- niejasne dla recenzenta jest, dlaczego Autor nie wybrał najaktywniejszego szczepu i nie zoptymalizował warunków do syntezy kwasu mlekowego na najwydajniejszym źródle węgla i azotu;
- jaka jest tolerancja *Rhizopus oryzae* na kwas mlekowy?
- jakość zdjęć na rys. 52 i 53 jest słabo czytelna, nie ma możliwości stwierdzenia w jakiej formie grzybnia rośnie w hodowli wytrząsanej i w bioreaktorze. Korzystniejsze byłyby zdjęcia z płytki Petriego lub z użyciem mikroskopu;
- w kolejnych etapach badań określono wpływ określonych parametrów hodowli (pH,

temperatura, źródło węgla i azotu, czas hodowli) lecz wyniki te nie zawsze zostały uwzględnione w dalszych etapach pracy;

- cennych informacji mogłoby dostarczyć przeliczenie wydajności kwasu mlekowego na gram suchej masy grzybni;
- na formę wzrostu morfologicznego duży wpływ ma też lepkość podłoża, dlatego parametr ten powinien być uwzględniony w dalszych badaniach;
- w trakcie długotrwałej hodowli (144 godz.) podłoże odparowuje, jednak brak informacji w pracy na ten temat, gdyż zagęszczone podłoże wpływa na zawyżenie wyników oznaczeń kwasu mlekowego;
- niezrozumiały jest opis intensywności napowietrzania w bioreaktorze (0,1-1,5 ml/dm³ podłoża – str. 80), brak informacji w jakim czasie? Czy nie jest to za zbyt niska intensywność? Jakie więc było stężenie tlenu w bioreaktorze podczas syntezy kwasu mlekowego?
- brak informacji dotyczących wpływu mieszania mechanicznego (300 obr./min.) na trwałość unieruchomionej grzybni;
- z pewnością wykorzystanie metody *simplex* lub *modified simplex* przyczyniłoby się znacząco do zmniejszenia ilości analizowanych prób oraz ograniczyłoby czasochłonność procesów optymalizacyjnych.

Uwagi redakcyjne

Praca jest napisana poprawnym i zrozumiałym językiem. Niemniej Autor nie uniknął błędów i pomyłek. Oto niektóre z nich:

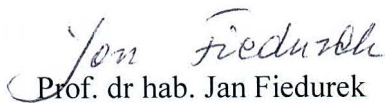
- na str. 20 i 30, Rys. 3 i 7 - powinny zawierać polskie opisy;
- na str. 37 - jest Wajsman - powinno być: Waksman;
- na str. 98 - jest: najwyższe wartości dynamiki produkcji kwasu mlekowego w podłożu - co to znaczy?
- na str. 107 - jest: „Interakcja badanych szczepów *Rhizopus* z rodzajem sacharydu” - co to znaczy? Podobnie na str. 153: „temperatura oraz jej współdziałanie z odpowiednim szczepem”.
- na str. 113 - jest: „w substracie skrobi” - powinno być: przy użyciu substratu skrobiowego;
- na str. 166 - jest: „odczyn podłoża” - powinno być: wartość pH;

- na str. 165 - jest: „grzybni strzępiastej” - powinno być: grzybni nitkowatej;
- na str. 178 - jest: „komórek grzybów immobilizowanych nośnikami kostek poliuretanowych” - powinno być: grzybni immobilizowanej na poliuretanowych kostkach;
- na str. 191 - jest: „zastosowano surowce skrobiowe takie jak...jabłka, sok jabłkowy, sok winogronowy” - czy można je zaliczyć do surowców skrobiowych?
- na str. 197 - jest: „dostępne piśmiennictwo potwierdza wyniki badań własnych” – powinno być: wyniki badań własnych są zgodne z uzyskanymi wcześniej przez innych autorów”.

Przytoczone powyżej uwagi i pytania (usterki) nie umniejszają w sposób istotny wartości pracy, są jedynie wskazówkami do ewentualnego wykorzystania w/w wyników do publikacji.

Reasumując moją ocenę stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalną, wartościową pracę badawczą, na co składają się takie elementy jak: interesująca tematyka badawcza, osiągnięcie założonych celów badawczych, prawidłowo przeprowadzone eksperymenty, z małymi wyjątkami poprawna metodyka badań, prawidłowo sformułowane wnioski. Omówienie i dyskusja wyników badań wskazują na umiejętność Doktoranta do formułowania i weryfikacji hipotez oraz logicznego rozumowania. Założenie tak obszernego zakresu badań, charakteryzujących się dużą złożonością, wymagało od Doktoranta opanowania i umiejętności zastosowania różnorodnych metod mikrobiologicznych, jak i technik analizy biochemicznej. Poznanie przez mgr Michała Pałysa tak szerokiego wachlarza metod analitycznych wzbogaciło niewątpliwie jego warsztat badawczy.

W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska mgr Michała Pałysa pt.: „Mikrobiologiczna konwersja sacharydów do kwasu mlekowego przez nowo wyizolowane szczepy grzybów z rodzaju *Rhizopus*”, wykonana pod kierownictwem jest prof. dr hab. Zdzisława Targońskiego, spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i z pełnym przekonaniem przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr Michała Pałysa dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Jan Fiedurek