

Gdańsk, luty 2017

dr hab. inż. Ewa Wojciechowska
Wydział Inżynierii Lądowej i Środowiska
Politechnika Gdańska

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Natalii Kujawskiej
pt. „Wytwarzanie kwasu dokozaheksaenowego przez mikroglony z rodzaju
Schizochytrium sp. z wykorzystaniem gliceryny technicznej”**

1. Wprowadzenie

Podstawą napisania niniejszej recenzji jest pismo z dnia 27 stycznia 2017 r. Pani dr hab. inż. Ewy Paturej, prof. UWM, Dziekan Wydziału Nauk o Środowisku Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Oceniana rozprawa doktorska ma formę opracowanego maszynopisu i obejmuje 103 strony tekstu, 197 pozycji cytowanego piśmiennictwa, 25 rysunków oraz 20 tabel, a także streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz ważniejszych oznaczeń i symboli.

Recenzowana rozprawa dotyczy badań nad hodowlą mikroglonów z rodzaju *Schizochytrium sp.* na medium hodowlanym zawierającym glicerynę techniczną będącą produktem odpadowym w produkcji biodiesla. Mikroglony *Schizochytrium sp.* charakteryzują się zdolnością wytwarzania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym kwasu dokozaheksaenowego DHA, będącego cenionym produktem spożywczym. Produkcja DHA na drodze hodowli mikroglonów w skali technicznej nie jest na razie opłacalna m.in. z powodu wysokich kosztów chemicznych składników mediów hodowlanych. Zastąpienie ich przez substraty pochodzenia odpadowego, np. glicerol, pozwoliłoby ograniczyć koszty produkcji biomasy.

Rozprawa spełnia wymagania ustawowe wobec rozpraw doktorskich. Zawiera jasno sformułowany cel, jak również tezy i zakres badań, a także szczegółowy opis metodyki badań, uzyskanych wyników oraz dyskusję. Całokształt pracy świadczy o dużej wiedzy merytorycznej Doktorantki oraz umiejętności planowania i prowadzenia eksperymentów naukowych.

2. Umiejscowienie tematyki i zakresu badań

Temat badań objętych pracą doktorską został trafnie wybrany. Prowadzone przez Doktorantkę badania doskonale wpisują się w najnowsze kierunki prac dotyczących zastosowania mikroglonów i produkowanych przez nie substancji w dziedzinach takich jak medycyna, farmacja, przemysł spożywczy i produkcja pasz. Wykorzystanie mikroglonów na skalę przemysłową napotyka na ograniczenia wynikające z wysokich kosztów ich produkcji. Jest to m.in. związane z kosztami reagentów chemicznych używanych do produkcji podłoży hodowlanych. Proces produkcji kwasów tłuszczowych np. kwasu dokozaheksaenowego DHA, przez mikroalgi na podłożach zawierających odpadowe źródło węgla jest technicznie

możliwy, jednak konieczne jest poszukiwanie nowych metod hodowli, które przyczynią się do uzyskania wysokiej wydajności oraz wartościowego produktu końcowego. W tym kontekście, badania prowadzone przez panią mgr inż. Natalię Kujawską polegające na optymalizacji efektywności hodowli glonów z rodzaju *Schizochytrium sp.* na medium hodowlanym zawierającym glicerol pochodzenia odpadowego, przyczynią się z pewnością do obniżenia kosztów hodowli. Jednocześnie, konwersja odpadowych źródeł węgla w oleje o wysokiej zawartości cennych kwasów tłuszczowych, takich jak DHA, wpisuje się w zasadę zrównoważonego rozwoju i pozwala ograniczyć negatywny wpływ na środowisko. Wyniki badań przedstawione w rozprawie doktorskiej pani mgr inż. Natalii Kujawskiej dotyczą hodowli *Schizochytrium sp.* i produkcji DHA w skali zarówno laboratoryjnej jak i pilotowej, co sprawia, że stanowią ważny krok w kierunku powiększania skali hodowli.

3. Ocena pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska podzielona została na trzynaście rozdziałów. Osiem pierwszych stanowią kolejno *Wprowadzenie*, *Stan badań*, *Cel*, *tezy i zakres badań*, *Metodyka badań*, *Wyniki badań*, *Dyskusja wyników badań*, *Podsumowanie i wnioski* oraz *Piśmiennictwo*. Dalsze rozdziały pracy (od 9 do 13) to *Spis równań*, *Spis Tabel*, *Spis rysunków* oraz *Streszczenie* w języku polskim i w języku angielskim. Praca zawiera również *Wykaz ważniejszych oznaczeń i symboli*, zamieszczony na stronie 5. Strukturę pracy uważam za tradycyjną, zaś podział na poszczególne rozdziały jest logiczny.

W pierwszym rozdziale, zatytułowanym *Wprowadzenie*, w jasny i rzeczowy sposób nakreślona została tematyka badawcza i jej umiejscowienie na tle aktualnych trendów badań światowych.

Kolejny rozdział *Stan badań*, rozpoczyna się na stronie 7 i liczy 16 stron. W rozdziale tym Doktorantka dokonała przeglądu literatury, dzieląc go na dwa podrozdziały. W pierwszym z nich przedstawiła powstawanie odpadowej frakcji glicerynowej w procesach przemysłowych oraz metody jej zagospodarowania. Drugi podrozdział poświęcony jest kwasom tłuszczowym oraz ich roli w systemach biologicznych. Omówiono tu również proces wytwarzania kwasów tłuszczowych przez mikroglony oraz wykorzystanie przemysłowe kwasów tłuszczowych. W punkcie tym stosunkowo dużo miejsca zajmuje charakterystyka kwasów tłuszczowych oraz roli, jaką pełnią w organizmach żywych (str. 15-17), a także ich synteza przez organizmy roślinne i zwierzęce (str. 18-19). Łącznie te informacje zajmują 5 stron tekstu, co stanowi około 30% całego, liczącego zaledwie 16 stron, przeglądu literaturowego. Wydaje się, że nie są to informacje bezpośrednio związane z tematyką rozprawy doktorskiej. Znacznie bardziej wartościowa, z punktu widzenia tematu pracy, jest część poświęcona dotychczasowym próbom wytwarzania kwasów tłuszczowych przez mikroorganizmy, w tym przez mikroalgi hodowane na podłożach zawierających odpadowe źródło węgla. Szkoda, że w tej części pracy nie znalazł się podrozdział poświęcony metodzie Placketta-Burmana oraz metodzie powierzchni odpowiedzi, które wykorzystano w pracy do optymalizacji procesu hodowli mikroalg na podłożu hodowlanym zawierającym odpadowy glicerol.

W Rozdziale 3, na 23 stronie rozprawy, sformułowano cel badawczy, tezy i zakres pracy. Praca miała na celu 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. Doktorantka postawiła trzy tezy. Pierwsza z nich zakłada, że gliceryna techniczna jest odpowiednim źródłem węgla do wykorzystania w procesie wytwarzania DHA przez mikroglony *Schizochytrium sp.* Tezy 2 i 3 dotyczą wpływu parametrów technologicznych procesu na efektywność produkcji DHA przez testowaną biomasę glonów. Teza druga

zakłada, że największy wpływ na efektywność procesu mają temperatura, stężenie gliceryny technicznej oraz stężenie tlenu. Natomiast teza trzecia zakłada, że zwiększenie wartości objętościowego współczynnika wnikania tlenu przez zmianę parametrów mieszania i napowietrzania w hodowli *Schizochytrium sp.* wpływa na zwiększenie stężenia DHA w układzie technologicznym. W odniesieniu do tez 2 i 3 trudno się oprzeć wrażeniu, że zostały one postawione po zakończeniu prac eksperymentalnych, na podstawie *de facto* dokonanych już obserwacji najbardziej istotnych parametrów procesu hodowli. Realizacja celu badawczego oraz weryfikacja postawionych tez wymagała realizacji kolejnych zadań zdefiniowanych w zakresie pracy, w tym określenia wpływu parametrów technologicznych takich jak pH, temperatura, napowietrzanie, prędkość mieszania, stężenie źródła węgla i źródła azotu, poziom zasolenia, stężenie makro- i mikroelementów oraz stężenie witamin na wydajność procesu hodowli *Schizochytrium sp.* i efektywność wytwarzania DHA, określenie profilu kwasów tłuszczowych produkowanych w trakcie procesu oraz określenie efektywności hodowli w zależności od zastosowanej wartości objętościowego współczynnika wnikania tlenu (k_{La}). Dodatkowo w zakresie pracy wymieniono zadania takie jak zweryfikowanie efektywności technologicznej procesu produkcji biomasy *Schizochytrium sp.* w hodowli okresowej, okresowej z zasilaniem oraz ciągłej, określenie stopnia zmetabolizowania gliceryny technicznej oraz końcowego stężenia DHA w zależności od sposobu prowadzenia hodowli i wreszcie określenie charakterystyki zewnątrzkomórkowych substancji polimerycznych (extracellular polymeric substances – EPS) produkowanych przez *Schizochytrium sp.* oraz ich wpływu na lepkość hodowli oraz produkcję kwasu DHA. Zakres pracy nie budzi zastrzeżeń i służy realizacji celu badawczego, należy przy tym stwierdzić, że wykracza poza postawione w pracy tezy.

Rozdział czwarty ocenianej rozprawy został poświęcony bardzo dokładnemu omówieniu metodyki prowadzonych badań. Rozdział ten liczy 20 stron, został zilustrowany siedmioma rysunkami, przedstawiającymi m.in. stanowisko badawcze i zastosowane materiały, a także siedzioma tabelami.

W podpunkcie 4.1. Doktorantka wyjaśniła ogólną koncepcję pracy badawczej. Prace eksperymentalne podzielono na cztery etapy. W etapie pierwszym zidentyfikowano najbardziej istotne parametry procesu hodowli *Schizochytrium sp.* na podłożu zawierającym glicerynę techniczną. Etap ten wymagał realizacji serii eksperymentów, które zaplanowano przy użyciu metody statystycznej Placketta-Burmana. Natomiast wartości kluczowych parametrów procesu określono z wykorzystaniem metody powierzchni odpowiedzi (Response Surface Methodology). Drugi etap prac polegał na hodowli *Schizochytrium sp.* przy zastosowaniu parametrów wyłonionych w poprzednim etapie oraz określeniu parametrów procesu takich jak kinetyka wzrostu mikroalg, szybkość zużycia gliceryny technicznej, końcowe stężenie lipidów i DHA w komórkach *Schizochytrium sp.* oraz końcowe stężenie biomasy w reaktorze. Hodowla biomasy *Schizochytrium sp.* w tym etapie badań prowadzona była na trzy sposoby: hodowla okresowa, okresowa z zasilaniem oraz ciągła. W etapie trzecim prowadzono hodowlę *Schizochytrium sp.* w skali pilotażowej, w reaktorze o objętości 20 dm³. Wreszcie, w etapie czwartym, analizowany był wpływ EPS wytwarzanych przez mikroglony z rodzaju *Schizochytrium sp.* na efektywność kumulowania kwasu DHA w komórkach, poprzez powiązanie lepkości podłoża hodowlanego z wartością współczynnika określającego efektywność transportu tlenu do komórek. W dalszych podpunktach rozdziału poświęconego metodyce badań, przedstawiono kolejno materiały zastosowane w pracach eksperymentalnych, stanowisko badawcze (4.2), procedury badawcze zastosowane w kolejnych etapach badań (4.3) oraz zastosowane metody analityczne i statystyczne (4.4). Bardzo istotny jest podpunkt 4.3. poświęcony procedurom badawczym, w którym objaśniono plan eksperymentu zmierzającego do wytypowania kluczowych parametrów hodowli mikroglonów z rodzaju *Schizochytrium sp.* z wykorzystaniem metody Placketta-Burmana oraz metodę powierzchni

odpowiedzi. **Zarówno ten podpunkt, jak i cały rozdział *Metodyka badań*, świadczy o doskonalej umiejętności planowania eksperymentów badawczych z wykorzystaniem najnowszych metod statystycznych.** Nie mam również zastrzeżeń do zastosowanych procedur analitycznych oraz metod analizy statystycznej.

W rozdziale piątym Pani mgr inż. Natalia Kujawska przedstawiła wyniki prowadzonych prac eksperymentalnych. Rozdział ten podzielony został na cztery podrozdziały, poświęconych kolejnym etapom badań. W podrozdziale 5.1. wytypowano kluczowe parametry hodowli, mając na uwadze osiągnięcie dwóch celów: a) przyrost biomasy oraz b) wytwarzanie kwasu dokozaheksaenowego. Najistotniejsze parametry zidentyfikowano na podstawie wyników eksperymentów zaprojektowanych metodą Placketta-Burmana (podpunkt 5.1.1.), zaś ich wartości określono metodą powierzchni odpowiedzi (podpunkt 5.1.2.). Stwierdzono, że do najbardziej istotnych parametrów warunkujących proces hodowli *Schizochytrium sp.* oraz wytwarzanie kwasu DHA należały: stężenie gliceryny technicznej, temperatura, stężenie tlenu oraz stężenie peptonu. Stwierdzono również, że na stężenie biomasy komórek (DCW) oraz stężenie kwasu DHA wpływają te same parametry hodowli, jednak w zależności od celu hodowli (osiągnięcie jak najwyższego stężenia biomasy lub maksymalnej produkcji DHA) parametry te powinny mieć różne wartości, co, jak słusznie zauważyła Doktorantka, wskazuje na celowość prowadzenia hodowli dwustopniowej. Porównano również wartości przewidywane metodami analizy statystycznej z rzeczywistymi wynikami hodowli w dwóch wariantach: zmierzając do uzyskania jak najwyższego stężenia biomasy oraz maksymalnej produkcji kwasu DHA. W rezultacie porównania wyników analizy statystycznej metodą powierzchni odpowiedzi oraz danych eksperymentalnych stwierdzono, że stężenie DCW (masy komórek w jednostce objętości) uzyskane w rzeczywistych warunkach laboratoryjnych było o 1,27% niższe od przewidywanego. Natomiast uzyskane eksperymentalnie stężenie kwasu DHA w komórkach było o 3,03% wyższe od przewidywanego. Wyniki te w pełni potwierdzają prawidłowość zastosowanego podejścia do planowania prac badawczych z zastosowaniem metod statystycznych.

W kolejnym podrozdziale omówiono wyniki uzyskane dla trzech wariantów hodowli: okresowej, okresowej z zasilaniem oraz hodowli ciągłej, przy różnych współczynnikach rozcieńczenia i porównano uzyskane w tych wariantach stężenia DCW, temp przyrostu stężenia DHA oraz skład kwasów tłuszczowych wytwarzanych przez *Schizochytrium sp.* W przypadku hodowli ciągłej najlepsze efekty (najwyższe wartości stężenia lipidów oraz kwasu DHA) uzyskano stosując współczynnik rozcieńczenia $D = 0,4$ l/d. Najbardziej efektywna pod względem tempa przyrostu biomasy, stężenia lipidów w biomasie oraz stężenia kwasu DHA okazała się być hodowla okresowa z zasilaniem.

W podpunkcie 5.3. Doktorantka porównała wskaźniki efektywności hodowli uzyskane podczas badań laboratoryjnych oraz badań prowadzonych w skali pilotażowej (bioreaktor o pojemności 20 dm³). Zarówno w hodowli laboratoryjnej jak i pilotażowej wyróżniono trzy fazy wzrostu mikroglonów: fazę adaptacji, fazę logarytmicznego wzrostu (pomiędzy 20 a 80 godziną hodowli w skali laboratoryjnej oraz pomiędzy 20 a 60 godziną hodowli w skali pilotażowej) i fazę stacjonarną. W obu rodzajach hodowli zaobserwowano podobną dynamikę przyrostu biomasy (zmiany stężenia DCW) do 60 godziny trwania eksperymentu. Po 120 godzinach hodowli w skali pilotażowej uzyskano o 24% niższy przyrost biomasy mikroalg niż w tym samym okresie czasu dla hodowli prowadzonej w warunkach laboratoryjnych. W hodowli pilotażowej uzyskano stężenia lipidów oraz kwasu dokozaheksaenowego wynoszące około 78% wartości uzyskanych w hodowli w warunkach laboratoryjnych. Chciałabym prosić Doktorantkę o ocenę, czy uzyskana w Jej badaniach wydajność hodowli pilotażowej jest wystarczająca, aby myśleć o zastosowaniu procesu na skalę przemysłową w niedługim horyzoncie czasowym. Doktorantka zaobserwowała również, że w logarytmicznej fazie

wzrostu komórek miał miejsce największy przyrost stężenia DHA, natomiast po wejściu hodowanej biomasy w stacjonarną fazę wzrostu, produkcja DHA utrzymywała się na stałym, intensywnym poziomie.

W ostatnim, czwartym podpunkcie rozdziału poświęconego Wynikom badań, pani mgr inż. Natalia Kujawska analizowała wpływ Zewnątrzkomórkowych Substancji Polimerycznych (skrót z jęz. ang. EPS) na efektywność produkcji kwasu dokozaheksaenowego. Stwierdziła, że zależność lepkości medium hodowlanego od wzrostu stężenia biomasy miała charakter liniowy, o wysokim współczynniku korelacji R^2 wynoszącym 0,9825. Doktorantka podaje również (podpunkt 5.4.2, str. 66), że lepkość medium hodowlanego jest liniowo powiązana ze stężeniem polisacharydów, stanowiących część produkowanych EPS, jednak stwierdzenie to nie jest poparte wynikami obliczeń ani rysunkami. Na przywołanym w tym miejscu Rys. 22 pokazano jedynie zależność lepkości medium hodowlanego oraz stężenia EPS od czasu trwania hodowli. W dalszej części podrozdziału Doktorantka przeanalizowała wpływ objętościowego współczynnika wnikania tlenu k_{La} na produkcję biomasy oraz kwasu DHA, stwierdzając, że wzrost efektywności transportu tlenu do komórek powoduje zwiększenie zarówno przyrostu biomasy mikroglonów jak i większą efektywność wytwarzania DHA.

Dyskusja wyników została przedstawiona w rozdziale szóstym, który rozpoczyna się na stronie 71. Doktorantka omówiła tu wyniki prowadzonych badań na tle dokonań badaczy prezentowanych w piśmiennictwie. Część informacji zawartych w tym rozdziale mogłaby z powodzeniem znaleźć się w Rozdziale 2 *Stan badań*, co w żaden sposób nie umniejsza prezentowanych informacji, a jedynie stanowi uwagę dotyczącą organizacji manuskryptu. W rozdziale *Dyskusja wyników* Doktorantka wskazuje między innymi, że w dotychczasowych, pionierskich badaniach, stwierdzono istotny wpływ źródła węgla na wzrost biomasy oraz syntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT), przy czym hodowle, w których źródłem węgla był glicerol charakteryzowały się wyższymi wydajnościami w porównaniu do hodowli w których zastosowano glukozę, olej kokosowy, odpady z przemysłu browarniczego czy ścieki z produkcji mleka sojowego. Prezentuje również doniesienia literaturowe, w których, podobnie jak w badaniach własnych Doktorantki, uzyskano najwyższą wydajność procesu w hodowli okresowej z zasilaniem. Ważnym dokonaniem pracy pani mgr inż. Natalii Kujawskiej było porównanie wydajności hodowli *Schizochytrium sp.* w skali laboratoryjnej i pilotażowej, co jak dotychczas, realizowane było przez nielicznych badaczy. Wydajności uzyskane w badaniach Doktorantki (stężenie biomasy na poziomie ok. 103 g/dm³ oraz stężenie kwasu DHA 39,2 g/dm³) były wyższe od wydajności osiągniętych w skali pilotażowej w reaktorze o pojemności 50 dm³ (odpowiednio stężenie biomasy 92,7 g/dm³ i stężenie DHA 17,7 g/dm³). W dalszej części Dyskusji Doktorantka w sposób bardzo jasny wskazuje na umiejscowienie podjętej tematyki badawczej na tle trendów badań światowych. Zarówno w Dyskusji wyników, jak i w ogóle w piśmiennictwie, zdecydowanie dominuje literatura angielskojęzyczna, co stanowi walor pracy i świadczy o jej nowatorstwie.

Na stronach 80-81 rozprawy przedstawiono *Podsumowanie i wnioski*. Doktorantka sformułowała 8 wniosków szczegółowych (nienumerowanych). Postawione w pracy wnioski wynikają bezpośrednio z przeprowadzonych prac eksperymentalnych i wynikają jasno z treści rozprawy.

4. Uwagi dotyczące pracy

Pani mgr inż. Natalia Kujawska, pomimo wysokiego poziomu merytorycznego rozprawy, nie ustrzegła się pewnych błędów, w tym literówek, błędów interpunkcyjnych itp., które można skorygować przed opublikowaniem pracy.

Chciałabym prosić Doktorantkę o wyjaśnienie następującej kwestii. W podpunkcie 4.3 rozdziału *Metodyka badań* podano zmienne parametry hodowli mikroglonów. Łącznie testowano 10 zmiennych, do których należały temperatura, początkowe pH, procentowe stężenie tlenu, objętościowe natężenie przepływu powietrza, zawartość inokulum, stężenie gliceryny technicznej, zasolenie, stężenie ekstraktu drożdżowego, prędkość obrotów mieszadła oraz stężenie peptonu. W trakcie eksperymentów zaprojektowanych metodą Placketta-Burmana każda z wymienionych zmiennych była badana na poziomie niskim (-) oraz wysokim (+). Wartość zmiennej na poziomie niskim była to najniższa wartość danego parametru, która umożliwiała wzrost *Schizochytrium sp.* oraz produkcję kwasu dokozaheksaenowego, zaś zmienna na poziomie wysokim odpowiadała najwyższej wartości parametru, która nie hamuje wymienionych procesów. Na stronie 31 pracy Doktorantka stwierdza, że wartości zmiennych dobrano na podstawie analizy dostępnych danych literaturowych, jednak nie podaje w tym miejscu (ani też w innych miejscach pracy) żadnych odniesień do wzmiankowanych prac. Bardzo proszę o wymienienie tych prac oraz podanie wartości parametrów, które w nich stosowano. Uważam, że szczegółowy opis wartości zastosowanych zmiennych wraz z uzasadnieniem z konkretnymi odwołaniami do piśmiennictwa powinien znajdować się w rozdziale 2 *Stan badań*, który jest mało rozbudowany. Odniesienia do wspomnianych prac mogłyby również wzbogacić *Dyskusję wyników* zawartą w rozdziale 6. Szkoda, że zagadnienie to nie zostało szerzej omówione w pracy.

W kilku miejscach pracy użyto niewłaściwych jednostek. Na stronie 31 pracy Doktorantka podaje jednostkę *objętościowego natężenia przepływu powietrza* jako $L_{pow}/min \times L_{zbior}$. Jednostką objętościowego natężenia przepływu płynu, czyli strumienia objętości, jest m^3/s . Z kolei na str. 37 pracy pojawia się parametr F szybkość przepływu substratu, którego jednostką jest, według Doktorantki [$m^3/doba$]. Podana jednostka odnosi się do objętościowego natężenia przepływu, nie do prędkości, zatem albo błędnie zdefiniowano parametr F jako „szybkość”, albo podana jednostka jest niewłaściwa. Dalej, również na str. 37, parametr D z jednostką [$1/doba$] nie jest „szybkością rozcieńczenia”. Prawdopodobnie chodzi tu o tłumaczenie angielskiego słowa „rate”, które może oznaczać prędkość, jednak bardziej odpowiednim tłumaczeniem byłby w tym wypadku „współczynnik” lub „wskaźnik”, ewentualnie „tempo”.

Zgodnie, z uwagami podanymi wcześniej, uważam, że tezy pracy (szczególnie tezy 2 i 3) powinny zostać sformułowane w inny sposób. Na str. 50 pracy można przeczytać następujące stwierdzenie: „Potwierdzono, iż w zależności od głównego celu przeprowadzonej hodowli, a mianowicie zwiększenia efektywności przyrostu biomasy lub przyrostu stężenia DHA, konieczny jest dobór odmiennych wartości najistotniejszych parametrów hodowli”. To zdanie brzmi jak odniesienie do tezy, której jednak w rozprawie nie postawiono wprost. Brak również tezy odnoszącej się do wpływu lepkości hodowli na wartość współczynnika wnikania tlenu oraz na wydajność hodowli.

Poniżej przedstawiam listę uwag szczegółowych, które mogą być pomocne przed opublikowaniem pracy.

Uwagi szczegółowe

- Jeżeli jakaś nazwa pojawia się w tekście po raz pierwszy, nie powinno się stosować skrótu, tylko pełną nazwę, a w nawiasie podać skrót – w pracy na str. 13 pojawia się skrót DHA, również na str. 13 WNKT, na str. 22 DCW; w poprzedzającym tekście nie ma pełnej nazwy;
- Wydaje się, że w podrozdziale 2.1. informacje są podawane nie po kolei. Najpierw opisane zostały produkty wytwarzane przez mikroalgi wykorzystujące odpadowy glicerol jako źródło węgla (str. 10-12). Ten fragment rozdziału jest niejako

podsumowany zamieszczoną na str. 12 Tabelą 1 (*Substancje bioaktywne wytwarzane przez mikroorganizmy na bazie odpadowego glicerolu*). Jednak na str. 14 ponownie pojawiają się dane dotyczące β -karotenu, astaksantyny oraz skwalenu. Jest to pewna niekonsekwencja, którą zapewne łatwo będzie skorygować w przypadku publikowania pracy,

- str. 18 brak odwołań do literatury przy opisie syntezy kwasów tłuszczowych przez organizmy roślinne i zwierzęce,
- str. 31 zamiast „wartość progowa gliceryny technicznej” powinno być „wartość progowa stężenia gliceryny technicznej”,
- str. 38 zamiast „według procedury opisanej w punkcie 0” powinno być „zamiast procedury opisanej w punkcie c)”
- str. 44 zamiast „zmieniała się” powinno być „zmieniało się”
- str. 49 zastosowane wykresy warstwowe nie ilustrują w czytelny sposób omawianych wyników. Umożliwiają wprawdzie przestrzenne pokazanie trzech zmiennych, jednak wydaje się, że wykresy liniowe lub słupkowe byłyby o wiele lepszym rozwiązaniem,
- str. 53 parametr r_{DCW} nie powinien być definiowany jako „szybkość przyrostu biomas” – angielskie słowo „rate” powinno być w tym wypadku przetłumaczone jako „tempo przyrostu”.

5. Walory poznawcze pracy

Oceniana rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w badania polegające na wykorzystaniu odpadowych substratów organicznych do hodowli mikroglonów z rodzaju *Schizochytrium sp.* na cele przemysłowe. W szczególności, za istotne dokonania rozprawy uważam:

- wytypowanie kluczowych parametrów warunkujących wzrost biomasy *Schizochytrium sp.* na podłożach hodowlanych zawierających odpadowe źródło węgla w postaci gliceryny technicznej;
- przeprowadzenie optymalizacji procesu hodowli *Schizochytrium sp.* mając na uwadze uzyskanie jak najwyższego przyrostu biomasy mikroalg oraz efektywności produkcji kwasu dokozaheksaenowego;
- wykazanie, że jakkolwiek przyrost biomasy oraz efektywność produkcji kwasu DHA uzależnione są od tych samych parametrów hodowli, jednak w zależności od celu hodowli wskazane są inne wartości analizowanych parametrów, co wskazuje na celowość prowadzenia hodowli dwustopniowo;
- porównanie parametrów i wydajności procesu hodowli mikroalg *Schizochytrium sp.* na podłożu sporządzonym z wykorzystaniem gliceryny technicznej w skali laboratoryjnej i w skali pilotażowej, co stanowi ważny krok w kierunku ewentualnego wdrożenia procesu w skali przemysłowej;
- potwierdzenie, że najwyższy przyrost stężenia lipidów oraz kwasu DHA następuje w logarytmicznej fazie wzrostu natomiast w stacjonarnej fazie wzrostu produkcja kwasu DHA utrzymuje się na jednakowym, wysokim poziomie;
- wykazanie, że podwyższenie wartości współczynnika wnikania tlenu $k_L a$ w wyniku zwiększenia objętościowego natężenia przepływu powietrza oraz obrotów mieszadła, powoduje wzrost produkcji biomasy oraz efektywności wytwarzania kwasu DHA

6. Wnioski końcowe

Wszystkie moje zastrzeżenia i uwagi w niczym nie umniejszają pozytywnego obrazu całokształtu dysertacji. Rozprawa Pani mgr inż. Natalii Kujawskiej zatytułowana

„Wytwarzanie kwasu dokozaheksaenowego przez mikroglony z rodzaju Schizochytrium sp. z wykorzystaniem gliceryny technicznej” zawiera oryginalne wyniki i posiada niewątpliwe walory poznawcze. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i prowadzenia eksperymentów badawczych, analizy wyników oraz formułowania wniosków, posiadających potencjał zastosowania w praktyce. Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że oceniana rozprawa Pani mgr inż. Natalii Kujawskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art.13 ust.1 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wnioskuje o dopuszczenie rozprawy do publicznej obrony.

Sma Wojciechowska