

Poznań, 23.12.2022

Prof. UPP dr hab. inż. Małgorzata Gumienna
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Pracownia Fermentacji i Biosyntezy

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr. inż. Katarzyny Robak
pt.: **” Intensyfikacja wykorzystania monosacharydów w procesie otrzymywania
bioetanolu drugiej generacji”**

wykonanej w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydziału Biotechnologii i Nauki o Żywności Politechniki Łódzkiej,
pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Marii Balcerek, prof. uczelni

Podstawą sporządzenia recenzji jest pismo z dnia 29.09.2022 r. Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej Pani dr hab. inż. Anny Diowsz, prof. uczelni informujące o uchwale nr 82/2021 Rady do Spraw Stopni Naukowych z dnia 6 lipca 2021 r. z prośbą o dokonanie ocenę rozprawy doktorskiej w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Recenzję wykonano zgodnie z wytycznymi ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Ocena formalnej strony pracy.

Praca doktorska Pani mgr. Katarzyny Robak zawarta jest łącznie na 235 stronach, z czego na streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wstęp i przegląd literatury przypada 74 strony, na cel pracy, materiał i metody badawcze jak i opis stanowiska badawczego 28 stron. Omówienie i dyskusja wyników wraz z wnioskami zawarte zostały na kolejnych 95 stronach. Materiał faktograficzny badań własnych przedstawiono czytelnie w 23 tabelach i 38 rysunkach. Pracę zamyka bibliografia, która obejmuje 307 pozycji literaturowych, w tym 8 aktów prawnych. Ponadto w opracowaniu, w formie załączników, zawarte zostały wyniki analizy statystycznej obejmujące 16 tabel oraz wykaz dorobku naukowego doktorantki. Układ pracy jest odpowiedni dla rozpraw promocyjnych o charakterze doświadczalnym.

Proporcje między objętością poszczególnych rozdziałów pracy należy uznać za prawidłowe, mimo dużej objętości całej pracy. Praca napisana jest językiem poprawnym

i komunikatywnym. Nie ma dużych trudności w podążaniu za narracją i myślą Autora, jednakże zastosowanie w całym opracowaniu dużej ilości oznaczeń i skrótów zmusza do pilnej analizy tekstu szczególnie w części wynikowej pracy. Teoretyczne rozważania poparto ponadto licznymi danymi przedstawionymi w postaci 12 rysunków i 1 tabeli.

W opinii recenzenta całość opracowania jest obszerna i zawiera kilka elementów, których pominięcie nie zaszkodziłoby jej jakości i przejrzystości. Dotyczy to między innymi fragmentów wstępu, w których znajdziemy powtórzenie streszczenia, a także fragmenty powtórzeń w rozdziale 5.4 z rozdziału 4. Jednakże oceniana rozprawa doktorska przygotowana została z dużą starannością, co świadczy o swobodzie poruszania się Doktorantki w obszarze podejmowanych zagadnień i spełnia wymagania formalne stawiane pracom doktorskim.

Merytoryczna ocena pracy.

Problem bezpieczeństwa energetycznego oraz redukcja gazów cieplarnianych to główne cele polityki klimatyczno-energetycznej UE, która obliguje państwa członkowskie do zwiększenia produkcji energii ze źródeł odnawialnych, w tym pochodzących z biomasy. Szczególną rolę odgrywają biopaliwa ciekłe, stosowane jako dodatki paliwowe. Do tej pory były to biopaliwa pierwszej generacji, do produkcji których wykorzystuje się rośliny o wysokiej zawartości skrobi. Jednakże z konieczności zachowania bezpieczeństwa żywnościowego oraz w zgodzie z przyjętymi kryteriami zrównoważonego rozwoju coraz większe zainteresowanie budzą biopaliwa drugiej generacji wykorzystujące biomasę lignocelulozową. Przykładem produkcji ciekłych biopaliw drugiej generacji jest bioetanol produkowany z odpadowej biomasy lignocelulozowej. Surowce te są odnawialne, stosunkowo tanie i dostępne, co najważniejsze nie stanowią konkurencji dla produkcji żywności.

Do takich surowców między innymi należy słoma zbóż, której w ostatnich latach w Polsce, odnotowuje się szacunkową nadwyżkę około 13 mln ton rocznie. Jednakże konwersja surowca lignocelulozowego do monosacharydów na drodze biochemicznej jest procesem trudniejszym niż standardowa restrukturyzacja surowców skrobiowych. Proces ten wymaga zazwyczaj kilku etapów obróbki wstępnej z powodu krystalicznej struktury celulozy i obecności ligniny, które to związki utrudniają hydrolizę enzymatyczną. Problem związany z wytworzeniem bioetanolu z tych surowców stanowi również jednoczesna fermentacja pentoz i heksoz dostępnych w hydrolizatach lignocelulozowych.

Przedstawiona do oceny praca mgr. Katarzyny Robak wpisuje się merytorycznie w nurt badawczy tego typu zagadnień.

W części teoretycznej pracy Autorka przedstawiła przegląd literatury światowej i krajowej adekwatny do realizowanego zakresu pracy. Cytowane źródła literaturowe w 88% stanowią prace opublikowane w ostatniej dekadzie, co świadczy o aktualności podjętego tematu badawczego. W tej części pracy Autorka poruszyła tematykę dotyczącą polityki klimatyczno-energetycznej UE, biopaliw z uwzględnieniem podziału ze względu na stan skupienia czy generacje. Dużo miejsca w pracy Pani mgr poświęciła technologii produkcji biopaliw drugiej generacji przede wszystkim metodą biochemiczną na przykładzie bioetanolu, nie pomijając jednak metod termochemicznych. W rozdziale 5 Doktorantka bardzo szczegółowo opisała surowiec lignocelulozowy, wyraźnie wyodrębniając słomę zbożową charakteryzując ją pod kątem składu, ilości zbioru (mln ton) oraz średniej ceny w zł/tonę uzyskiwanych w latach 2010-2020. Istotnym elementem części literaturowej jest opracowany przez Panią mgr przegląd metod obróbki wstępnej surowca lignocelulozowego z uwzględnieniem najnowszych metod np. obróbki cieczami jonowymi. Autorka zwróciła również uwagę na zagadnienia związane z obróbką wstępną surowca o wyższym poziomie ligniny i związany z tym problem detoksykacji produktów powstałych w wyniku obróbki wstępnej takiego surowca. Produkty takie w większości są inhibitorami enzymów w procesie fermentacji etanolowej. Dodatkowo Doktorantka klasyfikację metod obróbki wstępnej surowców lignocelulozowych przedstawiła w opracowaniu własnym, w postaci jasnego i czytelnego rysunku, co znacznie ułatwiło analizę opisywanych zagadnień. Kolejne podrozdziały dotyczyły hydrolizy enzymatycznej i fermentacji etanolowej. Ostatnie krótkie podrozdziały autorka poświęciła strategii produkcji etanolu drugiej generacji oraz destylacji i dehydratacji etanolu. Jedynym słabym elementem dotyczącym treści zawartych w rozdziale piątym jest pobieżne potraktowanie zagadnienia związanego z odwadniania alkoholu etylowego (podroz. 5.8).

Opracowany przegląd literatury zawiera liczne dane umieszczone w tabelach, rysunkach w formie wykresów oraz jasnych i czytelnych schematów, które w większości są opracowaniami własnymi autora. W opinii recenzenta, każdy z opracowanych rozdziałów mógłby stanowić oddzielny materiał o dużych walorach dydaktycznych, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu doktorantki do realizowanego tematu badawczego. Całość części teoretycznej została spięta syntetycznym podsumowaniem.

Przegląd literatury dał dobrą podstawę do sformułowania celu pracy. Cel główny został przedstawiony w sposób jasny i komunikatywny. Został rozwinięty przez cele

szczegółowe, których Autorka wymienia siedem. W opinii recenzenta są to jednak bardziej zadania (etapy) badawcze niż cele szczegółowe, przedstawiające zakres prowadzonych badań.

Część pracy zatytułowaną: „Materiały badawcze” Autorka opracowała w sposób prawidłowy, opisując obszernie z pełną charakterystyką materiał badawczy, chociaż pewną konsternację recenzenta wzbudził rys. 8.1, gdzie podstawiono zdjęcie słomy żytniej, która według opisu powinna być zmielona do cząstek o rozmiarach od 2-5 mm, co jednak jasno nie wynika z przedstawionego rysunku.

W rozdziale pt. „Przebieg postępowania badawczego” Pani mgr przedstawia syntetyczny opis wykonania kolejnych etapów związanych z obróbką wstępną surowca, optymalizacją hydrolizy enzymatycznej oraz optymalizacją procesu fermentacji etanolowej. Na szczególną uwagę zasługuje etap badań dotyczący optymalizacji obróbki wstępnej słomy żytniej przy wykorzystaniu jednostopniowej obróbki cieczami jonowymi. Wykorzystanie cieczy jonowych w badaniach stanowi o ambitnym podejściu Doktorantki do zagadnienia obróbki wstępnej surowca lignocelulozowego. Na uwagę zasługują również dobrze wykonane schematy przedstawiające warianty przetwarzania słomy żytniej w uwzględnieniu operacji jednostkowych obróbki wstępnej i hydrolizy enzymatycznej. Nie mniej ciekawymi nowatorskim podejściem do rozwiązania problemu badawczego związanego z fermentacją pentoz było zastosowanie rekombinowanych genetycznie drożdży odznaczających się podwyższonym stopniem wykorzystania ksylozy bądź arabinozy z podłoża. Szczepy pozyskano dzięki współpracy międzynarodowej Ośrodka Łódzkiego z Uniwersytetem Tekszańskim w Austin USA.

Dobrym uzupełnieniem dla oceny rezultatów przeprowadzonych badań były prawidłowo przedstawione metody obliczeń między innymi odzysku części stałych, stopnia usunięcia ligniny po obróbce wstępnej, wydajności etapu hydrolizy enzymatycznej czy stopień wykorzystania pentoz i heksoz w czasie procesu fermentacji, chociaż wymagające uważnego prześledzenia kolejności działań.

Oceniając całość części metodycznej pracy należy stwierdzić, że została ona opracowana w sposób przemyślany. Układ poszczególnych doświadczeń, sekwencja analiz z wykorzystaniem nowoczesnych analiz instrumentalnych, statystyczne opracowanie wyników wskazują na oryginalne podejście Autorki do rozwiązywanego problemu badawczego. Podjęte badania wymagały zastosowania różnorodnych metod: fizycznych, chemicznych, instrumentalnych i wskazują na opanowanie warsztatu badawczego przez Doktorantkę.

Omówienie wyników zawiera obszerną dokumentację rezultatów kolejno przeprowadzonych badań. Kolejność omawianych procesów tworzy logiczny ciąg zgodny z założonymi celami (etapami) badawczymi.

Pierwsza część omówienia dotyczyła ustalenia wpływu obróbki wstępnej surowca na wydajność hydrolizy enzymatycznej. W tym celu Doktorantka zastosowała wybrane metody chemicznej obróbki wstępnej słomy żytniej, a mianowicie zweryfikowała zastosowanie obróbki: zasadowej (NaOH o stężeniu od 1 do 7,5% w/v), oksydacyjnej (H₂O₂ w zakresie od 1,0 do 5,0% w/v), dwustopniowej alkaliczno-oksydacyjnej (NaOH od 1,0 do 5,0% oraz H₂O₂ od 1,0 do 5,0% w/v), kwasowej (H₂SO₄ o stężeniu od 1,0 do 5,05 w/v) oraz cieczami jonowymi stosując [Bim][Ac], [Bim][Ac] z 5,0% w/v NaOH, [Emim][SCN], [Bmpyr][NTf₂]. W wyniku przeprowadzonych badań okazało się, że zastosowanie obróbki wstępnej słomy żytniej przyczyniło się do zwiększenia wydajności hydrolizy enzymatycznej poszczególnych polisacharydów. Najefektywniejszą obróbką wstępną surowca, przy której osiągnięto najwyższą wydajność hydrolizy polisacharydów to obróbka z zastosowaniem 5,0% w/v NaOH w temp. 121°C przez 1h. Ta metoda obróbki została wybrana do dalszego etapu badań. Należy tutaj również wspomnieć o zastosowaniu cieczy jonowych do obróbki wstępnej, w najkorzystniejszym układzie [Bim][Ac]+5,0 % NaOH, pomimo ostatecznie wykluczenia tej metody z dalszego etapu badań, uzyskany stopień usunięcia ligniny (do 97,3%) jest jednak wynikiem, który należy zauważyć pomimo relatywnie słabego odzysku polisacharydów.

Ten etap pracy został bardzo dobrze opracowany i przedstawiony. Doktorantka dobrze zweryfikowała chemiczne metody obróbki wstępnej surowca, a przeprowadzona hydroliza enzymatyczna była dobrym miernikiem jej skuteczności.

W kolejnym etapie badań Autorka podjęła próbę zoptymalizowania procesu hydrolizy enzymatycznej wstępnie przetworzonej słomy żytniej poprzez zastosowanie komercyjnych preparatów wieloenzymatycznych. W celu zwiększenia wydajności procesu dodatkowo zastosowała pięć środków powierzchniowo czynnych między innymi Tween 20 i Tween 80 w dawkach od 1,0 do 3,0 g/l. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantce udało się ustalić najefektywniejszy rodzaj jak i dawkę komercyjnego preparatu enzymatycznego oraz środka powierzchniowo czynnego, które wytypowano do dalszych badań.

W ostatnim etapie badań w celu optymalizacji procesu fermentacji etanolowej hydrolizatów słomy żytniej przeprowadzona badania w kierunku doboru: dawek inokulum drożdży, kultury starterowej, technik szczepienia podłoża mikroorganizmami o zdolnościach fermentacyjnych, suplementacji podłoża solami mineralnymi, suplementacji podłoża

związkami azotowymi oraz obciążen biomasą. Kryterium optymalizacyjnym procesu była maksymalizacja stężenia i wydajności etanolu. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały na brak istotnego wpływu zwiększonej dawki inokulum na stężenie i wydajność etanolu. Najlepszym pod względem przyjętych kryteriów optymalizacyjnych szczepem drożdży okazała się natywna monokultura *Pachysolen tannophilus* 0043 (75,5% wyd. teoret.) spośród 9 testowanych monokultur starterowych, wśród 7 rekombinowanych genetycznie szczepów najlepszy okazał się SSS (74,5% wyd. teoret.) jako szczep referencyjny wykorzystywano Ethanol Red. Spośród zastosowanych technik inokulacji symultanicznej (jednoczesna) i sekwencyjnej bardziej efektywniejszą pod kątem wydajności teoretycznej etanolu w przeliczeniu na surowiec natywny czy produktywności etanolu wykazywały się kultury mieszane w symultanicznej inokulacji podłoży fermentacyjnych. Wzbogacenie hydrolizatów słomy żytniej dodatkiem soli mineralnych nie wpłynęło istotnie na wzrost efektywności produkcji etanolu niezależnie od użytych drożdży w procesie fermentacji. Suplementacja azotem w postaci ekstraktu drożdżowego wpłynęła ogólnie na podwyższenie wydajności, jednakże po 72 h najlepszą wydajność odnotowano w przypadku fermentacji z użyciem Ethanol Red, *Pachysolen tannophilus* 0043 oraz SSS (szczep rekombinowany genetycznie). Zwiększenie obciążenia biomasą od 3% do 12% w/v s.s. wpłynęło na wzrost stężenia i produktywności etanolu, ale nie odnotowano poprawy wydajności etanolu z jednostki surowca.

Przedstawiony bilans masy produkcji bioetanolu drugiej generacji przy ustalonych optymalnych warunkach procesu stanowi dopełnienie całości prowadzonych badań.

Uzyskane wyniki, z szerokiego zakresu badań eksperymentalnych, Autorka podsumowała w kolejnym rozdziale rozprawy formułując obszernie, przejrzyste stwierdzenia i wnioski, które świadczą o zrealizowaniu celów szczegółowych (etapów) i celu głównego, zatem wskazują na pełną realizację zaplanowanych badań. Jednakże w opinii recenzenta brakuje wniosku końcowego przedstawiającego efekty pracy w ujęciu nowości i korzyści wynikających z zastosowanych eksperymentów.

Z obowiązku recenzenta wskazuję poniżej zagadnienia do dyskusji:

1. Co było podstawą zainteresowania się słomą żytnią (najmniejszy uzysk) jako surowca odpadowego służącego do wytworzenia bioetanolu metodą biochemiczną? Czy to, że zawiera stosunkowo wysoką zawartość lignin leżało u podstaw zainteresowania się tym surowcem odpadowym?

2. Jak Autorka odniesie się do frakcji ciekłej powstałej podczas obróbki wstępnej słomy żytniej. Czy frakcja ta stanowi zagrożenie dla środowiska, czy jest bezpieczna?
3. Nie ma w pracy propozycji Autorki, w sprawie zbilansowania efektywności całości procesu technologicznego. Przedstawiony bilans nie do końca wyznacza najbardziej efektywny model procesu. Czy można wyznaczyć/ znaleźć model bardziej efektywny uwzględniający pracę urządzeń?

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Robak dostarcza wartościowych, oryginalnych wyników badań związanych z otrzymywaniem bioetanolu drugiej generacji z odpadowych surowców lignocelulozowych. Badania przeprowadzone w ramach opiniowanej rozprawy mają charakter zarówno poznawczy jak i aplikacyjny oraz stanowią oryginalny wkład do dziedziny nauk rolniczych i dyscypliny technologii żywności i żywienia. Przedstawiona do recenzji praca dowodzi wysokich umiejętności analitycznych Autorki, umiejętności radzenia sobie z problemami metodycznymi, a dodatkowo wskazuje na szeroką wiedzę w prezentowanym temacie. Autorka wykazała się biegłością w prowadzeniu doświadczeń naukowych, również umiejętnością analizowania uzyskanych wyników oraz wnioskowania. Reasumując stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Robak pt.: "Intensyfikacja wykorzystania monosacharydów w procesie otrzymywania bioetanolu drugiej generacji" spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia o przyjęcie pracy i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 23.12.2022 r.



Prof. UPP dr hab. inż. Małgorzata Gumienna
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Pracownia Fermentacji i Biosyntezy
ul. Wojska Polskiego 31
60-624 Poznań

Wniosek o wyróżnienie

rozprawy doktorskiej Pani mgr. inż. Katarzyny Robak
pt.: **”Intensyfikacja wykorzystania monosacharydów w procesie otrzymywania
bioetanolu drugiej generacji”**

wykonanej w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydziału Biotechnologii i Nauki o Żywności Politechniki Łódzkiej,
pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Marii Balcerek, prof. uczelni

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat pozyskiwania bioetanolu II generacji z surowca lignocelulozowego, jego obróbki wstępnej czy samego procesu fermentacji z udziałem szczepów natywnych i rekombinowanych genetycznie. Wykonane badania i sposób ich prezentacji świadczą o obszernej wiedzy teoretycznej w zakresie podjętego w rozprawie tematu oraz o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowo-badawczej. Wysoką wartość naukową rozprawy potwierdza ranga czasopism w jakich zostały opublikowane wyniki, uzyskane w ramach prowadzonych badań.

Uwzględniając wysoką wartość naukową rozprawy wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Robak pt.: **”Intensyfikacja wykorzystania monosacharydów w procesie otrzymywania bioetanolu drugiej generacji”**. O wysokiej wartości naukowej pracy decyduje koncepcja pracy, nowoczesne metody analityczne oraz możliwości aplikacyjne przedstawionych w pracy rozwiązań. Dodatkowym argumentem przemawiającym za wyróżnieniem rozprawy jest znaczący dorobek publikacyjny z zakresu badawczego Doktorantki, obejmujący 6 oryginalnych publikacji, z czego 5 publikacji anglojęzycznych z listy JCR o zasięgu międzynarodowym i łącznym sumarycznym IF 14,285, łącznej sumie punktów MEiN 470 pkt. Doktorantka jest również autorką lub współautorką 5 rozdziałów monografii, była kierownikiem projektu w ramach Funduszu Młodych Liderów Nauki na Wydziale Biotechnologii i Nauki o Żywności, jak również wykonawcą w projekcie Biostrateg2. Wyniki badań prezentowała także na licznych konferencjach naukowych, za które była nagradzana i wyróżniana.

M. Gumienna

Poznań, 23.12.2022 r.