



## RECENZJA

rozprawy doktorskiej p. mgr Karoliny Oszust pt.  
„Opracowanie biopreparatu enzymatycznego do optymalizacji procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych oraz określenie zmian struktury metanogenów w biomacie fermentacyjnej”  
wykonanej w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego  
Polskiej Akademii Nauk w Lublinie  
pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Frąc, prof. IA PAN

---

### 1. Ocena problematyki rozprawy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Oszust wpisuje się w bardzo ważny obecnie nurt badań nad nowymi źródłami energii, których celem jest poszukiwanie nowych, tanich i efektywnych odnawialnych źródeł energii w tym wykorzystanie odpadów ligninocelulozowych oraz procesów mikrobiologicznych do ich przetwarzania. Należy zaznaczyć, że biologiczny aspekt przetwarzania biomasy celulozowej jest przedmiotem badań w wielu laboratoriach na całym świecie.

Oceniana rozprawa doktorska jest zwięzłym maszynopisem, bo liczącym 152 stron tekstu, jest napisana w tradycyjnym układzie, obejmującym obszerny 20-stronicowy przegląd literatury, nazwany wprowadzeniem, poprzedzony spisem treści oraz 4 stronicowym streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim. We wstępie Autorka zamieściła 3 kolorowe rysunki i jedną tabelę, a na jego końcu przedstawiła cele i hipotezy badawcze swoich badań. Z kolei omówieniu materiału biologicznego i metodom użytych w badaniach jest poświęcony 30 stronicowy rozdział – materiał i metody, a kolejną bardzo obszerną część tekstu, bo liczącą 67 stron to interesujące wyniki badań i ich omówienie, które zilustrowano 23 kolorowymi rysunkami i 16 tabelami, co stanowi bardzo obszerną i wyjątkowo dobrze przedstawioną dokumentację pracy. Końcowy rozdział to piśmiennictwo liczące 138 cytowania oraz kilka stron internetowych, w większości są to oryginalne prace z ostatniego dziesięciolecia łącznie z kilkunastoma najnowszymi artykułami, opublikowanymi w 2016 roku, które wykorzystano we wstępie pracy, celem wprowadzenia czytelnika w omawiany problem. Tekst rozprawy jest napisany dobrą polszczyzną błędy literowe i stylistyczne w kontekście rozmiaru pracy są nieliczne i na tyle nieistotne, że nie będą



ich cytować. Układ tekstu jest przejrzysty, kolejność rozdziałów logiczną, a jakość dokumentacji wysoką.

Jednymi z najważniejszych problemów współczesnej cywilizacji są zagadnienia dotyczące wyżywienia wzdostającej liczby ludności, dostępu do źródeł wody i energii oraz zachowanie naturalnego środowiska w stanie nie gorszym niż go zastaliśmy. Stąd świadomość naszych związków ze środowiskiem, w którym żyjemy, zaczyna dominować w większości podejmowanych przez człowieka działań związanych z eksploatacją zasobów przyrody i wymusza działalność pro-ekologiczną. Do ludzi dociera świadomość, że podejmując niekiedy proste działania, można nie niszcząc podstawowych elementów środowiska wyeliminować szkodliwe czynniki z naszego otoczenia, a prowadząc odpowiedni styl życia zachować zdrowie na długie lata.

Nasze bogactwa naturalne i zasoby środowiska mocno nadwerężone w przeszłości, bez wątplenia nie wytrzymają dalszych obciążeń. Eksperci już dziś ostrzegają, szczególnie w krajach rozwijających się, a także i w Polsce, że wzdostająca liczba ludności pociągnie za sobą wzrost zanieczyszczenia środowiska. Wydaje się, że nowoczesne procesy biotechnologiczne wykorzystujące najnowsze zdobycze wiedzy z zakresu ekologii, biologii molekularnej, genetyki, inżynierii genetycznej i mikrobiologii mogą sprostać stojącym przed ludzkością zadaniom i przyczynić się do zmniejszenia zanieczyszczenia środowiska oraz zapewnić dostateczną ilość żywności i energii. Nic, więc dziwnego, że temat pracy doktorskiej p. mgr Karoliny Oszust związany jest z aktywnością i właściwościami biochemicznymi bakterii metylotroficznych, które zamierza wykorzystywać do produkcji biopreparatu enzymatycznego, który dodany do biomasy fermentacyjnej zwiększałby produkcję biogazu. Należy zaznaczyć, że w chwili obecnej nie ma na świecie ani jednej efektywnej oraz opłacalnej technologii, która pozwalałaby na konwersję surowej biomasy roślinnej do biogazu czy etanolu. Cała uwaga Doktorantki skupia się na takiej „idea fix”, jakim byłby taki dobór bakterii metylotroficznych, aby można je było wykorzystać w procesie SSF – (Simultaneous Saccharification and Fermentation) tj. jednoczesnego scukrzania i fermentacji.

Należy zaznaczyć, że na całym świecie poszukuje się skutecznych i szybkich metod pozwalających na konwersję materiału ligninocelulozowego do cukrów prostych, a następnie wykorzystać je do produkcji metanu czy alkoholi. Jak na razie wydaje się, że wykorzystanie metod biotechnologicznych z zastosowaniem mikroorganizmów w tym bakterii i drożdży są jednymi z najefektywniejszych sposobów, które mogą już w niedalekiej przyszłości rozwiązać ten ważny problem. Oczywiście proces biodegradacji ligninocelulozy przez drobno-ustroje jest wieloetapowy i uwarunkowany wieloma czynnikami, których jeszcze dokładnie nie znamy. Te skomplikowane warunki przebiegu biokonwersji wskazują jak trudnym jest to proces i ile jeszcze trzeba szczegółowych badań, aby otrzymywać w tani sposób biopaliwa tzw. drugiej generacji



Dlatego jestem pełen uznania za trud podjęcia badań zmierzających do wyjaśnienia biochemicznych zależności między bakteriami metylotroficznymi, a stworzonymi w warunkach laboratoryjnych czynnikami środowiskowymi wpływającymi na proces biokonwersji. Głównym celem pracy było uzyskanie nowego wydajniejszego biopreparatu enzymatycznego zdolnego do zwiększonej produkcji metanu. Podjęcie powyższych badań uważam za słuszne i celowe, a wykonanie ich na konkretnych szczepach bakteryjnych i przeprowadzenie doświadczeń w warunkach laboratoryjnych, gdzie stworzono i kontrolowano wiele naturalnych zależności i interakcji za bardzo cenne osiągnięcie Doktorantki.

## 2. Ocena pracy pod względem metodycznym

Przystępując do oceny recenzowanej pracy, jako rozprawy doktorskiej pragnę zaznaczyć, że zebrane wyniki dotyczą ogromnego zakresu badań wykonanych w warunkach laboratoryjnych. Powyższe badania stanowią cenne osiągnięcie naukowe z zakresu biologii molekularnej, mikrobiologii i inżynierii metabolicznej, wyjaśniające wiele problemów związanych z procesami biochemicznymi bakterii metylotroficznych. Zastosowane metody badawcze oparte są na powszechnie stosowanych metodach mikrobiologicznych, fizycznych i chemicznych, są właściwie dobrane oraz zastosowane, pozwalające na udowodnienie postawionego celu. Praca wykonana jest poprawnie pod względem metodycznym. Na szczególne podkreślenie zasługują badania nad poszukiwaniem aktywnych szczepów bakterii metylotroficznych czynnych w rozkładzie ligninocelulozy oraz badania nad uzdolnieniami wyizolowanych bakterii do przeprowadzania procesu fermentacji celem uzyskania metanu. Powyższe badania Doktorantka przeprowadziła wyjątkowo starannie, w licznych powtórzeniach, co zaowocowało wieloma bardzo interesującymi wynikami, które być może znajdą praktyczne zastosowanie w procesach biotechnologicznych związanych z wykorzystaniem biomasy roślinnej celem otrzymywania cennego metanu.

Należy podkreślić bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do badań mikrobiologicznych, genetycznych, molekularnych, a także chemicznych i analitycznych. Opis użytych technik jest prawidłowy i nie budzi żadnych wątpliwości natury merytorycznej czy naukowej. Autorka bardzo dokładnie opisała użyte odczynniki, pożywki, szczepy bakteryjne, metody izolacji i hodowli bakterii, metody analiz biochemicznych, chromatograficznych i genetycznych, a także zastosowane testy mikrobiologiczne, podając ich źródło pochodzenia oraz odnośną literaturę. Ważną i pracochłonną częścią rozprawy doktorskiej wymagającej specjalistycznej wiedzy były badania nad otrzymanym biopreparatem „METAFERM”, który został scharakteryzowany pod wieloma względami głównie w zakresie uzdolnień enzymatycznych i biochemicznych. Na szczególną uwagę zasługują również metody molekularne związane z monitoringiem struktury zbiorowisk mikroorganizmów metanogennych.



### 3. Ocena pracy pod względem merytorycznym

Z obowiązku recenzenta powinienem wskazać jakieś nieścisłości, niekompletne tezy, czy też inne niejasności w ocenianej rozprawie doktorskiej, jednak nie znajduję fragmentów, które wymagałyby dodatkowych wyjaśnień.

Oceniana praca doktorska zawiera bardzo dobrze opracowaną część wstępną-przeglądową, w której autorka opisuje dotychczasowy dorobek naukowy w tej dziedzinie, dając wyraz swej doskonałej orientacji w najnowszych osiągnięciach badawczych nad rolą i znaczeniem drobnoustrojów w tym niektórych gatunków bakterii i grzybów w produkcji różnych związków, które można by wykorzystać, jako biopaliwa.

Głównym celem wykonanej pracy doktorskiej były badania mikrobiologiczne, zmierzające do wyizolowania nowych efektywnych szczepów bakterii metanogennych, które byłyby zdolne do biokonwersji biomasy ligninocelulozowej zawierającej duże ilości celulozy do metanu. Zamierzony cel osiągnięto poprzez izolację nowych szczepów bakterii metylogennych i posiadanego szczepu grzyba *Trichoderma atroviride* oraz wykorzystując do tego celu wiele metod biochemicznych pozwalających analizować aktywność badanych drobnoustrojów w zakresie ważnych cechy metabolicznych.

W wyniku przeprowadzonych badań mikrobiologicznych, genetycznych i biochemicznych Doktorantka uzyskała wyniki, które pozwoliły Jej na szczegółową charakterystykę otrzymanego biopreparatu nazwanego „metaferm” zwiększającego wydajność procesu fermentacji metanowej odpadów organicznych.

Szczególnie interesujące są wyniki dotyczące m.in.:

1. Mikrobiologicznych badań skryningowych wybranych odpadów organicznych, w tym badania uzdolnień hydrolitycznych szczepów mikroorganizmów
2. Szczegółowa charakterystyka genetyczna i fenotypowa szczepu produkcyjnego charakteryzującego się wysoką aktywnością celulozową.
3. Charakterystyki biopreparatu *metaferm* w tym jego termostabilności, pH-stabilności, aktywności enzymów towarzyszących.
4. Charakterystyki i badań nad optymalizacją działania preparatu *metafarm*, w różnych warunkach środowiskowych.

Przeprowadzone badania są bardzo ważne pod względem naukowym i nie budzą żadnych zastrzeżeń natury merytorycznej. Jako oryginalne i bardzo ciekawe wnoszą one nowe elementy poznawcze do fizjologii, biochemii i genetyki bakterii metanogennych i ich aktywności w procesie fermentacji materiału lignocelulozowego. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że czynniki środowis-

kowe mają istotny wpływ na proces biokonwersji celulozy przeprowadzane przez bakterie i grzyby, przebiegający w warunkach laboratoryjnych.

W oparciu o uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań autorka wyciągnęła wnioski, które sprecyzowane są bardzo rzeczowo i konkretnie. Do najważniejszych wniosków Doktorantki należy zaliczyć te, w których stwierdza, że najważniejszymi czynnikami decydującymi o produkcji metanu z odpadów organicznych są czynniki środowiskowe, w tym: odczyn, temperatura, skład podłoża, zawartości celulozy, czas hodowli i wiele innych w których wykazała, że:

1. W wyniku przeprowadzonych badań opracowano sposób otrzymywania biopreparatu enzymatycznego o nazwie *metafarm* do optymalizacji procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych (odpady z przetwórstwa owoców (25%), osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich (25%), kiszonka kukurydziana (12%), wywar zbożowy (38%)).
2. Wybór odpowiedniego szczepu mikroorganizmu (*Trichoderma atroviride* G79\_11) oraz dobór składników podłoża produkcyjnego, a także optymalizacja warunków prowadzenie hodowli pozwoliły uzyskać, w skali laboratoryjnej, wysoką produkcję celulaz i innych enzymów hydrolitycznych.
3. Zastosowanie zoptymalizowanych warunków hodowli (pH 4,5, temperatura 22°C, naświetlanie inokulum światłem białym) miało istotny wpływ na zwiększenie produkcji enzymów celulolitycznych.
4. Opracowane podłoże, zawierające celulozę mikrokryształiczną (5 g dm<sup>-3</sup>), laktozę (10 g dm<sup>-3</sup>), azotan amonu (5 g dm<sup>-3</sup>) i mąkę sojową (20 g dm<sup>-3</sup>) może być wykorzystywane jako alternatywne, niskonakładowe podłoże do produkcji biopreparatów enzymatycznych.
5. Bogaty wachlarz specyficzności substratowej białek enzymatycznych, wchodzących w skład opracowanego biopreparatu (celulazy, ksylanazy, β-glukozydaza, karboksymetylocelulaza, pektynoesteraza, poligalakturunaza, amylaza, proteaza), stanowi o jego konkurencyjności w stosunku do dostępnych na rynku biopreparatów enzymatycznych.
6. Wyniki efektywności przeprowadzonego procesu hydrolizy wskazują, że biopreparat *metafarm* charakteryzuje się wysokim potencjałem do degradacji mieszanki odpadów organicznych, zawierających celulozę, arabinoksylan i inne polisacharydy niecelulozowe.
7. Zastosowanie biopreparatu do hydrolizy biomasy mieszanki odpadów organicznych miało znaczący wpływ na wzrost wydajności produkcji biogazu, powodując zwiększenie biogazodochodowości w zakresie od 4% do 30% w zależności od typu, dawki oraz sposobu aplikacji biopreparatu.
8. Wprowadzenie biopreparatu *metafarm* do mieszanki odpadów organicznych powodowało ilościowe zmiany w strukturze zespołu metanogenów zasiedlających masę pofermentacyjną. Zmiany te prowadziły do zwiększenia uzysku biogazu.
9. Na podstawie monitoringu zmian struktury metanogenów i uzysku biogazu w trakcie prowadzenia fermentacji metanowej stwierdzono, że proces przebiegał bez zaburzeń z dominacją metanogenów z rodzaju: *Methanobacterium* i *Methanosaeta*.

Z obowiązku recenzenta powyższej rozprawy doktorskiej, zgłaszam następujące uwagi oraz proszę o dokładniejszą informację w sprawie:



1. Co Pani rozumie pod pojęciem – „Alternatywne źródła energii”?
2. Proszę omówić proces SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation).
3. Proszę omówić etapy powstawania metanu w czasie beztlenowego przetwarzania materii organicznej.
4. Proszę wyjaśnić, co to są paliwa pierwszej, drugiej i trzeciej generacji?
5. Jakie są zasoby metanu na świecie?
6. Proszę omówić główne zalety: inżynierii genetycznej, inżynierii metabolicznej i inżynierii ewolucyjnej oraz jak je należy stosować?
7. Jakie bakterie oprócz metanogenów należą do domeny *Archae*?
8. Jakie parametry hodowlane są wg Pani najlepsze do pozyskania dużej ilości enzymów celulolitycznych zarówno z hodowli bakterii jak i grzybów?

Moje uwagi - nie mają charakteru krytycznego i oczywiście nie wpływają w najmniejszym stopniu na wartość naukową pracy, a są jedynie pytaniami i uwagami w dyskusji oraz powinny służyć lepszemu przygotowaniu pracy do druku.

#### 4. Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Praca napisana jest bardzo obszernie, ale dokładnie, precyzyjnie i treściwie, stąd przedstawioną rozprawę p. mgr Karoliny Oszust oceniam bardzo wysoko. Uzyskane w Jej pracy wyniki wzbogacają naszą wiedzę z zakresu mikrobiologii i biochemii procesów fermentacyjnych przeprowadzane przez drobnoustroje wykorzystywanych do produkcji metanu. Gromadzenie tego rodzaju faktów jest szczególnie cenne w obecnym czasie, kiedy obserwujemy gwałtowne zapotrzebowanie na nowe źródła energii. Należy podkreślić, że praca wykonana jest poprawnie pod względem formalnym, stylistycznym i językowym oraz nie budzi zastrzeżeń natury naukowej. Na uwagę zasługuje poprawny styl i język polski. Na specjalną pochwałę zasługuje sama redakcja pracy, którą wykonano bardzo estetycznie i wyjątkowo starannie, co dodatkowo świadczy o wszechstronnych uzdolnieniach Doktorantki.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma dużą wartość poznawczą i stanowi podwaliny do wykorzystania aplikacyjnego. Doktorantka zrealizowała szeroko zakrojony program badawczy, który pozwolił na opracowanie i dokładne scharakteryzowanie nowego biopreparatu zwiększającego aktywność procesu fermentacji metanowej.

#### 5. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższe dane dotyczące oceny formalnej, metodycznej i merytorycznej pracy doktorskiej pani mgr Karoliny Oszust, pt.:

„Opracowanie biopreparatu enzymatycznego do optymalizacji procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych oraz określenie zmian struktury metanogenów w biomacie fermentacyjnej”

stwierdzam, że powyższa rozprawa stanowi niewątpliwie oryginalne i cenne osiągnięcie naukowe doktorantki w zakresie mikrobiologii, metagenomiki i biotechnologii. Wykazała w prezentowanej pracy umiejętność organizacji i samodzielnej realizacji badań. Duża znajomość literatury przedmiotu, opanowanie techniki badawczej z zakresu mikrobiologii i analityki - wskazują na dobre przygotowanie doktorantki do pracy naukowej. Powyższa praca powinna być opublikowana.

W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska pod w/w tytułem wykonana przez p. mgr Karolinę Oszust z Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie, pod kierunkiem **p. dr hab. Magdaleny Frąc** **w pełni odpowiada wymogom i kryteriom stawianym rozprawom doktorskim. W związku z powyższym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN o dopuszczenie mgr Karoliny Oszust do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na znaczenie naukowe tematu, duży wkład pracy własnej w badaniach, nowatorski charakter opracowania oraz sposób przedstawienia wyników, ich opracowanie i omówienie stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej p. mgr Karoliny Oszust - stosowną nagrodą (Nagroda Dyrektora lub Nagroda Ministra).

Prof. zw. dr hab. Wiesław BARABASZ  
Katedra Mikrobiologii  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 24/28  
tel. (012) 633-13-56, +48 602295120



Prof. zw. dr hab. Wiesław Barabasz

Kraków, dnia 11 lipca 2016 r.