



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Kraków, 2023-03-13

Prof. dr hab. Maciej Szaleniec

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni

Im. Jerzego Habera

Polskiej Akademii Nauk

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr Marcina Waltera

pt. „Application of plant biomass in biotechnology”

Wstęp

Rozprawa doktorska pana mgr Marcina Waltera pt. „Application of plant biomass in biotechnology” została przygotowana na Wydziale Technologii Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierownictwem prof. dr hab. inż. Iwony Konopki oraz dr hab. inż. Marka Adamczaka, prof. UWM. Rozprawa ma charakter hybrydowy i jest połączeniem opracowania monograficznego oraz cyklu publikacyjnego. Część monograficzna liczy 140 stron i 7 rozdziałów, które poprzedzają polskie i angielskie streszczenie, spis treści i skrótów wykorzystywanych w pracy. Dwie prace stanowiące uzupełnienie opracowania monograficznego zostały opublikowane w Biomass Conversion and Refinery (praca przeglądowa) oraz w Przemysle Chemicznym (praca oryginalna).

Układ części monograficznej jest klasyczny, tzn. po części wstępu literaturowego doktorant określa cele pracy, zwięźle opisuje metodykę i materiał badany, po czym przechodzi do opisu rezultatów i dyskusji wyników. Rozprawę kończą konkluzje oraz długi spis cytowanej literatury. Na samym końcu pracy znaleźć można oświadczenia współautorów, z których dowiadujemy się o zakresie zaangażowania pana Marcina Waltera w opracowanie treści pracy przeglądowej oraz wykonanie eksperymentów i opis pracy oryginalnej.

Praca porusza temat bardzo ważny i związany z dokonującą się na naszych oczach transformacją gospodarki opartej na surowcach kopalnych w biogospodarkę opartą na surowcach odnawialnych. Tak więc przedstawiona mi do oceny praca wpisuje się w najnowsze trendy naukowe i jest bardzo aktualna. Ma też charakter zdecydowanie aplikacyjny, chociaż pojawiają się w niej również elementy badań o charakterze podstawowym.

Ocena merytoryczna rozprawy.

Cele

Za cel badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej pan Marcin Walter postawił sobie opracowanie efektywnych biotechnologicznych metod konwersji biomasy do alkoholu etylowego (o zastosowaniu biopaliwowym) oraz karotenoidów. Narzędziami biotechnologicznymi, które zdecydował się wykorzystać w pracy, były zarówno modyfikacje biomasy za pomocą koktajli enzymatycznych, jak i jej biotransformacja z wykorzystaniem mikroorganizmów (różne szczepy *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor rouxii*, *Rhodotorula glutinis* i *R. rubra*). Metody biotechnologiczne zostały wsparte obróbką mechaniczną, fizyczną i fizykochemiczną. Z kolei biomasa poddawana obróbce pochodziła od dwóch gatunków trzciny (miskanta olbrzymiego i cukrowego tj. *Miscanthus giganteus* i *M. sacchariflorus*), korzenia buraka cukrowego (*Beta vulgaris*) oraz rafinatu (po ekstrakcji nadkrytycznym CO₂) kory wierzby purpurowej (*Salix purpurea*). W przypadku obróbki biomasy pochodzącej z miskantów, głównym celem pracy było zwiększenie efektywności uwalniania monocukrów na drodze obróbki i enzymatycznej hydrolizy celulozy i hemicelulozy oraz potencjalne wielokrotne użycie preparatów enzymatycznych, aczkolwiek przebadano też produkcję etanolu na drodze fermentacji. Z kolei w przypadku biomasy buraka cukrowego badania ukierunkowano na uwolnienie cukrów metodami mechaniczno-enzymatycznymi oraz ewaluację różnych trybów fermentacji (osobno od etapu sacharyfikacji celulozy oraz jednocześnie). Ostatnia zaś część doktoratu skupia się na adaptacyjnej ewolucji drożdży *Rhodotorula* do produkcji karotenoidów z rafinatu kory wierzbowej również poddanej wstępnej hydrolizie.

Praca ma więc bardzo zróżnicowane cele i obiekty badawcze, które niewątpliwie nie ułatwiają konstrukcji spójnej dysertacji naukowej. W tym kontekście należy również zwrócić uwagę na bardzo szeroko zakrojony tytuł pracy doktorskiej, moim zdaniem bardziej adekwatny dla pracy habilitacyjnej. Z drugiej strony zdecydowanie wspólnym mianownikiem wszystkich przedstawionych badań jest biotechnologiczna obróbka biomasy pochodzenia roślinnego, tak więc tytuł jest moim zdaniem do zaakceptowania.

Część literaturowa

Pracę rozpoczyna wprowadzenie, które w sposób ogólny zakreśla problem przetwarzania biomasy roślinnej przez naszą cywilizację na cele energetyczne oraz definiuje strumienie dostępnej biomasy. W szczególności autor skupia się na biomasie lignocelulozowej, będącej obecnie odpadem rolniczym i przemysłowym. Zarysowuje również trzy zagadnienia, którym poświęcone zostało wprowadzenie, a więc odzysk enzymów do rozkładu biomasy, opracowanie efektywnych procesów wstępnej obróbki biomasy i zastosowanie drożdży do produkcji karotenoidów. Na

następnych 37 stronach został zaprezentowany szeroki przegląd literatury dotyczący potencjału przeróbki biomasy roślinnej w kierunku biopaliw oraz związków platformowych, różnorodnych metod wstępnej obróbki lignocelulozy ukierunkowanych na separację ligniny od hemicelulozy i celulozy, samego procesu hydrolizy i towarzyszących im procesów inhibicji. Zaprezentowano bardzo szeroki wachlarz metod fizycznych, chemicznych i mechanicznych oraz biologicznych. Zwieńczeniem tego rozdziału jest opis metod fermentacji tak przygotowanej biomasy w kierunku alkoholu oraz przykłady adaptacji mikroorganizmów do prowadzenia biotransformacji biomasy. Rozdział ten w wielu zakresach pokrywa się z pracą przeglądową w Biomass Conversion and Refinery jednak nie jest w żadnym wypadku jego powieleniem. Każdy z tekstów szczegółowo rozwija nieco odmienne zagadnienia (np. w samym artykule znajdują się bardzo przydatne schematy procesów jak i instalacji do etapów wstępnej obróbki i bioreaktorów prowadzących proces fermentacji oraz opis osuszania bioetanolu). Zasadniczo ten rozdział był dla mnie bardzo ciekawy i pouczający. Patrząc na niego z perspektywy enzymologa, a więc osoby nie zajmującej się dokładnie takimi badaniami. Jedyne czego żałowałem to fakt, że praca przeglądowa została załączona na końcu, a nie bezpośrednio po tym rozdziale. Dzięki takiemu układowi treści te następowałyby jedna po drugiej, co ułatwiłoby czytanie. Wydaje się też, że umożliwiłoby to niepowtarzanie dużych tabel, które są łatwiejsze do przeczytania w publikacji niż w pracy.

W kontekście wstępu zainteresowała mnie uwaga doktoranta, który twierdzi, że obecnie nie istnieją firmy produkujące rekombinowane celulazy na skalę przemysłową. Firma Creative Enzymes z USA dostarcza przemysłowych ilości celulaz z szeregu mikroorganizmów (głównie do bio-polishingu, ale i dla przemysłu spożywczego i faktycznie głównie z *Trichoderma reesei* albo z *A. niger*). Również sporo firm chińskich dostarcza preparatów celulazowych. **Czy więc wg. wiedzy doktoranta obecnie powszechnie dostępne na rynku preparaty pochodzą wyłącznie z naturalnych, nie-rekombinowanych źródeł? Jeżeli tak jest w istocie, to czy nie jest to interesująca luka umożliwiająca rozwój badań komercyjnych (np. we współpracy z firmami produkującymi enzymy)?**

Po przeglądzie następuje krótki rozdział dotyczący wspomnianych celów oraz rozdział 4 dotyczący materiałów i metod. Rozdział ten ma tylko 11 stron i prawdę mówiąc wątpię, aby na podstawie zamieszczonych w nim lakonicznych opisów można było powtórzyć eksperymenty opisane w pracy. Poczynając od bardzo skąpo opisanych materiałów (czym np. jest sucha masa z miskantusów – z jakich konkretnie części roślin została otrzymana i jak ją przygotowano), poprzez niekompletne opisy szczepów (brak numerów szczepów przy kolekcji DSMZ dla wykorzystywanych szczepów, bardzo skrótowe, jednoakapitowe opisy procesu fermentacji, minimalistyczne opisy procesu produkcji karotenoidów, uniemożliwiające powtórzenie tego bioprocessu na podstawie opisu). Jako enzymologa również interesuje mnie, czy aktywność komercyjnych preparatów

enzymatycznych była mierzona w warunkach reakcji, czy też przyjmowano ją na podstawie specyfikacji preparatów. Prosiłbym również doktoranta o przejrzenie wzorów na produktywność uwalniania cukrów redukcyjnych (1, str. 60) która zamiast jednostki g/g suchej masy ma miarę g^2dm^{-1} . Również wymiar kolejnego wzoru różni się moim zdaniem od % (nie podano wymiaru współczynnika konwersji, ale jeżeli jest bezwymiarowy, to W1 i W2 wychodzą w g dm^{-1}).

Zaskoczyła mnie również informacja w podrozdziale 4.2.3 dotycząca fermentacji. Znajdujemy tam informację, że enzymatyczna hydroliza biomasy buraka była prowadzona w 60°C przez 15 min. Ponieważ inne procesy w pracy były prowadzone na przestrzeni wielu godzin zastanawia mnie, czy ta informacja jest poprawna i dlaczego doktorant zdecydował się na tak krótki proces? Czy był on w jakiś sposób optymalizowany?

Z kolei w podrozdziale 4.2.4 brak informacji, w jaki sposób oceniano ilościowo zawartość karotenoidów wyprodukowanych przez drożdże (jest tylko później informacja o metodach ekstrakcji). W opisie kolumny HPLC do analizy cukrów zabrakło producenta (Biorad) oraz średnicy złoża (zakładam, że $9\text{ }\mu\text{m}$). Choć dane te obecnie można znaleźć w Internecie, kiedyś nie będą dostępne, gdy zmieni się asortyment dostawcy.

Na koniec bardzo niewiele poświęcono analizie statystycznej danych. Brak informacji, jak liczne były grupy analizowanych eksperymentów (ilości powtórzeń, w publikacji w Przemśle Chemicznym wspomniano, że wykonywano co najmniej dwa powtórzenia) i czy były równoliczne (co akurat ma znacznie dla testu RIR bo wg. Podręcznika A. Stanisza do Statistica w przypadku nierównolicznych grup stosuje się wariant testu Tuckya nazywany testem Spjotvolla i Stolinne'a) i jakie są miary rozstępów przedstawione na wykresach. Nie znalazłem też wyjaśnienia konwencji istotności statystycznej za pomocą różnych liter, co utrudniło mi interpretację późniejszych wykresów. **Czy oznaczenie danych grup tą samą literą oznacza brak istotnych różnic między nimi czy właśnie ich występowanie?**

Rezultaty i dyskusja

Wyniki otwiera analiza możliwości wielokrotnego wykorzystania hydrolaz do uwalniania cukrów z biomasy lignocelulozowej miskanta. Treść tych badań została również przedstawiona w artykule w Przemśle Chemicznym. Biomase poddawano wstępnej obróbce alkalicznej, by po detoksykacji zastosować komercyjne mieszanki enzymów hydrolitycznych. Po odmyciu hydrolizatu jeszcze dwukrotnie wznawiano proces dodając kolejnych porcji biomasy. Doktorant analizował stężenie redukujących cukrów, produktywność uwalniania cukrów oraz wydajność hydrolizy. Samo założenie eksperymentu jest niewątpliwie ciekawe i wykazanie, że można wielokrotnie wykorzystać tę samą porcję cennych enzymów ma niewątpliwie znaczenie praktyczne. Zastanawia mnie, czy dobrze rozumiem, że poszczególne szarże reakcyjne trwały tylko 15 min (tak by wynikało

z rozdziału 4). Również przedstawienie wyników na Fig. 7, 8 i 9 niczego zasadniczo nie wnosi do analizy, gdyż są to wartości wykazujące takie same tendencje (choć czasem występują różnice w istotności statystycznej między grupami w zależności do sposobu przedstawienia wydajności). Niestety w pracy brak pogłębionej analizy eksperymentu, poza dość trywialnym wnioskiem ze strony 70, wskazującym, że większą aktywność enzymu dodanego do eksperymentu skutkowało wyższą wydajnością procesu. Chociaż doktorant na stronie 74 przytacza doniesienia literaturowe na temat podobnych badań, nie dyskutuje swoich wyników w ich kontekście. **Bardzo proszę w czasie obrony o porównanie efektywności zastosowanej przez doktoranta metody do danych literaturowych.**

Również zdjęcia z SEMu pozostawiono właściwie bez komentarza. **Dla mnie jako enzymologa nie jest jasne jakie strukturalne elementy tych zdjęć ‘validate the use of lytic enzymes’.**

W tym miejscu doktorant porzuca (na jakiś czas) biomasę z miskanta i skupia się na obróbce buraka cukrowego. Na wstępie doktorant omawia możliwość separacji frakcji cukrów, które występują w buraku zanim nastąpi obróbka biomasy. W eksperymencie jednak decyduje się na prowadzenie przeróbki całej biomasy bez separacji sacharozy, stanowiącej do 20% suchej masy buraka. Prawdę mówiąc w kontekście tej pracy taki wybór bardzo mnie zaskoczył, gdyż spodziewałem się przeróbki wyśrodków. Same buraki są bowiem bardzo cenną rośliną i ich przeróbka na bioetanol o zastosowaniu paliwowym klasyfikowałaby go jako produkt pierwszej generacji (konkurencja z żywnością i paszą). Nie zmienia to oczywiście faktu, że koncerny paliwowe wykorzystują nadmiarowe ilości buraka do produkcji etanolu.

W pracy przedstawiono wpływ różnych procedur wstępnej obróbki biomasy za pomocą metod mechanicznych, ciśnieniowych i enzymatycznych (różne kombinacje preparatów komercyjnych) na stężenie uwalnianych cukrów prostych i sacharozy. Doktorant przedstawił szczegółowe wyniki analiz zawartości poszczególnych cukrów w tabelach 10-14 identyfikując optymalne warunki procesu (ekspansja próżniowa, hydroliza enzymatyczna w 50°C przez Rapidase i Accelerase 1500). Doktorant uzyskał w ten sposób 14.8 % sacharozy z suchej masy, co wg. tabeli 7 jest poniżej naturalnej zawartości sacharozy w suchej masie buraka. **Nasuwa się więc pytanie, jaka jest wydajność przemysłowej rafinacji sacharozy z buraka bez stosowania hydrolizy lignocelulozy?** Czy opracowana metoda pozwala na uzyskanie wyższej wydajności, która w naturalny sposób przekładałaby się na wyższą zawartość alkoholu w fermentacji?

Kolejną pracą prezentuje efekty biotransformacji cukrów do alkoholu i najlepszy okazuje się szczep *S. cerevisiae* 7 (5.36% g/V). Zaskoczyło mnie natomiast niezamieszczenie wyników pokazujących efektywność hydrolizy i sposobu prowadzenia fermentacji (fermentation management system) – co wydawało się celem tej części badań. **Ponownie brak jest również komentarza na temat**

efektywności opracowanej metody względem literatury. Nagłe porzucenie tematyki burakocukrowej w pracy był dla mnie znów zaskoczeniem.

W kolejnym bowiem rozdziale doktorant powraca do biomasy miskanta, gdzie omawia wpływ obróbki mikrofalowo-chemicznej na biotransformację do etanolu. Celem była eliminacja frakcji ligniny a pozostawienie celulozy i hemicelulozy i najlepsze wyniki osiągnięto stosując kwas siarkowy oraz 60% etanol. Ponownie przedstawiono serie zdjęć SEM badanych preparatów, które **opisano za pomocą jednego zdania**. Materiały zostały również przeanalizowane spektrometrią IR, ale widma są bardzo nieczytelne, a omawiane pasma nie zostały zaznaczone na wykresach (na których skala częstotliwości jest ledwo widoczna). Nie jestem specjalistą od FTIR, ale nie doszukiwałbym się pasm rozciągających C-H przy 2300 cm^{-1} (w tym rejonie z reguły na widmach IR nie ma pasm charakterystycznych jak zresztą potwierdzają wykresy z pracy). Wg. literatury pasma rozciągające C-H lignin znajdują się przy 2842 i 2939 cm^{-1} (Boeriu *et al.*, *Indust. Crop. Prod.* 2004, 20, 205-218). Również pozostałe pasma C-H związane z aromatycznym pierścieniem znajdują się przy 1462 cm^{-1} a nie 900 czy 600 cm^{-1} . **Proszę o komentarz w tej sprawie i ew. korektę analizy.**

Kolejne eksperymenty, wykazujące zawartość różnych cukrów po procesie oraz powstających produktów ubocznych potencjalnie inhibujących fermentację są znacznie lepsze. Ukoronowaniem tej części jest Figura 22, która zestawia efektywność hydrolizy w procesie wstępnym ze stężeniem etanolu w fermentacji. Uważam, że sposób przedstawienia i przeanalizowania tych danych mógłby zostać pogłębiony. Wskazane byłoby zastosowanie analizy korelacyjnej (o ile liczności eksperymentów na to pozwalają) dla całej grupy lub podgrup lub (jeżeli zostaną wykryte cząstkowe korelacje) regresji wieloczynnikowej w celu zbadania, czy faktycznie zachodzą jakieś zależności między stężeniem cukrów, inhibitorów oraz stosowanego ciśnienia a efektywnością fermentacji.

Ostatnią część pracy doktorant poświęcił laboratoryjnej adaptacji drożdży z rodziny *Rhodotorula* do przeróbki rafinatu kory wierzby purpurowej. Eksperymenty hodowlane prowadzono na pożywce YGC (yeast extract glucose chloramphenicol) stopniowo wzbogacanej w hydrolizaty rafinatu. Na Figurze 23 znajdują się krzywe wzrostu, które porównują wzrost natywnego szczepu *R. glutinis* i *R. glutinis* adaptowanego na 25% hydrolizacie. Przedstawione na Fig. 23 krzywe są trudne do interpretacji. Na szczęście pomocna jest tabela 20 gdzie w sposób liczbowy przedstawiający zmiany w gęstości optycznej. Zmiany te są przedstawione % co jest dość dziwne, bo nie jest jasne co jest referencją i dlaczego nie użyto po prostu czasu podwojenia ilości komórek co jest dość dobrą miarą oceny szybkości wzrostu mikroorganizmów. Być może powodem było przejście niektórych hodowli od ekspotencjalnej fazy podziału do fazy stacjonarnej a nawet zamierania. Jak jednak te nieliniowe zmiany zamieniły się w % zmiany OD jest dla mnie tajemnicą.

Ostatecznie doktorant przedstawił efekty adaptacji (Tabela 21), która przekładała się na statystycznie różną zdolność do produkcji karotenoidów względem szczepów kontrolnych (nieadaptowanych) i hodowanych tylko na pożywce YGC. Co ciekawe niejednokrotnie szczepy adaptowane wykazywały się obniżoną wydajnością produkcji (np. *R. rubra* KKP350). **Te zaskakujące wyniki nie zostały omówione w pracy, dlatego prosiłbym o dokładniejszą ich analizę w czasie obrony.**

Pracę kończy zwięzłe konkluzje potwierdzające postawione hipotezy. Zasadniczo nie mam do nich uwag poza, moim zdaniem, nieprawdziwym stwierdzeniem, że adaptowany *R. rubra* KKP350 50H wykazuje się większą produktywnością karotenoidów (czemu zdaje się przeczyć Tabela 20). Jeżeli jestem w błędzie proszę o komentarz.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska pana mgr Marcina Waltera porusza niezwykle istotną i bardzo szeroką tematykę produkcji biopaliw i wartościowych związków z biomasy roślinnej. Niewątpliwym bardzo wartościowym aspektem dysertacji jest systematyczne przebadanie szeregu metod wstępnej obróbki biomasy i pełna charakterystyka cukrów uwalnianych w tym procesie, jak również praktyczna demonstracja efektywności procesu fermentacji. Jestem przekonany, że praca ma duży potencjał badawczo wdrożeniowy i może stanowić dobry punkt wyjścia dla badań przemysłowych. Niedosyt pozostawia aspekt podstawowy oraz niedostateczna, w moim odczuciu, analiza uzyskanych wyników. Być może wpływ na to odczucie ma również fakt, że doktorant zdecydował się na badanie trzech różnych źródeł biomasy zamiast skupić się na jednym strumieniu surowca.

Pomimo tych niedociągnięć oraz moich uwag doceniam wartość wyników przedstawionych w pracy. Stwierdzam, że przedstawiona mi praca spełnia kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. Zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Technologii Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie mgr Marcina Waltera do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



Prof. dr hab. Maciej Szaleniec