

prof. dr hab. inż. Kazimierz Przybysz

## Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Szadkowskiej

pt.: „**Badanie wydajności procesów enzymatycznej hydrolizy holocelulozy pozyskanej z drewna topoli (*Populus alba* L.)**”

praca realizowana pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Zawadzkiego w Instytucie Nauk Drzewnych i Meblarstwa Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Andrzej Radomski

### Podstawa oceny

Podstawą oceny jest zlecenie wykonania recenzji rozprawy doktorskiej skierowane przez dyrektora Instytutu Nauk Drzewnych i Meblarstwa Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie dr hab. inż. Pawła Kozakiewicza, prof. SGGW.

### Ogólna charakterystyka pracy

Przedstawiona do oceny praca doktorska napisana jest w klasycznym układzie i składa się ze streszczenia oraz 6 rozdziałów numerowanych o następujących tytułach:

1. Wstęp;
2. Przegląd literatury;
3. Cel i zakres badań;
4. Materiały i metody;
5. Wyniki i dyskusja;
6. Wnioski;

Manuskrypt pracy liczy 129 stron, 72 rysunki i 17 tabel. Literatura źródłowa zawiera 224 pozycji literaturowych oraz 10 aktów prawnych lub norm branżowych. W literaturze zawarto również 6 źródeł internetowych. Ponad 70 cytowanych pozycji literaturowych powstało po roku 2010, które można uznać za publikacje nowe.

## Ocena ogólna pracy

Zagadnienie wykorzystania etanolu jako paliwa silnikowego jest aktualne od początku motoryzacji, a więc od początku XX wieku. Paliwo to wytwarzane jest dotychczas głównie z roślin zawierających skrobie, które są wykorzystywane do produkcji żywności. Wobec deficytu żywnościowego powstało wiele międzynarodowych uregulowań prawnych ograniczających zużycie etanolu pochodzącego z roślin skrobiowych do celów motoryzacyjnych. Z tego względu uwaga uczonych została skierowana na wykorzystanie ogromnego potencjału roślin zawierających celulozę m.in. drewno, słomę do produkcji etanolu. Materiały te są określane ogólnie mianem materiałów lignocelulozowych. Ze względu na obecność w składzie chemicznym tych materiałów ligniny, substancji ekstrakcyjnych oraz ich zwartą strukturę stanowią one w stosunku do roślin skrobiowych znacznie mniej efektywny surowiec.

Tematyka zwiększenia efektywności biokonwersji kompleksu lignocelulozowego jest tematyką, która wpisuje się w główny nurt badań na styku chemii, biotechnologii i technologii drewna. Tematyka ta stanowi dobry punkt wyjściowy do badań realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Bezpośrednia hydroliza enzymatyczna drewna jest mało efektywna ze względu na zwartą strukturę tego surowca, osłonowy wpływ ligniny oraz toksyczne działanie substancji ekstrakcyjnych na stosowane preparaty enzymatyczne. Stąd proces biokonwersji drewna do bioetanolu prowadzi się wielostopniowo. W klasycznym układzie, jak wskazuje Autorka (s.18) proces ten składa się z następujących etapów:

- ✓ przygotowanie surowca drzewnego tzw. pretreatmentu polegającego na rozdrobnieniu surowca i usunięcia z niego ligniny i substancji ekstrakcyjnych,
- ✓ hydrolizy enzymatycznej pozostałych w surowcu celulozy i hemiceluloz do mono i oligosacharydów oraz
- ✓ fermentacji alkoholowej wydzielonych cukrów fermentujących wraz z oddestylowaniem wytworzonego bioetanolu.

Zgodnie z tytułem pracy Autorka powinna się skupić głównie na pierwszych dwu zagadnieniach decydujących o wydajności całego procesu. Należy bowiem zwrócić uwagę, że przedmiotem badań niniejszej pracy doktorskiej jest czysta holoceluloza – czyli drewno pozbawione ligniny i substancji ekstrakcyjnych, które są głównym źródłem inhibitorów hydrolizy enzymatycznej. Natomiast Autorka, wbrew tytułowi pracy,



zaniedbując moim zdaniem, zagadnienia hydrolizy enzymatycznej holocelulozy poświęciła prawie połowę rozdz. 5 wydzielonym już z drewna i nieobecnym w holocelulozie substancjom ekstrakcyjnym jako inhibitorom hydrolizy enzymatycznej oraz innym inhibitorom nie związanym z hydrolizą holocelulozy.

W celu zwiększenia efektywności procesu hydrolizy, w ramach pretreatmentu podejmowane są różne operacje o charakterze fizycznym, chemicznym, biochemicznym przygotowujące surowiec drzewny do przerobu. Jedną z takich metod jest wstępny przerób surowca drzewnego na holocelulozę lub masę celulozową (głównie metodą siarczanową). Dzięki tym operacjom uzyskuje się;

- ✓ rozwłóknienie drewna – rozwinięcie potencjalnej powierzchni właściwej kontaktu surowca z enzymem,
- ✓ usunięcie ligniny osłaniającej holocelulozę przed dostępem enzymu,
- ✓ usunięcie substancji ekstrakcyjnych wykazujących toksyczne działanie na stosowane preparaty enzymatyczne.

Należy zaznaczyć, że przerób drewna na masy celulozowe metodą siarczanową, którą można uznać za klasyczną metodę pretreatmentu, umożliwia wydzielenie ligniny przy ograniczonym uszkodzeniu holocelulozy, ponadto wydzielenie ligniny jest spalane zapewniając w nadmiarze potrzeby energetyczne całego procesu. Odzyskane w wyniku spalania substancje chemiczne stosowane do roztwarzania drewna są w cyklu produkcyjnym regenerowane i ponownie zwracane do procesu. Również substancje ekstrakcyjne zawarte w drewnie są w procesie siarczanowym wydzielane w postaci oleju talowego stanowiącego cenny surowiec dla przemysłu chemicznego. Metoda ta została wynaleziona w roku 1879 i w wyniku ciągłego doskonalenia zaliczana jest do procesów tzw. zielonej chemii. Obecnie metodą tą wytwarza się rocznie w skali światowej ok. 200 mln ton mas celulozowych (w Polsce 1,1 mln ton).

### **Przegląd literatury**

Zgodnie ze stwierdzeniem zawartym w ogólnej charakterystyce pracy, literatura źródłowa zawiera 224 pozycje literaturowe oraz 10 aktów prawnych lub norm branżowych. W literaturze zawarto również 6 źródeł internetowych. Ponad 70 cytowanych pozycji literaturowych powstało po roku 2010, które można uznać za publikacje nowe.

Przegląd literatury rozpoczyna się od opisu uwarunkowań prawnych, które są zarówno na poziomie krajowym jak również UE. Ta część pracy wykonana jest



starannie i przedstawione dokumenty są jak najbardziej w zakresie omawianego tematu. Następnie Autorka przedstawia źródła literaturowe w zakresie informacji odnośnie biomasy, bioetanolu oraz surowców lignocelulozowych. Ponadto Doktorantka przedstawia krótko informacje o podstawowych składnikach drewna.

Pomimo, że Autorka zacytowała 224 pozycje literaturowe (nie zawsze związane bezpośrednio z tematyką realizowanej pracy doktorskiej), pominęła jednak niewygodne dla niej ważne pozycje literaturowe dotyczące bezpośrednio przerobu drewna topolowego na bioetanol. Chodzi mianowicie o prace realizowane w ramach tego samego grantu PBS1/A8/16 co niniejsza praca doktorska i dotyczące najprawdopodobniej tego samego surowca topolowego. O znaczeniu tych publikacji świadczy fakt, że zostały one opublikowane w 3 artykułach zamieszczonych w prestiżowym czasopiśmie naukowym „Cellulose” (IF 3,417) oraz „Industrial Crops and Products” (IF 4,191). Taki selektywny dobór literatury naukowej jest nieetyczny i podważa zaufanie do rzetelności realizowanej pracy doktorskiej.

#### **Cel i zakres pracy**

Podstawowym „celem pracy było zbadanie procesu hydrolizy enzymatycznej holocelulozy wydzielonej z drewna topoli białej (*Populus alba* L.), a w szczególności ustalenie warunków korzystnych z punktu widzenia szybkości i wydajności reakcji z użyciem wybranych kompleksów enzymatycznych”. Ponadto „celem pracy było oszacowanie działania substancji jako potencjalnych inhibitorów hydrolizy enzymatycznej”.

#### **Materiały i metody**

Informacje odnośnie zastosowanych materiałów i metod w szczególności w kontekście uzyskania wiarygodnych wyników hydrolizy enzymatycznej budzą w pracy największe zastrzeżenia.

Na stronie 41 Autorka przytacza, jedynie informacje z karty katalogowej preparatów enzymatycznych, które stosuje w swoich badaniach. Największym mankamentem pracy, po części podważającym jej znaczenie naukowe, jest brak oznaczenia aktywności enzymów. Autorska opiera się w swojej pracy tylko i wyłącznie na danych producenta. W pracy nie jest wspomniane również jak przygotowywany był enzym. Stosowane enzymy dostarczone były w postaci proszków i od sposobu ich przygotowania w dużym stopniu zależy uzyskiwana aktywność preparatu w postaci ciekłej. Wskazane aktywności przez producenta są bardzo wysokie (115÷140 kU/g dla CP CONC i 90÷110 kU/g dla 2XP CONC). Z punktu widzenia rzetelności naukowej



konieczne byłoby zweryfikowanie tych wartości. Sprawdzenie aktywności enzymów chociażby standardowo na CMC w celu określenia aktywności celulolitycznej oraz na ksylanie brzoźowym w celu określenia aktywności ksylanolitycznej jest absolutnym minimum. Oczywiście zweryfikowanie aktywności pobocznych byłoby bardzo korzystne, chociażby z uwagi na fakt, że producent deklaruje takowe na karcie charakterystyki.

Kolejną kwestią są zastosowane dawki preparatu enzymatycznego. Sugerowane dawki według producenta to dodatek od 10 do 100 g enzymu na tonę, czyli jest to od 0,001 do 0,01%. Natomiast Doktoranta stosuje dawki średnio kilkusetkrotnie większe czyli ok. 2% w stosunku do bezwzględnie suchej masy holocelulozy (średnio 0,03g enzymu na ok 1,7g holocelulozy).

Kolejną zupełnie przemilczaną przez Autorkę informacją jest sam fakt, że stosowane enzymy według danych producenta nie są dedykowane do całkowitego scukrzania celulozy. W pracy nie ma niestety odpowiedzi na pytania dlaczego pomimo innego przeznaczenia wskazanego przez producenta, Autorka zdecydowała się zastosować właśnie takie enzymy.

Podsumowując tę część można stwierdzić, że użyto preparatów enzymatycznych, dla których nie jest znana realna aktywność, zastosowano ich dawki co najmniej dziesiątki albo i setki razy większe niż sugerował producent bez wyjaśnienia powodów takiej decyzji, a być może wynikało to z faktu, że te preparaty enzymatyczne w ogóle nie nadają się do całkowitego scukrzania holocelulozy. Odnieść można wrażenie, że enzym został potraktowany jak zwykły odczynnik chemiczny typu sól. Założono, że wystarczy go rozpuścić w wodzie i zawsze będzie tak samo działał. Jednakże takie podejście jest zupełnie błędne.

W zakresie metod chromatograficznych i sposobu przygotowania drewna oraz oznaczenia jego składu opis materiałów i metod jest wystarczający. W zakresie metod chromatograficznych Autorka przedstawia bardzo szczegółowe opisy, co pokazuje, że te techniki są w obszarze jej zainteresowań.

### **Wyniki i dyskusja**

W rozdz. 5.1. (s.54) „Zawartość substancji strukturalnych i ekstrakcyjnych w drewnie topoli białej (*Populus alba* L.)” zbadano, że zawartość holocelulozy (celulozy i hemiceluloz) w tym surowcu drzewnym wynosi ponad 75%. Jest to istotna różnica między powyższym wskaźnikiem a wydajnością masy celulozowej z tego samego surowca drzewnego uzyskana klasyczną metodą siarczanową, która wynosi zaledwie



ok. 50%. Powyższe porównanie, wskazuje na duże straty holocelulozy w procesie siarczanowym i wyznacza potencjalne możliwości usprawnienia pretreatmentu tego surowca przed hydrolizą enzymatyczną. Uważam, że wyjaśnienie różnic między zawartością holocelulozy w drewnie topolowym a wydajnością masy celulozowej siarczanowej topolowej stanowiłoby doniosłe osiągnięcie niniejszej pracy doktorskiej.

Niestety zaniechano tego zadania pomimo, że badania nad obydwoima metodami pretreatmentu (metodą siarczanową i traktowaniem chloranem sodu w celu otrzymania holocelulozy) wykonywano w ramach tego samego grantu naukowego i Autorka zapewne dysponowała próbkami masy celulozowej otrzymanej z drewna topolowego.

Również w pominiętych tendencyjnie pozycjach literaturowych zawartych w artykułach opublikowanych w czasopiśmie „*Cellulose*” oraz „*Industrial Crops and Products*” zawarto dane dotyczące wydajności procesu wytwarzania masy z badanego drewna topolowego metodą siarczanową (52,3+56,0%), wydajności hydrolizy enzymatycznej w zakresie glukozy i cukrów redukujących (odpowiednio 80,6 i 100%) profilu otrzymanych cukrów oraz wydajności bioetanolu z jednostki wagowej drewna (120g/kg).

Dlaczego nie wykonano (lub nie opublikowano) analogicznych badań porównawczych z holocelulozą badaną w niniejszej pracy doktorskiej?

Z wyników powyższych badań można by wyciągnąć interesujące wnioski. Można bowiem przewidywać, że w przypadku drewna topolowego niższa ewentualnie wydajność masy celulozowej w stosunku do holocelulozy wynika z usuwania pentozanów, które nie podlegają fermentacji. Wyniki te mogłyby stanowić więc podstawę do optymalizacji procesu siarczanowego drewna topolowego pod kątem hydrolizy enzymatycznej tego surowca (np. zmniejszenia zawartości alkaliów czynnych, zmniejszenie temperatury roztwarzania itp.).

Można wnioskować zatem, że zgodnie z fałszywą zasadą, że jeżeli fakty są niezgodne z oczekiwaniami tym gorzej dla faktów, Autorka pominęła wspomniane pozycje literaturowe, pomimo, że posiadają afiliację dotyczącą tego samego grantu naukowego co przedstawiona praca doktorska.

Ponadto chciałbym zwrócić Autorce pracy, bardzo biegłej w aktach normatywnych UE, uwagę że stosowanie związków chloru w wytwarzaniu proponowanej przez nią metodą holocelulozy jest od dawna ograniczane przez obowiązujące przepisy oraz nie spełnia wymagań certyfikatów TCF (Total Chlorine



Free). Proponowana przeto przez Autorkę metoda otrzymywania holocelulozy nie jest z punktu widzenia technicznego ani legislacyjnego możliwa do przeskalowania i stanowić może jedynie materiał do abstrakcyjnych rozważań.

W rozdz. 5.3. (s. 82) „*Wyniki analizy składu produktów hydrolizy enzymatycznej metodą chromatografii cieczowej (HPLC)*”. W rozdziale tym dotyczącym optymalizacji warunków hydrolizy enzymatycznej Autorka zbadała wpływ temperatury, odczynu pH dla dwóch badanych preparatów enzymatycznych.

Ogólnie wiadomo, że proces hydrolizy enzymatycznej, podobnie jak wielu innych procesów biochemicznych, niezależnie od warunków tych procesów, wykazują określony charakter przebiegu. W odniesieniu do hydrolizy enzymatycznej polisacharydów proces ten na początku przebiega z największą szybkością, następnie w miarę wyczerpywania się substratów lub nasilania się inhibującego oddziaływania produktów reakcji, szybkość procesu stopniowo maleje dążąc do ustalenia się stanu równowagi. Kinetykę tego procesu można więc opisać konkretnym równaniem.

Rozpatrując wykresy (rysunki 52+65) dotyczące powyższych parametrów Autorka zapomina, że bada różne przebiegi tego samego procesu. W badaniu wpływu temperatury i odczynu pH wykazuje pełną bezradność, stosując trzy punkty pomiarowe, nie stara się nawet odwzorować standardowego przebiegu kinetyki procesu lecz przyjmuje ostatni punkt jako pewnik. Generuje to trudne do oszacowania błędy pomiarowe i powoduje niekiedy, że wbrew ogólnej zasadzie proces hydrolizy enzymatycznej przyspiesza w końcowej fazie dążąc do wydajności powyżej 100%.

Ani w opisie metodyki ani w opisie wyników nie ma wskazanego procesu trwałej dezaktywacji enzymu (denaturacja białka) przed wykonaniem analiz chromatograficznych. Zatem istnieje pewne ryzyko, że część wyników, wyszła wyższa z uwagi na fakt, że enzym pozostał aktywny po zakończeniu procesu hydrolizy. Niestety ponownie o tym aspekcie przygotowania próbki, który wpływa na rzetelność wyników, nie ma informacji w pracy.

W celu wypełnienia luki dotyczącej bezpośrednio badania hydrolizy enzymatycznej drewna topolowego, Autorka podjęła szerokie badania dotyczące nieistniejących w otrzymanej holocelulozie substancji ekstrakcyjnych. Przedstawione one są w podrozdziale 5.4. Autorka stosuje jako inhibitory wanilinę, furfural, kationy żelaza i manganu oraz ekstrakt z obróbki wysokotemperaturowej. Zasadność tego rozdziału jest wątpliwa. Skoro Autorka przeprowadza obróbkę wstępną, w której chce uzyskać holocelulozę, czyli usunąć ligninę i substancje ekstrakcyjne, to jaki jest powód



dodawania tych substancji później? Ponadto jaki jest powód dodawania ekstraktów z zupełnie innej metody jaką jest obróbka gorącą wodą, bądź ekstraktu chloroform-etanol? Jeżeli Doktorantka miała na celu zbadanie wpływu tych substancji na enzym, to wykonać to można poprzez dodatek takich substancji podczas określania aktywności preparatów enzymatycznych na modelowych substratach takich jak CMC i ksylan brzozy.

### **Podsumowanie**

Podsumowując praca nie wnosi nowości w zakresie badań podstawowych ani tym bardziej stosowanych. Oczywiście nie kwestionuję wolności w zakresie wyboru tematyki badawczej, natomiast oczekuje się od pracy jasnego wskazania, w jakim aspekcie obecna wiedza uległa poszerzeniu lub uzupełnieniu.

Głównymi wadami pracy są:

- pominięcie w przeglądzie literatury ważnych osiągnięć w zakresie hydrolizy enzymatycznej drewna topolowego,
- brak określenia aktywności stosowanych preparatów enzymatycznych,
- dobór preparatów enzymatycznych, które nie są dedykowane do tego zastosowania,
- zastosowanie dawek kilkadziesiąt albo i nawet kilkaset razy większych niż sugerowane przez producenta,
- brak wskazania sposobu dezaktywacji enzymu,
- wykonanie krzywych kinetyk hydrolizy bez modelu w oparciu o trzy punkty doświadczalne,
- brak oceny błędów oraz brak informacji o krotności powtórzeń dla kinetyk hydrolizy.

Elementy, które obniżają wartość pracy są bardzo istotne, natomiast nie leżą wyłącznie po stronie Autorki. Przekazanie do realizacji Doktorantce tematu, którym w dużym stopniu obejmuje biotechnologię, bez najprawdopodobniej zapewnienia odpowiedniego zaplecza metodycznego i technicznego można uznać za źródło większości wad tej pracy. W wyniku dokonanej oceny, która jest jednoznacznie negatywna z punktu widzenia merytorycznego, wnoszę jednakże o dopuszczenie pracy do obrony zgodnie z przepisami (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668, z późn. zm.) tak by umożliwić Doktorantce ustosunkowanie się do tych uwag na forum Rady. Zgodnie bowiem z obowiązującymi przepisami to Rada Dyscypliny podejmuje końcową decyzję i może praktycznie każdą pracę uznać za pracę doktorską.