

Prof. dr hab. Jerzy Długoński  
prof. senior UŁ  
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytetu Łódzkiego

Łódź, 12 listopada 2022 r.

## **Recenzja**

### **rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Robak zatytułowanej „Intensyfikacja wykorzystania monosacharydów w procesie otrzymywania bioetanolu drugiej generacji”**

Oceniana praca doktorska została wykonana w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem Pani dr hab. Marii Balcerek, prof. uczelni (promotor rozprawy) oraz Pani dr inż. Urszuli Dziekońskiej-Kubczak (promotor pomocniczy pracy).

Recenzję wykonałem w oparciu o Uchwałę nr 82/2021 Rady do Spraw Stopni Naukowych PŁ z dnia 6 lipca 2021 roku, a także pismo Pani Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ dr hab. inż. Anny Diowkszej, prof. uczelni, z dnia 29 września 2022 r. oraz dostarczonego egzemplarza pracy doktorskiej.

Bioetanol drugiej generacji to alkohol etylowy wytwarzany z biomasy odpadowej, zwłaszcza roślinnej, zawierającej oprócz celulozy i hemicelulozy znaczne ilości ligniny. Szczególnie przydatne są odpady pochodzenia rolniczego np. słoma różnych zbóż, a także biomasa z terenów zieleni dużych aglomeracji miejskich np. skoszona trawa, czy opadłe (pod koniec okresu wegetacyjnego) liście drzew. Obecność w biomacie ligniny powoduje konieczność jej eliminacji np. poprzez biodegradację do monomerów. W warunkach naturalnych ligniny ulegają powolnej degradacji mikrobiologicznej sprzyjając powstawaniu humusu i tym samym utrzymaniu korzystnej dla rozwoju roślin struktury gleby. Szczególną rolę odrywają w tym procesie drobnoustroje lignino- i celulozowe. Wytwarzane przez nie enzymy, zwłaszcza: celulazy, hemicelulazy, lakazy, peroksydazy wykorzystywane są w różnych procesach przemysłowych do hydrolizy polimerów roślinnych,

jak również przekształcania i detoksykacji produktów rozkładu lignin. Dotyczy to również produkcji bioetanolu na bazie odpadowej masy roślinnej.

W swojej pracy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyna Robak jako model badawczy wykorzystwała słomę żyta ozimego (*Secale cereale* L.) odmiany Dańkowskie Amber, która została zarejestrowana w Polsce w 2010 roku i jest uprawiana z powodzeniem na terenie całego kraju, również na słabszych glebach. Zawartość lignin w słomie żyta waha się najczęściej w granicach 20 – 25 % w/w s.s. W przypadku żyta Dańkowskie Amber, ilość ligniny w słomie jest bliska górnej granicy (podanej wyżej wartości liczbowej), dzięki czemu źdźbła tej odmiany są bardziej odporne na wyleganie, ale stwarza to dodatkowe trudności w uzyskiwaniu bioetanolu ze słomy. Przy optymalizacji tego procesu zarówno na etapie obróbki wstępnej, hydrolizy enzymatycznej, jak i fermentacji alkoholowej Doktorantka wykorzystwała dostępne dane literaturowe oraz rezultaty wcześniejszych badań prowadzonych w zespole kierowanym przez Panią promotor – dr hab. inż. Marię Balcerek, prof. uczelni

W bardzo obszernej części teoretycznej rozprawy obejmującej aż 5 rozdziałów zatytułowanych kolejno: Wstęp, Zarys polityki klimatyczno-energetycznej UE, Biopaliwa, czyli paliwa odnawialne pochodzenia biologicznego, Technologia produkcji biopaliw drugiej generacji metoda termochemiczną, oraz Technologia produkcji biopaliw drugiej generacji metodą biochemiczną na przykładzie bioetanolu, Doktorantka omówiła szeroko zarówno zagadnienia związane bezpośrednio z produkcją bioetanolu, jak i czynniki o charakterze polityczno-ekonomicznym sprzyjające wykorzystaniu biomasy odpadowej jako surowca do wytwarzania płynnych biopaliw drugiej generacji. Część teoretyczna rozprawy zakończona jest podsumowaniem (rozdział nr 6) uwypuklającym najistotniejsze kwestie omawiane w poprzednich rozdziałach.

Cel pracy, jak i przedstawione w siedmiu punktach cele szczegółowe (rozdział nr 7) zostały jasno sprecyzowane i nie budzą zastrzeżeń. W kolejnych rozdziałach zatytułowanych: Materiały badawcze, Przebieg postępowania badawczego, Metody oznaczeń analitycznych i Metody obliczeń (rozdziały o kolejnych numerach 8 – 11) Doktorantka przedstawiła szczegółowo techniki i metody stosowane w trakcie realizacji doktorskiej, a także kwestie związane metodyką opracowywania wyników.

Zasadniczą część pracy doktorskiej stanowi rozdział 12 zatytułowany Wyniki badań i dyskusja oraz bardzo krótki ale równie ważny dla całości rozprawy rozdział 13 Bilans masy podczas produkcji bioetanolu drugiej generacji. Uwidocznione w tych rozdziałach rezultaty badań zostały ujęte w postaci 38 rycin oraz 23 tabel uzupełnionych komentarzami uwypuklającymi najbardziej istotne dane. Przedstawionym wynikom towarzyszy wnikliwa ocena uzyskanych danych, na tle doniesień literaturowych. Przeprowadzona w rozprawie dyskusja świadczy zarówno o bardzo szerokiej i ugruntowanej wiedzy Doktorantki, krytycznym podejściu do własnych osiągnięć, jak i o dużym zaangażowaniu w problematykę naukową związaną z Jej dysertacją doktorską.

Wnioski (rozdział 14) i stwierdzenia końcowe wyciągnięte z przeprowadzonych badań i dyskusji zostały przedstawione w 9 punktach, co w pełni odzwierciedla zakres i złożoność zagadnień, którymi zajmowała się Doktorantka. Spis literatury (rozdział 15) obejmuje najważniejsze pozycje piśmiennictwa, z uwzględnieniem najnowszych publikacji dotyczących problematyki rozprawy doktorskiej (łącznie 307 cytowanych pozycji literaturowych). Rozprawa doktorska zawiera również krótkie streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych w pracy oznaczeń oraz dwa załączniki zawierające wyniki analizy statystycznej i wykaz dorobku naukowego.

Do najważniejszych osiągnięć recenzowanej pracy doktorskiej zaliczam:

1. Wykazanie, że użycie w trakcie obróbki wstępnej słomy żytniej 5% w/v zasady sodowej może doprowadzić do usunięcia ponad 98% ligniny, co w dalszym postępowaniu znacząco ułatwia hydrolizę enzymatyczną glukanu.
2. Uzyskanie, w trakcie hydrolizy enzymatycznej surowca, efektu synergii spowodowanej użyciem stosownej kombinacji preparatu enzymatycznego Cellic CTec2 i surfaktantu Tween 20, co pozwoliło na otrzymanie hydrolizatu zawierającego glukozę, ksylozę i arabinozę z wydajnością na poziomie odpowiednio: 98,8, 95,6 i 78,6% wydajności teoretycznej w przeliczeniu na użytą biomasę.
3. Uwidocznienie, że zastosowanie symultanicznej inokulacji podłoża fermentacyjnych mieszaną kulturą drożdży *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red + *Pachysolen*

*tannophilus* 0043 może zaowocować zwiększeniem stężenia etanolu w płynie pohodowlanym do wartości 11,26 g/l.

4. Wykazanie, że zastosowanie szczepu drożdży natywnych *P. tannophilus* 0043 oraz szczepów drożdży rekombinowanych genetycznie SSS do fermentacji podłoża o 12% w/v s.s. obciążeniu biomasy słomy żytniej odmiany Dańkowskie Amber umożliwia uzyskanie stężenia alkoholu etylowego powyżej 40 g/l, co pozwala na prowadzenie opłacalnej ekonomicznie produkcji bioetanolu drugiej generacji na bazie odpadowej słomy żytniej.

Niemniej istotne (zwłaszcza z aplikacyjnego punktu widzenia) wydają się być wyniki uzyskane przez Doktorantkę, wskazujące że monokultury drożdży: *P. tannophilus* i modyfikowanych genetycznie szczepów SSS wykazują zwiększoną (w stosunku do drożdży *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red) zdolność do wykorzystania pentoz, zwłaszcza ksylozy.

Uwagi i pytania dodatkowe.

1. Na stronie 10 rozprawy Doktorantka pisze: „W ostatniej fazie badań otrzymane hydrolizaty celulozowe poddano fermentacji przy użyciu 17 kultur drożdży na które składały się: ...” i tu podaje nazwy drobnoustrojów bez pełnej nazwy rodzajowej, mimo że pojawiają się one po raz pierwszy w rozprawie.
2. W ostatnim zdaniu podrozdziału 3.1. (str. 30 rozprawy) Doktorantka stwierdza: „ W szczególności Polska, jako kraj rolniczy, posiada bardzo duży potencjał produkcji biomasy.” Udział rolnictwa w tworzeniu PKB w Polsce wynosi jedynie 3%, a zatrudnienie w sektorze rolno-spożywczym około 10%. Natomiast udział powierzchni rolnej stanowi 56% w odniesieniu do całości powierzchni całego kraju. Dlatego wydaje się, że bardziej odpowiednie byłoby sformułowanie: „W szczególności Polska, jako kraj którego powierzchnia rolna stanowi 56% w odniesieniu do całości powierzchni kraju, posiada bardzo duży potencjał produkcji biomasy”.
3. W podrozdziale 9.1.4 Doktorantka podaje: „Do kolb podawano również roztwór antybiotyków w dawce 10 mg/l, w celu ograniczenia ryzyka wystąpienia zakażenia

mikrobiologicznego.” Z dalszej części pracy wynika, że inkubację prowadzono w temp. 50 °C, przez 72 godziny. Czy w tych warunkach nie następowała częściowa inaktywacja penicyliny G oraz streptomycyny i czy tym samym nie było konieczności dodatkowego wprowadzania antybiotyków do badanych układów?

4. W podrozdziale 9.3.1 oraz 9.3.2 (odpowiednio str. 87 i 88) opisane są warunki odwirowania drożdży i hydrolizatu. Podany jest typ wirówki, czas wirowania oraz liczba obrotów/min. Powinien też być podany typ/ średnica rotora lub prościej wartość g przy której wirowano próby. Czy przy braku informacji o temperaturze w jakiej wirowano badane próbki należy rozumieć, że była to temperatura pokojowa?
5. W całej rozprawie Doktorantka używa określenia „mikroorganizmy”, co jest oczywiście prawidłowe i powszechnie stosowane w literaturze naukowej. Niemniej gdy wyraz ten często się powtarza, czasami nawet dwa razy w tym samym zdaniu (podrozdział 5.6.3, str. 63), można by też użyć słowa „drobnoustroje”.

Pragnę zaznaczyć, że przedstawione wyżej uwagi i pytania mają jedynie charakter dyskusyjny lub porządkowy i nie obniżają bardzo wysokiej wartości poznawczej oraz aplikacyjnej recenzowanej pracy doktorskiej.

Podsumowując swoją ocenę stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyna Robak zatytułowana „Intensyfikacja wykorzystania monosacharydów w procesie otrzymywania bioetanolu drugiej generacji” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i z pełnym przekonaniem przedkładam Wysokiej Radzie do Spraw Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej wnioski o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Robak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze:

- znaczący dorobek naukowy Doktorantki, w tym publikacje związane bezpośrednio z tematyką doktoratu, w których Doktorantka jest pierwszym autorem;
- trafne sformułowanie hipotez badawczych, jak również precyzyjne i jasne ujęcie celu głównego oraz celów cząstkowych badań;

- zastosowanie z powodzeniem w pracy nowoczesnych technik badawczych, umiejętne opracowanie wyników, przeprowadzenie wnikliwej i przekonywającej ich oceny na tle danych literaturowych oraz wyciągnięcie trafnych wniosków końcowych;
- dużą szansę na zastosowanie uzyskanych wyników w praktyce;

wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Robak stosowną nagrodą.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Długoński', with a stylized flourish at the end.

Prof. dr hab. Jerzy Długoński