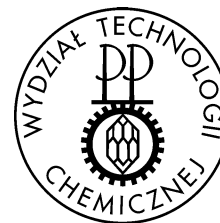




**POLITECHNIKA POZNAŃSKA**  
**INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ**  
Berdychowo 4, 60-965 Poznań  
tel. 61 665-37-16, fax 61 665 36 49  
e-mail: lukasz.chrzanowski@put.poznan.pl  
*dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski*  
*Zakład Chemii Organicznej*



Poznań, 30.03.2017

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej mgr inż. Piotra Kubiaka**  
**pt. „Biokonwersja glicerolu do 1,3-propanodiolu przez *Clostridium butyricum* w fermentacjach ciągłych z recykulacją i bez recykulacji komórek”**

Oceniana praca doktorska została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Włodzimierza Grajka.

**Podstawa wykonania recenzji**

Recenzję wykonałem w oparciu o uchwałę Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 28 kwietnia 2016 roku, a także pisma Pani dr hab. Bożeny Danyluk, Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 23 lutego 2017 roku oraz dostarczonego egzemplarza pracy doktorskiej.

**Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej**

Wzrastającą świadomość ekologiczną wraz z rozporządzeniami prawnymi doprowadziły do masowej produkcji paliw bazujących na źródłach odnawialnych. Wśród nich największe znaczenie mają estry metylowe lub etylowe wyższych kwasów tłuszczowych, potocznie nazywane biodieslem. Paliwo to otrzymuje się najczęściej z nasion roślin oleistych, jakkolwiek produkcja z tłuszczu zwierzęcych jest również realizowana. W każdej strefie klimatycznej bez trudu można wytypować wydajne rośliny, które dostarczą nam surowca do produkcji biodiesla. Niezależnie jednak od materiału wyjściowego, biodiesel pierwszej generacji produkowany jest z wykorzystaniem reakcji transestryfikacji, w wyniku czego powstają pożądane estry metylowe lub etylowe kwasów tłuszczowych oraz glicerol. O ile sam biodiesel jest praktycznie od razu rozdysponowany, o tyle zagospodarowanie wygenerowanego glicerolu pozostaje kwestią otwartą. Oczywistym odbiorcą wydaje się być przemysł kosmetyczny, jednak nawet on nie jest w stanie wykorzystać ogromnych ilości glicerolu wytwarzanego przy produkcji biodiesla. Co więcej, nierównomierny skład frakcji glicerynowej i jego różna zawartość powoduje szereg problemów, przez co wiele firm nie decyduje się na korzystanie z odpadowego glicerolu. Dość szybko jednak zaczęto dostrzegać potencjał glicerolu, jako substratu dla procesów biotechnologicznych. Przez ostatnie lata środowisko naukowe w sposób szczególnie intensywny bada i opracowuje nowe sposoby wykorzystania glicerolu i jego biokonwersje do bardziej pożądanych związków chemicznych.

Tematyka badawcza podjęta przez Pana mgr inż. Piotra Kubiaka doskonale wpisuje się w nowoczesne technologie zmierzające do najbardziej efektywnego wykorzystania substratów, które jeszcze stosunkowo niedawno temu traktowano by jako zło konieczne i utylizowano w każdy możliwy sposób. Doktorant zwrócił swoją uwagę w stronę przemysłu tworzyw sztucznych, który w ostatnich dwudziestu latach dostrzegł

potencjał 1,3-propanodiolu do otrzymywania między innymi nowatorskich poliestrów. Bardzo szybko do chemicznych metod wytwarzania tego diolu dołączyły również metody biotechnologiczne, a wśród nich biokonwersja glicerolu przez bakterie *Klebsiella pneumoniae* lub *Clostridium butyricum*. Sam proces może być realizowany na szereg sposobów, jednak Doktorant szczególną uwagę skierował na fermentację ciągłą. O ile sam proces wzmiankowany jest na łamach literatury światowej, o tyle jego dokładne opisanie wraz z optymalizacją nadal pozostają kwestiami otwartymi i nadal wymagają wnikliwych analiz. Stąd też badania podjęte w niniejszej pracy doktorskiej posiadają elementy nowości naukowej, a przede wszystkim duży potencjał aplikacyjny.

### Formalna ocena pracy doktorskiej

Praca doktorska rozpoczyna się trzystronicowym spisem treści. Następnym elementem jest półtorastronicowe streszczenie w języku polskim oraz analogiczne streszczenie w języku angielskim. Na kolejnych 20 stronach doktorant w sposób bardzo skondensowany przedstawił aktualny stan wiedzy. Wykorzystał w tym celu starannie wyselekcjonowane prace z ostatnich 20 lat, przy czym dominują prace z ostatniego dziesięciolecia. Należy pochwalić doktoranta, gdyż nie często spotyka się tak dobre podsumowanie aktualnego stanu wiedzy, na tak niewielu stronach. Przy czym wszystkie interesujące i ważne aspekty, z punktu widzenia tematyki badawczej doktoranta, zostały opisane i podsumowane.

Cała praca bazuje na 154 pozycjach literaturowych. Podczas cytowania doktorant stosuje wersję: Autor i inni. Recenzent przychyliła się do wersji Autor i wsp., która chyba trafniej koresponduje z ideą bycia współautorem pracy naukowej.

Rozprawa doktorska napisana jest na ogół poprawnym stylistycznie językiem, jednak zyskałaby po przeprowadzeniu niewielkiej korekty edytorskiej. W przedstawionej do recenzji wersji można odnaleźć drobne uchybienia, a wśród nich najbardziej rzuca się w oczy niejednolity sposób zapisu miar. Czasami wartości liczbowej towarzyszy symbol, a czasami symbol przedzielony jest spacją. Zgodnie z wytycznymi Rady Języka Polskiego powołanej przez Prezydium Polskiej Akademii Nauk uchwałą nr 17/96 z dnia 9 września 1996 r. zalecana jest następująca reguła „zapisu oznaczeń wartości fizycznych i matematycznych: **między wartością liczbową a literowym oznaczeniem miary, czyli skrótem lub skrótowcem, stawiamy spację, natomiast między wartością liczbową a oznaczeniem miary za pomocą symbolu albo połączenia skrótu/skrótowca i symbolu spacji nie stawiamy.** Poprawny zapis to zatem: np. 5 proc., 5 m, 5 s, 20 V, 13 Ω, 7,5 rd, 10,5 rad, 98 Hz oraz 5% (nie: 5 %, choć: 5 proc.), 3‰ (nie: 3 ‰), 10°C (nie: 10 °C ani 10 ° C), 212°F (nie: 212 °F ani 212 ° F), 3' (nie: 3 '), 35" (nie: 35 ") , 25g (nie: 25 g) itd.”

Wybrane usterki przedstawiono poniżej:

- str. 7 „... z wykorzystaniem bioreaktor membranowy.” – błąd stylistyczny
- str. 19 „... finalnego stężenia ...” – raczej końcowego stężenia
- str. 24 „W środowisku drobnoustroje występują w postaci konsorcjów ...” – raczej w postaci społeczności. W obrębie społeczności mogą występować konsorcja – ale nie muszą. Dokładne definicje wraz wyjaśnienie różnic można znaleźć w **Manual of Environmental Microbiology**, Third edition, ASM Press, Washington 2007, USA, str. 101-103 – rozdział - **Cultivation of Microbial Consortia and Communities**, Wolfaardt i wsp.
- str. 32 „Magnezu (II) siarczan, siedmiowodny” – prawidłowy zapis to siarczan (VI) magnezu, przy czym uwodnienie można zapisać jako x7H<sub>2</sub>O
- str. 34 „... funkcjonowania finalnej wersji ...” – raczej końcowej
- str. 63 „... wykazywał wysoka produkcja kwasów ...” – błąd stylistyczny

Elementem, który warto wyróżnić, jest wyraźnie sformułowana hipoteza badawcza. Wynika ona bardzo ściśle ze studiów literaturowych, dzięki czemu Doktorant odnalazł swoją niszę badawczą, a przede wszystkim uzasadnił konieczność prowadzenia badań we wskazanym przez siebie kierunku.

Kolejnym elementem pracy jest spis materiałów i metod wykorzystanych podczas eksperymentów. Ta część jest na ogół przedstawiona w sposób jasny, jednakże zdecydowanie korzystniej przedstawić pełen opis każdej procedury analitycznej wraz z opisem sposobu poboru próbek, objętością pobranych próbek i procedurą

szczegółowego postępowania – bez powoływania się na analogiczną procedurę z punktu poprzedniego. Pełen opis jest zawsze łatwiejszy do szybkiego zweryfikowania. Przykładowo na str. 37 Doktorant opisuje procedurę oznaczania wewnątrzkomórkowego pH: „Przygotowania próby dokonano identycznie, jak w przypadku analiz integralności membran komórkowych. Do próby dodawano ...”. W punkcie: 3.4.3.1. Integralność membrany komórkowej podano: „Próby pobrane z bioreaktora były wirowane ... Do 400  $\mu$ L próby dodawano ...” Pojawia się więc pytanie jakiej objętości próby pobierano pierwotnie z bioreaktora ? Są to oczywiście pytania, z którymi Doktorant poradzi sobie bez problemu i udzieli wyczerpujących odpowiedzi, jednak opis procedur powinien wyeliminować tego typu pytania. Dyskusje powinny przebiegać raczej w kierunku właściwego doboru konkretnej metody a nie szczegółów o objętość wyjściową próbek, która może mieć lub nie mieć znaczenia.

Nie jest natomiast jasnym opis zastosowanego mikroorganizmu. Czy jest to nowy szczep wyizolowany przez Doktoranta ? Czy może jest to szczep przekazany do badań ? W każdym przypadku charakterystyka szczepu jest zbyt lakoniczna, a biorąc pod uwagę fakt, że mikroorganizm jest równie kluczowy jak sama instalacja, powinien być opisany w sposób bardziej szczegółowy.

W dalszej części pracy Doktorant przystąpił do opisu otrzymanych wyników. Tekst jest bardzo czytelny i bez problemu pozwala prześledzić kolejne doświadczenia. Podczas wnikliwej lektury Recenzentowi nasunęły się pewne sugestie oraz pytania.

- Czy zdaniem Doktoranta nie byłoby korzystniej wybrać kilka szczepów (np. 3, wśród nich szczep referencyjny – opisany w literaturze) i przeprowadzić porównanie efektywności produkcji 1,3-propanodiolu w optymalnych warunkach ? Ewentualnie z jednym szczepem przebadać różne metody hodowli ? Jest to o tyle zasadne, że trudno odnieść wyniki Doktoranta do wyników uprzednio opisanych w literaturze.
- Czy zakładając, że parametry przebadane w ramach niniejszej pracy można opisać za pomocą funkcji ściśle monotonicznych – dlaczego nie przeprowadzono optymalizacji działania układu w oparciu o prosty model ? Byłoby to stosunkowo łatwe a dodatkowo praca zyskałaby na wartości.
- Dlaczego w pracy nie podjęto próby zbilansowania układu ? W tym miejscu warto zauważyć, że wydajność produkcji wybranych metabolitów powinna być podawana z taką samą liczbą cyfr znaczących. Bilans układu jest zdecydowanie niezbędny z punktu widzenia ekonomii procesu – o czym zresztą wspomina autor na stronie 23.
- Jakie inne metabolity powstawały w procesie – oprócz kwasów mlekowego, octowego i masłowego ?
- Czy Doktorant nie brał pod uwagę wykorzystania pochłaniacza tlenu – aby wykluczyć przypuszczalny wpływ tlenu na spadek efektywności fermentacji z recyrkulacją komórek ?
- Czy zdaniem Doktoranta analiza wewnątrzkomórkowego pH ma praktyczne znaczenie i może być w przyszłości stosowana jako wskaźnik wyboru technologii ?

Elementem, który należy wyróżnić, jako najbardziej interesujący i stanowiący o unikalności pracy są badania stanu fizjologicznego populacji komórek z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Chodzi przede wszystkim o analizę integralności membrany komórkowej oraz aktywności metabolicznej. Jednakże potencjał tych badań nie został do końca wykorzystany. Analizując literaturę światową można zauważyć, że tego typu badania są bardzo rzadko podejmowane, a w odniesieniu do tematu niniejszego doktoratu, praktycznie nigdy, co tym bardziej podnosi rangę przeprowadzonych przez Doktoranta badań.

Ostatnim elementem pracy jest dyskusja wyników, która została przeprowadzona w sposób wnikliwy. Doktorat dojrzałe analizuje swoje wyniki w odniesieniu do wyników uzyskanych przez innych naukowców. Dyskusja jest zwarta, konkretna i prowadzi do bardzo dobrych wniosków.

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską wyróżnić należy bardzo duży wkład własnej pracy Doktoranta. Zdecydowanie widać, że jest to praca przemyślana, wymagająca umiejętności praktycznych, oraz doskonale zinterpretowana. Pomimo pewnych uwag i sugestii bardzo wysoko oceniam ją pod względem merytorycznym.

## Wniosek końcowy

Analizując niniejszą pracę doktorską pod kątem aktualności i oryginalności podjętych badań można z całą pewnością stwierdzić, że Autor z sukcesem odnalazł swoją niszę badawczą, a zrealizowane przez Niego badania będą interesujące dla szeregu naukowców zainteresowanych biokonwersją glicerolu do użytecznych chemikaliów.

Reasumując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr inż. Piotra Kubiaka pt. „**Biokonwersja glicerolu do 1,3-propanodiolu przez *Clostridium butyricum* w fermentacjach ciągłych z recyrkulacją i bez recyrkulacji komórek**” oceniam bardzo pozytywnie oraz stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim {określone w art. 31 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595 z późn. zm.) i 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 wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Piotra Kubiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski