

Prof. dr hab. Zdzisław Targoński  
Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka  
Towaroznawstwa Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
20144 Lublin, ul Skromna 8

Lublin, 7.04.15

### Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Kamili Buzaty pt. „Wpływ rozdrobnienia i delignifikacji biomasy ligninocelulozowej na przebieg hydrolizy enzymatycznej polisacharydów” wykonanej w Instytucie Papiernictwa i Poligrafii Politechniki Łódzkiej

Badania nad wykorzystaniem biomasy na cele energetyczne i produkcję chemikalii mają długą tradycję. Jednym z powodów jest fakt, iż z blisko stu najważniejszych dla przemysłu chemicznego związków chemicznych, które stanowią 99% ogólnej produkcji chemikalii, 74 % jest produkowana z 5 podstawowych związków, tj. etylenu, propylenu, benzenu, toluenu i ksylenu, które mogą być wytwarzane z biomasy.

Pomimo wieloletnich badań dotychczas nie udało się opracować i wdrożyć opłacalnej, w porównaniu z innymi surowcami węglowodanowymi, technologii otrzymywania cukrów prostych z materiałów ligninocelulozowych. Głównym powodem jest oporność biomasy na biodegradację. Materiały ligninocelulozowe mają skomplikowaną budowę strukturalną, różnorodny skład chemiczny, różną się podatność na działanie czynników fizycznych i chemicznych. Stąd też różnie zachowują się podczas hydrolizy kwasowej jak i enzymatycznej. Zarówno w hemicelulozach jak i celulozie można wydzielić frakcje łatwo i trudno hydrolizujące, co bardzo utrudnia efektywne prowadzenie hydrolizy. Dodatkowo lignina w materiałach ligninocelulozowych spełnia wobec celulozy funkcje ochronną przed działaniem drobnoustrojów celulolitycznych przez oddziaływanie chemiczne i wypełnianie kapilar. Ponadto wymiary cząsteczek enzymów celulolitycznych znacznie przewyższają średnice kapilar natywej celulozy jak i materiałów ligninocelulozowych, dlatego też ich enzymatyczna hydroliza przebiega tak opornie. Z tych powodów biokonwersja materiałów

ligninocelulozowych, powinny być poprzedzone procesem wstępnego przygotowania do hydrolizy.

Idealna metoda wstępnego przygotowania materiałów ligninocelulozowych do enzymatycznej hydrolizy powinna doprowadzić do rozbicia kompleksu ligninocelulozowych, zmniejszyć krystaliczność celulozy, zwiększyć powierzchnię właściwą substratu, a ponadto być oszczędna w zużyciu energii na jednostkę surowca i innych kosztach oraz nie powinna dawać szkodliwych produktów ubocznych. Jak dotychczas brak metody spełniającej wszystkie wymienione wymagania, dlatego nie ustaje się w poszukiwaniu coraz bardziej doskonałych metod obróbki wstępnej.

Podstawowym celem ocenianej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu stopnia rozdrobnienia wybranych surowców ligninocelulozowych oraz otrzymanych z nich metodą siarczanową mas celulozowych, na wydajność i dynamikę enzymatycznej ich hydrolizy. Ponadto oceniano przydatności preparatów enzymatycznych do hydrolizy polisacharydów zawartych w badanych surowcach lub półproduktach.

Metoda siarczanowa jako sposób obróbki surowców ligninocelulozowych obarczony jest licznymi wadami i na ogół nie jest brana pod uwagę jako metoda mogąca znaleźć zastosowanie przemysłowe. Autorka podaje, że na rynku europejskim cena siarczanowej masy celulozowej kształtuje się na poziomie 700-800 USD za tonę. Jest to cena wysoka w porównaniu do ceny surowców skrobiowych i ich hydrolizatów czy sacharozy. Ponadto powstający w procesie tzw. ług czarny zawiera w sobie nie tylko zmodyfikowaną ligninę i chemikalia, ale także większość hemiceluloz, z których część uległa daleko idącej destrukcji i nie jest przydatną dla wielu procesów biotechnologicznych. Tym niemniej badania z tego zakresu warto było podjąć mając na uwadze fakt, iż otrzymana masa celulozowa z większości surowców ulegała prawie pełnej enzymatycznej hydrolizie. Ponadto można było wykazać, że stopień hydrolizy jest w dużej mierze uzależniony od stopnia delignifikacji masy celulozowej, a jednocześnie potwierdzono, że metody mechanicznego rozdrabniania są kosztowne i mało efektywne.

Oceniana rozprawa doktorska jest opracowaniem obszernym, zamieszczonym na 197 stronach, z klasycznym układem poszczególnych rozdziałów. Zwraca uwagę obszerny materiał faktograficzny, bardzo dobrze

dokumentujący przebieg szeregu prac eksperymentalnych, na który składają się 72 rysunki i 27 tabel. W pracy zacytowano 205 pozycji piśmiennictwa.

W przeglądzie piśmiennictwa Autorka przedstawiła takie zagadnienia jak; charakterystyka składu surowców ligninocelulozowych, struktura i budowa morfologiczna, charakterystyka wybranych materiałów ligninocelulozowych, enzymatyczna degradacja materiałów ligninocelulozowych oraz omówiła technologie stosowane do obróbki materiałów ligninocelulozowych. Przegląd piśmiennictwa zawarty na blisko 70 stronach jest dobrym wprowadzeniem czytelnika do problematyki badawczej rozprawy doktorskiej. W opinii Recenzenta treści zawarte w rozdziale 2.4 można było pominąć, gdyż zawierają informacje prezentowane w klasycznych podręcznikach z biochemii. Natomiast szkoda, że Doktorantka pominęła omówienie zależności pomiędzy wpływem powierzchni właściwej i rozkładu por w materiałach ligninocelulozowych i celulozowych na kinetykę enzymatycznej hydrolizy celulozy.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka scharakteryzowała użyte w pracy materiały oraz w przejrzysty sposób przedstawiła sposoby wykonania poszczególnych eksperymentów. Zwraca uwagę duża różnorodność zastosowanych technik analitycznych i umiejętny ich dobór. Niektóre z metod badawczych nie są dokładnie opisane, jak choćby oznaczenie aktywności FPA, w której nie podano, że rozcieńczenie preparatu enzymatycznego winno być takie by otrzymać 2 mg cukrów redukcjach w przeliczeniu na glukozę w wyniku 1 godzinnej enzymatycznej hydrolizy bibuły filtracyjnej Whatman 1. Dane te są istotne dla prawidłowego obliczenia aktywności celulaz. Jednak do zdecydowanej większości opisów metodyk badawczych nie można mieć zastrzeżeń. Wątpliwości budzi celowość opisu metodyk oznaczenia aktywności enzymów amylolytycznych czy inwertazy badanych preparatów enzymatycznych, których wyniki nie zostały zaprezentowane w części omawiającej wyniki badań. Ponadto, pewnym utrudnieniem w interpretacji wyników części badań jest określenie stopnia delignifikacji surowców drzewnych tylko liczbą kappa, a nie procentową zawartością ligniny, co przekłada się na brak składu chemicznego otrzymywanych mas celulozowych, w szczególności dotyczy to mas o niższym stopniu delignifikacji.

W rozdziale zatytułowanym „Wyniki i ich dyskusja” Autorka w sześciu podrozdziałach w sposób szczegółowy zaprezentowała wyniki badań, ich

omówienie i niektóre z nich zestawiała z wynikami innych badaczy. Układ i sekwencja następujących po sobie eksperymentów jest logiczna i dobrze przemyślana. Na wstępie Doktorantka oceniła przydatność kilku preparatów enzymatycznych do hydrolizy masy celulozowej i do dalszych badań wybrała preparat o symbolu NS-22086 firmy Novozymes A/S. Następnie ustaliła optymalne warunki hydrolizy masy celulozowej biorąc pod uwagę temperaturę, pH, stężenie preparatu enzymatycznego i substratu. W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę, że operowanie pojęciem „wpływ stężenia enzymu...” jest nieprawidłowe, ponieważ w stosowanym preparacie enzymatycznym jest wiele enzymów, w tym kilka celulaz. Ponadto Doktorantka nie oznaczała zawartości poszczególnych enzymów w preparacie enzymatycznym.

Otrzymane wyniki zawartości cukrów redukujących w mieszaninach reagujących poddano analizie statystycznej. W optymalnych warunkach procesu enzymatycznej hydrolizy uzyskano hydrolizaty, w których w najwyższym stężeniu stwierdzono obecność glukozy, a w dużo niższym celobiozy i ksylozy, zaś w niewielkim stężeniu mannozy. Taki skład hydrolizatu należy uznać za korzystny dla późniejszego wykorzystania w procesach biotechnologicznych.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka opisała wyniki badań wpływu stopnia rozdrobnienia drewna na jego podatność na enzymatyczną hydrolizę. Otrzymane dane potwierdziły wyniki innych badaczy którzy podkreślali, że rozdrabianie mechaniczne jest procesem bardzo energochłonnym, a jednocześnie nie powoduje poważnego zwiększenia wydajności enzymatycznej hydrolizy, a szczególnie celulozy. Ponadto Doktorantka wykazała, że drewno gatunków liściastych, za wyjątkiem dębu jest bardziej podatne na działanie badanego preparatu enzymatycznego niż drewno gatunków iglastych.

Kluczowe badania rozprawy doktorskiej dotyczyły enzymatycznej hydrolizy mas celulozowych otrzymanych metodą siarczanową. Na wstępie oceniono wydajność hydrolizy enzymatycznej mas celulozowych w zależności od stopnia ich lignifikacji, określonej liczbą kappa oraz powiązano ze stopniem ich krystaliczności. Wykazano, że wysokiej krystaliczności towarzyszyła niższa wydajność hydrolizy, a pozostała po hydrolizie celuloza wykazywała znacznie niższą krystaliczność niż na początku tego procesu. Badania nad termodynamiką zmian polimorfizmu masy celulozowej pod wpływem hydrolizy enzymatycznej należy uznać za istotną wartość naukową wnoszoną do wiedzy o enzymatycznej hydrolizie celulozy.

Wydajności hydrolizy mas otrzymanych z drewna liściastego były bliskie 100%, zaś z sosny były nieco niższe. Skład enzymatycznych hydrolizatów oznaczono metodą HPLC oraz potwierdzano metodą enzymatyczną. Dane te wskazują, że obróbka substratów ligninocelulozowych metodą siarczanową pozwala na uzyskanie wysokiego stopnia scukrzenia zawartej w masie celulozowej zarówno celulozy jak i pozostałości hemiceluloz. Stopień hydrolizy uzależniony był m.in. od stopnia delignifikacji masy celulozowej, co wykazano na przykładzie sosnowej masy celulozowej, a także w sposób mniej spektakularny, na przykładzie topolowej masy celulozowej.

Przedmiotem badań były także masy celulozowe otrzymane ze słomy zbożowej, choć nie podano z jakiego zboża, paździerza i włókna konopi, makulatury i nadmiarowej frakcji drobnej z układów technologicznych papierni. Zwraca uwagę wysoka wydajność hydrolizy mas celulozowych otrzymanych ze słomy oraz z frakcji drobnej z papierni.

W końcowym etapie pracy Doktorantka zaprezentowała wyniki badań otrzymane z enzymatycznej hydrolizy sosnowej mas celulozowych i topolowej masy celulozowej w tzw. skali ćwierćtechnicznej. Zwiększając stężenie masy celulozowej do 8% w stosunku do wcześniejszych badań ze stężeniem masy celulozowej wynoszącej 1,4%, uzyskano znacznie mniejsze wydajności enzymatycznej hydrolizy. Bielenie sosnowej masy celulozowej i dwustopniowa, trwająca po 96 godzin hydroliza enzymatyczna, pozwoliły uzyskać blisko 100 % scukrzenie masy celulozowej. Dane te wskazują na dość silne hamowanie enzymatycznej hydrolizy produktami końcowymi, w szczególności w obecności glukozy i celobiozy.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Wnioski”, Doktorantka dokonała na 4,5 stronach podsumowania najważniejszych efektów pracy doktorskiej, natomiast nie sformułowała wniosków. Pewnym mankamentem pracy jest także brak klasycznego rozdziału „Dyskusja wyników badań”. Okazjonalne nawiązywanie do prac innych badaczy przy omawianiu wyników badań własnych, nie zastąpi dyskusji dotyczącej w pierwszym rzędzie zaproponowanych metod obróbki surowców ligninocelulozowych, na tle bogatej literatury opisującej inne metody tejże obróbki.

W mojej opinii przedstawiona do recenzji praca jest interesującym, wartościowym studium dotyczącym wpływu rozdrobnienia i delignifikacji

surowców ligninocelulozowych ma dynamikę i stopień enzymatycznej hydrolizy zawartych w nich polisacharydów. Część wyników badań potwierdziła wcześniejsze doniesienia z tego zakresu, ale w pracy nie brak jest także elementów nowości o charakterze praktycznym, z pewnymi elementami wiedzy podstawowej. Na podkreślenie zasługuje dojrzałość badawcza Doktorantki, a w szczególności Jej dobre i wszechstronne przygotowanie warsztatowe. W pracy zamieszczono bogaty i dobrze opisany materiał faktograficzny, który został poprawnie opracowany statystycznie. Zwraca uwagę poprawność formułowania myśli, bardzo dobra stylistyka językowa oraz poprawna grafika pracy.

Biorąc pod uwagę wartość aplikacyjną pracy, zawarte w niej elementy nowości naukowej, szeroki zakres przeprowadzonych eksperymentów badawczych oraz dobre przygotowanie warsztatowe Doktoranta stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Kamili Buzwały w pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom na stopień naukowy doktora i wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony.



**Prof. dr hab. Zdzisław Targoński**