

dr hab. inż. Grzegorz Kłosowski, prof. nadzw.
Zakład Biotechnologii
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

RECENZJA

**Pracy doktorskiej mgr inż. Natalii Anny Kordala
wykonanej w Katedrze Biotechnologii Żywności
Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie,
Pod kierunkiem promotora Pana prof. dr hab. Włodzimierza Bednarskiego oraz
promotora pomocniczego dr inż. Małgorzaty Lewandowskiej,
pt: "Analiza czynników decydujących o wykorzystaniu sacharydów surowców
lignocelulozowych w biosyntezie etanolu"**

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, zgodnie zapisami art. 13, ust 1, oraz art. 20 ust. 5 Ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003, Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską mgr inż. Natalii Anny Kordala oceniam bardzo pozytywnie, nie tylko pod względem poznawczym ale również z uwagi na znaczący potencjał aplikacyjny. Trafny i aktualny jest wybór tematyki rozprawy, związany z zagadnieniem produkcji bioetanolu II generacji. Chociaż fermentacja alkoholowa należy do procesów biotechnologicznych o najdłuższej historii, jej wykorzystanie do produkcji biopaliwa stwarza nadal wiele problemów natury technologicznej, pomimo dobrej znajomości podstaw biochemicznych procesu. Szczególnie w zakresie wykorzystania jako surowca biomasy lignocelulozowej, liczne kwestie związane z doborem parametrów procesowych, obróbki wstępnej oraz detoksykacji hydrolizatu wymagają nadal wyjaśnienia, zarówno na poziomie badań podstawowych jak i aplikacyjnych. Dodatkowe trudności stwarza wykorzystanie nowych surowców oraz konieczność poszukiwania efektywniejszych biokatalizatorów do ich degradacji. Produkcja etanolu z lignocelulozy to również konieczność użycia mikroorganizmów o szerszym spektrum substratowym, tolerancyjnych na liczne czynniki stresu, których metabolizm podlega wielu złożonym mechanizmom regulacyjnym, z których nie wszystkie są w pełni poznane. Niewątpliwie szlak biochemiczny fermentacji alkoholowej jest dobrze poznany, ale nadal istnieje potrzeba prowadzenia badań nad wieloma czynnikami, głównie procesowymi, wywierającymi wpływ na aktywność metaboliczną mikroorganizmów. Badania takie, w których nurt wpisuje się recenzowana rozprawa, pozwalają na stopniowe uzupełnienie obecnego stanu wiedzy na temat wpływu nowych surowców i metod ich obróbki, biokatalizatorów a niekiedy inhibitorów na przebieg fermentacji. Za godne podkreślenia w odniesieniu do ocenianej rozprawy uważam kompleksowe podejście do problematyki badawczej, obejmujące wszystkie kluczowe aspekty

tj. charakterystykę surowca i obróbkę wstępną, detoksykację hydrolizatów i przygotowanie podłoży fermentacyjnych, dobór mikroorganizmów i metody fermentacji oraz ocenę jej efektywności. Co więcej, Doktorantka podjęła trudną próbę (nie osiągnięto oczekiwanych rezultatów) pozyskania celulaz z hodowli bakterii *Cellulosimicrobium cellulans* oraz grzybów strzępkowych *Aspergillus Niger*.

Struktura rozprawy i uwagi ogólne

Rozprawy liczy łącznie 163 strony maszynopisu. Została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Precyzyjny spis treści obejmuje 8 rozdziałów: Streszczenie, Wstęp, Część teoretyczna zatytułowana - „Problematyka badań w dostępnej literaturze”, Cel pracy, Materiały i metody, Omówienie wyników, Dyskusja wyników, Wnioski i stwierdzenia końcowe, Literatura, Załączniki (Tabele 18-38). Niektóre z wymienionych rozdziałów mają rozbudowaną strukturę podrozdziałów, logicznie uporządkowanych, których układ określiłbym jako klasyczny dla prac eksperymentalnych. Cytowane piśmiennictwo, w znacznej części anglojęzyczne, obejmuje najnowsze publikacje z ostatnich pięciu lat, jest bardzo obszerne, obejmuje 217 pozycji, dobranych adekwatnie do tematyki rozprawy, części metodycznej i dyskusji.

Forma i sposób przedstawienia rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Natalii Anny Kordala są zgodne z uznanymi standardami i spełniają warunki formalne. Treść rozprawy została generalnie zaprezentowana w sposób zwięzły i zrozumiały, poprawny pod względem językowym. Doktorantka nie uniknęła jednak całkowicie drobnych usterek edytorskich, językowych, niezręcznych sformułowań i skrótów myślowych. Za przykład niech posłuży zdanie znajdujące się na stronie 9, o następującej treści : „Jednak wykorzystywanie ich (dotyczy kukurydzy i cukru trzcinowego) skutkuje wzrostem cen żywności oraz **konfliktami paliwowo-spożywczymi**”. Z kolei na stronie 12 lignoceluloza określona została mianem polimeru złożonego z „trzech zasadniczych frakcji: celulozy, hemicelulozy oraz ligniny”. W innych częściach rozprawy lignoceluloza definiowana jest natomiast jako struktura o złożonej budowie kompleksowej, co wydaje się być określeniem bardziej adekwatnym, gdyż poza wymienionymi biopolimerami zawiera pektyny, białka, woski, kwasy tłuszczowe, gumy i inne oraz składniki mineralne, głównie Ca, K, Mg i Si. W treści rozprawy zauważyłem nieliczne błędy literowe, których trudno całkowicie uniknąć w tego typu opracowaniach, a z uwagi na brak ich wpływu na wartość merytoryczną, nie widzę potrzeby ich wyliczania. Stosowna korekta językowa powinna być jednak dokonana na etapie przygotowania publikacji. Pragnę też zwrócić uwagę na pewne usterki natury semantycznej. W wielu miejscach rozprawy Doktorantka używa określenia „zawartość” (np. str. 110 – 114 oraz tabele 18-24 oraz 30-37), prezentując wyniki wydajności etanolu i wykorzystania cukrów fermentujących, używa przy tym jednostek $[g \times dm^{-3}]$ lub $[\% v/v]$. Dla takiego sposobu wyrażenia ilości jednego związku chemicznego w jednostce objętości lub jednostce masy roztworu, właściwsze wydaje się użycie określenia „stężenie” a nie „zawartość”.

Wstęp i Problematyka badań w dostępnej literaturze. Rozdziały zostały zaprezentowane poprawnie, zwięzłe i nie budzą zastrzeżeń. Obejmują łącznie 37 stron. W 14 podrozdziałach uwzględniono przegląd aktualnego stanu wiedzy i technologii w zakresie produkcji etanolu celulozowego. Scharakteryzowano, w kontekście rozprawy

wybrane metody obróbki wstępnej surowców lignocelulozowych i powstające w jej trakcie inhibitory fermentacji oraz metody detoksykacji hydrolizatów. Opisano aspekty mikrobiologiczne i metaboliczne związane z wykorzystaniem specyficznego substratu jakim są hydrolizaty lignocelulozowe. Część teoretyczną kończy podrozdział poświęcony aktualnym zagadnieniom obejmującym doskonalenie procesu fermentacji alkoholowej z wykorzystaniem surowców lignocelulozowych. Podsumowując ocenę tych części rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością podstaw teoretycznych stanowiących przedmiot zrealizowanych przez Nią prac eksperymentalnych.

Cel Pracy. Po części teoretycznej w odrębnym rozdziale opisano ogólnie sprecyzowany cel pracy, oraz zakres badań podzielony na dwa główne etapy. Pewien niedosyt powoduje brak wyraźnie wyodrębnionych hipotez badawczych, co może utrudniać sformułowanie wniosków w sposób bezpośrednio odpowiadający zdefiniowanemu celom. Zostało to, pozostawione w pewnym stopniu czytelnikowi do własnej interpretacji.

Materiały i metody. Rozdział zawiera szczegółowo opisane metody badawcze i analityczne jak również charakterystykę surowców użytych do badań. Dobór metod jest poprawny dla zapewnienia możliwości pełnej realizacji założonych celów badań. Możliwe jest pełne odtworzenie przebiegu prac eksperymentalnych, co jest jednym z warunków stanowiących o rzetelności uzyskanych wyników. Prezentacja użytych metod jest przejrzysta i dokładna, opatrzona stosownymi odnośnikami literaturowymi. Wiarygodność uzyskanych wyników podnosi wykorzystanie nowoczesnych metod analizy instrumentalnej, zwłaszcza w zakresie wysokosprawnej chromatografii cieczowej, użytej do analizy stężenia cukrów prostych w hydrolizatach oraz mediach pofermentacyjnych.

Uwagi krytyczne:

- W podrozdziale 4.7. Hydroliza enzymatyczna, (strony 56-57) istotne było by zamieszczenie charakterystyki użytych w badaniach, handlowych preparatów enzymów celulolitycznych.
- W podrozdziale 4.11.3. Oznaczanie zawartości alkoholu w próbach po fermentacji z wykorzystaniem aparatu do destylacji z deflegmatorem (AOAC 1990) – nie podano informacji czy przed destylacją przeprowadzano neutralizację lotnych kwasów organicznych mogących przechodzić do destylatu i mogących wpływać na wyniki pomiarów piknometrycznych.

Omówienie wyników, Dyskusja wyników. Pomimo obszernego zakresu danych eksperymentalnych Doktorantka zrealizowała prezentację wyników w sposób przejrzysty, jednoznaczny i zrozumiały. Rezultaty zilustrowano czytelnymi wykresami, a kluczowe informacje zestawiono w poprawnie skonstruowanych tabelach zamieszczonych w znacznej części jako załączniki. Taki układ nieco utrudnia śledzenie danych i ich interpretację. Tym niemniej zwraca uwagę umiejętność precyzyjnej prezentacji wyników, wyselekcjonowanie najważniejszych ustaleń naukowych, które będą zapewne przedmiotem publikacji.

Prezentując wyniki badań doktorantka przeprowadziła ocenę skuteczności czterech metody obróbki wstępnej biomasy mискanta olbrzymiego tj. przy zastosowaniu alkalicznej obróbki z udziałem wodorotlenku sodu oraz amoniaku (w dwóch wariantach czasu ekspozycji

i temperatury), a także wariant z użyciem kwasu szczawiowego. Ustalono, że najwyższe stężenie uwolnionych cukrów jest możliwe do uzyskania po obróbce alkalicznej, natomiast najwyższa wydajność hydrolizy enzymatycznej obliczona względem dostępnych polisacharydów jest obserwowana w wariancie z użyciem kwasu szczawiowego. Ocena uwarunkowań technologicznych decydujących o wydajności biokonwersji sacharydów w procesie fermentacji etanolowej nie wykazała jednoznacznej przewagi systemu fermentacji SHF w porównaniu SSF. Interesujące jest zaprezentowane zróżnicowanie stopnia wrażliwości użytych mikroorganizmów na oddziaływanie związków potencjalnie hamujących proces oraz wykazana przydatność niektórych rodzimych szczepów drożdży gorzelniczych w procesie biokonwersji do etanolu hydrolizatów lignocelulozowych poddanych detoksykacji. Ciekawe jest ustalenie wskazujące, że możliwe jest pominięcie detoksykacji w procesie fermentacji prowadzonym z udziałem *Mucor indicus*, co może ograniczyć straty surowca przeznaczonego do dalszej hydrolizy enzymatycznej. Przyniesione wyżej ustalenia naukowe stanowią niewątpliwie oryginalny wkład Doktorantki w dynamicznie postępujący rozwój wiedzy w obszarze produkcji etanolu celulozowego.

Dyskusja wyników przedstawiona przez Autorkę jest elementem rozprawy, który zwraca uwagę w pozytywnym aspekcie. Sposób omawiania poszczególnych elementów będących przedmiotem analizy jak również układ i kolejność omawianych zagadnień zasługują na uznanie. Doktorantka sprawnie omawia i analizuje uzyskane wyniki, biorąc pod uwagę różne analizowane zmienne. Potwierdza to umiejętność sprawnego prowadzenia dyskusji na temat niezwykle złożony, jakim jest wykorzystanie biomasy lignocelulozowej do produkcji etanolu II generacji. Sprawnie poprowadzona dyskusja świadczy również o dobrej znajomości literatury w obszarze tematyki rozprawy, co w połączeniu z dobrym poziomem językowym sprawia, że cała praca zasługuje na wyróżnienie.

Wnioski i stwierdzenia końcowe. Redakcja wniosków nawiązuje do sprecyzowanych celów pracy i stanowi odpowiedź na sformułowane pytania badawcze. Sposób sformułowania wniosków jest generalnie poprawny a ich strona merytoryczna znajduje uzasadnienie w prezentowanych wynikach badań. Być może w przypadku gdyby oprócz sprecyzowania celów, wyodrębniono wyraźnie również hipotezy badawcze, redakcja wniosków, szczególnie w odniesieniu do rezultatów nie spełniających oczekiwań była by bardziej czytelna. Poddaję też pod rozwagę, aby w przypadku publikacji wyników badań podkreślić w sposób bardziej jednoznaczny w jaki sposób wnioski wynikające ze zrealizowanych badań mogą być wykorzystane w praktyce.

Podsumowanie recenzji

Pomimo, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Natalii Anny Kordala została napisana w sposób zwięzły i zrozumiały oraz sprawnie zredagowana pod względem merytorycznym jak również językowym i edytorskim, to jej lektura wymaga od czytelnika dużego skupienia, głównie z względu na wielowątkowość, złożoność analiz oraz ilość analizowanych danych. Doktorantka sprawnie sformułowała temat i cel pracy, poprawnie zaplanowała i przeprowadziła prace eksperymentalne służące jego realizacji, umiejętnie wykorzystwała narzędzia badawcze, analityczne i statystyczne, co podnosi znacząco wiarygodność ustaleń naukowych prezentowanych w rozprawie.

Stwierdzam, że dysertacja stanowi wieloaspektowe opracowanie naukowe, w którym Autorka uwzględniła w sposób kompleksowy uwarunkowania surowcowe, mikrobiologiczne, biochemiczne i technologiczne związane z technologią produkcji etanolu II generacji z biomasy lignocelulozowej. Prezentowane rezultaty stanowią nie tylko rozszerzenie aktualnej wiedzy w tym obszarze ale charakteryzuje je znaczący potencjał aplikacyjny.

Reasumując, przedłożona do oceny praca doktorska stanowi wartościowe, oryginalne podejście do rozwiązania sformułowanego problemu naukowego, jak również potwierdza zaawansowaną wiedzę teoretyczną Autorki w zakresie przedmiotu rozprawy i wskazanej dyscypliny naukowej. Doktorantka udokumentowała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, wysokie kompetencje i umiejętności w zakresie użytych metod badawczych i analitycznych oraz interpretacji uzyskanych wyników. Większość aspektów przedłożonej mi do recenzji dysertacji oceniam bardzo pozytywnie i mimo kilku krytycznych uwag stwierdzam, że stanowi ona opracowanie spełniające wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym wnioskuję do Wysockiej Rady Wydziału Nauki o Żywności o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Natalii Anny Kordala do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę aktualność i znaczenie podjętej tematyki badawczej, szeroki zakres i wielowątkowy charakter pracy oraz jej istotną wartość poznawczą i aplikacyjną, jak też wysoki w mojej ocenie potencjał publikacyjny, zgłaszam wniosek o wyróżnienie przedłożonej rozprawy doktorskiej stosownie do zasad obowiązujących na Wydziale Nauki o Żywności.

dr hab. inż. Grzegorz Kłosowski, prof. UKW

