Legnica, dn. 05.03.2023 r.

Prof. dr hab. inż. Jerzy Jan Pietkiewicz
Wydział Nauk o Zdrowiu i Kulturze Fizycznej
Collegium Witelona Uczelnia Państwowa
59-220 Legnica, ul. Sejmowa 5A

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana mgr Marcina Waltera pt. „Application of plant biomass in biotechnology" (Zastosowanie biomasy roślinnej w biotechnologii)

**wykonanej w Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie
na Wydziale Nauki o Żywności
w Katedrze Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych
i w Katedrze Inżynierii, Aparatury Procesowej i Biotechnologii Żywności**

**pod kierunkiem:
Pani prof. dr hab. inż. Iwony Konopki
i Pana dr. hab. inż. Marka Adamczaka, prof. uczelni**

1. Dobór i znaczenie tematu

Głównym źródłem węgla i energii dla drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych do produkcji różnych bioproduktów są sacharydy i polisacharydy występujące biomasie roślinnej. Podstawowym źródłem fermentujących sacharydów jest skrobia i jej hydrolizaty.

Innym polisacharydem, znajdującym coraz częściej zastosowanie w procesach biotechnologicznych jest celuloza i hemiceluloza. Hydrolizaty celulozy i hemicelulozy zawartej w roślinach oraz odpadach po przetwórstwie roślin są bardzo dobrym źródłem fermentujących sacharydów coraz powszechniej stosowanych do sporządzania podłoży hodowlanych dla drobnoustrojów stosowanych w procesach biotechnologicznych do produkcji różnych bioproduktów, a zwłaszcza biopaliw.

Prowadzenie badań i opracowanie efektywnych technologii hydrolizy surowców i odpadów roślinnych zawierających celulozę jest zatem jak najbardziej pożądanym kierunkiem badań. Istnieje duże społeczne zapotrzebowanie na opracowanie efektywnej i racjonalnej ekonomicznie technologii otrzymywania hydrolizatów celulozowych.

W ramach ocenianej rozprawy doktorskiej Pan mgr Marcin Walter:

1. Badał procesy wstępnej obróbki biomasy: miksanta olbrzymiego, miksanta cukrowego, buraka cukrowego i rafinatu kory wierzby purpurowej, przed hydrolizą enzymatyczną, stosując różne metody wstępnej obróbki: rozdrabnianie mechaniczne, ekspandowanie

próżniowe, obróbkę mikrofalową w wybranych rozpuszczalnikach (0,1 M NaOH; 0,1 M H_2SO_4; H_2O; 60% C_2H_5OH), delignifikację alkaliczną oraz detoksykację hydrolizatów.

2. Oceniał zmiany strukturalne matryc lignocelulozowych po wstępnej obróbce, na podstawie obrazowania z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR).
3. Badał i oceniał efekty hydrolizy enzymatycznej matryc lignocelulozowych po wstępnej obróbce, przy użyciu komercyjnych zestawów enzymatycznych stosowanych do degradacji lignocelulozy.
4. Badał fermentację etanolową i oceniał wydajności produkcji etanolu z hydrolizatów lignocelulozowych.
5. Badał biosyntezę karotenoidów przez szczepy drożdży *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula glutinis* KKP347 i *Rhodotorula glutinis* KKP350 z hydrolizatów rafinatu kory wierzby purpurowej.

Pracownicy Katedry Inżynierii, Aparatury Procesowej i Biotechnologii Żywności działającej na Wydziale Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, od wielu lat prowadzą badania naukowe dotyczące hydrolizy materiałów celulozowych i biosyntezy różnych bioproduktów. Ich wkład w naukę w tym zakresie jest udokumentowany wieloma publikacjami naukowymi.

Katedra Inżynierii, Aparatury Procesowej i Biotechnologii Żywności jest wyposażona w odpowiednią aparaturę naukową do wykonywania tego rodzaju badań, a liczne grono wybitnych naukowców jest gwarantem wysokiego poziomu badań. Należy zatem uznać za właściwy wybór tematyki oraz miejsca wykonywania badań, a podjęta przez Pana mgr Marcina Waltera tematyka badawcza mogła być z powodzeniem zrealizowana w tej Katedrze.

2. Ocena rozprawy pod względem formalnym

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Marcina Waltera jest napisana w języku angielskim, obejmuje wraz z załącznikami 175 stron, 21 tabel, 23 rysunki i zawiera: Podziękowania (Acknowledgments); Spis treści (Contents); Listę skrótów (List of abbreviations); Streszczenie (Abstract) w języku angielskim i polskim – 4 strony; Dodatkowe informacje na temat przedstawianej rozprawy (Additional information on presented dissertations); Wprowadzenie (Introduction) – 3 strony; Przegląd literatury (Review of the literature) – 38 stron; Cel i zakres pracy (Purpose and scope of the work) – 2 strony; część metodyczną noszącą nazwę Materiały i metody (Materials and methods) – 12 stron; Dyskusja wyników (Disscussion of the results) – 43 strony;

Wnioski i uwagi (Conclusions and observations) – 2 strony; Bibliografia (References) – 25 stron, zawierająca 244 pozycje.

W końcowej części rozprawy w załącznikach (Appendices) liczących 35 stron, Kandydat przedstawił kopie 2 publikacji oraz 6 oświadczeń współautorów tych publikacji. Na 12-tej stronie ocenianej rozprawy Kandydat informuje, że: „Część materiału naukowego **zawartego** w prezentowanej pracy została już opublikowana. W dwóch pracach ...". A zatem jako recenzent przyjmuję, że dołączone publikacje nie są częścią ocenianej rozprawy doktorskiej tylko dokumentują dorobek naukowy Kandydata.

Na końcu rozprawy nie zamieszczono spisu rysunków i spisu tabel. Umieszczenie tych spisów na pewno pozwoliłoby Kandydatowi zauważyć, że w rozprawie brakuje dziewiątej tabeli, której zamieszczenie zostało zapowiedziane na 81. stronie rozprawy. Ponadto zestawienie tytułów rysunków i tabel ułatwiłoby Kandydatowi analizę poprawności zastosowanych podpisów i ich ujednolicenie.

Kandydat w treści rozprawy używa wielu symboli, skrótów i akronimów. Stosowanie skrótów utrudnia czytanie i analizowanie treści rozprawy doktorskiej.

Uważam, że tytuł rozprawy doktorskiej jest zbyt ogólny i nie powinien dotyczyć „całej" biotechnologii, lecz nawiązywać do badań procesów hydrolizy wybranej biomasy roślinnej i prób zastosowań hydrolizatów w niektórych bioprocesach.

W opinii recenzenta należałoby podzielić treść 5-tego rozdziału rozprawy („Discussion of the results" - Dyskusja wyników) na dwa odrębne rozdziały, zatytułowane: „Omówienie wyników badań" oraz „Dyskusja wyników". Uzyskano by w ten sposób nie tylko lepszy poddział treści rozprawy, ale przede wszystkim podkreślono by i wyodrębniono wyniki własnych badań i ich zestawienie z osiągnięciami badawczymi innych autorów.

W treści rozprawy zastosowano niewłaściwe odsyłacze do szeregu rysunków i tabel, np.: na 69. stronie Autor napisał „Rysunki 7-10 ilustrują ..."; na 74. stronie Autor napisał „Rysunki 11-12 pokazują ..."; na 77. stronie Autor napisał „Tabela 7 pokazuje ..."; na 88. stronie Autor napisał „Wyniki przedstawione na rysunku 14. pokazują ...". To Autor na rysunkach i w tabelach „przedstawia ...", „pokazuje ...", a zatem należy używać określeń: pokazano, przedstawiono, z analizy danych przedstawionych w tabeli (na rysunku) wynika, że ....

W treści rozprawy brakuje konsekwencji w stosowaniu jednolitych jednostek miary, np.: stężenie etanolu jest podawane w: $g \cdot dm^{-3}$, $mg \cdot dm^{-3}$, $mg \cdot g^{-1}$; stężenie cukrów redukujących jest podawane w: $g \cdot dm^{-3}$, $mg \cdot g^{-1}$, %; ciśnienie - w MPa i w psi.

Na 61-ej stronie Autor odsyła czytelnika do punktu 4.1.6, który nie występuje w treści rozprawy. W 11-tym wierszu od dołu 61-ej strony odsyła czytelnika do pkt. 4.2.2 zamiast do pkt. 4.2.1.

Podpisy rysunków oraz objaśnienia podane w obrębie rysunków i w ich podpisach, a także tytuły tabel, opisy kolumn pionowych i poziomych oraz ewentualne objaśnienia w dolnej części tabeli powinny zawierać pełne i zrozumiałe informacje dla czytelnika, aby nie musiał zaglądać do treści pracy.

W treści rozprawy zastosowano niewłaściwe podpisy wielu rysunków i niewłaściwie tytuły tabel. Treść podpisów rysunków powinna określać prezentowane na nich zależności (np.: co na co wpływa; co od czego zależy; przebieg zmian ... w zależności od ...). Podpis pod rysunkiem 7 powinien więc brzmieć: „Wpływ dawki mieszaniny enzymów celulolitycznych Accellerasa 1500 z dodatkiem enzymów uzupełniających na stężenie cukrów redukujących w próbkach zhydrolizowanej biomasy *Miscanthus giganteus* (a) i *Miscanthus sacchariflorus* (b) po hydrolizie enzymatycznej (Hydroliza 1) i po dwukrotnym (Hydroliza 2) i trzykrotnym (Hydroliza 3) recyklingu stałej frakcji". Na rysunku 8 na osi Y pokazano wydajność, nie produktywność.

Podpis pod rysunkiem 9 powinien mieć brzmienie: „Wpływ dawki mieszaniny enzymów celulolitycznych Accellerasa 1500 z dodatkiem enzymów uzupełniających na wydajność hydrolizy polisacharydów w próbkach biomasy *Miscanthus giganteus* (a) i *Miscanthus sacchariflorus* (b) po hydrolizie enzymatycznej (Hydroliza 1) i po dwukrotnym (Hydroliza 2) i trzykrotnym (Hydroliza 3) recyklingu stałej frakcji". Itd., itd. ... Na rysunkach przedstawiających wygląd struktury biomasy badanych surowców roślinnych przed i po obróbce wstępnej lub hydrolizie enzymatycznej (rysunki: 11; 12; 13; 15; 16; 17; i 18) nie podano pełnych ich opisów, brakuje m.in. informacji pod jakim powiększeniem mikroskopu fotografowano obrazy.

Zalecam uwzględnienie uwag przedstawionych w tej recenzji przy pisaniu i wygłaszaniu autoreferatu podczas obrony rozprawy doktorskiej oraz przy publikowaniu fragmentów rozprawy.

Układ pracy jest logiczny i odpowiedni dla rozpraw doktorskich. Stwierdzam, że Kandydat w dostatecznym stopniu wykazał się opanowaniem techniki pisania rozpraw naukowych, a przedłożona do oceny praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim.

3. Ocena rozprawy pod względem merytorycznym

Po krótkim „**Wprowadzeniu**", w rozdziale pt. „**Przegląd literatury**" (Review of the literature), Kandydat dokonuje kompleksowego przeglądu piśmiennictwa, popartego cytowaniem licznych prac z ostatnich 15 lat, dotyczących:

- wykorzystania różnych rodzajów biomasy roślinnej w biotechnologii do celów energetycznych,
- badania różnych metod wstępnej obróbki biomasy roślinnej,
- usprawnienia wstępnej obróbki biomasy roślinnej poprzez zastosowanie ekspansji próżniowej lub promieniowania mikrofalowego,
- badania różnych metod hydrolizy biomasy lignocelulozowej,
- ponownego wykorzystania (recyklingu) enzymów zaadsorbowanych (unieruchomionych) na stałej frakcji materiału lignocelulozowego w celu zmniejszenia zużycia enzymów stosowanych do hydrolizy biomasy roślinnej,
- zastosowania hydrolizatów lignocelulozowych jako substratów do biosyntezy etanolu.

W tym rozdziale (Przegląd literatury) Kandydat nie przedstawił przeglądu piśmiennictwa dotyczącego otrzymywania hydrolizatów z rafinatu wierzby purpurowej i ich wykorzystania do biosyntezy karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula*. Brakuje również przeglądu piśmiennictwa dotyczącego produkcji etanolu z buraków cukrowych.

W spisie literatury nie zamieszczono tytułów norm: PN-EN ISO 13906:2009 i PN-ISO 5498:1996 cytowanych na 63-ej stronie, PN-R-74458-1999 cytowanej na 77-ej stronie oraz nazwy procedury NREL/TP-510-42622 cytowanej na 64-ej stronie.

Na 59-tej stronie w 6 wierszu od góry Autor odsyła czytelnika do źródła literaturowego autorstwa: Mikulski et al. (2019) dotyczącego procedury wstępnej obróbki mikrofalowej. Tej pozycji nie ma w spisie literatury (References). Na 67-ej stronie w 2-gim i 14-tym wierszu od góry jest odesłanie do pozycji literaturowej autorstwa: Kot et al. (2017) – tej pozycji również nie ma w spisie literatury.

Przedstawiony przegląd stanu wiedzy wprowadza czytelnika w eksperymentalną część pracy i tylko częściowo uzasadnia cele podjętych badań eksperymentalnych opisanych w dalszych częściach ocenianej rozprawy. W tej części rozprawy nie przedstawiono przesłanek do sformułowania 2-giej i 3-ciej hipotezy badawczej, w części dotyczącej fermentacji etanolowej i biosyntezy karotenoidów.

Treść części teoretycznej rozprawy oceniam pozytywnie i stwierdzam, że Pan mgr Marcin Walter dobrze opanował i przedstawił wiedzę dotyczącą różnych metod wstępnej obróbki i hydrolizy biomasy lignocelulozowej.

W trzecim rozdziale pt. **Cel i zakres pracy** (Purpose and scope of the work) Kandydat przedstawił 3 hipotezy badawcze:

1. Recykling enzymów zaadsorbowanych na stałej frakcji materiału lignocelulozowego jest efektywną techniką zwiększenia efektywności ekonomicznej hydrolizy enzymatycznej

hydrolizatów lignocelulozowych z biomasy miksanta olbrzymiego, miksanta cukrowego i buraka cukrowego.

2. Ekspansja próżniowa biomasy buraka cukrowego i obróbka mikrofalowa biomasy miksanta olbrzymiego czynią biomasę bardziej podatną na hydrolizę enzymatyczną i sprzyjają fermentacji alkoholowej.
3. Zastosowanie laboratoryjnej adaptacji drożdży *Rhodotorula* do wykorzystania hydrolizatów lignocelulozowych rafinatu kory wierzby purpurowej sprzyja wydajnej biosyntezie karotenoidów.

Następnie w pięciu punktach określił dosyć ogólnie zakres badań. Brakuje rysunku, na którym Autor powinien przedstawić schemat organizacji i przebiegu badań.

W pierwszej hipotezie Kandydat zakłada badanie: „... zwiększenia efektywności ekonomicznej hydrolizy enzymatycznej ...". W ocenianej rozprawie doktorskiej Autor nie używa mierników ekonomicznych służących do oceny efektywności ekonomicznej, a jedynie stara się ocenić efektywność hydrolizy enzymatycznej.

Zdaniem recenzenta przyjęto zbyt „szeroki", wielowątkowy zakres badań, którego pełna realizacja wymagała przeprowadzenia wielu doświadczeń, zastosowania wielu mierników zdefiniowanych w bioinżynierii, analizy i optymalizacji warunków procesowych, dobrej prezentacji i oceny wyników badań.

W rozdziale pt. „**Materiał i metody badawcze**" (Materials and methods), Kandydat przekazuje informacje o użytych w tracie badań materiałach i mikroorganizmach oraz zastosowanych metodach badawczych i analitycznych.

Proszę o uzasadnienie, dlaczego do badań stosowano korzenie buraka cukrowego pochodzące z Holandii, nie z Polski? Na jakiej podstawie dokonano wyboru szczepów mikroorganizmów zastosowanych w badaniach fermentacji etanolowej i biosyntezy karotenoidów?

Opisy zastosowanych metod wstępnej obróbki surowców roślinnych i ich hydrolizy enzymatycznej są na ogół dokładne, zrozumiałe i na ich podstawie będzie można odtworzyć większość eksperymentów opisanych w ocenianej rozprawie.

Pewien niedosyt budzi dobór i opis metod oceny efektywności przebiegu hydrolizy enzymatycznej surowców roślinnych po wstępnej obróbce oraz opis procesów biosyntezy etanolu i karotenoidów. Podczas oceny i porównywania wyników uzyskanych w kolejnych eksperymentach nie wystarczy tylko analizować stężenia bioproduktów. Wskazane jest posługiwanie się wydajnością i dodatkowo produktywnością tj. parametrami uwzględniającymi czas reakcji (hydrolizy, hodowli, biosyntezy), a mianowicie:

- szybkością objętościową biosyntezy bioproduktu, która podaje informację ile gramów bioproduktu powstało w jednym litrze podłoża hodowlanego (mieszaniny reakcyjnej) w ciągu godziny,
- szybkością właściwą biosyntezy bioproduktu, która podaje informację ile gramów bioproduktu jest syntetyzowanych przy udziale jednego grama enzymu lub biomasy drobnoustrojów w ciągu godziny.

Przedstawione w rozprawie (na 60. i 61. stronie) pięć wzorów dotyczy obliczania wydajności (yield), którą przedstawia się w postaci ułamkowej – jako współczynnik wydajności (yield effici ncy) lub po pomnożeniu przez 100 – jako wydajność (yield) wyrażoną w procentach.

Na podstawie wzoru nr 1 Autor tej pracy oblicza jakiś parametr (nie jest to produktywność), który po uwzględnieniu informacji i jednostek zawartych w opisie tego wzoru, jest wyrażany w dziwnej jednostce $g^2 \cdot dm^{-3}$. Z analizy wzorów nr 2 i nr 3 stosowanych do obliczania wydajności hydrolizy, po podstawieniu jednostek zawartych w opisach tych wzorów otrzymujemy dziwną i dla mnie nie zrozumiałą jednostkę wydajności, a mianowicie $g/(dm^3\ \%)$.

Na podstawie wzoru nr 4 Autor oblicza współczynnik wydajności hydrolizy biomasy roślinnej (nie produktywność), wyrażony w postaci ułamkowej, który pomnożony przez 100 wyrażałby wydajność w procentach.

Jedynie na podstawie wzoru nr 5 można poprawnie obliczyć wydajność hydrolizy wyrażoną w procentach. Autor w opisie tego wzoru nie wyjaśnia, co reprezentuje użyty w mianowniku współczynnik 1,111. Ten wzór (nr 5) powinien być umieszczony w pkt. 4.2.2. Enzymatyczna hydroliza substratów (Enzymatic hydrolysis of substrates). Autor nie zamieścił odnośników do źródeł literaturowych, a zatem są to wzory opracowane przez Autora tej rozprawy.

W tej części pracy Kandydat nie przedstawił sposobów (wzorów) na obliczanie parametrów opisujących efektywność procesów biosyntezy etanolu i karotenoidów.

Na stronie 63-ej w punkcie 4.3.1. Oznaczanie zawartości suchej masy (Determination of dry matter content) Autor napisał, że zawartość suchej masy w próbkach oznaczał za pomocą wagosuszarki, susząc próbki w temperaturze 130°C przez 20 sekund. Mam wątpliwości, czy w tak krótkim czasie uzyskiwano stałą wagę próbek oraz czy tak wysoka temperatura nie powodowała częściowego rozkładu i karmelizacji niektórych związków chemicznych zawartych w próbkach.

W punkcie 4.3.12. Pomiar emisji CO_2 (Measurement of CO_2 emission) Kandydat przedstawił metodę wagową oznaczania ilości ditlenku węgla wyemitowanego w czasie fermentacji etanolowej. Jest to bardzo niedokładna metoda, ponieważ w czasie 72. lub 96-cio godzinnej fermentacji prowadzonej w temperaturze 30°C z podłoża fermentującego uwalnia się nie tylko ditlenek węgla, ale również odparowuje woda i etanol. Ponadto część substratu w czasie fermentacji była zużywana

na podtrzymanie życia komórek drożdży i na biosyntezę etanolu o mniejszym ciężarze właściwym od substratu. Tak wykonanych pomiarów emisji ditlenku węgla nie można stosować do oceny efektywności fermentacji etanolowej.

Wysoko oceniam prowadzenie analiz statystycznych z użyciem programu komputerowego Statistca 13.3 i analizy wariancji ANOVA z testem RIR Tukey'a.

Kończąc ocenę tego rozdziału chciałbym podkreślić, że zastosowano właściwą aparaturę badawczą i dobre metody dotyczące badania i oceny wyników badań wstępnej obróbki i hydrolizy biomasy lignocelulozowej.

W rozdziale 5-tym pt. **„Omówienie wyników"** (Discussion of the results) zawarto dokumentację wyników uzyskanych w kolejnych eksperymentach. Wyniki badań przedstawiono na 18 rysunkach i w 14 tabelach.

W pierwszej części tego rozdziału Kandydat przedstawił wyniki badań biomasy miksanta olbrzymiego i miksanta cukrowego, poddawanej wstępnej obróbce polegającej na hydrolizie alkalicznej mechanicznie rozdrobnionej biomasy. Wstępna obróbka miała na celu ułatwienie i zwiększenie efektywności późniejszej hydrolizy enzymatycznej.

Następnie do odwirowanej stałej frakcji biomasy, po jej detoksykacji i zawieszeniu w wodzie dejonizowanej dodawano różnej wielkości dawki enzymów (Accellerase 1500 z dodatkiem mieszaniny enzymów uzupełniających) i poddawano hydrolizie, przy czym dodawano takie dawki enzymów aby zapewnić aktywność celulazy w środowisku reakcji na poziomie: 18; 29; 35 i 58 jednostek FPU. Ten sposób postępowania wynikał z doniesień zawartych w cytowanych publikacjach i nie był nowością w badaniach prowadzonych przez Pana mgr M. Waltera w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej.

Nowością w tych badaniach jest próba zastosowania recyklingu enzymatycznego, to jest wykorzystania enzymów unieruchomionych na stałej frakcji biomasy miksanta olbrzymiego i miksanta cukrowego pozostałej po pierwszej hydrolizie, do przeprowadzenia drugiego i trzeciego cyklu hydrolizy enzymatycznej następnych porcji biomasy.

Autor nie wyjaśnia, ile gramów stałej biomasy pozostawało po pierwszej i po drugiej hydrolizie, ile dodawano „...świeżych partii matrycy roślinnej" (... fresh batches of plant matrices) i jaka była aktywność celulazy w środowisku reakcji w czasie drugiej i trzeciej hydrolizy.

W tym etapie badań brakuje wyznaczenia optymalnych warunków hydrolizy enzymatycznej, m.in.: temperatury, ciśnienia, czasu. Analizowano jedynie wpływ „z góry określonej" dawki enzymów.

Uzyskiwanie większego stężenia cukrów redukujących i większej wydajności hydrolizy badanej biomasy przy wyższych dawkach preparatów enzymatycznych jest oczywiste. Również przy

zastosowaniu wyższych dawek preparatów enzymatycznych większa ilość enzymów ulegała unieruchomieniu, a zatem należało spodziewać się większego stężenia cukrów redukujących i większej wydajności w kolejnych hydrolizach. Gdyby w badaniach uwzględniano wpływ czasu hydrolizy na jej efektywność, może uzyskano by odpowiedź na pytanie przy jakiej dawce enzymów uzyskuje się najlepszą produktywność (czyli szybkość właściwą i objętościową hydrolizy).

W następnej części tego rozdziału Kandydat przedstawił wyniki badania wstępnej obróbki i hydrolizy biomasy buraków cukrowych. Na 77-ej stronie Kandydat zamieścił tabelę z Polskiej Normy (PN-R-74458:1999), w której podano przeciętny skład chemiczny korzenia buraka cukrowego. Jeśli podanie tych informacji (tabela 7) byłoby potrzebne dla realizacji celu badań w ocenianej rozprawie doktorskiej, to te dane powinny były być podane w Przeglądzie literatury, ponieważ nie są to wyniki z badań własnych Doktoranta.

Również w tej części rozprawy Kandydat wiele miejsca przeznacza na prezentację wyników badań innych autorów i informuje, że już były prowadzone, m.in. badania dotyczące:

- wykorzystania korzeni buraków cukrowych i produktów ubocznych przemysłu cukrowniczego do produkcji cukrów fermentujących,
- przebadania wielu metod wstępnej obróbki buraków cukrowych.

Te informacje zaczerpnięte z publikacji powinny były zostać podane w Przeglądzie literatury, w którym nie wspomniano, że są już opracowane technologie produkcji etanolu z buraków cukrowych i są one stosowane m.in. w polskich gorzelniach.

Następnie w tekście rozprawy Kandydat określa, że w pracy zbadano możliwość wykorzystania korzenia buraka cukrowego do produkcji bioetanolu, przy użyciu różnych metod obróbki wstępnej i hydrolizy enzymatycznej. Eksperymenty miały na celu zwiększenie ilości uwalnianych cukrów fermentujących poprzez zastosowanie nowej, prostej metody obróbki wstępnej rozdrobnionych buraków cukrowych, a także wydajnej hydrolizy enzymatycznej poprzez ponowne wykorzystanie enzymów zaadsorbowanych na stałej frakcji biomasy.

Z informacji przedstawionych w rozprawie wynika że w burakach cukrowych jest tylko około 5% (s.m.) nierozpuszczalnej biomasy. A zatem należy przypuszczać, że ilość enzymów zaadsorbowanych (unieruchomionych) na stałej frakcji biomasy pozostającej po hydrolizie enzymatycznej również będzie niewielka. Sacharoza stanowi około 75% s.m. korzenia buraka. Moim zdaniem praktyczne znaczenie miałyby tylko badania dotyczące hydrolizy enzymatycznej biomasy korzenia buraka cukrowego po separacji sacharozy, czyli dotyczące hydrolizy wysłodków buraczanych lub wywaru, po przeprowadzeniu fermentacji alkoholowej całej biomasy i oddestylowaniu etanolu.

W tytule tabeli 8. Kandydat podał informację, że w niej przedstawiono: „Skład chemiczny próbek biomasy buraków cukrowych". Ten tytuł nie jest pełny, bo nie podano w nim informacji, że skład chemiczny dotyczył próbek „... po mechanicznym rozdrobnieniu i po ekspansji próżniowej". Nie podano pełnej informacji o jednostkach, w których wyrażono zawartość: suchej masy, surowego popiołu, białka ogółem, włókna surowego i sacharozy. Jakie to są jednostki procentowe? Czy to jest: % m/m (masowo-masowy), czy % m/v (masowo-objętościowy), czy % v/v (objętościowo-objętościowy)? Uważam, że źle oznaczono i podano w tabeli 8. zawartość pektyn w biomasie buraka. Moim zdaniem nie jest możliwe, aby w biomasie buraka było ich ponad 14% s.m. Taka ilość nie bilansuje się z pozostałymi składnikami suchej masy.

Analiza danych zawartych w tabeli 8. wykazała, że ekspansja próżniowa miała niewielki wpływ na zmiany zawartości badanych substancji w składzie chemicznym biomasy buraków cukrowych, w porównaniu ze składem chemicznym próbek poddanych tylko rozdrabnianiu mechanicznemu. Dopiero na obrazach mikroskopowych (rys. 14) przedstawiających wygląd struktury mechanicznie rozdrobnionej biomasy i biomasy poddanej ekspansji widać, że ekspansja próżniowa powodowała częściowy rozpad ścian komórkowych.

Prezentując dane literaturowe Kandydat udowadnia, że zastosowanie zmian ciśnienia hydrostatycznego nie jest nowością w badaniach, bo inni autorzy już stosowali tę metodę wstępnej obróbki biomasy, a zatem Jego obserwacje potwierdzają dane podane w cytowanych publikacjach.

To nie tabele 9-14 podsumowują wyniki oznaczeń cukru po hydrolizie wstępnie obrobionej matrycy buraków cukrowych, tylko Kandydat w tych tabelach je prezentuje (nie podsumowuje). Tabeli 9 nie zamieszczono w rozprawie. Prezentowanie wyników badań, seryjnie w 4-ech kolejno następujących po sobie tabelach zawierających niepełne tytuły i opisy kolumn bardzo utrudnia odczytywanie wyników badań i ich interpretację.

Kandydat bardzo krótko podsumował wyniki badań przedstawione w tabelach 10-14. Nie spróbował skomentować wyników badań zaprezentowanych w każdej tabeli z osobna i nie podsumował ich co najmniej jednym wnioskiem. Napisał, że uzyskane w badaniach wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, przytaczając dane literaturowe. Tym samym wykazał, że przeprowadzone przez Niego badania nie mają cech nowości.

W dalszej części punktu 5.2 Kandydat przedstawiał wyniki badań dotyczące:

- hydrolizy enzymatycznej biomasy buraka przeprowadzonej po wstępnym mechanicznym rozdrobnieniu i po ekspansji próżniowej,
- sekwencyjnej fermentacji etanolowej (SHF) – fermentacji etanolowej prowadzonej bezpośrednio po hydrolizie enzymatycznej biomasy buraka poddanej wstępnej obróbce,
- fermentacji skojarzonej (SSF) – jednoczesnej hydrolizy i fermentacji etanolowej.

Analiza wyników uzyskanych w tych badaniach i ich dyskusja wykazała ich zgodność z opublikowanymi wynikami badań cytowanych autorów.

W dalszej części omawiania wyników badań Kandydat przedstawił wyniki badań wpływu różnych rozpuszczalników i ciśnień stosowanych podczas wstępnej obróbki mikrofalowej na efektywność hydrolizy enzymatycznej biomasy miksanta olbrzymiego. Najlepsze efekty hydrolizy uzyskano prowadząc hydrolizę enzymatyczną podczas obróbki mikrofalowej w środowisku kwaśnym (H_2SO_4) pod ciśnieniem 90 psi (0,621 MPa). Podczas fermentacji tego hydrolizatu uzyskano bardzo niskie stężenie etanolu (1,31%). Najwyższe stężenie etanolu (2,36%) uzyskano w fermentacji hydrolizatu enzymatycznego otrzymanego po zastosowaniu obróbki mikrofalowej w środowisku kwaśnym pod ciśnieniem 30 psi (0,207 MPa).

Kandydat podsumowując wyniki tych badań tylko stwierdza, że „Przy wyborze parametrów obróbki mikrofalowej należy wziąć pod uwagę kompromis między wysoką wydajnością hydrolizy a produktywnością fermentacji etanolowej" , ale nie przedstawia optymalnego rozwiązania.

W końcowej części omawiania wyników badań Kandydat przedstawił wyniki badań dotyczące doskonalenia szczepów drożdży *Rhodotorula* do biosyntezy karotenoidów, w hodowlach na hydrolizatach enzymatycznych rafinatu kory wierzby purpurowej poddanego wstępnej, termicznej obróbce zasadowej. Adaptacyjna metoda doskonalenia szczepów drobnoustrojów jest metodą przestarzałą i rzadko stosowaną we współczesnych badaniach dotyczących doskonalenia cech drobnoustrojów stosowanych w bioprocesach.

Nie bardzo rozumiem, jakimi motywami kierował się Kandydat, aby w rozprawie przedstawić wyniki badań dotyczące doskonalenia szczepów drożdży i prób biosyntezy karotenoidów. Skoro temu zagadnieniu nie poświęcił nawet jednej strony w części literaturowej tej rozprawy, a badania dotyczące zastosowania zaadaptowanych szczepów drożdży do biosyntezy karotenoidów były bardzo powierzchowne i bardzo słabo przedstawione.

W metodyce badań, w punkcie 4.3.18. Pomiary gęstości optycznej, Kandydat podał, że płytki studzienkowe z zawiesiną bakteryjną (domyślam się, że chodzi tutaj o zawiesinę drożdży w badanych podłożach) inkubował w temperaturze 30°C przez 168 godzin. Płytki były wstrząsane tylko przed każdym pomiarem gęstości optycznej, wykonywanym co 6 godzin, a zatem te hodowle były prowadzone w warunkach beztlenowych. Nie jest to dobra metoda do określania kinetyki wzrostu drożdży, które do intensywnego rozmnażania się wymagają warunków tlenowych.

Nie podano też sposobu obliczania zmian gęstości optycznej i wyrażania tych zmian w procentach. Stwierdzam, że tego rodzaju hodowle powinny być prowadzone w warunkach tlenowych, tj. z napowietrzaniem podłoża hodowlanego. Pomiary tylko gęstości optycznej biomasy drożdży hodowanej w warunkach beztlenowych w płytkach studzienkowych nie mogą być

stosowane do badań optymalizacji składu podłoży do hodowli drożdży z rodzaju *Rhodotorula*, które wymagają zastosowania natleniania podłoża hodowlanego.

Przedstawione w tej części rozprawy wyniki badań dotyczące analizy możliwości zastosowania drożdży *Rhodotorula* do biosyntezy karotenoidów na hydrolizatach kory wierzby purpurowej mają charakter poznawczy, nie są to kompleksowe badania, w wyniku których możliwe byłoby zoptymalizowanie parametrów bioprocesowych dla biosyntezy karotenoidów.

Prezentując wyniki własnych badań Pan mgr Marcin Walter konfrontował je z wynikami badań innych autorów. W dużej części wyniki badań Kandydata są tylko weryfikacją wyników otrzymanych przez inne zespoły badawcze oraz wskazują kierunki doskonalenia procesów wstępnej obróbki i hydrolizy enzymatycznej biomasy miksantów olbrzymiego i cukrowego, korzenia buraka cukrowego i kory wierzby purpurowej, mających na celu zwiększenie stężenia fermentujących cukrów. Przeprowadzone przez Niego badania przyczyniły się do pogłębienia wiedzy dotyczącej hydrolizy wybranych surowców lignocelulozowych.

W końcowej części rozprawy, w pkt. 6. Wyniki i obserwacje (Conclusions and observations), Kandydat przedstawił 11 szczegółowych wniosków będących podsumowaniem przedstawionych w rozprawie wyników badań.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedłożona mi do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego badania metod wstępnej obróbki i hydrolizy enzymatycznej biomasy miksanta olbrzymiego, miksanta cukrowego, korzenia buraka cukrowego i kory wierzby purpurowej, mających na celu zwiększenie stężenia fermentujących cukrów. Uzyskane w badaniach wyniki potwierdzają słuszność założeń badawczych i mają znaczenie poznawcze.

Pan mgr Marcin Walter w prawidłowy sposób przeprowadził badania stosując dobrane metody analityczne, wykazał się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Przedstawione uwagi, aczkolwiek ukazujące pewne mankamenty w pracy, brak precyzyjności wyrażeń oraz uchybienia językowe, w większości mają charakter redakcyjny i w niewielkim stopniu zmniejszają moją pozytywną ocenę recenzowanej rozprawy.

Podsumowując formalną i merytoryczną ocenę przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej pt. „Application of plant biomass in biotechnology" (Zastosowanie biomasy roślinnej w biotechnologii) stwierdzam, że rozprawa ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U. z 2022, poz. 574 z późn. zm.), a Pan mgr Marcin Walter posiada ogólną wiedzę teoretyczną

w zakresie dyscypliny naukowej Technologii żywności i żywienia oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Na tej podstawie stawiam wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej przez Radę Naukową Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie i dopuszczenie do jej publicznej obrony.

Prof. dr hab. inż. Jerzy J. Pietkiewicz