



### Recenzja

pracy doktorskiej Pana mgr inż. Marcina Sobeckiego pt. „Badania procesu biosyntezy kwasu itakonowego z surowców celulozowych”. Praca została wykonana w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Projektowania Projektowego, Wydział Chemiczny, Politechnika Gliwicka pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Hehlmana i prof. dr hab. Wiesława Szeja.

Na Świecie przyroda corocznie wytwarza więcej biomasy niż wynosi produkcja całego przemysłu chemicznego, a celuloza zajmuje w niej godne miejsce. Wykorzystanie biomasy roślin jako źródło ciepła to czas teraźniejszy. Prognozuje się, że w przyszłości biomasa ta może także stanowić odnawialny surowiec procesów biorafinacyjnych. Pojęcie biorafinacji obejmuje procesy tradycyjnej rafinacji wzbogacone o narzędzia biotechnologiczne, takie jak mikroorganizmy, enzymy czy systemy wieloenzymowe. W takim wykorzystaniu daru natury, jakim jest biomasa, widzi się postęp, rozwój i bezpieczną przyszłość społeczeństw. Oczywiście dziedzina ta, jak każda nowa, lub uznana za nową strategią rozwoju nauki nie jest skończoną prawdą absolutną ale niesie w sobie ożywcze idee umożliwiające w szerszym niż dotychczas zakresie wytworzenie nowych surowców, produktów i energii z ogromnego oceanu różnorodnej biomasy.

W recenzowanej pracy doktorskiej dostrzegam pewne elementy biorafinacji, a mianowicie – depolimeryzację materiałów celulozowych enzymami mikrobiologicznymi i dalsze ich przetworzenie metodą fermentacji do kwasu itakonowego, a wszystko to opisane i zrealizowane narzędziami mającymi swoje źródło w chemii, inżynierii chemicznej, słowem w rafinacji. Na końcu jest sam kwas itakonowy - wartościowy substrat/surowiec w wielu cennych aplikacjach.

Mój wywód nie oznacza, iż pojęcie *biorafinacja* powinno się znaleźć w jej tytule, ale wskazuje na dużą pojemność i złożoność tej dyscypliny nauki. Stąd wniosek, że pomału dorastamy mentalnie i technicznie do uprawiania tej dziedziny i korzystania z ogromnych jej możliwości. W kraju niewiele ośrodków naukowych zaczyna zajmować się tą dziedziną nauki, rozwijać i scalać jej elementy narzędziami inżynierskimi używanymi do opisu procesów biotechnologicznych.

Recenzowana praca doktorska Pana mgr inż. Marcina Sobeckiego posiada typowy układ rozpraw doktorskich. Manuskrypt został napisany na 211 stronach maszynopisu. Zapleczem merytorycznym jest bibliografia zawierająca ponad 233 pozycji literaturowych. Do pracy

dołączono także obfity aneks na CD, w którym na 256 stronach zamieszczono szczegółowe wyniki badań, które ułatwiają ocenę recenzowanej pracy. To jest solidny, obfity i uporządkowany materiał naukowy.

Rozdział 1 „Przedmiot i cel pracy” zawiera wyczerpujący opis postawionego celu naukowego, przedstawionego w kilku płaszczyznach postrzegania powodów wyboru tej tematyki, podstaw teoretycznych i aplikacyjnych oraz zamysłu realizacji zamierzeń. Stwierdzam, że cel ten został zrealizowany.

W rozdziale 2, pt.: „Studia literaturowe” (42 strony) Autor bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę badań omawiając: mechanizmy chemicznej i enzymatycznej degradacji celulozy; sposoby obróbki materiałów lignocelulozowych; bioreaktory oraz sposoby prowadzenia procesu enzymatycznej hydrolizy celulozy; zagadnienia związane z biotechnologicznym wytwarzaniem kwasu itakonowego, opisuje mechanizm biosyntezy; proces fermentacji oraz bioreaktory stosowane do tego celu, koncentrując uwagę na hydraulice reaktorów airlift (ALR) z wewnętrzną rurą cyrkulacyjną. Zamieszcza także wyczerpujące podsumowanie wiedzy dotyczącej przedmiotu badań oraz analizę rozwiązań prezentowanych w publikacjach naukowych. Końcowe konkluzje potwierdzają naukową atrakcyjność jego koncepcji badań. Po pierwsze, Autor w znanej mu literaturze nie znalazł publikacji dotyczących zastosowania hydrolizatów ligno-

ulozowych do biosyntezy kwasu itakonowego. Po drugie stwierdził że, stosowane rozwiązania aparaturowe reaktorów do hydrolizy enzymatycznej surowca celulozowego nie zapewniają wystarczającej efektywności procesu co ma implikacje kosztowe, które Autor zamierza niwelować poprzez zastosowanie nowych rozwiązań aparaturowych i lignocelulozowych surowców odpadowych. Jest to naprawdę dobrze napisany rozdział. Opisywane zagadnienia znajdują uzasadnienie w planowanych doświadczeniach a szczegółowość opisu koresponduje z wykreowanym celem pracy. Podoba mi się, ponieważ analiza literatury została przeprowadzona z pozycji inżyniera, który, o ile to możliwe, zamierza iść swoją drogą, w konkretnym celu. Tym celem jest biosynteza kwasu itakonowego. W tym momencie pragnę zwrócić uwagę Autorowi, iż w moim przekonaniu opracowując nowe rozwiązania aparaturowe nawet na moment nie należy tracić z pola widzenia „źródła przemian metabolicznych” jakim jest wybrany mikroorganizm, bo to on w ostateczności będzie „wykonywał tę pracę”. Dostrzegłem, jak to bywa, pewne uchybienia językowe oraz nieściśłości, które przekazałem Autorowi i oczekuję ich wyjaśnienia na obronie.

Rozdział 3, zajmujący 27 stron, opisuje efekty enzymatycznej hydrolizy celulozy. W badaniach dostrzegam przenikające się dwie części, procesową i biotechnologiczną. Badania prowadzono w reaktorze bez mieszania i w reaktorze z dwoma niezależnymi mieszadłami, co pozwoliło Autorowi ustalić procesową efektywność enzymu, określić optymalne warunki

przewodzenia hydrolizy oraz wytypować metody obróbki surowca. Aby wykonać zaplanowane badania zbudowano stanowisko, którego głównym elementem był termostатовany reaktor zbiornikowy bez i z mieszaniem, stanowisko do wstępnej obróbki surowca nasyconą parą wodną o temperaturze 100°C i promieniowaniem mikrofalowym o różnej mocy, oraz bioreaktor z dwoma niezależnymi mieszadłami do okresowej oraz półciągłej hydrolizy surowca. Do treści merytorycznych tego rozdziału oraz sposobu opisu nie wnoszę zastrzeżeń.

W rozdziale 4, na 63 stronach, zamieszczono opis badań nad procesem enzymatycznej degradacji materiałów celulozowych w modelowym reaktorze. Opisano stanowisko badawcze, przyrządy pomiarowe, metodykę, zakres i program badań, dokonano charakterystyki obserwowanych struktur mieszanej zawiesiny, wyznaczono: minimalną częstość obrotów mieszadła gwarantującą wytworzenie mieszaniny całkowitej, moc mieszania mieszadła głównego, efektywność mieszania surowca celulozowego, wzajemny wpływ pracy mieszadeł na efektywność procesu mieszania; scharakteryzowano moc mieszania w procesie enzymatycznej hydrolizy, określono wpływ stref hydrodynamicznych na hydrolizę surowca celulozowego; strategię dozowania enzymu i surowca, efekt jednoczesnej pracy obu mieszadeł, wykonano badania dotyczące odzysku stosowanego enzymu, opracowano równania kryterialne mocy mieszania dla układu surowiec celulozowy/woda, wyznaczono szczegółowe równania kryterialne, przeprowadzono interpretację równań mocy mieszadła, opisano model kinetyczny enzymatycznej hydrolizy surowca celulozowego. Nie mam zastrzeżeń do tego rozdziału.

Rozdział 5, na 51 stronach, zawiera opis badań nad biosyntezą kwasu itakonowego w bioreaktorze typu airlift (ALR) z regulacją przepływu w rurze wznoszącej, wykazujący na etapie projektowania pewne modyfikacje. W rozdziale tym opisano stanowisko badawcze; przyrządy pomiarowe; metodykę i zakres; określono wpływ zmiennych parametrów procesowych na: hydraulikę badanego reaktora, stopień zatrzymania gazu, prędkość przepływu cieczy, objętościowy współczynnik wnikania tlenu, średnicę i ilości pęcherzy powietrza w odcinku rury wznoszącej; wykonano badania procesu biotransformacji hydrolizatów celulozowych w modelowym ALR; opisano stosowaną metodykę, zakres i program badań; wybrano pożywkę; zamieszczono rezultaty wytwarzania kwasu itakonowego na podłożu porównawczym, zawierającym glukozę i podłożu zawierającym enzymatyczny hydrolizat celulozy w modelowym, uprzednio scharakteryzowanym fermentorze airlift; sprawdzając wpływ natlenienia, opracowano metodę określenia prędkości cyrkulacji roztworu w reaktorze ALR; zamieszczono dokładny tok interpretacji i stosowany algorytm obliczeniowy oraz doświadczalny model kinetyczny konwersji cukrów podczas wytwarzania kwasu itakonowego. Do treści merytorycznych oraz sposobu opisu nie wnoszę zastrzeżeń.

W rozdziale 6 zamieszczono wreszcie analizę prezentowanych rozwiązań i podsumowanie. Praca zawiera także spisy: rysunków (128), tabel (23) i załączników zamieszczonych na płycie CD.

**Ocena merytoryczna.** Nie zamierzam omawiać szczegółowo zaprezentowanych rezultatów, chciałbym jedynie zwrócić uwagę na te elementy, które w moim przekonaniu, zgodnie z moimi kompetencjami, stanowią najbardziej istotną wartość naukową pracy.

W badaniach stosowano dwa wybrane preparaty celulolityczne firmy Novozymes, z których preparat Cellic CTec 2 w opracowanych warunkach procesowych uwalniał do roztworu 90% cukrów zawartych w celulozie. Jest to wartościowy wynik. Autor stwierdził inhibicję enzymów kompleksu celulolitycznego produktami reakcji, co jest znamienne dla tego procesu. Znanych jest kilka dróg niwelowania, z różnym skutkiem, tego zjawiska. Najlepiej sprawdzić to doświadczalnie. Autor rozpoznał od strony literaturowej ten problem (rozdział 2) i zastosował empirycznie opracowany sposób polegający na dozowaniu do środowiska reakcji kolejnej porcji substratu. Zabieg ten zapewnił uzyskanie odpowiednio wysokiej koncentracji sacharydów (ok. 10%) wymaganej do biosyntezy kwasu itakonowego, przy jednoczesnym obniżeniu mocy mieszania. Hydroliza surowca bogatego w celulozę (ręczniki papierowe) dała roztwór zawierający wyższe stężenie łatwo przyswajalnych cukrów. Oceniając, jest to kolejny pozytywny element pracy. Równie ważnym był wybór preparatu enzymów celulolitycznych. Wiadomo, iż na rynku znajduje się wiele preparatów, stąd moje pytanie o kryteria wyboru enzymów do badań. Przy okazji - Autor używa w pracy nazw enzymów: endo- i egzo-celulazy oraz  $\beta$ -glukozydaza, co chemicy uznają za poprawne (patrz Prof. Bogdan Burczyk, Wiadomości Chemiczne, 2009, 63, 739-776). Mam pytanie. Jakie nazwy mają enzymy celulolityczne zgodnie z nomenklaturą naukową (EC)?

Inny interesujący etap pracy to obróbka surowca celulozowego przed procesem enzymatycznej hydrolizy, która według koncepcji Autora nie tylko winna zwiększać podatność materiału na działanie enzymów, ale również dezynfekować surowiec. I tu zwróciłem uwagę na wykorzystanie do tego celu promieniowania mikrofalowego. Metoda ta bezwzględnie jest korzystna w aspekcie dezynfekcji odpadu celulozowego. Może to mieć znaczenie w kontekście, zaproponowanej przez Autora, metody wielokrotnego wykorzystania enzymu do tego procesu. Ocenę działania mikrofal na biomasę, Pan Sobiecki wykonał dwoma sposobami. Sposób pierwszy polegał na oznaczeniu masy rozpuszczalnych w wodzie cukrów wytworzonych po enzymatycznej hydrolizie celulozy uprzednio poddanej i nie poddanej działaniu mikrofalowego promieniowania, i w tym przypadku nie stwierdził różnicy w ilości uwolnionych z celulozy cukrów. Ocena druga polegała na przekształcaniu, za pomocą drożdży, enzymatycznie

wytworzonych sacharydów do etanolu i analizie jego ilości metodą GC. W tym przypadku stwierdzono zwiększenie udziału sacharydów metabolizowanych przez drożdże do etanolu, co z punktu widzenia przyszłego zastosowania hydrolizatu jako składnika podłoża hodowlanego stosowanego do biosyntezy kwasu itakonowego, okazywało się zachęcające. Wynik pierwszej oceny można byłoby sprecyzować stosując do analizy sacharydów rozpuszczalnych dodatkowo, np. test enzymatyczny do wybiórczego oznaczenia stężenia glukozy. Pierwsza metoda oceny daje bardzo szybko rezultaty a wynik drugiej, mającej większą wartość dla badacza, uzyskuje się po kilku dniach. Podoba mi się także sama koncepcja wykorzystania fermentacji etanolowej do określenia przydatności produktów enzymatycznej hydrolizy biomasy do biosyntezy kwasu itakonowego. Takie podejście, co prawda znacznie bardziej pracochłonne, pomaga oszacować przydatność otrzymanych hydrolizatów do zamierzonej fermentacji. Samo oznaczenie jakościowe i ilościowe cukrów, np. metodą HPLC także nie jest do końca miarodajne, ponieważ nie pokazuje ewentualnych inhibitorów, biosyntezy kwasu itakonowego wytwarzanego przez *Aspergillus terreus*, uwalnianych, np. z papieru gazetowego. Choć, jak stwierdza Autor, najlepszym i ostatecznym testem przydatności jako źródła węgla otrzymanych hydrolizatów jest przeprowadzenie ich fermentacji do kwasu itakonowego.

W porównaniu do drożdży, grzyby *Aspergillus terreus* metabolizują szerszą paletę cukrów (np. pentozy powstałe z degradacji hemiceluloz). Stąd uzyskanie hydrolizatu papieru gazetowego słabo konwertowanego przez drożdże do etanolu, nie powinno, bez sprawdzenia, eliminować jego zastosowania do biosyntezy kwasu itakonowego.

Z uwagi na uzyskiwany wyższy stopień konwersji, jako surowiec do badań nad procesem biosyntezy kwasu itakonowego, użyto hydrolizaty wysokocelulozowych ręczników papierowych.

Interesującym jest zaproponowany sposób częściowego odzysku enzymów po hydrolizie materiału celulozowego z mieszaniny poreakcyjnej, umożliwiający jego powtórne wykorzystanie. Najprostszą metodą odzysku, nie wymagającą stosowania dodatkowych urządzeń jest adsorpcja, pozostałego białka enzymatycznego z roztworu po hydrolizie, na świeżym surowcu celulozowym. Pozwala to na obniżenie kosztów tego etapu, choć, zgadzam się z sugestiami Autora, wymaga jeszcze dopracowania. Oceniam, iż w sumie może być „warta skórka za wyprawkę”. Myślę, że jest okazja do postawienia pytania. Czy w przypadku, zwłaszcza poddanego hydrolizie enzymatycznej papieru gazetowego, należy używać terminu „cukry redukujące” czy raczej „substancje redukujące”. A co z absorpcją rozpuszczalnych cukrów na świeżym surowcu?

Podsumowaniem tego zakresu badań było zaproponowanie przez Autora modelu kinetycznego enzymatycznej hydrolizy surowca celulozowego. Czerpiąc z literatury

przedmiotu wskazującej na skomplikowane wzajemne oddziaływania substratu/ów z enzymami celulolitycznymi, Doktorant do rozważań kinetycznych przyjął uproszczony przebieg reakcji nieodwracalnej przyjmując, iż podczas hydrolizy następuje rozerwanie wiązań glikozydowych łączących mery cukrowe, a reakcja przebiega według równania kinetycznego pierwszego rzędu. W zaproponowanym ujęciu kinetyki reakcji przyjął zastępczą szybkość reakcji całego procesu hydrolizy, niezależnie od składowych reakcji zachodzących podczas degradacji celulozy. Doświadczalnie potwierdził, że stała  $k$  nie ma charakteru uniwersalnego a o jej wartości decydują czynniki, takie jak enzym (w tym jego ilość i strategia dozowania), reżim hydrauliczny zawiesiny surowca i rodzaj surowców celulozowych. W przypadku odwzorowania geometrii reaktora i identyczności parametrów procesowych otrzymane równania mogą być stosowane w procedurach projektowych, co uważam za osiągnięcie Autora.

Ostatnim etapem pracy były badania nad biosyntezą kwasu itakonowego w fermentorze. I znów, jak poprzednio, Autor dokonał analizy literatury przedmiotu. Uwzględniając właściwości wybranego szczepu *Aspergillus terreus* IAW 38, wybrał jako stanowisko badań fermentor ALR (airlift). W badaniach porównał procesy biosyntezy kwasu itakonowego w modelowym ALR na podłożach zawierających jako źródło węgla handlową glukozę i otrzymane przez siebie hydrolizaty celulozowe. Dla obu podłoży nie stwierdził zasadniczej różnicy w wydajności kwasu itakonowego, co potwierdziło słuszność koncepcji stosowania produktów hydrolizy biomasy celulozowej i umożliwiło wykorzystanie dotychczasowych wyników w ramach badań optymalizacyjnych, obejmujących przygotowanie surowca celulozowego, warunki hydrolizy katalizowanej przez enzymy i ich następczej biotransformacji, jako punkt wyjścia do opracowania koncepcji biotechnologicznej metody wytwarzania kwasu itakonowego.

Autor opracował koncepcję budowy modelowego reaktora typu airlift z wewnętrzną cyrkulacją o regulowanej prędkości przepływu cieczy bez konieczności zmiany natężenia przepływu gazu. Uzyskane wyniki stały się punktem wyjścia do opracowania założeń projektowania reaktorów do otrzymywania kwasu itakonowego z wykorzystaniem materiału wysokocelulozowego jako surowca. Chciałbym zaznaczyć, iż w ramach pracy wykonano projekt i skonstruowano taki fermentor, co można uznać za sukces Autora.

Uzyskana wydajność kwasu itakonowego odbiega od najlepszych wyników literaturowych. Zgadzam się z Autorem, gdy pisze o konieczności dalszej optymalizacji procesu biotransformacji. Życie nas uczy, że zawsze jest za mało czasu na szeroką realizację zamierzonego celu doktoratu. W sumie doktorat z wynikami zamieszczonymi na CD ma ok. 460 stron, pozostawiam to bez komentarza. Praca pokazuje interesujące podejście dobrze

zakotwiczone w inżynierii procesowej. Część biotechnologiczną, w niektórych fragmentach pracy, Autor opisał, zbyt ogólnie. Być może chodzi tu *know-how*. Uwaga ta dotyczy ważnych czynności technologicznych, takich jak: przechowywanie, uaktywnianie szczepu produkcyjnego i przygotowanie inokulum. Na tych obszarach widzę duże rezerwy. Stąd nasuwają się spostrzeżenia, które dotyczą ewentualnych przyszłych działań. Uwagi te nie wpływają na ocenę merytoryczną pracy a są jedynie rodzajem podpowiedzi recenzenta zainteresowanego problemem naukowym. Dla potrzeb realizacji celu doktoratu dokonał wyboru szczepu kolekcyjnego *Aspergillus terreus* IAW 38. Szczepy tego gatunku pobrane z różnych źródeł nie muszą mieć identycznych właściwości. Mają podobne, ale to słowo jest bardzo rozciągliwe. Chcąc otrzymać wysoką wydajność produkcji kwasu należy sięgnąć po odpowiednio wydajne narzędzie mikrobiologiczne i zoptymalizować warunki jego hodowli. W tym przypadku wybór szczepu mogę uznać za trafiony. Interesuje mnie kryterium wyboru szczepu do badań. Skład podłoża hodowlanego i jego optymalizacja może znacznie zwiększyć produktywność biosyntezy kwasu itakonowego. Inne elementy to kontrola mikrobiologicznej czystości procesu. Czuję także niedosyt oceniając metodę analizy zastosowaną do oznaczania stężenia wytwarzanego kwasu itakonowego. Proszę Pana mgr inż. Marcina Sobeckiego o ustosunkowanie się do tych zagadnień podczas obrony.

Reasumując uważam, że omówienie i dyskusja uzyskanych wyników zostały napisane kompetentnie i klarownie. Prawdliwość wybranych do dyskusji prac, interpretacja oraz umiejętność kojarzenia wiedzy „z różnych pól”, świadczą o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktoranta. Pragnę podkreślić, że realizacja pracy wymagała konstrukcji lub udoskonalenia szeregu niezbędnych do jej realizacji urządzeń, których zakup byłby sporą inwestycją. W pracy dostrzegam ciekawy potencjał rozwojowy oraz naukową wartość zaplanowanych badań, które oceniam jako wartościowe i ambitne.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pana mgr inż. Marcina Sobeckiego, pt. „Badania procesu biosyntezy kwasu itakonowego z surowców celulozowych” spełnia wszystkie wymagania określone w ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych stawiane pracom doktorskim. Wnoszę, zatem o dopuszczenie Autora przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Tadeusz Antuch

