

Prof. dr hab. Zbigniew Czarnecki
Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Zakład Fermentacji i Biosyntezy
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Szymańskiej

pt. „INTENSYFIKACJA FERMENTACJI ETANOŁOWEJ SUROWCÓW
LIGNOCELULOZOWYCH”

Promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski
Promotor pomocniczy: dr inż. Małgorzata Lewandowska
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Nauki o Żywności.

Ocena formalnej strony pracy.

Praca doktorska mgr inż. Karoliny Szymańskiej liczy łącznie (bez załączników) 139 stron, z czego na wstęp i przegląd literatury przypada 50 stron, na cel pracy, materiały i metody 19 stron, na omówienie wyników 27 stron oraz na dyskusję wyników 11 stron. Materiał faktograficzny dokumentujący wyniki przeprowadzonych eksperymentów przedstawiono w 35 tabelach umieszczonych jako załączniki oraz na 16 rysunkach umieszczonych w rozdziale „Omówienie wyników”. Ponadto trzy tabele umieszczono w przeglądzie literatury jako dane cytowane z numeracją taką samą jak w załącznikach. Praca zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozprawę zamyka 11 wniosków oraz spis piśmiennictwa, który obejmuje 89 pozycji silnie korespondujących z tematyką pracy. Układ pracy jest logiczny i w miarę przejrzysty, zgodny ze standardami przyjętymi dla rozpraw o charakterze empirycznym. Proporcje między objętością poszczególnych rozdziałów należy uznać za poprawne, chociaż przegląd literatury można by skrócić bez szkody dla jakości przekazu. W opinii recenzenta całość opracowania zawiera kilka elementów, których pominięcie poprawiłoby jej przejrzystość i ułatwiłoby lekturę. Dotyczy to między innymi częstych powtórzeń w tekście i niekoniecznych zdań wprowadzających przy

omawianiu wyników. Należy jednak podkreślić, że lektura pracy nie stwarza większych problemów.

Ocena merytoryczna pracy.

Problematyka racjonalnego wykorzystania biomasy lignocelulozowej w procesach biotechnologicznych znajduje się w kręgu zainteresowań naukowych od wielu lat. W latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia prowadzono powszechnie, w tym również w Polsce, badania nad biosyntezą między innymi białka organizmów jednokomórkowych (SCP). W tym okresie zainicjowane zostały również programy badawcze na rzecz energii odnawialnej, jako alternatywy dla paliw kopalnych, szczególnie ropopochodnych. Pojawiły się wtedy terminy: „biodiesel” oraz „bioetanol”, ten ostatni nie do końca słusznie w opinii wielu znawców przedmiotu. Otrzymywanie etanolu na drodze biokonwersji składników zapasowych roślin (skrobia, sacharoza, monocukry) jest relatywnie proste i praktykowane od tysięcy lat. Jednak produkcja etanolu paliwowego z użyciem tych surowców staje się konkurencją dla produkcji żywności, co stanowi problem społeczny i etyczny. W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania i zintensyfikowania badań naukowych w obszarze zagospodarowania powszechnie dostępnej biomasy lignocelulozowej do otrzymywania etanolu paliwowego tzw. „drugiej generacji”. Biokonwersja materiałów lignocelulozowych do etanolu jest jednak zdecydowanie trudniejsza. Z uwagi na inną ich strukturę i rolę jaką pełnią w roślinie, są one z natury odporne na działanie czynników zewnętrznych. Dlatego też badania mające na celu poszukiwanie i opracowanie metod racjonalnego i efektywnego wykorzystania surowców lignocelulozowych do otrzymywania etanolu paliwowego są w pełni uzasadnione, czego dowodem jest podjęcie takich badań przez wiele ośrodków w kraju i zagranicą. Przedstawiona do oceny praca Pani mgr Karoliny Szymańskiej jest zatem uprawnionym merytorycznie elementem tego nurtu badawczego.

W części teoretycznej pracy autorka przedstawiła przegląd współczesnej literatury światowej i krajowej dotyczącej między innymi źródeł pozyskiwania biomasy lignocelulozowej, jej charakterystyki chemicznej oraz dotychczas opracowanych i stosowanych metod ich wstępnej obróbki, detoksykacji surowca po obróbce, hydrolizy polocukrów i fermentacji z uwzględnieniem różnych wariantów prowadzenia

tych procesów. Podkreśliła między innymi kluczowe znaczenie obróbki wstępnej surowca, której celem jest naruszenie struktury lignocelulozy, obniżenie stopnia krystalizacji celulozy i usunięcie ligniny. Nie bez znaczenia jest również obecność czynników inhibujących procesy hydrolizy i fermentacji powstające w wyniku obróbki wstępnej oraz konieczność ich usunięcia przed dalszymi etapami procesu. W dalszej części autorka przedstawiła szereg możliwości technologicznych przeprowadzenia wszystkich etapów procesu, a także wymagania stawiane użytym w procesie enzymom i mikroorganizmom. Tutaj nasuwa się uwaga, że wymaganie dla mikroorganizmów fermentujących wysokiej odporności na stężenie alkoholu na poziomie 40g na litr jest pewnym nieporozumieniem. Zawarte w części teoretycznej treści, jak też cytowana literatura naukowa, świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu autorki do podjęcia badań nad efektywną biokonwersją biomasy lignocelulozowej do etanolu.

Przegląd literatury był dobrą podstawą do sformułowania celu pracy. Cel ten został przedstawiony w sposób prosty i zwięzły. Umieszczono tutaj szczegółowo zadania badawcze służące do jego zrealizowania. Moja uwaga w tym miejscu ma charakter formalny i dotyczy niepoprawnej odmiany terminu „podłoże” (patrz: SŁOWNIK POPRAWNEJ POLSZCZYZNY PWN).

W części zatytułowanej: „Materiały i metody” mgr Karolina Szymańska przedstawiła materiały badawcze, opis szeregu eksperymentów tworzących układ doświadczeń oraz zastosowane w pracy metody analityczne. Część ta zawiera w zasadzie wszystkie niezbędne informacje i została ułożona w sposób, który nie utrudnia czytelnikowi lektury. W części wstępnej umieszczono informacje o podstawowym materiale badawczym jakim były substraty lignocelulozowe: wierzba wiciowa i słoma rzepakowa. Pozostałe opisane materiały to użyte w pracy preparaty enzymatyczne, szczepy drożdży, podłoża hodowlane i odczynniki chemiczne. W części dotyczącej przebiegu doświadczeń autorka przedstawiła między innymi sposób przygotowania inokulum i podłoży hodowlanych oraz przebieg zastosowanych procesów – obróbki wstępnej surowca, detoksykacji, hydrolizy i wielowariantowej fermentacji. Podrozdział „Metody analityczne” zawiera opis metod analitycznych stosowanych w celu weryfikacji poszczególnych etapów badań. Zakres zastosowanych metod analitycznych uważam za właściwy i wystarczający, lecz nie

do końca wykorzystany. Rozdział „Materiały i metody” opisany ten jest w sposób czytelny i komunikatywny, jednak kilka jego elementów wydaje się być dyskusyjnych. Mam wątpliwości, czy zastosowane w pracy enzymy mogą mieć znaczenie aplikacyjne. W opisie procesów z udziałem brzeczek syntetycznych sformułowanie: „w warunkach niestacjonarnych z dostępem tlenu” jest mało precyzyjne i nie bardzo wyjaśnia istotę procesu. W celu obiektywnej interpretacji rezultatów badań autorka zastosowała ocenę statystyczną przy użyciu analizy wariancji i testów istotności różnic średnich. W pracy znalazłem liczne ślady analizy wariancji w postaci umieszczonych w tekście wartości poziomu istotności i żadnych danych liczbowych dotyczących testów istotności różnic wartości średnich.

Omówienie wyników zawiera obszerną dokumentację rezultatów kolejno przeprowadzonych eksperymentów. Kolejność omawianych doświadczeń tworzy w zasadzie logiczny ciąg zgodny z zaplanowanymi etapami badań. Niezrozumiałe wydaje się umieszczenie rozdziału 5.4 po rozdziałach 5.2 i 5.3, które powinny korzystać z rezultatów tego rozdziału. Pierwsza część posłużyła porównaniu wytypowanych gatunków i szczepów drożdży pod kątem ich przydatności do fermentacji cukrów (heksoz i pentoz) oraz wrażliwości na obecność potencjalnych inhibitorów. Uzyskane wyniki potwierdziły wysoką przydatność szczepów *S. cerevisiae* do fermentacji heksoz i niezadowalającą efektywność szczepów *Pichia* i *Candida* względem pentoz. Odnośnie interpretacji wyników nasuwa się tutaj uwaga, że analiza wariancji odnosi się do czynników eksperymentu a nie do różnic wartości średnich. Autorka wykazała zróżnicowaną tolerancję badanych szczepów na obecność inhibitorów. Najkorzystniej prezentowały się szczepy B4 i 7. Zastosowanie dwóch różnych zakresów skali wydajności na rysunkach 5 i 6 nie wydaje się dobrym pomysłem. Również nazwanie dwóch szczepów drożdży „termofilami”, a także określenie dodatku inhibitorów jako „wzbogacanie” nie wydaje się trafne. W następnym etapie mgr Karolina Szymańska badała przydatność hydrolizatów lignocelulozowych oraz skuteczność detoksykacji w odniesieniu do efektywności fermentacji. Wykazała między innymi że obróbka wstępna surowca generuje powstawanie inhibitorów fermentacji, których rodzaj i ilość zależy od rodzaju substratu. Zastosowany proces detoksykacji okazał się skuteczny do eliminacji powstałych inhibitorów i korzystnie wpłynął na wydajność fermentacji. Proces ten

powoduje jednak istotne straty masy surowca. Mimo wysokiej wydajności względnej fermentacji stężenie etanolu w płynach pofermentacyjnych było bardzo niskie. W następnych eksperymentach autorka wprowadziła kilka modyfikacji technologicznych procesu hydrolizy i fermentacji w celu zwiększenia koncentracji etanolu w brzeczce po fermentacji. Zastosowała proces zagęszczania hydrolizatów enzymatycznych przed fermentacją. Badała również przebieg procesu jednoczesnej hydrolizy i fermentacji z zasilaniem. Fermentacja dwukrotnie zagęszczonych hydrolizatów skutkowała wzrostem stężenia alkoholu w brzeczce i jednoczesnym obniżeniem wydajności względnej procesu. Obserwowane zmiany i ich wielkość zależały zarówno od rodzaju substratu jak od użytego szczepu. Modyfikacja technologii jednoczesnej hydrolizy i fermentacji z zasilaniem spowodowała obniżenie wydajności biokonwersji cukrów. Uzyskane w tej części pracy rezultaty, mimo że nie spełniły większości oczekiwań autorki, mogą być ważną wskazówką przy ewentualnej kontynuacji badań. W ostatnim etapie badań mgr Karolina Szymańska oceniła ilościowy i jakościowy skład lotnych związków zawartych w otrzymanych destylatach. Stwierdziła że skład ten zależy od zastosowanego substratu a ilość zanieczyszczeń nie przekracza norm dla etanolu paliwowego.

Przedstawiony w omówieniu wyników materiał dowodowy jest obszerny, a dyskusja wyników sprowadza się niekiedy do jego powtórzenia. Jednak sporo jest fragmentów, w których autorka opisuje rezultaty innych badaczy w krytycznej ich konfrontacji z wynikami badań własnych. Zwięźleniem pracy jest 11 wniosków, które szczegółowo i obszernie odnoszą się do zadań postawionych w celu pracy oraz wyników i ich omówienia. W opinii recenzenta wnioski zawierają najważniejsze konkluzje wynikające z pracy.

W ocenie całości rozprawy chciałbym stwierdzić, że Pani mgr Karolina Szymańska zrealizowała postawione w pracy doktorskiej cele i zadania badawcze, czym dała dowód wiedzy, umiejętności warsztatowych oraz dojrzałości intelektualnej uprawniającej do ubiegania się o stopień naukowy doktora. Pracę oceniam pozytywnie zarówno pod względem poznawczym jak i aplikacyjnym. Jak wiele prac doktorskich nie wyczerpuje ona w pełni tematu i oprócz ważnych stwierdzeń i obserwacji zostawia również pole do kontynuacji badań, zwłaszcza w aspekcie aplikacyjnym.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że praca Pani mgr Karoliny Szymańskiej stanowi istotny wkład w rozszerzenie wiedzy na temat możliwości zastosowania substratów lignocelulozowych w procesach biokonwersji i otrzymywania etanolu na cele energetyczne. Rozprawa spełnia wymagania stawiane przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14.03.2003 roku kandydatom do stopnia naukowego doktora, dlatego w przekonaniu o wysokiej wartości tej pracy wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Szymańskiej do publicznej obrony zawartych w pracy tez.

Poznań, 26.11.2017

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'K. Szymańska', written in a cursive style.