

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Elwiry Komoń-Janczary pt. „Doskonalenie procesu biosyntezy kwasu fumarowego przez grzyby z rodzaju Rhizopus” w związku z powierzeniem przez Radę Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie obowiązku recenzenta

Rozprawa doktorska pt. „Doskonalenie procesu biosyntezy kwasu fumarowego przez grzyby z rodzaju Rhizopus” została wykonana w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii w Lublinie pod kierunkiem prof. dr. hab. Zdzisława Targońskiego oraz promotora pomocniczego dr. inż. Adama Kuzdralińskiego. Rozprawa dotyczy optymalizacji procesu wytwarzania kwasu fumarowego przez wybrane grzyby z rodzaju Rhizopus na podłożach zawierających surowy glicerol odpadowy. Przygotowana została w oparciu o wyniki otrzymane podczas realizacji grantu „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych” pozyskanego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (2007-2012).

Przedstawiona rozprawa charakteryzuje się układem typowym dla tego typu prac i obejmuje następujące części: Spis treści, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Przegląd literatury, Hipotezę badawczą i cel pracy, Materiały i metody badań, Wyniki badań, Dyskusję, Wnioski i stwierdzenia, Bibliografię, Spis tabel i Spis rysunków. Praca liczy aż 199 stron.

Tytuł rozprawy jest bardzo pojemny, ale nie wskazuje na jej główny cel/osiągnięcie. Autorka podkreśla, np. w dyskusji, że zagadnienia poruszane w pracy są tożsame z założeniami grantu Zielona Chemia, a nie ma to odzwierciedlenia w tytule.

We **Wstępie** (2 strony) Autorka poprawnie zarysowała przesłanki, które skłoniły ją do podjęcia badań, zwracając szczególną uwagę na, z jednej strony, wzrastające

zapotrzebowanie na kwas fumarowy wykorzystywany głównie w przemyśle spożywczym i chemicznym, a z drugiej, na rosnące koszty surowca i koszty środowiskowe dotychczasowej metody produkcji tego związku opartej na ropie naftowej. Przedstawiła też główne kierunki swoich badań. Myślę jednak, że powinny być one zarysowane bardziej przejrzysto i z mocniejszym podkreśleniem elementów nowości.

Przegląd literatury dobrze wprowadza czytelnika w temat rozprawy. Pokazuje, że Autorka zapoznała się z dostępną, aktualną literaturą (**Bibliografia** obejmuje aż 233 pozycje, w większości pochodzące z ostatnich 30 lat) i postarała się zarysować szerokie tło dla wyników swojej pracy. Tekst wzbogacają w większości dobrze dobrane elementy graficzne i tabele. Część ta obejmuje 48 stron i składa się z pięciu rozdziałów. W pierwszym, Autorka ogólnie omawia grzyby z rodzaju *Rhizopus*, po czym, w trzecim, wraca do tematu, przedstawiając *Rhizopus* sp. jako głównego producenta kwasu fumarowego. Taka kolejność wydaje się niewłaściwa i wprowadza niepotrzebne zamieszanie. Wydaje się, że lepiej byłoby zacząć konwencjonalnie, od części charakteryzującej kwas fumarowy i jego zastosowanie (bo to jego dotyczy praca) (rozdział 2), a następnie dopiero zająć się producentem. Dodatkowo, podrozdział „Wykorzystanie grzybów z rodzaju *Rhizopus*” nie wydaje się konieczny, bo nie wiąże się bezpośrednio z tematem pracy, zamiast tego można było więcej uwagi poświęcić fizjologii tych grzybów. Autorka przeznaczyła na to tylko jeden krótki akapit (str. 13), dodatkowo jakby wyrwany z kontekstu. Kolejny rozdział to charakterystyka kwasu fumarowego, opis metod jego otrzymywania i oczyszczania oraz przedstawienie zastosowania kwasu w różnych gałęziach przemysłu. W trzeciej części, Autorka opisuje grzyby *Rhizopus* pod kątem produkcji kwasu fumarowego (chemotypy, szlaki biosyntezy, transport kwasu). W kolejnym rozdziale przedstawia wpływ warunków prowadzenia hodowli na metabolizm *Rhizopus* i wytwarzanie kwasu fumarowego. Rozdział 5. opisuje strategie prowadzące do intensyfikacji mikrobiologicznej produkcji kwasu fumarowego. Niedociągnięciem w tej części pracy są niezbyt jasno i treściwie opisane „Modyfikacje genetyczne i inżynieria metaboliczna” w rozdz. 2.5.1., a także bardzo enigmatyczny opis, w podrozdziale 2.5.2.2., hodowli z jednoczesnym scukrzaniem, a w podrozdz. 2.5.2.4. – badań nad kontrolą pH.

Ogólnie **Przegląd literatury** jest napisany ciekawie i dość poprawnie, jednak Autorka nie ustrzegła się też błędów. Część z nich to błędy natury językowej (gramatyczne, fleksyjne,

stylistyczne, interpunkcyjne), które czasami utrudniają czytanie i zrozumienie tekstu, jak np. w zdaniu ze str. 19: „Komercyjnie, na skalę światową, kwas fumarowy otrzymywany jest w procesie izomeryzacji kwasu maleinowego uzyskanego z bezwodnika maleinowego (*powinno być: powstałego/otrzymanego*) na drodze utleniania butanu...” lub ze str. 46 „o ile proces kiełkowania zarodników grzybów może przebiegać w szerokim zakresie pH (..), o tyle najintensywniejszy wzrost (*czego?*) obserwuje się w pH zbliżonym do obojętnego”. Takich niejasnych stwierdzeń jest w całej pracy więcej. Inna grupa to błędy lub nieścisłości merytoryczne, których przykłady to:

- w rozdziale 2.1.1.1. – apofiza nie jest dokładnie tym, co podano, a bezpłciowe zarodniki *Rhizopus* są wytwarzane wewnątrz sporangium, a nie na nim.

- w rozdz. 2.3.2., str. 33 – mylące lub błędne opisanie funkcji kluczowych enzymów cyklu Krebsa, dehydrogenazy jabłczanowej i fumarazy, poprzez przypisanie im funkcji, jaką pełnią w reduktywnym TCA. Dodatkowo, Rys. 2.7 powinien być lepiej opisany.

Hipoteza badawcza i cel pracy sformułowane są dość poprawnie. Natomiast cele szczegółowe powinny być bardziej zapisem tego, do czego dążyła Autorka, a nie jak to robiła.

Materiały i metody badań opisane są na 21 stronach i zawierają wszystkie typowe dla tego rodzaju prac elementy. Używane grzyby, podłoża, odczynniki itp. wymienione i scharakteryzowane są w tabelach. Moim zdaniem brakuje tylko dokładniejszej charakterystyki używanych gliceroli odpadowych. Stosowane metody są adekwatne do założonych celów. Opisano dość szczegółowo metodykę prowadzenia hodowli wytrząsanych i bioreaktorowych, natomiast w części dotyczącej analizy filtratów pochodzących metodą HPLC przedstawiono jedynie oznaczanie kwasu fumarowego. Nasuwa się też pytanie, czy niedodawanie CaCO_3 do hodowli przeznaczonych do oznaczania suchej masy nie zmieniło ich przebiegu i w rezultacie czy wyniki można odnieść do hodowli z węglanem?

Wyniki badań przedstawiono na 57 stronach. Autorka podzieliła je na 8 części. W pierwszej i drugiej podaje wyniki badań zmierzających do wyboru szczepów nadprodukcujących kwas fumarowy, które będą używane w dalszych eksperymentach, w tym identyfikacji taksonomicznej zgromadzonych 90 przedstawicieli *Rhizopus* sprowadzonych z kolekcji zagranicznych, kolekcji krajowej oraz izolatów środowiskowych zebranych w ramach grantu. Tutaj nasuwa się pytanie, czy było to konieczne w stosunku do szczepów *R. oryzae* z

renomowanych kolekcji zagranicznych? Dla tych szczepów całkowicie potwierdzono przynależność gatunkową, w przeciwieństwie do szczepów z kolekcji krajowej, dla których wykazano, że należą do *R. oryzae*, nie *R. stolonifer* jak podawano. Przeważająca większość izolatów też zaliczała się do tego ostatniego gatunku. Następnie, na podstawie testu hodowlanego wykonanego dla każdego przedstawiciela *Rhizopus*, określono główny metabolit, kwas mlekowy (23 z 43 *R. oryzae*) lub kwas fumarowy (reszta *R. oryzae* i wszystkie izolaty). Wyniki te, w 6 na 90 przypadków, nie pokryły się z wynikami analizy obecności genów kodujących funkcjonalną i niefunkcjonalną formę dehydrogenazy mleczanowej. Dla wybranych *R. oryzae* (10, 1:1 wytwarzające i niewytwarzające kwas fumarowy) określono profil metaboliczno-genetyczny w celu sprawdzenia możliwości usprawnienia w ten sposób skriningu producentów kwasu. Z opisu wyników i dyskusji, nie do końca można wywnioskować, czy wyniki te znalazły zastosowanie w dalszych badaniach. W części trzeciej Autorka omawia wyniki badań dotyczących wpływu temperatury hodowli na wzrost wybranych 10 szczepów na podłożach stałych: PDA, zawierających glukozę lub glicerol o różnej czystości lub ich połączenie. Potwierdzono poprawność wcześniej otrzymanych wyników pokazujących, że optymalna temperatura wzrostu dla grzybów z terenu Polski to 30°C (silna ujemna korelacja między temp. a szybkością wzrostu grzybni), a dla pochodzących z zagranicy to 35-37°C (zróżnicowana, dodatnia korelacja w zakresie temp. 30-35°C). W części czwartej przedstawiono wyniki hodowli wybranych 2 *R. oryzae* i 2 *R. stolonifer* (nie podano kryterium wyboru) na glicerolu czystym i trzech bliżej niescharakteryzowanych glicerolach odpadowych. Najwyższe stężenia kwasu fumarowego uzyskano dla szczepu wzorcowego R-22 i nowego R-45 na surowym glicerolu odpadowym. Stężenia te nie były satysfakcjonujące, więc kolejne doświadczenia prowadzono z dodatkiem glukozy lub syropu pszenicznego jako dodatkowych źródeł węgla. W rezultacie osiągnięto 1,5-krotny wzrost stężenia kwasu oraz dowód na możliwość zastosowania tańszego źródła węgla. Kolejna część rozprawy to badania nad optymalizacją źródła azotu. Autorka przeprowadziła szereg hodowli, stosując różne nieorganiczne i organiczne źródła azotu, ale także różne źródła węgla i różne szczepy. Tutaj nasuwa się pytanie, z jakich powodów często zmieniano zestaw szczepów, które używano w kolejnych doświadczeniach optymalizacyjnych, np. pomijając potencjalnego, nowego producenta R-45? Lekturę tej części wyników, jak i zresztą wszystkich pozostałych, znacznie ułatwiłoby umieszczenie po każdej partii doświadczeń krótkiego podsumowania, konkluzji, która byłaby punktem wyjścia

dla następnego kroku w badaniach. Również przedstawianie wyników w postaci rozbudowanych tabeli nie ułatwia zapoznania się z nimi, np. nie do końca widać z czego wynika, podkreślany w Dyskusji, wybór układu fruktoza-glicerol. Kolejne wyniki pokazują, jaki wpływ na wytwarzanie kwasu ma zwiększenie o kilka stopni temperatury hodowli grzybów dokonywane po okresie namnażania biomasy. W tym badaniu nie wykonano jednak kontroli, co w połączeniu z dość dużymi różnicami badanych parametrów pomiędzy poszczególnymi hodowlami, nie pozwala wyciągnąć wiążących wniosków. Ostatnia część Wyników to podsumowanie badań nad intensyfikacją produkcji kwasu fumarowego w hodowlach bioreaktorowych. Jak pisze Autorka, hodowli tych przeprowadzono ponad 200 i prowadzone były częściowo równoległe z hodowlami wytrząsanymi, więc niełatwo było przedstawić ich rezultaty. Z opisu wyłania się przede wszystkim ogrom problemów, z którymi trzeba było się zmierzyć, ale także i konkretne rozwiązania, które prowadzą do zwiększenia opłacalności produkcji kwasu fumarowego przy użyciu grzybów *Rhizopus*. Rozwiązania takie jak zastosowanie glicerolu jako jedyne źródła węgla i niskiego pH do namnażania grzybnicy; syrop glukozowo-fruktozowy jako kosubstrat zastosowany w hodowli okresowej z zasilaniem; rodzaj i sekwencja użycia źródeł azotu, specyficzny sposób regulacji pH oraz jednoetapowy proces hodowli składają się na zaproponowaną przez Autorkę strategię zastosowaną z sukcesem w hodowli pilotażowej szczepu R-45. Co prawda wysokiemu końcowemu stężeniu kwasu nie towarzyszyła wysoka wydajność i produktywność, a ponadto nie wiadomo jak powtarzalne są uzyskane wyniki, ale jest to dobry punkt wyjścia dla dalszych badań.

W podsumowaniu **Wyników** trzeba zwrócić uwagę na duży wkład pracy Autorki związany z szerokim zakresem badań optymalizacyjnych. W rezultacie otrzymała cenne wyniki, które poszerzają wiedzę i mogą przyczynić się do wznowienia mikrobiologicznej produkcji kwasu fumarowego. Trzeba stwierdzić, że tego typu badania są dość niewdzięcznym materiałem do prezentacji, stąd pewnie sposób ich przedstawienia pozostawia nieco do życzenia. Zaobserwowane niedociągnięcia to zdarzająca się Autorce chaotyczność i nieprzejrzystość opisu oraz dyskusyjny podział treści na rozdziały.

Uwagi szczegółowe:

1. Opis wyników na str. 88 nie zgadza się z Rys. 5.2 i 5.3; w tekście brak odniesienia do Rys. 5.3.

2. Niejasne, niepoparte wynikami stwierdzenia, np. „Szczepy, u których analiza genetyczna wskazywała zdolność do produkcji kwasu mlekowego w żadnym z testowanych układów hodowlanych (z wykorzystaniem różnych źródeł węgla i azotu) nie wykazywały produkcji tego kwasu w nadmiarze” (str. 95).
3. W rozdziale 5.3 nie znalazłam wyników hodowli na podłożach płynnych, wspomnianych w tytule.
4. Rys. 5.8 i 5.9 – zamiana kolorów jest myląca; Rys. 5.10 nic nie wnosi, jest słabej jakości i pozostał bez konkluzji; niezgodność podpisów z Rys. 5.14 i 5.15; błędy i słaba organizacja tabeli 5.24. Na rysunkach dotyczących hodowli bioreaktorowych warto by było podać wartości pH.
5. Przydatny schemat badań bioreaktorowych na str. 78, nie znalazłam jednak wyników wspomnianych doświadczeń z ograniczeniem dostępu światła.
6. Błędy językowe i literówki.

Dyskusja uzyskanych wyników jest obszerna (22 str.). Z jej lektury widać, że Autorka dobrze orientuje się w literaturze, ale niestety nie do końca potrafi syntetycznie i przejrzysto zaprezentować wyniki własnych badań - ich opis jest raczej źródłem licznych pytań niż odpowiedzi. Szczególnie dużo jest w tej części pracy niejasnych, niepopartych wynikami stwierdzeń, są również błędy językowe, a nawet merytoryczne.

Uwagi szczegółowe i pytania:

1. Przykłady niejasności:

Niejasne stwierdzenia na temat przydatności danych z badań z wykorzystaniem technik biologii molekularnej (str. 151) - w jakim stopniu wykorzystano ich wyniki w skryningu producentów kwasu fumarowego? Czy w literaturze są przykłady na takie zastosowanie?;

Co oznacza „relatywnie pozytywny wpływ substancji uznawanych za zanieczyszczenie glicerolu na wzrost grzybni w wyższych temperaturach inkubacji” (str. 154)?;

Co Autorka miała na myśli pisząc, w kontekście poprzednich i następnych zdań, na str. 155 „Interakcje zachodzące między składnikami po degradacji dużych złożonych cząsteczek a

systemem transportu substratów do komórek mikroorganizmu mogą wpłynąć na wydajność produkcji poprzez jej podniesienie lub, częściej, poprzez jej obniżenie”?;

Co oznacza stwierdzenie ze str. 167, że „glicerol na etapie biosyntezy kwasu fumarowego przejmował rolę kosubstratu” i na czym ta rola polegała skoro „pozostawał nienaruszony w hodowli” (str. 156)?,co, w takim razie, z jego utylizacją (w rozumieniu środowiskowym)? Czy stwierdzenie, że glicerol „ograniczał w znacznej mierze powstawanie produktów ubocznych” nie jest spekulacją? – brak danych, które to potwierdzają, a w hodowli pilotażowej stwierdzono 1 % etanolu;

Glukoza nie jest chyba „wielokrotnie tańsza od glicerolu odpadowego”, a ponadto glicerol nie spełnia w badaniach Autorki roli głównego źródła węgla,

2. Nie można się zgodzić z argumentacją, że użycie antybiotyków do selekcji szczepów rekombinacyjnych E. coli (str. 152, badania Li i wsp., 2014) ma jakikolwiek wpływ na przydatność rekombinanta do ewentualnej produkcji kwasu fumarowego.

3. Dlaczego substratem wyjściowym w hodowlach bioreaktorowych była fruktoza, dlaczego „przełomowe” było zastąpienie jej syropem pszenicznym, skoro zawiera on tylko 15% fruktozy i dodatkowo ta fruktoza nie była wykorzystywana przez grzyba (str. 167)?

4. Cały akapit na str. 168 o syntezie kwasu fumarowego na resztkach żywności powinien raczej znaleźć się w Przeglądzie literatury, bo nie odnosi się do wyników Autorki.

Wnioski przedstawione na końcu pracy byłyby bardziej czytelne, gdyby te, z których wynika strategia hodowlana, podkreślana jako główne osiągnięcie pracy, zebrać na początku, a następnie dopiero przedstawić spostrzeżenia, które, jak rozumiem, są traktowane jako ewentualny punkt wyjścia dalszych badań.

W podsumowaniu oceny rozprawy doktorskiej Pani Elwiry Komoń-Janczary stwierdzam, że została ona przygotowana zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dziennik Urzędowy Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Autorka podjęła się tematu aktualnego i ważnego zarówno z punktu widzenia rozwoju nauki, jak i ze względów aplikacyjnych. Przeprowadzone badania optymalizacyjne były wielokierunkowe, szerokie, wymagały wiele zaangażowania i dyscypliny. Uzyskane przez Panią Komoń-Janczarę wyniki są

wartościowe, mają potencjał aplikacyjny i mogą znacznie przyczynić się do rozwoju technologii mikrobiologicznej produkcji kwasu fumarowego. Otwierają też drogę do dalszych badań nad biosyntezą tego metabolitu. Słabszą stroną rozprawy jest prezentacja i dyskusja uzyskanych rezultatów. Nie wpływa to jednak na moją pozytywną ocenę całości. Zwracam się więc do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie mgr inż. Elwiry Komoń-Janczary do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 26. 08. 2019

Matywnika Pleczyński