

Wrocław, 14 września 2015

**Dr hab. inż. Katarzyna Majewska-Nowak, prof. PWR**  
Politechnika Wrocławska  
Katedra Technologii Oczyszczania Wody i Ścieków  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław  
Tel.: +48 71 3204120  
Fax.: +48 71 3282980  
e-mail: katarzyna.majewska-nowak@pwr.edu.pl

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Lech

pt. „Wielostopniowa separacja membranowa wybranych białek sprzężona z procesami bioreaktorowymi ”

### Podstawa opracowania

Niniejsza recenzja została opracowana na zlecenie Dziekana Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej z dnia 24 sierpnia 2015 roku w oparciu o uchwałę Rady Wydziału.

### Celowość podjęcia tematu

Produkcja i przetwórstwo mleka w Polsce pełni ważną rolę w rolnictwie, przemyśle spożywczym i gospodarce żywnościowej kraju. Polska jest szóstym producentem mleka w krajach Unii Europejskiej, przy czym dominującą rolę w polskiej produkcji i przetwórstwie odgrywa mleko krowie.

Specyficzną cechą przemysłu spożywczego, w tym mleczarskiego, jest zależność jakości surowców, a więc i produktów, od jakości środowiska. W związku z tym ochrona środowiska jest nie tylko obowiązkiem zakładów branży mleczarskiej, ale leży także w ich interesie. Należy tu podkreślić, iż większość produktów ubocznych i odpadów z przetwórstwa mleka ulega biodegradacji.

Jednym z produktów ubocznych powstających podczas produkcji sera i twarogu jest serwatka. Generowane objętości serwatki są bardzo duże (9 litrów na 10 litrów mleka) i z tego też względu jej zagospodarowanie jest nie lada wyzwaniem, zwłaszcza dla dużych zakładów mleczarskich. Surowa serwatka, ze względu na wysoką wartość wskaźnika BZT<sub>5</sub>, nie może być odprowadzana do wód lub kanalizacji. Z drugiej strony, poszczególne składniki serwatki posiadają dużą wartość użytkową i powinny być jak najefektywniej wykorzystane jako surowiec lub półprodukt. Odzyskiwanie składników serwatki może przyczynić się do kilkukrotnego obniżenia wskaźników BZT i ChZT, a także obniżenia zawartości tłuszczów i związków azotu w ściekach mleczarskich.

W świetle powyższych rozważań, wszelkie działania zmierzające do polepszenia efektów przetwarzania serwatki, jak i mogące przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów membranowej separacji białek i peptydów oraz biodegradacji serwatki należy uznać za celowe. Autorka przedstawionej do oceny rozprawy podjęła kompleksowe badania nad możliwością wydzielenia białek serwatkowych oraz uzyskania peptydów w procesie hydrolizy enzymatycznej uzupełnione o biochemiczne przetwarzanie organicznych składników serwatki w reaktorze biologicznym, co w konsekwencji doprowadziło do opracowania zintegrowanego procesu zagospodarowania serwatki przemysłowej. Tak więc celowość tematu rozprawy nie budzi wątpliwości.

### Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca liczy 138 stron i zawiera 77 rysunków, 6 fotografii, 12 tabel oraz spis 113 cytowanych prac. Rozprawę podzielono na 7 podstawowych części

zawierających przegląd literatury, cel pracy, opis materiałów i aparatury oraz stosowanych metod badawczych, prezentację i analizę wyników badań oraz wnioski i spis oznaczeń.

W części pierwszej Autorka dokonała przeglądu literatury z zakresu problematyki będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej. Część ta składa się z 3 rozdziałów, w których przedstawiono kolejno podstawy ciśnieniowych procesów membranowych i możliwości ich wykorzystania w przemyśle mleczarskim, metody i mechanizm hydrolizy białek serwatkowych oraz sposoby realizacji biodegradacji serwatki z wykorzystaniem bakterii, grzybów i enzymów. W tej części zwrócono uwagę na zagrożenia spowodowane odprowadzaniem surowej serwatki do środowiska i przepisy prawne normalizujące ten problem. Analizując praktyczne aspekty aplikacji technik membranowych, Autorka przeanalizowała przyczyny zjawiska *foulingu* i sposoby jego ograniczania, a także wpływ metod czyszczenia membran na możliwość odzyskania pierwotnej wydajności membran. Podano liczne przykłady wykorzystania mikrofiltracji, ultrafiltracji i nanofiltracji m.in. do produkcji koncentratów białkowych, frakcjonowania białek serwatkowych, separacji laktozy, glikomakropeptydów i peptydów oraz demineralizacji serwatki. W rozdziale 2 (części pierwszej) Autorka skoncentrowała się przede wszystkim na enzymatycznej hydrolizie białek serwatkowych, jako metodzie zdecydowanie mniej agresywnej niż hydroliza chemiczna. Przedstawiono tu model matematyczny hydrolizy wiązań peptydowych, definiując przy tym stopień hydrolizy i szybkość hydrolizy wiązań peptydowych. Ostatnim zagadnieniem omówionym w części literaturowej jest biodegradacja serwatki. Doktorantka omówiła tlenowe i beztlenowe metody biochemicznego rozkładu składników serwatki, podając przy tym możliwe do zastosowania typy bioreaktorów (reaktor z upakowanym złożem, reaktor ze złożem fluidalnym, reaktor zbiornikowy o systemie ciągłym, reaktor membranowy).

Rozdział 4 (część druga) zawiera, sformułowane na podstawie wiedzy Doktorantki, cel i zakres pracy.

Część badawcza rozprawy (rozdział 5 części III i rozdział 6 części IV)) obejmuje opis materiałów, aparatury i metodyki badań oraz omówienie wyników badań. Doktorantka szczegółowo przedstawiła wykorzystane materiały (w tym membrany i moduły membranowe) oraz zastosowane instalacje do separacji białek serwatkowych i peptydów, hydrolizy albuminy oraz biodegradacji serwatki. Podała metodykę oznaczeń analitycznych i analiz chromatograficznych, sposób wyznaczania współczynników retencji poszczególnych składników serwatki oraz sposób obliczania stopnia hydrolizy albuminy. W części dotyczącej metodyki badań znalazł się także szczegółowy opis hodowli szczepów mikroorganizmów (bakterii i grzybów) oraz metody regeneracji membran.

Najważniejsza i najobszerniejsza część rozprawy to omówienie wyników badań (część IV). Zasadniczą dyskusję uzyskanych wyników Doktorantka poprzedziła oceną wpływu stopnia rozcieńczenia naturalnej serwatki na wydajność membran mikro- i ultrafiltracyjnych (rozd. 6.1). Stwierdzono spadek strumienia permeatu w czasie (o 20-30%), przy czym spadek ten był tym większy, im większe było rozcieńczenie serwatki. Oczywiście przyczyną tego niekorzystnego zjawiska było gromadzenie się białek na powierzchni lub w porach membran (w ilości 2-5% w stosunku do początkowej ilości białka) i w konsekwencji – wzrost oporów hydraulicznych membran. Mając na uwadze jeden z celów rozprawy, jakim było wydzielenie białek serwatkowych, na tym etapie badań Doktorantka oceniła ogólną retencję białek w procesie MF i UF, która okazała się dość zróżnicowana (25-72%). Wyjaśnienie tego stanu rzeczy Autorka znalazła w wykonanych chromatogramach serwatki surowej, rozcieńczonej i po procesie filtracji membranowej, co dało podstawę do stwierdzenia, że w procesie MF możliwe jest wydzielenie immunoglobulin, natomiast proces UF może posłużyć do wymycia glikomakropeptydów oraz  $\alpha$ -laktoalbuminy i  $\beta$ -laktoalbuminy.

Dążąc do zoptymalizowania stopnia retencji poszczególnych białek serwatkowych w kolejnej fazie badań (rozd. 6.2). Doktorantka oceniła skuteczność membranowej separacji

naturalnej serwatki (rozcieńczonej 20-krotnie) w warunkach zmiennego odczynu i różnego stężenia chlorku sodu. Analizując ogólny współczynnik retencji białek zaobserwowano pogorszenie separacji białek wraz ze wzrostem siły jonowej i podwyższeniem pH w przypadku membran ceramicznych, zaś dla polimerowej membrany ultrafiltracyjnej zmiany te były dużo mniej widoczne. Z kolei ocena współczynników retencji poszczególnych składników serwatki doprowadziła do wniosku, iż nie jest możliwe całkowite rozdzielenie poszczególnych białek w procesie filtracji membranowej, chociaż membrany ultrafiltracyjne zatrzymują całkowicie immunoglobuliny, zaś podwyższenie odczynu i siły jonowej serwatki sprzyja oddzieleniu immunoglobulin i laktoferyny wraz albuminą od  $\alpha$ -laktoalbuminy i  $\beta$ -laktoalbuminy wraz glikomakropeptydami.

Kolejny obszerny etap badań związany jest z hydrolizą wybranego białka w celu otrzymania peptydów serwatkowych (rozd. 6.3). Zadanie to Doktorantka zrealizowała dla wybranego białka (albuminy serum) w procesie hydrolizy enzymatycznej. Opracowanie kinetyki reakcji hydrolizy wiązań peptydowych wymagało szeregu eksperymentów w warunkach zmiennego stężenia substratu przy dobranym optymalnym stężeniu termolizyny, przy czym analiza stopnia hydrolizy w procesie okresowym wykazała, że reakcja przebiega z produktową inhibicją niekompetecyjną. Autorka opracowała równania reakcji hydrolizy enzymatycznej albuminy przy założeniu, że reakcja przebiega zgodnie z kinetyką zerowego rzędu, jak i z kinetyką pierwszego rzędu. Wyzaczyła stałe kinetyczne i sprawdziła dopasowanie opracowanych modeli kinetycznych do przebiegu danych doświadczalnych, uzyskując błąd dopasowania na poziomie 10-12%. Ostateczną weryfikację opracowanych modeli przeprowadzono w reaktorze z mieszaniem działającym w trybie ciągłym.

Kontynuacją badań przedstawionych w rozdziale 6.3 są eksperymenty opisane w rozdziale 6.4 i 6.5, które miały na celu wydzielenie aktywnych biologicznie peptydów wraz z inhibitorem reakcji hydrolizy białek serwatkowych. Ideą tego etapu prac było wykorzystanie zintegrowanego układu: reaktor enzymatyczny – proces nanofiltracji, co wiązało się z doбором odpowiedniej membrany. Analiza chromatogramów serwatki przemysłowej przed i po procesie hydrolizy enzymatycznej oraz permeatów dla membran o *cut-off* 1-15 kDa wykazała, że wytypowane membrany w znacznym stopniu przepuszczają niskocząsteczkowe frakcje peptydów, zaś zatrzymują niehydrolizowane białka, i co najważniejsze – zatrzymują enzym proteolityczny (termolizynę). Uzyskane wyniki dały podstawę do zaprojektowania reaktora membranowego, w którym Doktorantka z sukcesem przeprowadziła początkowo hydrolizę albuminy serum, by następnie doprowadzić do hydrolizy serwatki przemysłowej z ciągłym odbiorem aktywnych biologicznie peptydów (rozd. 6.5). Uzyskane stopnie hydrolizy białek serwatkowych w reaktorze membranowym były większe niż w klasycznym reaktorze z mieszaniem.

Istotnym dopełnieniem zrealizowanego cyklu badań było sprawdzenie możliwości biodegradacji strumieni odpadowych po procesie separacji białek serwatkowych. Realizacja tego etapu badań wymagała od Doktorantki przeprowadzenia hodowli różnych mikroorganizmów i wytypowania szczepu (tu akurat bakteryjnego) zdolnego do biodegradacji składników organicznych zawartych w serwatce. Autorka zdefiniowała równania opisujące kinetykę wzrostu bakterii (*Bacillus licheniformis*) początkowo dla reaktora działającego w trybie okresowym, następnie zaś – dla reaktora działającego w trybie ciągłym. Doktorantka opracowała też równania opisujące szybkość przekształcania laktozy i białek serwatkowych w zależności od ich stężenia i stężenia biomasy w reaktorze. Efektem ciągłej biodegradacji serwatki przemysłowej (rozcieńczonej) było uzyskanie produktu charakteryzującego się wskaźnikiem ChZT na poziomie 7,6 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>, co pozwala na odprowadzenie takiego medium do odbiornika wodnego.

Rozprawę zamyka zwięzłe podsumowanie wraz z wnioskami wynikającymi z przeprowadzonych badań.

### Merytoryczna ocena rozprawy

Moim zdaniem podjęte przez Doktorantkę zagadnienie jest bardzo aktualne, a jego ujęcie, w formie próby kompleksowego rozwiązania problemu odpadowego strumienia, jakim jest serwatka przemysłowa, wskazuje na znaczny potencjał aplikacyjny. Wyróżnić należy zrealizowanie bardzo obszernego programu badań w zakresie membranowej separacji białek serwatkowych i peptydów wraz z analizą czynników wpływających na właściwości transportowe i separacyjne membran, hydrolizy białek serwatkowych wraz opracowaniem opisu matematycznego reakcji proteolizy, adaptacji reaktora membranowego do wydzielenia aktywnych biologicznie peptydów, w końcu – przeprowadzenie skutecznej biodegradacji serwatki przemysłowej wraz z opracowaniem modelu matematycznego przekształcania laktozy i białek. Podkreślić należy wyjątkową trudność w opracowaniu i interpretacji wyników badań, ze względu na pracę w znacznej mierze z rzeczywistą odpadową serwatką przemysłową, jak również dużą umiejętność Doktorantki w zakresie modelowania enzymatycznych i mikrobiologicznych procesów reaktorowych.

Za główne osiągnięcia Autorki pracy uważam:

- opracowanie zintegrowanego procesu zagospodarowania serwatki przemysłowej z wykorzystaniem dwustopniowej ciśnieniowej separacji membranowej i procesów bioreaktorowych. Jest to najważniejsze osiągnięcie Doktorantki, gdyż umożliwia odzyskanie wartościowych składników serwatki, zaś jakość oczyszczonej pozostałości poserwatkowej pozwala na jej odprowadzenie do wód lub ziemi;
- dowiedzenie złożoności procesu separacji białek serwatkowych z wykorzystaniem membran mikro- i ultrafiltracyjnych oraz wykazanie znaczącego wpływu takich parametrów, jak odczyn serwatki, stężenie soli mineralnej, *cut-off* membrany, stężenie i rodzaj białek na skuteczność i wydajność separacji membranowej;
- wykazanie istotnej roli zjawiska *foulingu* podczas separacji białek na membranach ceramicznych i zdecydowanie mniejszej intensywności tego zjawiska w przypadku membran polimerowych;
- wskazanie na potencjalną możliwość wydzielenia glikomakropeptydów z serwatki lub oddzielenia immunoglobulin razem z laktoferyną i albuminą od glikomakropeptydów wraz z  $\alpha$ -laktoalbuminą i  $\beta$ -laktoalbuminą poprzez odpowiedni dobór membran mikro- i ultrafiltracyjnych oraz kontrolę odczynu i siły jonowej serwatki;
- wykazanie, że reakcja hydrolizy albuminy z wykorzystaniem enzymu – termolizyny jest reakcją przebiegającą z inhibicją niekompetencyjną i można ją opisać modelem Michaelisa-Menten uproszczonym do reakcji pierwszego rzędu;
- opracowanie metody otrzymywania peptydów aktywnych biologicznie poprzez zastosowanie reaktora membranowego umożliwiającego prowadzenie procesu hydrolizy serwatki z jednoczesnym zatrzymaniem enzymu i wydzieleniem inhibitora reakcji (obok peptydów);
- dobranie szczepu bakteryjnego zdolnego do skutecznej biodegradacji związków organicznych zawartych w serwatce przemysłowej i opracowanie równania kinetycznego opisującego szybkość wzrostu bakterii z wykorzystaniem modelu Monoda.

### **Uwagi o charakterze dyskusyjnym**

Rozprawa została podzielona na część teoretyczną, stanowiącą tło analizowanego problemu i znacznie obszerniejszą część doświadczalną. Każda z tych części zawiera po kilka rozdziałów, których układ jest logiczny i przejrzysty. Poniższe uwagi i wątpliwości nie obniżają oceny rozprawy, mogą jednak być pomocne przy dalszym wykorzystywaniu wyników pracy np. w postaci publikacji.

- Moje wątpliwości dotyczą sposobu określania wydajności membran i stosowanej terminologii. Wobec różnej powierzchni membran, wskazane jest (dla celów porównawczych) odnośnienie strumienia objętości permeatu do jednostki powierzchni membrany. Zostało to zrobione w pracy tylko raz, poprzez wprowadzenie pojęcia *gęstość strumienia permeatu*. Z reguły wydajność membran jest charakteryzowana w pracy poprzez strumień permeatu w l/h, co przy porównaniu różnych typów membran może być mylące (np. rys. 6.1, 6.2 i 6.3);
- Kolejna uwaga o charakterze dyskusyjnym dotyczy analizy i interpretacji zjawiska *foulingu* podczas separacji białek serwatkowych. Zgodnie z opisem instalacji, w której ten proces prowadzono, był to system pracujący w trybie zateżnienia, tak więc nałożyły się tutaj 2 efekty – wpływ czasu pracy oraz wpływ rosnącego stężenia białek w retencie na intensywność osadzania się białek na powierzchni membrany. Ocenę podatności membran mikro- lub ultrafiltracyjnych na blokowanie składnikami separowanego roztworu najlepiej prowadzić przy ich stałym stężeniu (czyli tutaj z recyrkulacją permeatu).

#### Pozostałe uwagi i niedociągnięcia

- W pewnych fragmentach tekstu Doktorantka stosuje anglosaski zapis liczbowy (dziesiąte część liczb oddzielone są kropką zamiast przecinkiem);
- Niespotykany jest też zapis jednostek w tekście (w kwadratowych nawiasach), co moim zdaniem jest niepotrzebną komplikacją;
- Podpis pod rys. 1.1 (str. 2) jest nieprawidłowy (wykresy dotyczą białka, a nie laktozy);
- Doktorantka odwołuje się do przepisów prawnych w sprawie konieczności oczyszczania serwatki (str. 3 i 121). Niestety, nie wiadomo czego te przepisy dotyczą. Można domniemać, że chodzi tu o warunki odprowadzania ścieków przemysłowych do wód lub ziemi. Wspomniane w tej sprawie rozporządzenie powinno mieć swój opis bibliograficzny w spisie literatury;
- Nie zawsze cytowana literatura jest aktualna. Doktorantka często powołuje się na pozycje literaturowe z lat 80. i 90. ubiegłego wieku;
- Zgodnie z układem SI wskazane jest stosowanie jako jednostki ciśnienia *MPa* (zamiast jednostki *bar*); podobnie, wskazane jest ujednoczenie jednostek objętości (lepiej  $\text{dm}^3$  zamiast *l*);
- Niezbyt fortunne jest sformułowanie *wsteczne ciśnienie osmotyczne* (str. 6) zastosowane przy opisie zjawiska polaryzacji stężeniowej. Prawdopodobnie Autorka miała na myśli wsteczną dyfuzję, zaś wzrost stężenia separowanej substancji w warstwie granicznej może spowodować wzrost ciśnienia osmotycznego. Ponadto, wydaje się, że sformułowanie *wzdłuż membrany* lepiej zastąpić wyrażeniem *przy powierzchni membrany*, gdyż sposób kumulacji składników roztworu zależy od konfiguracji membrany i trybu realizacji filtracji membranowej (*cross-flow* lub *dead-end*). Z innych nieścisłości terminologicznych można wskazać takie wyrażenia, jak *osad aktywny* (czyli osad czynny) czy też *akumulacja na dnie* (czyli sedymentacja) (str. 28);
- Stwierdzenie, że *samo blokowanie porów membrany jest procesem nieodwracalnym* jest zbyt dużym uproszczeniem. *Fouling* jest zjawiskiem złożonym i jego odwracalność/nieodwracalność zależy od charakteru substancji blokujących i metod czyszczenia pozwalających na odzyskanie (lub nie) pierwotnej wydajności membran;
- Podana na str. 13 definicja *współczynnika odcięcia* wymaga dopracowania. Ponadto, sugeruję zamiennie stosowania wyrażenia *cut-off*, które (mimo angielskiego brzmienia) jest często stosowane w tekstach polskich;

- Ponownie, niezbyt fortunne jest sformułowanie *membrana pozytywnie naładowana* (str.14). Zapewne Autorka miała na myśli membranę posiadającą dodatni ładunek powierzchniowy. Weryfikacji wymaga fragment tekstu na str. 14 dotyczący właściwości membrany z regenerowanej celulozy w zależności od odczynu roztworu (Autorka pisze o membranie *pozytywnie naładowanej* zarówno dla pH równego 5, jak i pH wynoszącego 9);
- Sugeruję częstsze stosowanie *terminu liniowa prędkość retentatu* jak uniwersalnego parametru odzwierciedlającego warunki hydrauliczne w module membranowym (zamiast *strumienia retentatu*);
- Wskazane jest podanie średnicy kanałów (membrany ceramiczne) i kapilar (membrana polimerowa) w Tabeli 5.1;
- Mam wątpliwości odnośnie zakwalifikowania membran o *cut-off* 10 i 15 kDa jako membran nanofiltracyjnych (Tabela 5.2);
- Podana wartość prędkości liniowej retentatu (127 m/s) dla membrany kapilarnej wymaga weryfikacji;
- Opis procedury oznaczania stężenia biomasy wymaga doprecyzowania – moim zdaniem Doktorantka nie oznaczała mętności, a jedynie absorbancję próby przy długości fali 550 nm (str. 46 i 109) i na podstawie krzywej kalibracyjnej obliczała stężenie biomasy;
- Czy prowadzenie membranowej filtracji serwatki w warunkach podwyższonego odczynu (pH 9) nie było zbyt ryzykowne ze względu na możliwość denaturacji białek?

#### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

W podsumowaniu pragnę podkreślić, iż mimo wspomnianych wyżej uwag, głównie o charakterze dyskusyjnym i redakcyjnym, bardzo dobrze oceniam pracę przedstawioną mi do recenzji. Co więcej, uważam, iż rozprawa zasługuje na wyróżnienie. Na tę ocenę składa się zarówno ogromny wysiłek badawczy Doktorantki, systematyczność i kompleksowość badań, jaki i praktyczne znaczenie uzyskanych wyników rozprawy doktorskiej. Uważam, że mgr inż. Magdalena Lech istotnie przyczyniła się do poszerzenia stanu wiedzy na temat membranowej separacji składników serwatki oraz procesów enzymatycznych i mikrobiologicznych zachodzących podczas utylizacji i biodegradacji odpadowej serwatki przemysłowej, dostarczając jednocześnie wiele wskazówek o dużej wadze dla praktyki inżynierskiej. W swojej pracy Doktorantka wykazała się ogólną wiedzą w zakresie aplikacji technik membranowych i procesów bioreaktorowych oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Lech spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez obowiązujące ustawowe przepisy określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. Wnoszę zatem o przyjęcie pracy przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej i dopuszczenie jej Autorki do publicznej obrony.