

Opinia

na temat rozprawy doktorskiej nt. „Biotechnologiczna produkcja enancjomerów kwasu mlekowego na odpadach kawowych w aspekcie ich całkowitej biorafinacji” wykonanej przez mgr inż. Łukasza Patryka Wysockiego pod naukowym kierownictwem dr hab. Joanny Cieśli, prof. uczelni oraz prof. dr hab. inż. Andrzeja Chwojnowskiego

1. Ważność podjętej tematyki

Wykorzystanie naturalnych, odpadowych i łatwo dostępnych źródeł substancji odżywczych jest głównym trendem znanym obecnie jako gospodarka cyrkularna. Spożycie kawy w Polsce, jak i na całym świecie jest bardzo popularne. Równocześnie powstający odpad, niezależny od sposobu przygotowania kawy, jakim są fusy kawowe, nie znajduje obecnie szerokiego zastosowania.

W recenzowanej pracy podjęto próbę wykorzystania tego bioodpadu w kierunku biotechnologicznego pozyskiwania kwasu mlekowego. Kwas mlekowy jest produktem fermentacji o wysokim poziomie aplikacyjnym. Ma zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym. Przypisuje mu się rolę regulatorową w organizmie. Szczególne miejsce aplikacyjne zajmuje ponadto polimer kwasu mlekowego – polilaktyd. To polimer biodegradowalny, co pozwala na jego szerokie wykorzystanie w bioopakowaniach, ale także biozgodny, stąd stosowany jest w chirurgii i inżynierii biomedycznej.

Mając powyższe na względzie, tematykę recenzowanej rozprawy doktorskiej uważam za bardzo aktualną, wartą dogłębnych badań. Potwierdza to również fakt, że praca doktorska wpisuje się w misję przedsiębiorstwa EcoBean Sp. z o.o., założonego w 2018 roku przez pracowników Politechniki Warszawskiej.

2. Struktura pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana w postaci monografii wydanej przez wydawnictwo Politechniki Warszawskiej. Składa się z ośmiu głównych rozdziałów: *Wprowadzenia, Celu i zakresu pracy, Materiałów i metod, Wyników, Bilansu energetycznego biorafinerii przetwarzającej SCG, Dyskusji, Podsumowania i Bibliografii*. W pracy znalazł się także wykaz stosowanych skrótów, wykaz ilustracji, wykaz tabel oraz trzy załączniki. W sumie praca liczy dwieście osiemdziesiąt pięć stron. Przedstawionych zostało

pięćdziesiąt cztery wykresy, sześćdziesiąt cztery tabele, wyjątkowo duża liczba, trzysta osiemdziesiąt, pozycji literaturowych. Powyższe liczebniki świadczą o bardzo szerokim podejściu do rozważanego zagadnienia badawczego.

3. Cel pracy

Głównym celem pracy było uzyskanie wydajnej produkcji kwasu mlekowego przy użyciu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego, z zastosowaniem pożywki opracowanej na bazie hydrolizatów fusów kawowych. Podjęto także próbę wstępnego oczyszczenia otrzymanego kwasu mlekowego, stosując do tego celu ciśnieniowe procesy membranowe.

Końcowym celem pracy był bilans masowy i energetyczny oraz schemat ideowy całej biorafinerii.

4. Szczegółowy opis pracy

Standardowo, praca rozpoczyna się od rozdziału zatytułowanego *Wprowadzenie*, który stanowi aktualny opis wiedzy. Opisano w nim odpady kawowe (SCG) zwracając uwagę na aspekt prawny ich zagospodarowania oraz wskazując na ich minimalne do tej pory wykorzystanie np. do remediacji gleby czy do produkcji biogazu.

W kolejnym podrozdziale *Wprowadzenia* szeroko przedstawiono informacje na temat kwasu mlekowego, opisując chemię tego związku, rolę w organizmie człowieka oraz zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym. Bez wątpienia jest to związek o szerokim, niekończącym się zastosowaniu. Szczególne miejsce zajmuje polimer kwasu mlekowego, polilaktyd, który jest obecnie najpopularniejszym „plastikiem” z uwagi na biodegradowalność. Przedstawiono gatunki bakterii należące do tzw. bakterii fermentacji mlekowej (LAB). Choć wszystkie należą do gromady *Bacillota* to różnią się morfologicznie, preferencjami środowiskowymi, głównie optymalną temperaturą i pH. Krótko omówiono techniki hodowli mikroorganizmów a dalej techniki membranowe w oczyszczaniu płynów pohodowlanych.

Rozdział drugi to *Cel i zakres pracy*. Zakres pracy obejmował optymalizację procesów traktowania SCG, optymalizację procesu fermentacji mlekowej wraz ze wstępnym etapem oczyszczania kwasu mlekowego oraz stworzenie bilansu masowego i energetycznego opracowanej technologii.

Rozdział trzeci to *Materiały i metody*, gdzie wszystkie stosowane odczynniki, aparatura zostały skrupulatnie wypisane. Bardzo dokładnie opisano metody analityczne oraz stosowane procedury badawcze. W sposób przejrzysty przedstawiono także metodę Taguchiego, stosowaną do planowania eksperymentu i pozwalającą na minimalizację prób eksperymentalnych. Metoda ta, jak najbardziej mogła zostać zastosowana, gdyż wiadome

było, czego dotyczy ekstremum, a mianowicie dążono do uzyskania jak najwyższego stężenia kwasu mlekowego.

Rozdział 4 to *Wyniki*. Rozpoczyna się on badań wstępnych dotyczących obróbki SCG składającej się z hydrolizy kwasowej, neutralizacji i hydrolizy enzymatycznej. Optymalizację parametrów przeprowadzono metodą Taguchiego. Wykonano również wstępne hodowle na hydrolizacie SCG, bez suplementacji, stosując kilka wybranych szczepów LAB. Prowadzone równoległe hodowle na bogatej, komercyjnej pożywce, MRS, wskazały, że hodowle wyłącznie na SCG są mało efektywne [REDACTED]

W dalszej części rozdziału czwartego przedstawiono badania modyfikujące obróbkę SCG – [REDACTED]

Badania nad ekstrakcją heksanem i etanolem miały przede wszystkim doprowadzić do wydajnej ekstrakcji oleju kawowego oraz antyoksydantów, co nie było przedmiotem doktoratu, [REDACTED]

Kolejne podrozdziały poświęcone zostały przygotowaniu hydrolizatu. Jak pokazano w badaniach wstępnych miał on być otrzymany przez hydrolizę kwaśną (po działaniu kwasu siarkowego) oraz hydrolizę enzymatyczną poprzedzoną neutralizacją. Na każdym etapie rozważano zastosowanie filtracji. Badano także czas i temperaturę hydrolizy kwasowej oraz zasadność stosowania preparatu enzymatycznego. [REDACTED]

W kolejnych podrozdziałach części *Wyniki* poświęcono sporo uwagi nad doбором odpowiedniego szczepu LAB oraz suplementacją pożywki hodowlanej. Uzyskano interesujący wynik dla jednego ze szczepów [REDACTED]

W kolejnych badaniach dobierano warunki bioreaktorowe – natlenienie, temperaturę, pH i związaną z tym regulację w trakcie hodowli a także sposób inokulacji bioreaktora i dozowania nowej pożywki.

Ostatnim elementem badań było wstępne oczyszczenie kwasu mlekowego przy zastosowaniu ciśnieniowych procesów membranowych. Do tego celu na pierwszym etapie zastosowano membranę mikrofiltracyjną [REDACTED] zaś dalej membrany ultrafiltracyjne. Należy podkreślić, że membrany ultrafiltracyjne zostały wykonane przez

Doktoranta samodzielnie w Instytucie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN w Warszawie, pod kierunkiem Prof. dr hab. inż. Andrzeja Chwojnowskiego. Wyniki tej części badań zostały przedstawione głównie jako porównanie zawartości kwasu mlekowego w permeacie i w retencie. Zabrakło zmiany strumienia permeacji w czasie, policzenia współczynnika retencji. Tą część badań kończy dość lakoniczny wniosek, że płyn hodowlany nie stanowi wyzwania technologicznego dla układów membranowych, z czym nie mogę się zgodzić.

Ostatnia część rozdziału *Wyniki* dotyczy bilansu energetycznego biorafinerii przetwarzającej SCG. Przyjęto założenie wielkości produkcji 3000 kg na dzień. Wydatek energetyczny technologii jest wysoki, co wskazuje na konieczność dalszej optymalizacji poszczególnych węzłów technologii.

Rozdział 6 to krótka *Dyskusja wyników*, która właściwie jest już częścią *Podsumowania*, które stanowi rozdział 7. Podstawowy cel pracy, jakim było uzyskanie wydajnej produkcji kwasu mlekowego przy użyciu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego, z zastosowaniem pożywki na bazie fusów kawowych został osiągnięty.

5. Zagadnienia do poruszenia w czasie obrony

Praca jest napisana ładnym naukowym językiem, została przygotowana starannie, rysunki i tabele są czytelne a podział tekstu logiczny. Bardzo liczna literatura jest cytowana i zestawiona poprawnie.

W czasie publicznej obrony pracy doktorskiej chciałabym prosić Autora o wyjaśnienie następujących kwestii:

1. Dlaczego do produkcji kwasu mlekowego nie rozważono bezpośredniego (oczywiście po wcześniej sterylizacji w celu usunięcia ewentualnych pleśni) stosowania fusów kawowych w tzw. bioreaktorze na podłożu stałym?
2. Wykres 1, wykres 2 – dlaczego uzyskując najwyższy wynik stężenia cukrów przy najniższym stosowanym stężeniu enzymu (5% w/w), najniższym czasie hydrolizy (24h) nie podjęto prób stosowania niższego stężenia enzymu i krótszego czasu, co byłoby znacząco bardziej ekonomiczne?
3. Wykres 15 – Próba 4 dała znacząco (prawie dwukrotnie) lepsze wyniki. [redacted] Wynik ten jednak zaniechano z uwagi „na kontekst projektowania biorafinerii”. Wniosek ten stoi w kontraście do badań przedstawionych na Rycinie 19 z [redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
4. Wykres 46 – przy porównaniu dodatków do pożywki SCG otrzymanej po ekstrakcji fusów kawowych przydałaby się próba ślepa tj. produkcja kwasu mlekowego bez

- pożywki SCG, a z wszystkimi dodatkami, co istotnie podkreśliło by sensowność zastosowania hydrolizatu z fusów kawowych.
5. Str. 190 - jak wytłumaczyć fakt, że membrana o relatywnie dużych porach wykazywała punkt odcięcia na poziomie 30-50 kDa? Czy nastąpił aż tak silny *fouling*? Jeżeli tak, to jak można by było go ograniczyć?
 6. Nie jest zrozumiały dla mnie wniosek umieszczony pod Wykresem 54 dotyczący modułu I.
 7. Str. 200 - czy sformułowanie, że fusy kawowe wykorzystywane są w 100 % jest prawidłowe? Według ryciny 3, można tak domniemać, ale czy na każdym etapie tzw. procesów oczyszczania np. ligniny nie jest generowana znacząca masa odpadów? Ponadto wracając do punktu 3 tego podrozdziału recenzji, stosowano ostatecznie filtrat po procesie hydrolizy, a odfiltrowane ciało stałe stało się produktem ubocznym technologii.

8. Dorobek naukowy

Według załączonego raportu dotyczącego dorobku Pan Łukasz Wysocki jest autorem siedmiu prac, z czego w dwóch z nich jest pierwszym autorem. Trzy pozycje to artykuły w czasopismach z IF (sumaryczny IF 9,395). Indeks Hirscha wynosi 3. Można te parametry uznać jako dorobek dobry.

Reasumując uważam, że Pan mgr inż. Łukasz Patryk Wysocki rozwiązał z powodzeniem zadania będące celem Jego rozprawy doktorskiej, która stanowi oryginalne, bogate w liczne eksperymenty osiągnięcie naukowe. Wykazał się przy tym wiedzą oczekiwaną od kandydata do stopnia doktora w dyscyplinie naukowej Biotechnologia.

Uważam, że przedłożona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane formalnie i zwyczajowo pracom doktorskim i stawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Łukasza Patryka Wysockiego do publicznej jej obrony. Równocześnie mając na uwadze szeroki zakres przeprowadzonych prac wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Anna Truch