

Łódź, 18.10.2018 r.



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Dr. hab. Przemysław Bernat, prof. nadzw. UŁ
Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Piotra Biniarza

pt. "Optymalizacja produkcji, oczyszczanie i badanie właściwości biosurfaktantów"

Pracę doktorską wykonano w Zakładzie Biotransformacji na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Marcina Łukaszewicza, prof. nadzw. UWr

Surfaktanty, związki powierzchniowo czynne o amfifilowej budowie, znajdują powszechne zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Natomiast od szeregu lat podejmuje się próby otrzymania i zastosowania na skalę przemysłową biosurfaktantów, czyli związków powierzchniowo czynnych pochodzenia biologicznego, najczęściej produkowanych przez drobnoustroje. W stosunku do syntetycznych surfaktantów charakteryzuje je m.in. niższa toksyczność, szybsze uleganie biodegradacji, możliwość zastosowania surowców odpadowych do ich produkcji, czy większa różnorodność aktywności biologicznej. Aktualnie prowadzone są liczne badania nad opracowaniem tańszych metod wydzielania i oczyszczania biosurfaktantów

oraz poznania molekularnych mechanizmów ich syntezy. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska bardzo dobrze wpisuje się w tematykę badań nad optymalizacją produkcji wybranych biosurfaktantów pochodzenia bakteryjnego.

Oceniana rozprawa doktorska, licząca 165 stron jest podzielona na rozdziały: streszczenie (3 strony), abstract – podsumowanie napisane w języku angielskim (3 strony), spis często używanych skrótów (2 strony), wstęp (24 strony), cele pracy (1 strona), materiały i metody (22 strony), omówienie i dyskusja wyników (84 strony), podsumowanie (1 strona). W pracy umieszczono 22 tabele oraz 54 rysunki i fotografie a także spis 215 pozycji cytowanego piśmiennictwa (obejmujące ważniejsze prace oryginalne i książki dotyczące dysertacji). Umieszczony jest także opis aktywności naukowej Doktoranta, który obejmuje wykaz otrzymanych grantów i odbytych staży w zagranicznych ośrodkach naukowych oraz prac naukowych i komunikatów konferencyjnych przygotowanych na bazie wyników zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej: 4 publikacje opublikowane w recenzowanych czasopismach z listy filadelfijskiej i 6 komunikatów. Natomiast całkowity dorobek naukowy Doktoranta obejmuje 6 publikacji o sumarycznym IF=20,82 oraz 17 doniesień konferencyjnych.

Wstęp jest dobrze przygotowanym rozdziałem pracy doktorskiej, obszerny przegląd literatury wprowadza w dziedzinę naukowych zainteresowań Doktoranta. Wstęp został podzielony na podrozdziały w których Doktorant charakteryzuje ogólnie surfaktanty, aby następnie omówić grupę biosurfaktantów ze szczególnym uwzględnieniem lipopeptydów i ich właściwości. Kolejne podrozdziały dotyczą analizy ilościowej biosurfaktantów z użyciem różnorodnych technik analitycznych, produkcji biosurfaktantów oraz ich oczyszczania. Doktorant w przejrzysty sposób tłumaczy dlaczego przeniesienie produkcji biosurfaktantów ze skali laboratoryjnej do produkcyjnej jest złożonym problemem, zwraca również uwagę na proces oczyszczania wyprodukowanych biosurfaktantów. Ważną rolę Autor przypisuje technikom membranowym stosowanym do oczyszczania bioproduktu. Ponieważ podczas produkcji biosurfaktantów w bioreaktorach powstają duże ilości piany Doktorant opisuje jej rolę w procesie otrzymywania biosurfaktantów. Autor porusza również temat technik chromatograficznych niezbędnych do otrzymania bioproduktu wysokiej czystości. W ostatnim

podrozdziale wstępu Doktorant charakteryzuje cykliczny lipopeptyd -pseudofaktynę, produkowany przez arktyczny szczep *Pseudomonas fluorescens* BD5. Należy podkreślić, że Wstęp zawiera liczne rysunki (12 pozycji) i tabelę ułatwiającą zaznajomienie z informacjami związanymi z tematyką rozprawy doktorskiej.

Nie mam w zasadzie uwag krytycznych do tej części rozprawy, która jest napisana w sposób czytelny, jedynie drobne sugestie. Omawiając bakterie z rodzaju *Pseudomonas* warto wspomnieć, że są one znane również z produkcji fosfolipidów. Proszę również o zwrócenie uwagi na drobne błędy edytorskie w tekście i spisie literatury (pozycje 79, 118)

Głównym celem ocenianej pracy doktorskiej była optymalizacja produkcji lipopeptydowego biosurfaktantu – pseudofaktyny. Do realizacji tak dość szeroko postawionego celu, przedstawiono pięć głównych etapów badawczych.

Stosowana do realizacji zamierzeń metodyka badań nie budzi zastrzeżeń. Doktorant użył wiele różnorodnych technik badawczych opisanych w rozdziałach Materiały i Metody. Materiał bakteryjny został scharakteryzowany prawidłowo. Zastosowano nowoczesne metody i techniki badawcze, w tym chromatografię cieczową oraz tandemową spektrometrię mas. Autor opisał sposoby optymalizacji hodowli bakteryjnych pod kątem produkcji biosurfaktanta w hodowlach w kolbach i bioreaktorach o różnej pojemności. W rozprawie doktorskiej przedstawiono również metody wyodrębniania i oczyszczenia pseudofaktyny z hodowli bakteryjnych. Doktorant wykonał także badania z zakresu sekwencjonowania i analizy genomu *P. fluorescens*.

Opis metod moim zdaniem jest raczej klarowny, chociaż przy charakterystyce podłoży hodowlanych brakuje informacji dlaczego Doktorant stosuje zwrot „Biolector 3”, nie definiując wcześniej tego systemu do mikrofermentacji. Opis dla systemu 3 i stosowanych detektorów DAD i MS mógłby być bardziej przejrzysty. Ponieważ piana odgrywa ogromną rolę w procesie produkcji biosurfaktantów, uważam, że można podać więcej informacji nt. sposobów gaszenia piany w wykonywanych doświadczeniach z użyciem bioreaktorów (np. ilość i rodzaj stosowanego odpieniacza, sposób dodawania odpieniacza – ręczny czy automatyczny). W

opisie metod można także zwrócić uwagę czy w trakcie analiz chromatograficznych obserwowano zjawisko przeniesienia próbki (carry over).

Szeroki zakres użytych metod i technik badawczych jest niewątpliwie atutem recenzowanej pracy doktorskiej a uzyskane wyniki badań zostały także poddane analizie statystycznej.

Rozdział "Wyniki i Dyskusja" jest najbardziej obszernym rozdziałem rozprawy, podzielonym na siedem głównych podrozdziałów. Kluczowe wyniki obejmują opracowanie szybkich metod jakościowych i ilościowych z wykorzystaniem LC i LC-MS umożliwiających analizę lipopeptydów w podłożach hodowlanych, otrzymanie ponad 100-krotnie większej ilości pseudofaktyny w wyniku optymalizacji warunków hodowli *P. fluorescens* BD5 w stosunku do układu nieoptymalizowanego, zaprojektowanie procesu produkcji lipopeptydu w bioreaktorach połączonego z wyodrębnianiem pseudofaktyny z piany, wykonanie badań porównawczych otrzymanych analogów pseudofaktyny i zaobserwowanie różnic w ich właściwościach. Zidentyfikowano również geny mogące brać udział w syntezie pseudofaktyny.

Jednym z wyników rozprawy doktorskiej jest obserwacja wpływu matrycy na oznaczalność lipopeptydów. Autor wspomina o adsorpcji biosurfaktantów na wewnętrznych powierzchniach kapilar systemów LC i LC-MS oraz materiałów używanych do przechowywania czy przenoszenia próbek natomiast uważam, że warto byłoby także poruszyć temat efektu matrycy w źródle jonów spektrometru masowego zaburzającego jonizację.

Na rys. 24 przedstawiono wyniki wskazujące na spadek stężenia pseudofaktyny po 28h hodowli w bioreaktorze, czym można tłumaczyć tą obserwację.

Mam również drobną uwagę do ewentualnych przyszłych doświadczeń z użyciem bioreaktora i produkcji pseudofaktyny. Biorąc pod uwagę intensywną asymilację tlenu przez drobnoustrój może warto byłoby ustalić minimalny poziom pO_2 na poziomie $\geq 20\%$ i zaobserwować czy brak warunków limitacji tlenem wpływa na wydajność procesu syntezy biosurfaktanta.

Zamieszczony w pracy opis uzyskanych badań jest klarowny, Autor umiejętnie dyskutuje swoje wyniki doświadczeń w oparciu o dane literaturowe. Sposób omówienia uzyskanych danych świadczy o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu doktoranta do rozwiązywania poruszanych w pracy problemów. Staranne i szczegółowe opisy pod rysunkami, dodatkowo ułatwiają zrozumienie poruszanych zagadnień.

Rozprawę doktorską zakończono podsumowaniem, opisującym efekty realizowanych zadań, weryfikującymi postawiony cel optymalizacji produkcji lipopeptydowego biosurfaktanta - pseudofaktyny i świadczącymi o nowatorskim charakterze badań.

WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując chciałbym podkreślić, że badania przeprowadzone przez mgr Piotra Biniarza przyczyniły się do poszerzenia wiedzy z zakresu optymalizacji produkcji biosurfaktantów lipopeptydowych. Doktorant zrealizował cele postawione w pracy, tematyka rozprawy doktorskiej jest aktualna i ważna. Eksperymenty zostały zaplanowane logicznie, a ich wykonanie odbyło się z użyciem współczesnych technik badawczych. Oryginalne wyniki zostały poddane rozważnej interpretacji. Stwierdzam więc jako recenzent, że praca doktorska mgr Piotra Biniarza, zatytułowana "Optymalizacja produkcji, oczyszczanie i badanie właściwości biosurfaktantów" odpowiada warunkom Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym i spełnia w pełni wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk biologicznych, dyscyplinie biotechnologia. Występuję zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Piotra Biniarza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto biorąc pod uwagę nakład pracy Doktoranta, różnorodność stosowanych metod badawczych niezbędnych do realizacji celu pracy oraz nowatorstwo wyników badań wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

