



Łódź, dn. 29.05.2025

Prof. dr hab. inż. Dorota Kręgiel
Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Łukasza Patryka Wysockiego
pt.: *Biotechnologiczna produkcja enancjomerów kwasu mlekowego na odpadach
kawowych w aspekcie ich całkowitej biorafinacji*

1. Podstawa prawna

Recenzja została napisana na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej z dnia 18.03.2025 roku oraz zlecenia Przewodniczącego Rady Naukowej Biotechnologia prof. dr hab. inż. Michała Chudy z dnia 02.04.2025 roku.

2. Informacje ogólne

Pan mgr inż. Łukasz Patryk Wysocki jest doktorantem Szkoły Doktorskiej Politechniki Warszawskiej. Doktorant jest współautorem łącznie 7 prac, w tym 3 prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR, 1 rozdziału w monografii oraz 3 prac opublikowanych w materiałach konferencyjnych. Dane bibliometryczne jego dorobku naukowego to $IF=9.395$, sumaryczna liczba punktów MEiN = 440, liczba cytowań wg Web of Sciences = 25.

Promotorami pracy doktorskiej wdrożeniowej są: dr hab. Joanna Cieśla, prof. uczelni oraz prof dr hab. inż. Andrzej Chwojnowski.

3. Tematyka i zakres pracy

Tematyka pracy doktorskiej wpisuje się w dyscyplinę Biotechnologia. Temat rozprawy jest bardzo ważny, gdyż dotyczy sektora kawowego, który generuje ogromne ilości odpadów i emituje dwutlenek węgla. Dotyczy to zarówno produkcji i transportu, odpadów opakowaniowych jak i zużytej kawy. Doktorant zajął się tym ostatnim problemem. Po parzeniu kawy pozostają popularne 'fusy kawowe', które również stanowią duże obciążenie dla środowiska. Ogromne ilości zużytej kawy trafiają na wysypiska śmieci, przyczyniając się do emisji metanu – gazu

cieplarnianego, a w konsekwencji do zmian klimatycznych. Fusy kawowe znajdują obecnie nowe zastosowanie jako przydatny surowiec w różnych procesach biotechnologicznych: produkcji biomasy, kompostu, biogazu, oraz gotowych produktów, np. biokompozytów lub innych chemikaliów.

Fusy po kawie zainspirowały Doktoranta do ich kompleksowego wykorzystania w taki sposób, by dokuczliwy odpad zmienił się w ekonomicznie opłacalny surowiec lub całkiem nowy produkt. Celem pracy była całkowita biorafinacja fusów kawowych, z zastosowaniem kaskadowych procesów jednostkowych, w celu otrzymania kwasu mlekowego na drodze fermentacji przez bakterie kwasu mlekowego (LAB). Zakres podjętych prac był bardzo szeroki i obejmował hydrolizę termiczno-chemiczną materiału odpadowego w różnych wariantach, przygotowanie i optymalizację składu pożywki fermentacyjnej, uzyskanej na bazie hydrolizatu, dobór parametrów środowiskowych procesu fermentacji, a także - co bardzo istotne dla technologii - wybór szczepów o najlepszej charakterystyce fermentacyjnej. Na każdym etapie realizacji pracy badawczej Doktorant brał pod uwagę aspekty ekonomiczne oraz środowiskowe prowadzonych procesów jednostkowych. Istotnym elementem prac były prowadzone bilanse - masowy i energetyczny. Warto tu podkreślić, że charakter wdrożeniowy rozprawy doktorskiej wymagał bieżącej analizy uzyskanych efektów i określenia współczynnika gotowości technologicznej. Dlatego badania prowadzone były we współpracy z technologami, projektantami oraz inwestorami. Końcowym efektem było opracowanie schematu ideowego całej biorafinerii.

Zakres głównych prac badawczych był bardzo szeroki i obejmował:

- opracowanie procesu obróbki fusów kawowych dla pozyskania biorafinatu, uwzględniając warunki: hydrolizy kwasowej (stężenie kwasu siarkowego i jego dawka w przeliczeniu na fusy kawowe, temperatura i czas procesu, przemywanie), neutralizacji po hydrolizie (rodzaj neutralizatora, metoda dozowania, dobór środka przeciwpiennego), hydrolizy enzymatycznej (rodzaj i stężenie enzymu, temperatura i czas procesu, mieszanie), oraz ekstrakcji etanolowej;
- ocenę uzyskanych hydrolizatów pod kątem zawartości sacharydów oraz standaryzację hydrolizatów;
- optymalizację składu pożywki fermentacyjnej uzyskanej na bazie hydrolizatu z odpadów kawowych, uwzględniając m.in. konieczność suplementacji dodatkowymi źródłami węgla i azotu i dodatkami na bazie surowców ubocznych;
- dobór szczepów bakterii kwasu mlekowego pod kątem produktywności tego metabolitu;
- dobór parametrów środowiskowych dla procesu fermentacji (inokulacja, czas i temperatura hodowli, pH, dostępność tlenu, dodatek surfaktanta, mieszanie);
- ocenę żywotności komórek LAB po hodowli na hydrolizatach z fusów kawowych;
- ocenę tworzenia kwasu mlekowego, z uwzględnieniem zdolności szczepów LAB do tworzenia enancjomerów D i L;
- powiększenie skali procesu tworzenia kwasu mlekowego od 20 ml do kilku litrów;
- dobór parametrów procesów membranowych dla płynów pohodowlanych;

- bilans energetyczny biorafinerii przetwarzającej fusy kawowe.

4. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest pracą o charakterze eksperymentalnym i stanowi bardzo obszerne opracowanie obejmujące 243 strony, wzbogacone wykazem skrótów, wykazem ilustracji (16) i wykresów (54), wykazem tabel (64) oraz 3 załącznikami obejmującymi dodatkowe tabele (47) i schematy (2). Struktura pracy jest typowa dla rozpraw naukowych i obejmuje następujące części: streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cel i zakres pracy, część eksperymentalną oraz wyniki badań, dyskusję, podsumowanie oraz wykaz cytowanej literatury. **Rozprawa wskazuje na dobrą orientację Doktoranta w obszarze poruszanych zagadnień, zwłaszcza dotyczących procesów fizykochemicznych a także technologicznych i wdrożeniowych.** Autor cytuje ponad 370 pozycji bibliograficznych - są to zarówno pozycje literatury naukowej, ustawy i rozporządzenia, jak i komercyjne strony internetowe. Większość cytowanej literatury naukowej stanowią pozycje anglojęzyczne. Mając na uwadze dużą liczbę cytowanych prac naukowych należy stwierdzić, że dobór bibliografii jest odpowiedni.

5. Merytoryczna ocena pracy

Tytuł pracy został poprawnie sformułowany i odpowiada treści pracy. **Wprowadzenie** stanowi typowy przegląd literatury związanej z tematyką prowadzonych badań. Doktorant przedstawił m.in. problematykę odpadów kawowych w różnych aspektach: prawnym, środowiskowym, a także procesowym. Odrębną część prowadzenia stanowi przegląd literatury na temat bakterii kwasu mlekowego i procesów fermentacyjnych prowadzonych z ich udziałem. Rozdział ten stanowi część dobrze wprowadzającą czytelnika w podstawowe zagadnienia. Jednak **uwzględam, że podrozdział 'Rola kwasu mlekowego i jego soli w organizmie człowieka' można byłoby pominąć, gdyż nie jest związany z celem i zakresem pracy.**

W kolejnej części Autor opisał **cel i zakres** pracy, syntetycznie ujmując celowość podjętych badań oraz wyjaśniając zakres współpracy naukowej i technologicznej z innymi jednostkami. Podjęte działania były zgodne zarówno z tematyką pracy, jak i założeniami gospodarki cyrkularnej. W oparciu o sformułowane cele Doktorant zaplanował zakres badań eksperymentalnych. **Brakuje tu jednak pewnego uporządkowania celów badawczych: celu głównego – związanego z głównym problemem badawczym oraz celów szczegółowych (które pomagają osiągnąć cel główny), a także celów operacyjnych (pomagających w realizacji celów szczegółowych).** Takie scharakteryzowanie celów na pewno pomogłoby lepiej zrozumieć czytelnikowi etapy podejmowanych badań.

W **części eksperymentalnej** Doktorant przedstawił materiał badawczy, a były nim: fusy kawowe i szczepy bakterii kwasu mlekowego. **Szkoda, że wszystkie testowane szczepy LAB nie zostały wcześniej poddane identyfikacji do gatunku, choćby najprostszą metodą biochemiczną (testy API).** Inne materiały zastosowane w badaniach to odczynniki chemiczne i pożywki mikrobiologiczne. Moim zdaniem, **aparatura, podobnie jak metody analityczne**

powinna stanowić osobną część metodyczną. Z kolei metoda Taguchi, która stanowi zestaw statystycznych narzędzi i metodologii projektowania doświadczeń mogłaby być z powodzeniem zaliczona do metod statystycznych, co znacznie poprawiłoby wartość metodyki. Bilanse masowy i energetyczny powinny być ujęte jako odrębne punkty metodyki.

Należy podkreślić, że w części metodycznej Doktorant dobrał właściwie i opisał procedury postępowania. Wykorzystał także szereg metod analitycznych: HPLC, metody enzymatyczne, spektrofotometrię oraz konwencjonalne metody mikrobiologiczne. Zakres stosowanych metod badawczych był bardzo szeroki (ekstrakcja, hydroliza, neutralizacja, fermentacja, skalowanie procesu, procesy mikro- i ultrafiltracji), co wymagało od Doktoranta multidyscyplinarnej wiedzy i doświadczenia. Przypuszczam, że ze względu na niską stabilność mikrobiologiczną badanego produktu ubocznego, tak szeroki zakres badań wymagał bardzo dobrej organizacji pracy i przestrzegania pewnych reżimów technologicznych.

Rezultaty przeprowadzonych badań Doktorant przedstawił w rozdziale *Wyniki* w postaci 49 tabel oraz 54 wykresów opatrzonych stosownymi komentarzami. Szkoda, że *Dyskusja* nie została włączona to części *Wyniki*. Zdaniem Recenzenta byłoby to bardziej korzystne w interpretacji uzyskiwanych wyników badań. Dyskusja w niniejszej dysertacji, umieszczona jako odrębny, stosunkowo krótki rozdział po wynikach badań chyba nie spełniła do końca swojej roli. Rozumiem multidyscyplinarny charakter badań, lecz kierowanie się w prowadzeniu badań eksperymentalnych poszczególnymi celami (cel główny, cele szczegółowe, cele operacyjne) pozwoliłoby na takie przedstawienie materiału z uzyskanych wyników, by było ono bardziej klarowne i oczywiste, bez zbędnych powtórzeń. Bardzo dobre uzupełnienie treści pracy doktorskiej stanowi dokumentacja przedstawiona w suplementach, która prezentuje w sposób bardzo obszerny uzyskane wyniki badań eksperymentalnych i technologicznych.

W efekcie realizacji badań Doktorant przeprowadził wiele procesów jednostkowych oraz wykonał zróżnicowane oznaczenia. Daje to obraz bardzo solidnych eksperymentów, a komentarze Autora dysertacji pozwalają stwierdzić, że Doktorant charakteryzuje się szczególną dociekliwością badawczą oraz niestandardową, oryginalną interpretacją wyników badań i procesów. Najważniejszą częścią prac tego doktoratu wdrożeniowego było zaprojektowanie, na podstawie uzyskanych wyników eksperymentalnych, pełnego procesu technologicznego, obejmującego wszystkie przebadane wcześniej procesy jednostkowe. To szczególna wartość tego doktoratu i zdaniem Recenzenta ta część pracy stanowi kluczowe osiągnięcie przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Przedstawione w pracy rozwiązania, ich oryginalność oraz obszerny zakres, oceniam bardzo pozytywnie.

Zaprezentowane przez Doktoranta wyniki badań wnoszą istotne elementy o znaczeniu nie tylko naukowym, ale także praktycznym, w rozwój dyscypliny naukowej biotechnologia.

6. Pytania i uwagi

Praca jest napisana dość poprawnym językiem, choć czasami zdarzają się pewne drobne niedoskonałości i nieprecyzyjne określenia. Stosowane pojęcia i terminologia nie budzą

większych zastrzeżeń. Prosiłabym jednak Autora o ustosunkowanie się do następujących uwag:

1. Proszę o uporządkowanie celów pracy: celu głównego – związanego z głównym problemem badawczym oraz celów szczegółowych i celów operacyjnych.
2. Dlaczego testowane szczepy LAB nie zostały wcześniej poddane identyfikacji do gatunku, choćby najprostszą metodą biochemiczną (testy API)? Taka analiza dawałaby pewne wyjaśnienia charakteru metabolizmu testowanych LAB: homofermentacji, heterofermentacji czy też fakultatywnej heterofermentacji.
3. Proszę o wyjaśnienie sformułowania: (str. 70) na podłożu PCA oraz MRS *oceniano jednorodność biofilmu w celu potwierdzenia, że w hodowli znajdują się mikroorganizmy jednego gatunku.*
4. Proszę o wyjaśnienie sformułowania: (str. 89) *Dalsza hodowla nie powodowała wzrostu stężenia kwasu mlekowego. Prawdopodobnie w kolejnych dobach bakterie były już martwe.*
5. Proszę o wyjaśnienie sformułowania (str. 96) *...mikroorganizmy preferują przeprowadzanie fermentacji w celu wzrostu...*
6. Proszę o wyjaśnienie terminów (Metodyka 3.2.7. i Tabela 22) : *M-murawa*; *PM – prawie murawa*. Takie oznaczenie zdolności do tworzenia kolonii nie można zakwalifikować jako oznaczeń ilościowych wyrażanych w jtk/ml.
7. Proszę o wyjaśnienie sformułowania (str 110): *należy założyć, że CaSO_4 był dodatkowym źródłem soli mineralnych w pożywce.*

7. Podsumowanie

Według wiedzy Recenzenta i zawartych w rozprawie wyników badań Doktorant zidentyfikował i wykazał wiele istotnych dla biotechnologii zależności pomiędzy cechami bakterii kwasu mlekowego, metodami fizykochemicznymi służącymi do uzyskania medium fermentacyjnego dla LAB, a wydajnością procesów biokonwersji. **Należy podkreślić konsekwencję i determinację Autora zmierzającą do rozwiązania istotnego i ważnego problemu naukowego, a także rolę poznawczo-badawczą oraz wdrożeniową podjętych zagadnień-eksperymentalnych.**

Doktorant poprzez realizację kolejnych etapów pracy wykazał:

- poprawność przyjętych metod i procesów, zmierzających do osiągnięcia sformułowanych celów rozprawy,
- znajomość i opanowanie wiedzy z zakresu biotechnologii, którą wykorzystał w należyтым stopniu podczas prowadzonych prac eksperymentalnych i wdrożeniowych,
- oryginalność rozwiązane go problemu naukowego, co w mojej opinii potwierdza umiejętności Doktoranta do samodzielnego zaplanowania metodyki badań i prowadzenia prac naukowo-badawczych oraz wdrożeniowych.

Uzyskane i zaprezentowane w rozprawie wyniki badań i analiz stanowią podstawę do stwierdzenia, że cele pracy zostały osiągnięte.

Przestawioną do recenzji rozprawę doktorską pt.: „Biotechnologiczna produkcja enancjomerów kwasu mlekowego na odpadach kawowych w aspekcie ich całkowitej biorafinacji”, niezależnie od przedstawionych w formie dyskusyjnej uwag, oceniam pozytywnie. Stwierdzam także, że praca spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U. z 2024 r., poz. 1571 ze zm.).

Wnioskuje do Rady Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej, o dopuszczenie Pana mgr. inż. Łukasza Patryka Wysockiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

