Prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
joanna.kawa-rygielska@upwr.edu.pl

Wrocław, 17.02.2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Marcina Waltera

pt. „Zastosowanie biomasy roślinnej w biotechnologii"

wykonanej pod kierunkiem

prof. dr hab. inż. Iwony Konopki z Katedry Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych, UMW oraz dr hab. inż. Marka Adamczaka, prof. uczelni z Katedry Inżynierii, Aparatury Procesowej i Biotechnologii Żywności, UWM

1. Podstawa opracowania recenzji

Podstawą formalną opracowania niniejszej recenzji jest pismo Rady Naukowej Dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 30 stycznia 2023.

2. Ocena wyboru tematu pracy i jej celu

Jednym z istotnych kierunków rozwoju współczesnej biotechnologii jest opracowanie wydajnych i efektywnych ekonomicznie procesów produkcji nowych bioproduktów na bazie surowców odnawialnych. W grupie tej na szczególną uwagę zasługują surowce lignocelulozowe. Znaczną część tej biomasy stanowią produkty uboczne, generowane przez przemysł rolniczy czy spożywczy, a ich zagospodarowanie wpisuje się doskonale w koncepcję „zero waste". Ze względu na złożoną strukturę kompleksów lignocelulozowych, materiał ten w pierwszej kolejności poddawany jest złożonej, wielostopniowej obróbce wstępnej, której celem jest zmiana struktury lignocelulozy. Technika i technologia przetwarzania biomasy lignocelulozowej do zastosowań przemysłowych musi być tania, wydajna, zapewniać minimalne straty cukrów oraz generować niewielkie ilości inhibitorów procesów enzymatycznych i fermentacyjnych. Dlatego zarówno w badaniach naukowych jak i w praktyce przemysłowej szeroko poszukuje się nowych, wydajnych, bezpiecznych dla środowiska metod obróbki surowców lignocelulozowych.

W odniesieniu do wyżej opisanych założeń i wytycznych Doktorant dokonał bardzo trafnego wyboru tematu swojej dysertacji. Temat rozprawy doktorskiej stanowi kompleksowe podejście do wypracowania innowacyjnego, efektywnego i ekonomicznie uzasadnionego procesu produkcji etanolu czy bioproduktów z surowców lignocelulozowych. W świetle powyższego wysoko oceniam podjętą tematykę, jest ona aktualna i niezwykle istotna dla rozwoju dyscypliny technologia żywności i żywienia. Przedstawiona do oceny praca została zrealizowana w ramach projektu „Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie z zakresu Biogospodarki''(POWR.03.02.00-00-I034/16-00) i przygotowana w języku angielskim.

3. Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest pracą o charakterze eksperymentalnym. Praca obejmuje 139 stron maszynopisu w tym 21 tabel oraz 24 rysunki. Ponadto Autor zamieścił dwie prace opublikowane w ramach rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów o ich udziale. Struktura pracy jest typowa dla rozpraw naukowych i obejmuje następujące części: spis treści, streszczenie w języku angielskim i polskim, spis publikacji przygotowanych w oparciu o uzyskane wyniki i dostępną literaturę, wprowadzenie, przegląd literatury, materiały i metody, wyniki badań z dyskusją, wnioski, bibliografię oraz załączniki. Wykaz literatury obejmuje blisko 240 pozycji literatury naukowej, głównie anglojęzycznej. Źródła literatury z ostatnich 5 lat stanowią ponad 30%. Dobór źródeł jest odpowiedni i obejmuje najważniejsze pozycje literatury. Prezentowana rozprawa doktorska charakteryzuje się poprawną strukturą. Napisana jest w sposób czytelny.

4. Ocena merytoryczna pracy

Tytuł pracy koresponduje z jej treścią. W streszczeniu pracy Doktorant w sposób syntetyczny przedstawiał zakres badań ze wskazaniem głównych osiągnięć pracy. W krótkim wprowadzeniu Autor uzasadnił celowość podjętych badań wskazując na ogromny potencjał produkcji odnawialnych źródeł energii czy nowych bioproduktów w oparciu o zagospodarowanie biomasy lignocelulozowej stanowiącej odpad produkcji rolniczej, leśnej itp.

Następnie Doktorant dokonał przeglądu literatury związanej z tematyką prezentowanych badań. Przegląd literatury zajmuje 37 stron. Autor zebrał w nim najważniejsze merytoryczne informacje, udokumentowane pozycjami literatury i wprowadzające czytelnika w tematykę badań. Autor omówił szczegółowo zagadnienia związane z charakterystyką materiałów ligninocelulozowych, opisał ich skład chemiczny. Ponadto wskazał potencjał wykorzystania

biomasy do wytwarzania nowych bioproduktów oraz odnawialnych źródeł energii (m.in.: bioetanolu, biodiesla czy biogazu). Wiele uwagi poświęcił charakterystyce składu oraz metod obróbki wstępnej surowców wskazując na złożoność kompleksów lignocelulozowych i konieczność stosowania wielostopniowych metod obróbki tego surowca. Przedstawił metody: biologiczne, fizyczne, chemiczne, metody fizyko-chemiczne oraz metody kombinowane. Zwrócił uwagę na problemy wynikające z kumulacji związków toksycznych powstających podczas prehydrolizy, jak: kwasy, furfural, 5-HMF, czy problemy środowiskowe wynikające z wyboru metod chemicznych. Autor opisał preparaty enzymatyczne, proces detoksykacji podłoża, metody fermentacji, charakterystykę potencjalnych mikroorganizmy stosowanych do produkcji etanolu. Przedstawił innowacje i trendy mające na celu zwieszenia efektywności i wydajności procesu produkcyjnego.

Autor w poprawny sposób zdefiniował i wskazał złożoność problemów wynikającą z przygotowania surowców lignocelulozowych, oraz konieczność poszukiwania nowych rozwiązań wpływających na poprawę wydajności, efektywności ekonomicznej procesu wytwarzania nowych bioproduktów.

Autor sfomułował trzy hipotezy badawcze, które poddał weryfikacji w ramach zaplanowanych eksperymentów.

W części doświadczalnej przedstawił materiał badawczy i biologiczny, wykonane analizy, przyjęte metody badań, obliczenia oraz sposób opracowania wyników. Do analizy materiału oraz oceny składu chemicznego produktów końcowych wykorzystano rekomendowane techniki badawcze oraz właściwą aparaturę badawczą m.in.: chromatograf gazowy (GC), oraz chromatograf cieczowy (HPLC), aparat do elektroforezy SDS (Mini protean II system), spektroforometr, elektronowy mikroskop skaningowy (SEM). Materiałem badawczym w pracy były surowce lignocelulozowe (*miskant olbrzymi, miskant cukrowy, burak cukrowy, rafinat kory wierzby purpurowej*). Jako materiał biologiczny wykorzystano: drożdże z rodzaju *Saccharomyces cerevisiae*, grzyby strzępkowe *Mucor rouxii*, drożdże z rodzaju *Rhodotorula*. W części doświadczalnej Doktorant opisał: stosowane metody obróbki wstępnej surowców lignocelulozowych (m.in.: *hydroliza alkaliczna w reaktorze ciśnieniowym, rozprężanie próżniowe biomasy, promieniowanie mikrofalowe*) oraz proces hydrolizy enzymatycznej biomasy z udziałem preparatów handlowych (takich , jak: *Accellerase 1500, Accellerase BG, Accellerase XC, Accellerase XY, i Rapidase*). Przedstawił przebieg i parametry technologiczne procesu fermentacji hydrolizatów z udziałem różnych mikroorganizmów i metod prowadzenia procesu (*SHF i SSF*). W ostatniej części opisał przebieg procesu adaptacji drożdży z rodzaju *Rhodotorula* na podłożu wzbogaconym w

hydrolizat z rafinatu kory wierzby purpurowej w ilości od 5 -100%, stanowiący substrat do biosyntezy karotenoidów. W ocenie jakości wybranych surowców, hydrolizatów, produktów Doktorant przeprowadził analizę wielu parametrów (m.in.; pektyn, włókna surowego, popiołu surowego, białka, cukrów redukujących metodą DNS, monosacharydów, zawartości karotenoidów czy elektroforezy białek). Analizy wykonano na poszczególnych etapach technologicznych. Układ doświadczenia jest dobrze zaplanowany, właściwie przemyślany. Doktorant prawidłowo dobrał metody analityczne.

Rezultaty przeprowadzonych analiz i badań Autor przedstawił w rozdziale zatytułowanym *„Wyniki i dyskusja"* w postaci 15 tabel i 17 rysunków prezentując obszerny materiał badawczy. Dokumentacja stanowi dobre uzupełnienie treści pracy doktorskiej i jest przygotowana z należytą starannością. Cennym uzupełnieniem dokumentacji są zdjęcia z skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) obrazujące zmiany struktury materiału lignocelulozowego pod wpływem zastosowanych metod obróbki wstępnej.

W pierwszym etapie badań Doktorant przeprowadził hydrolizę enzymatyczną badanej biomasy z zastosowaniem recyklingu enzymów zaadsorbowanych na frakcji stałej materiału lignocelulozowego. Koncepcja wielokrotnego wykorzystania wprowadzonych preparatów enzymatycznych wpisuje się w trendy współczesnej biotechnologii. W procesach biotechnologicznych koszty preparatów enzymatycznych są znaczne, dlatego zasadne jest poszukiwanie metod ich obniżenia. W prezentowanej pracy Doktorant założył, że enzymy lityczne zaadsorbowane na stałych cząstkach rafinatu są nadal aktywne, dzięki czemu po dodaniu świeżej porcji wstępnie przetworzonej biomasy lignocelulozowej można przeprowadzić kolejny cykl hydrolizy bez konieczności dodawania nowych dawek enzymu. Wyniki badań potwierdziły, że zastosowanie recyklingu enzymów pozwoliło na zwiększenie końcowej wydajności hydrolizy enzymatycznej biomasy miskanta olbrzymiego i miskanta cukrowego, a efektywność hydrolizy biomasy wzrastała wraz ze wzrostem aktywności celulaz.

W kolejnych pracach Doktorant skupił się na doskonaleniu procesu obróbki wstępnej biomasy roślinnej poprzez zastosowanie metod próżniowego rozprężania biomasy lub promieniowania mikrofalowego, a następnie ocenił efekty fermentacji przygotowanych hydrolizatów z udziałem różnych mikroorganizmów. W efekcie przeprowadzonych badań Autor wykazał, że metoda rozprężania próżniowego pozwoliła na zwiększenie efektywności hydrolizy enzymatycznej biomasy buraka cukrowego w porównaniu do rozdrabniania mechanicznego. Najlepsze efekty uzyskano poddając następnie otrzymany materiał hydrolizie enzymatycznej w temperaturze 50°C przy użyciu kompozycji preparatów enzymatycznych:

Rapidase® i Accellerase 1500. Ponadto potwierdzono możliwość ponownego wykorzystania enzymów w postaci frakcji immobilizowanej na nierozłożonej lignocelulozie. Wyższe stężenie etanolu uzyskano prowadząc proces fermentacji metodą SHF w porównaniu do SSF niezależnie od metody obróbki wstępnej. Największe stężenie etanolu uzyskano po fermentacji prowadzonej z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 7, jednocześnie stwierdzono brak przydatności grzyba strzępkowego *Mucor rouxii* w procesie fermentacji etanolowej biomasy buraka cukrowego.

W doświadczeniach wykorzystujących obróbkę mikrofalową biomasy miskanta olbrzymiego, obserwowano zróżnicowany wpływ stosowanych parametrów prowadzenia procesu na wydajność hydrolizy enzymatycznej i ilość uzyskanego etanolu. W środowisku kwaśnym, przy ciśnieniu 30psi, uzyskano stosunkowo niską wydajność hydrolizy próbek (30.1%), jednak w wyniku fermentacji uzyskano wyższą ilość etanolu (23.6 mg na gram suchej biomasy). Z kolei w próbach poddanych obróbce przy ciśnieniu 90psi. odnotowano wysoką wydajności hydrolizy (58%) i jednocześnie niższe o połowę stężenie etanolu. Doktorant wskazał, że dobór parametrów obróbki mikrofalowej należy, zatem rozważać, jako kompromis pomiędzy wysoką wydajnością hydrolizy enzymatycznej i produktywnością fermentacji etanolowej.

W trzecim etapie badań Doktorant ocenił wpływ hydrolizatów lignocelulozowych z rafinatu kory wierzby purpurowej na biosyntezę karotenoidów z udziałem drożdży z rodzaju *Rhodotorula*. W efekcie adaptacji drożdży do podłoża zawierającego badane hydrolizaty Doktorant uzyskał zmodyfikowane szczepy *Rhodotorula* (*R. glutinis* 50H, *R. rubra* KKP350 50H i *R. glutinis* KKP347 50H), które charakteryzowały się wydajniejszą zdolnością syntezy karotenoidów w porównaniu z szczepami testowymi. Największe stężenie karotenoidów (130 μg·g-1 s.s.) uzyskano po hodowli szczepu *R. glutinis* KKP347 50H na pożywce z hydrolizatem lignocelulozowym. Zastosowanie dodatku hydrolizatu lignocelulozowego do podłoża wzrostowego zwiększyło ilość uzyskanych karotenoidów, również u szczepów natywnych.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz otrzymanych wyników Autor sformułował łącznie 11 wniosków. Świadczą one o realizacji wyznaczonego celu badań. I stanowią odpowiedź na postawione w pracy trzy hipotezy badawcze.

Prowadzone przez pana mgr Marcina Waltera prace badawcze zostały zaplanowane bardzo konsekwentnie i logicznie. Przedstawione w pracy rozwiązania technologiczne, ich oryginalność oraz zakres przeprowadzonych badań oceniam pozytywnie. Zaprezentowane

przez Doktoranta wyniki badań wnoszą istotne elementy o znaczeniu nie tylko naukowym, ale również praktycznym w zakresie wykorzystania biomasy lignocelulozowej w procesach biotechnologicznych produkcji etanolu czy syntezy karotenoidów. Zaproponowane przez Doktoranta rozwiązania, wpłynęły na zwiększenie efektywności hydrolizy enzymatycznej badanego materiału lignocelulozowego oraz na wydajność realizowanych w pracy procesów biotechnologicznych. Opisane w pracy podejście do optymalizacji procesów przetwarzania biomasy lignocelulozowej stanowi autorskie osiągnięcie naukowe, które oceniam pozytywnie. Rozprawa napisana jest poprawianie i jej przyjęcie nie budzi wątpliwości.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marcina Waltera pt. „Zastosowanie biomasy roślinnej w biotechnologii" zawiera nie tylko badania poznawcze, ale przede wszystkim interesujące rozwiązanie technologiczne badanego problemu. Temat rozprawy doktorskiej stanowi innowacyjne podejście do opracowania wydajnego procesu produkcji bioproduktów na bazie odpadów lignocelulozowych. Wyniki pracy mają dużą wartość aplikacyjną i wnoszą oryginalny wkład w rozwój dyscypliny technologia żywności żywienia. Przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską oceniam pozytywnie i stwierdzam, że rozprawa ta spełnia wszystkie ustawowe wymogi i kryteria określone w art.187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022, poz.574 ze zm.). Na tej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Marcina Waltera do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

J. Kawa-Rygielska

Prof. Joanna Kawa-Rygielska