

dr hab. inż. Magdalena Zielińska, prof. UWM  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Geoinżynierii  
Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska  
ul. Słoneczna 45G, 10-709 Olsztyn  
tel. 89 523 41 85  
e-mail: magdalena.zielinska@uwm.edu.pl

Olsztyn, 16.02.2023

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej mgr inż. Weroniki Cieciury-Włoch**  
**pt. „Wytwarzanie wodoru w procesie ciemnej fermentacji z wykorzystaniem odpadowej**  
**biomasy roślinnej”**  
Promotor pracy: dr hab. inż. Sebastian Borowski, prof. uczelni

Podstawę formalną sporządzonej recenzji stanowiło pismo Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej Pani dr hab. inż. Anny Diowks, prof. uczelni z dnia 24.11.2022, informujące o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy w nawiązaniu do Uchwały nr 74/2021 Rady do Spraw Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia.

**Problem badawczy i główny cel pracy; ocena zasadności podjętej tematyki badawczej**

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy wykorzystania odpadowej biomasy roślinnej do wytwarzania wodoru w procesie ciemnej fermentacji. Wodór jest uważany za dobry nośnik energii i najbardziej obiecującą alternatywę dla paliw kopalnych ze względu na ponad 2,5-krotnie wyższą wydajność energetyczną oraz wytwarzanie wody zamiast gazów cieplarnianych podczas spalania. Obserwuje się niezwykle dynamiczny rozwój badań nad produkcją wodoru na świecie. Spośród metod biologicznych, wytwarzanie wodoru w procesie ciemnej fermentacji uważane jest za technologię najbardziej obiecującą, jeśli chodzi o możliwość komercjalizacji, ze względu na wymagania energetyczne, możliwość wykorzystania różnorodnych źródeł substratów, w tym organicznych materiałów odpadowych, oraz możliwość prowadzenia procesu w warunkach ciśnienia atmosferycznego. Co więcej, poferment może być dalej wykorzystywany, co dodatkowo podnosi wartość materiałów odpadowych, które stanowiły substrat do produkcji wodoru. Chociaż znaczącą rolę w produkcji wodoru odgrywają zbiorowiska mikroorganizmów zaangażowanych w ciemną fermentację, to szczególnie

ewolucja struktury tych zbiorowisk jest nadal niejasna. Wiadome jest, że mieszane kultury powinny być poddawane modyfikacji w celu selekcji tworzących przetrwalniki bakterii produkujących wodór i zahamowania wzrostu bakterii konsumujących wodór. Dlatego badania nad rozwojem technologii ciemnej fermentacji obejmują obróbkę wstępną nie tylko substratu, ale również inoculum, aby inaktywować mikroorganizmy metanogenne. Pomimo zdefiniowania licznych rodzajów roślinnych materiałów odpadowych podatnych na ciemną fermentację, zastosowanie procesu na skalę techniczną jest ograniczone niską wydajnością produkcji. Dlatego niezbędna jest optymalizacja warunków obróbki wstępnej, parametrów eksploatacyjnych reaktorów ciemnej fermentacji, sposobów ograniczania wpływu inhibitorów nieorganicznych i organicznych czy bioinhibitorów. Ponadto, potrzebny jest postęp w rozwoju systemów ciągłych czy półciągłych, które choć mają szereg ograniczeń, w tym niską lub umiarkowaną wydajność wodoru, to najbardziej sprzyjają zwiększaniu skali. Z tych względów słuszne wydaje się podjęcie przez mgr inż. Weronikę Cieciorę-Włoch badań nad możliwościami zwiększenia wydajności biologicznej produkcji wodoru. Tematyka podjęta w rozprawie bardzo dobrze wpisuje się w obszar badań naukowych nad waloryzacją biomasy lignocelulozowej. Głównym celem badań było określenie efektywności biologicznego wytwarzania wodoru z odpadowej biomasy roślinnej oraz intensyfikacja ciemnej fermentacji przez suplementowanie azotem, fosforem i żelazem. Cel pracy ma aspekt nie tylko naukowy, ale również praktyczny. Realizacja celu głównego i celów szczegółowych daje wiele cennych wskazówek prowadzących do zwiększenia wydajności produkcji wodoru z odpadów.

### **Struktura i treść rozprawy doktorskiej**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Weroniki Cieciorę-Włoch stanowi spójny tematycznie zbiór 5 dwu- lub wieloautorskich artykułów naukowych opublikowanych w latach 2019-2021 oraz jednej pracy będącej w recenzji. Zbiór prac został opatrzony 36-stronicowym opisem osiągnięcia naukowego, zawierającym: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp i cel pracy z obszernym sześciopunktowym zakresem badań, opis kolejnych 6 etapów badań z celem, podejściem metodycznym i syntezą uzyskanych wyników, 6 wniosków oraz spis 11 pozycji literatury, w całości anglojęzycznej. Następnie, w pracy przedstawionej do recenzji znalazły się załączniki zawierające publikacje wchodzące w skład rozprawy. Załączone oświadczenia współautorów wskazują na wysoki wkład (od 55 do 70%) mgr inż. Weroniki Cieciorę-Włoch w badania; we wszystkich publikacjach Autorka rozprawy jest pierwszym współautorem.

Dorobek naukowy składający się na rozprawę doktorską mgr inż. Weroniki Ciecior-Włoch jest dobry i wskazuje na wysokie znaczenie podjętej tematyki badawczej, zaangażowanie Doktorantki w pracę naukową i przemyślany dobór czasopism naukowych, w których publikowano wyniki badań. Załączone publikacje zostały wydane w uznanych czasopismach o IF od 2,702 do 11,889 (łącznie IF = 34,967, 600 punktów MEiN). Wszystkie opublikowane artykuły były już cytowane, łącznie 82 razy (Scopus, stan na 15 lutego 2023), co potwierdza ich obecność w międzynarodowym obiegu.

Na pozostałą aktywność naukową Autorki, której wykaz uzupełnia opis osiągnięcia naukowego, składa się 9 publikacji naukowych w czasopismach o IF od 1,517 do 4,927, 2 rozdziały w monografiach, 5 wystąpień ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, 14 posterów na konferencjach krajowych i międzynarodowych, współpraca w 16 projektach naukowo-badawczych we współpracy z otoczeniem gospodarczym, współautorstwo 5 patentów i jednego zgłoszenia patentowego, liczne staże, praktyki i szkolenia zawodowe. Dorobek ten potwierdza duże zaangażowanie Autorki w działalność naukową, co było również nagradzane. Na podkreślenie zasługuje praca organizacyjna Doktorantki na rzecz macierzystej uczelni i wydziału. Osiągnięcia te dowodzą, że czas studiów doktoranckich został przez Panią mgr inż. Weronikę Cieciorę-Włoch efektywnie wykorzystany w celu zdobywania umiejętności i doświadczeń do dalszej aktywności zawodowej.

Rozpatrując szczegółowy zakres prac przedstawionych w publikacjach składających się na rozprawę doktorską, w badaniach objętych Publikacją 1 testowano wydajność produkcji wodoru z sześciu różnych odpadowych materiałów roślinnych, a także z odpadów kuchennych oraz pochodzenia zwierzęcego, optymalizując obróbkę wstępną inoculum. Wykazano, że najwyższą jednostkową produkcję wodoru uzyskano z odpadów owocowo-warzywnych po termochemicznej obróbce wstępnej inoculum oraz substratu.

W badaniach przedstawionych w Publikacji 2 testowano wpływ hydrolizy termicznej, chemicznej, termochemicznej i enzymatycznej wysłodków buraczanych w warunkach statycznych. Najwyższą jednostkową produkcję wodoru uzyskano po wstępnej hydrolizie enzymatycznej oraz po termochemicznej obróbce wstępnej w 140°C i z dodatkiem 2% roztworu kwasu siarkowego. Jako zaletę obróbki enzymatycznej w niższych temperaturach podano osiągnięcie wysokiego uzysku wodoru bez potrzeby usuwania inhibitorów fermentacji. W przypadku hydrolizy termochemicznej udowodniono natomiast, że usunięcie furfuralu przed fermentacją zwiększa produkcję wodoru.

W Publikacji 3 przedstawiono wyniki badań nad wpływem czasu zatrzymania substratu, obciążenia komory ładunkiem związków organicznych i pH na przebieg ciemnej fermentacji w hodowlach półciągłych w warunkach mezofilnych z wykorzystaniem wysłodków buraczanych, odpadów owocowo-warzywnych i kiszonki kukurydzianej. Uzyskane wyniki skierowały dalsze badania ku wysłodkom buraczanym. Wydajność produkcji wodoru z wysłodków w hodowlach okresowych i półciągłych w warunkach mezofilnych oraz stabilność ciemnej fermentacji analizowano w zależności od suplementacji związkami azotu i fosforu (Publikacja 4) oraz związkami żelaza (Publikacja 5). Uzyskano znaczącą poprawę produkcji wodoru przez dodatek suplementów i odnotowano większą rolę fosforu niż azotu jako czynnika wspomagającego ciemną fermentację. Wskazano chlorek amonu i chlorek żelaza(III) jako suplementy obniżające produkcję wodoru. W Publikacji 6 pokazano wyniki badań nad wpływem suplementacji związkami żelaza na produkcję wodoru w warunkach termofilnych. Najwyższą produkcję wodoru, podobnie jak w warunkach mezofilnych, uzyskano przy suplementacji tlenkiem żelaza(III); w warunkach termofilnych czas fermentacji był krótszy, a wykorzystanie substratu wyższe.

Prowadzona w hodowlach półciągłych (publikacje 3-6) analiza metagenomiczna biomasy wykazała zależność między parametrami eksploatacyjnymi a zmianami w zbiorowisku mikroorganizmów, co przekładało się na skład biogazu, zawartość metanu i wodoru w biogazie oraz skład uwalnianych metabolitów.

### **Ocena rozprawy doktorskiej**

Rozprawę doktorską pani mgr inż. Weroniki Cieciry-Włoch oceniam wysoko za przeprowadzenie badań naukowych w szerokim zakresie, obejmującym podejście technologiczne oraz metagenomiczne. Za najbardziej wartościowe w pracy doktorskiej uważam:

- wyniki badań nad testowaniem szerokiego zakresu substratów pochodzenia nie tylko roślinnego z punktu widzenia produkcji wodoru oraz nad optymalizowaniem metod obróbki tych substratów i inoculum;
- wykazanie zależności między metodami obróbki wstępnej substratu a produkcją furfuralu i wodoru oraz udowodnienie, że hydrolizaty po produkcji furfuralu z wysłodków buraczanych mogą być wykorzystywane jako substraty do produkcji wodoru;

- wykazanie zmian w strukturze zbiorowiska mikroorganizmów w pofermencie w testach półciągłych i zależności między warunkami technologicznymi a liczebnością względną kluczowych mikroorganizmów, produkcją wodoru i innych metabolitów;
- analiza kluczowych produktów przemiany materii w procesie ciemnej fermentacji, również w warunkach suplementowania związkami azotu, fosforu i żelaza, dająca informację o stabilności procesu i umożliwiającą wnioskowanie o inhibitorach procesu oraz o czynnikach przeszkadzających w inhibicji metanogenezy;
- udowodnienie zjawiska adaptacji mikroorganizmów metanogennych do warunków optymalnych dla ciemnej fermentacji, co wywołuje konieczność prowadzenia dalszych badań nad intensyfikacją produkcji wodoru z materiałów odpadowych.

Lektura pracy nasuwa kilka pytań i uwag, które nie obniżają pozytywnej merytorycznej oceny rozprawy doktorskiej, lecz mogą stanowić początek dyskusji nad zagadnieniami prezentowanymi w pracy:

- Czym był podyktowany wybór żelaza do suplementacji biomasy? W pracy wspomniano o kofaktorach żelazowych i niklowych (str. 13), natomiast nie wyjaśniono wyboru tych pierwszych.
- Pierwszy cel szczegółowy powinien zostać tak sformułowany, aby wskazać kryterium wyboru metody obróbki wstępnej substratów i uniknąć określenia „najlepszej metody obróbki wstępnej substratów”.
- Opisując badania prezentowane w Publikacji 1 wykazano, że wysłodki buraczane charakteryzowały się najwyższą zawartością węgla, jednak bardzo niską zawartością azotu i fosforu (str. 16). Na podstawie czego więc zidentyfikowano potrzebę uzupełniania mieszaniny reakcyjnej przed fermentacją mikroelementami?
- Celem etapu 1 (badania objęte Publikacją 1) było testowanie różnych sposobów obróbki wstępnej inoculum, co pokazano również na rys. 3. Natomiast omówienie wyników (oraz rys. 4) wskazują na badania również wpływu obróbki substratu. Wprowadziło to niewielkie utrudnienia w śledzeniu wyników badań.
- Celem etapu 1 był dobór substratów pod względem wydajności produkcji wodoru. Czym podyktowane było zatem wybranie do dalszych badań nad optymalizacją obróbki substratu wysłodków buraczanych, a nie odpadów owocowo-warzywnych, z których uzysk wodoru był najwyższy?
- W etapie 1, prowadząc dobór substratów, stwierdzono, że odpady poubojowe nie są efektywnym substratem do produkcji wodoru ze względu na niską zawartość

polisacharydów. Czy jest możliwe wskazanie, na podstawie przeprowadzonych badań, minimalnej zawartości polisacharydów, przy której uzysk wodoru będzie istotny? Czy zawartość polisacharydów jest jedynym wskaźnikiem przydatności substratu do efektywnej produkcji wodoru?

- W etapie 3 (pkt. 9) zabrakło podsumowania wpływu stosowanych parametrów eksploatacyjnych (OLR, SRT) na wydajność produkcji wodoru z trzech analizowanych substratów. To zagadnienie pominięto również we wnioskach końcowych.
- Proszę wyjaśnić stwierdzenie ze str. 26: „Wysłodki buraczane mogą być z powodzeniem stosowane jako substrat do ciemnej fermentacji, jednak uzyski wodoru są umiarkowane, a proces przebiega niestabilnie.” Czy to oznacza, że powodzenie ciemnej fermentacji było oceniane na podstawie innych kryteriów niż uzysk wodoru i stabilność procesu?
- Czym można wytłumaczyć zmniejszenie aktywności mikroorganizmów z rzędu Lactobacillales w efekcie suplementowania substratu związkami azotu i fosforu?
- W badaniach nad wpływem suplementów na produkcję wodoru stopniowo zwiększono ich stężenie. Na jakiej podstawie wybierano czas trwania eksperymentu przy danym stężeniu?
- W pracy podano, z czym się zgadzam, że uzyskane wyniki mogą być wykorzystane przy wdrażaniu procesu ciemnej fermentacji na skalę przemysłową. Proszę rozwinąć tę myśl i wskazać, które działania można uznać za najważniejsze w odniesieniu do maksymalizacji produkcji wodoru i stabilności procesu oraz które z uzyskanych wyników będą w największym stopniu przydatne w poprawie wykonalności metody pod względem komercjalizacji.
- Jakie można zaproponować możliwości wykorzystania pofermentu?
- W polskojęzycznym opisie osiągnięcia naukowego nie uniknięto niefortunnnych zwrotów czy drobnych usterek, jak “Szczególnie wygodne jest stosowanie surowców bogatych w skrobię,…” (str. 10), „opadów organicznych” zamiast „odpadów organicznych” (str. 12), „dobór substratów dopasowanych do procesu ciemnej fermentacji” (str. 14), litry zamiast  $\text{dm}^3$  (str. 19, 24), „VS” zamiast „s.m.o.” (str. 20), „ $\text{Fe}_3\text{O}_2$ ” zamiast „ $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ” (str. 34) czy brak roku przy nazwisku cytowanego autora (str. 36). W sekcji załączników zawierających opublikowane prace Publikacje 4 i 5 powinny zostać zamienione miejscami, jako że w opisie osiągnięć podano, że Publikacja

4 traktuje o wpływie związków azotu i fosforu, a Publikacja 5 o wpływie związków żelaza na produkcję wodoru.

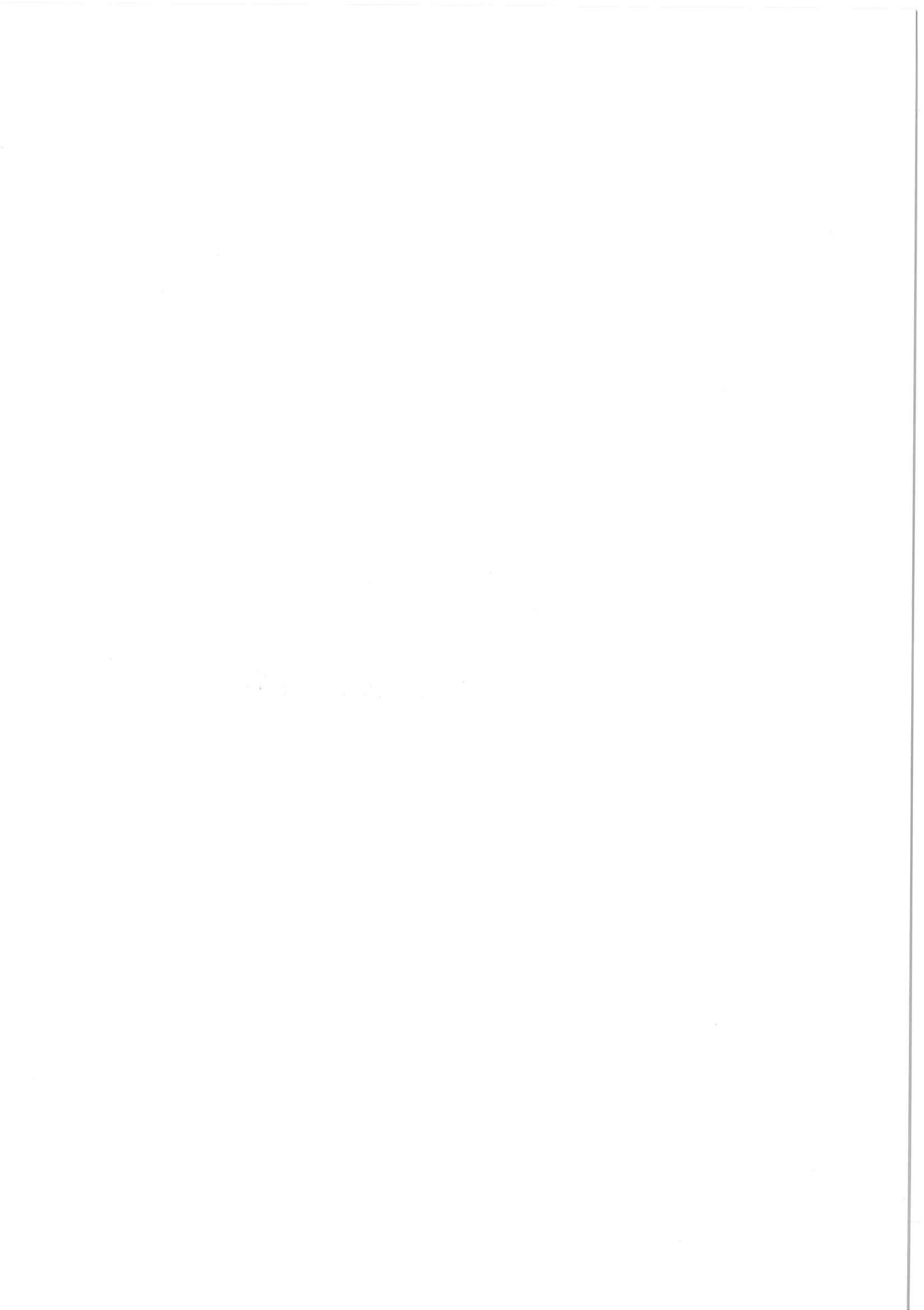
### **Podsumowanie**

Podsumowując moją opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Weroniki Cieciury-Włoch stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Autorka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością projektowania eksperymentów, jasno określiła problemy badawcze, a wyniki, które uzyskała, uzupełniają wiedzę z dyscypliny technologia żywności i żywienia i stanowią podstawę do prac nad rozwojem technologii produkcji wodoru w większej skali.

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska całkowicie spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Zwracam się z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Weroniki Cieciury-Włoch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Magdalena Zelińska*





dr hab. inż. Magdalena Zielińska, prof. UWM  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Geoinżynierii  
Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska  
ul. Słoneczna 45G, 10-709 Olsztyn  
tel. 89 523 41 85  
e-mail: magdalena.zielinska@uwm.edu.pl

Olsztyn, 16.02.2023

**Wniosek o wyróżnienie**  
**rozprawy doktorskiej mgr inż. Weroniki Cieciury-Włoch**  
**pt. „Wytwarzanie wodoru w procesie ciemnej fermentacji z wykorzystaniem odpadowej**  
**biomasy roślinnej”**

Wnioskuje o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Weroniki Cieciury-Włoch. Wniosek swój argumentuję bardzo wysoką wartością naukową pracy. Moja ocena wynika ze znaczenia podjętego tematu badawczego, wpływu na rozwój dyscypliny naukowej, bardzo szerokiego zakresu wykonanej pracy i uzyskania wyników, które mogą stanowić podstawę do istotnego poszerzenia możliwości aplikacyjnych technologii biologicznej produkcji wodoru.

Dodatkowo należy podkreślić znaczący dorobek naukowy Doktorantki, o czym świadczą wskaźniki bibliometryczne (IF 61,381, 1490 punktów MEiN, 142 cytowania (z wyłączeniem autocytowań), indeks H 8, Scopus, stan na 16.02.2023).

*Magdalena Zielińska*

