

Dr hab. inż. Iwona Skoczko
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Politechnika Białostocka
15-351 Białystok, ul. Wiejska 45E
Tel 797995985, e-mail: i.skoczko@pb.edu.pl

Białystok dn. 21.02.2017

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Szymona Talbierza

nt. Wpływ promieniowania UV raz metanosulfonianu etylu na przyrost biomasy i kumulację lipidów w heterotroficznej hodowli *Schizochytrium limacinum* na bazie gliceryny technicznej.

Promotor pracy dr hab. inż. Marcin Dębowski prof. UWM

1. Podstawa recenzji

Recenzję opracowano na podstawie pisma nr WNoŚ – DZ. 53.2.2017 Pani dr hab. inż. Ewy Paturej prof. UWM Dziekana Wydziału Nauk o Środowisku Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie oraz na podstawie decyzji Rady Wydziału Nauk o Środowisku Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 20 stycznia 2017 r., powołującej mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Szymona Talbierza.

2. Przedmiot i zakres rozprawy

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska mgr inż. Szymona Talbierza nt. „**Wpływ promieniowania UV raz metanosulfonianu etylu na przyrost biomasy i kumulację lipidów w heterotroficznej hodowli *Schizochytrium limacinum* na bazie gliceryny technicznej**”. Promotorem pracy jest dr hab. inż. Marcin Dębowski prof. UWM.

Celem pracy było określenie wpływu promieniowania UV raz metanosulfonianu etylu na przyrost biomasy mikroglonów *Schizochytrium limacinum* oraz wewnątrzkomórkową kumulację lipidów w heterotroficznej hodowli z wykorzystaniem gliceryny technicznej jako źródła węgla.

Recenzowaną pracę poświęcono udowodnieniu tezy, iż **gliceryna techniczna jest odpowiednim źródłem węgla w procesie heterotroficznej hodowli kumulujących bioolej mikroglonów z gatunku *Schizochytrium limacinu*.** Doktorant przy realizacji swoich badań postawił również tezę uzupełniającą i pozwalającą uszczegółwić prowadzone eksperymenty poprzez **poddanie referencyjnego szczepu mikroglonów *Schizochytrium limacinum* działaniu promieniowania UV i metanosulfonianu etylu pozwala na zwiększenie przyrostu ich biomasy oraz kumulacji lipidów w komórkach w warunkach hodowli heterotroficznej na bazie gliceryny technicznej.**

Tematyka pracy nawiązuje do aktualnego zagadnienia poszukiwania alternatywnych źródeł energii i paliw w dobie powszechnej i rabunkowej industrializacji. Jedynym sposobem na ograniczenie lub spowolnienie globalnego ocieplenia jest ograniczenie wydobycia i przetwarzania węgla, ropy i gazu. Światowe trendy zrównoważonego rozwoju proponują zmniejszyć wykorzystanie paliw kopalnych w około 80%. Odpowiedzią na ten trend są prace badawcze prowadzone w ramach recenzowanej pracy.

Recenzowaną rozprawę doktorską stanowi tekst przedstawiony na 88 stronach i zawarty w dwóch głównych częściach: teoretycznej i badawczej, składających się łącznie z 7 podstawowych rozdziałów. Pierwsza część pracy stanowi przegląd literatury w zakresie analizowanego tematu i składa się z dwóch rozdziałów: Wprowadzenie (rozdział 1) oraz Stan badań (rozdział 2). Część ta kończy się określeniem celowości podjętych prac badawczych oraz postawieniem dwóch tez pracy (rozdział 3). Drugi człon rozprawy jest jej częścią zasadniczą i składa się z 4 rozdziałów: Metodyka badań (rozdział 4), Wyniki badań (rozdział 5), Dyskusja wyników badań (rozdział 6), Podsumowanie i wnioski (rozdział 7), na końcu załączono literaturę, spisy tabel i rysunków, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz załącznik przedstawiający zestawienie wyników badań z etapu pierwszego.

W rozdziale pierwszym zatytułowanym „Wprowadzenie” doktorant w sposób wystarczający uzasadnia podjęcie tematu pracy oraz formułuje problem badawczy, nawiązuje również do celów badawczych oraz zakresu badań.

Rozdział drugi składa się z trzech podrozdziałów. W podrozdziale 2.1 opisano słabe i mocne strony wykorzystania mikroglonów do produkcji biopaliw. Autor powołuje się na liczne źródła literaturowe w których wykazano, że biomasa wspomnianych glonów jest jednym z najbardziej wydajnych, a także przyjaznych środowisku alternatywnych źródeł energii oraz stanowi perspektywiczne źródło biooleju, biokomponentów do biopaliw lub samych biopaliw. Ich hodowla może ograniczyć emisję gazów cieplarnianych do atmosfery. Jest to surowiec, który pod względem wykorzystania może konkurować z typowymi, lądowymi roślinami wyższymi, takimi jak rzepak, soja czy palma olejowa. Niezależnie od dostępności medium hodowlanego wykorzystującego wodę słodką lub słoną istnieje możliwość prowadzenia efektywnej produkcji biomasy mikroglonów. Po omówieniu licznych zalet wykorzystania mikroglonów doktorant przedstawia również słabe strony ich wykorzystania. W pierwszej kolejności należy do nich wysokość nakładów inwestycyjnych i eksploatacyjnych hodowli, jak również trudności w uzyskaniu odpowiedniej czystości i składu biomasy oraz trudności z hodowlą alg w fotobioreaktorach. Ponadto negatywnym zjawiskiem, wynikającym z niewłaściwej eksploatacji systemów produkcji biomasy glonów, jest zanieczyszczenie środowiska substancjami odżywczymi, prowadzące do zmian w funkcjonowaniu i strukturze ekosystemów wodnych. Jednocześnie brak odpowiednich instrumentów legislacyjnych nie sprzyja produkcji biopaliw uzyskiwanych z biomasy alg. W podrozdziale 2.2. autor opisuje systemy produkcji gatunków mikroglonów kumulujących związki lipidowe. Dokonuje tu analizy takich typów systemów hodowli jak: fotoautotroficzny, heterotroficzny, miksotroficzny i fotoheterotroficzny. Przytacza przykłady reakcji, w których produktem jest energia w postaci biopaliwa, biokomponentu lub kwasu tłuszczowego, zaś substratami są światło oraz dwutlenek węgla i woda. Rozpatruje różne substancje wspomagające i przeszkadzające mające wpływ na wydajność reakcji i produkcji biomasy. Podrozdział 2.3. „Metody zwiększania wydajności produkcji biomasy mikroalg oraz wytwarzania biooleju” ukazuje ogólnoswiatową ścieżkę poszukiwań możliwości wzrostu opłacalności hodowli alg, eliminacji czynników ograniczających jak też intensyfikacji wydajności produkcji zarówno samej biomasy jak i biopaliwa, które jest ubocznym produktem jej funkcjonowania w opisanych wcześniej reaktorach. Część teoretyczną autor kończy podsumowaniem wskazując na wady i zalety dotychczasowych rozwiązań stosowanych w hodowlach mikroglonów oraz przedstawia uzasadnienie podjęcia badań i konieczności opracowania alternatywnych rozwiązań w zakresie hodowli mikroglonów, określa cel prowadzenia prac badawczych i formułuje tezy pracy (rozdział 3).

W części doświadczalnej rozprawy doktorant przedstawia w rozdziale czwartym ogólną koncepcję pracy badawczej, która uwzględnia podział prowadzonych eksperymentów na trzy etapy:

- I. Badania wpływu promieniowania UV oraz EMS na efektywność przyrostu biomasy i lipidów w komórkach szczepu *Schizochytrium limacinum*.
- II. Badania wpływu różnych źródeł węgla na efektywność przyrostu biomasy i lipidów w komórkach *Schizochytrium limacinum* wraz z optymalizacją parametrów fizykochemicznych hodowli.
- III. Badania procesu dwustopniowej hodowli okresowej biomasy *Schizochytrium limacinum*.

W podrozdziale 4.2. autor charakteryzuje wykorzystane w pracy materiały, w tym odczynniki chemiczne (bufor fosforanowy, gliceryna techniczna, metanosulfonian etylu – EMS), media hodowlane (ekstrakt drożdżowy, pepton, glukoza, gliceryna techniczna) i inkulum będące podstawą eksperymentów. W podrozdziale 4.3. opisane jest stanowisko badawcze, które stanowią bioreaktory Biostat B Twin firmy Sartorius Stedim GmbH oraz kolby Erlenmeyera z zakrętkami i przegrodami do hodowli inkulum. W podrozdziale 4.4 opisane są procedury badawcze w podziale na zastosowane etapy eksperymentów. W pierwszym etapie przeprowadzono traktowanie mikroalg promieniowaniem UV (naświetlanie przygotowanych próbek 5, 10, 15, 20, 25, 30 minut), traktowanie mikroalg EMS (poprzedzone mieszaniem próbki i inkubacją w ciemności; EMS podawano w stałej dawce), inkubacja (po traktowaniu EMS i UV próbki umieszczono w ciemności w inkubatorze o temperaturze 26°C do momentu pojawienia się wyraźnych kolonii mikroglonów), selekcja mikroalg (badania przesiewowe szczepów o największej efektywności wzrostu i najwyższym wskaźniku produkcji lipidów) oraz kończąca I etap badań charakterystyka wyselekcjonowanych mikroalg przy porównaniu parametrów charakteryzujących efektywność przyrostu biomasy i kumulacji lipidów w komórkach do szczepu referencyjnego. Drugi etap badań obejmował: analizę wpływu źródła węgla na proces hodowli. Analizowano media hodowlane o symbolach M5, M6 31 oraz M7 i ich wpływ na tempo wzrostu biomasy oraz zawartość lipidów w komórkach. Autor wyjaśnia, iż wykorzystał metodę Plackett'a–Burman'a w celu identyfikacji parametrów fizycznych i chemicznych hodowli, które mają najistotniejszy wpływ na szybkość przyrostu komórek, końcowe stężenie suchej biomasy mikroglonów w układzie technologicznym oraz lipidów w komórkach). Następnie optymalizował wybrane parametry hodowli wskazane przez zastosowaną metodę Plackett'a–Burman'a, które istotnie wpływają na efektywność hodowli, a na końcu zweryfikował optymalne warunki hodowli. W etapie trzecim zostały opracowane

ostateczne parametry technologiczne hodowli mikroglonów na podstawie wyników hodowli określonych w etapie II. Należało do nich określenie wpływu temperatury oraz stężenia tlenu na wydajność hodowli okresowej. Rozdział czwarty kończy charakterystyka zastosowanych procedur analitycznych i statystycznych.

Uzyskane przez doktoranta wyniki badań są omówione w rozdziale 5 w odniesieniu do każdego z poszczególnych etapów badawczych. Wstępne badania prowadzące do ustalenia wpływu promieniowania UV oraz EMS na efektywność przyrostu biomasy i lipidów prowadzone były na zbiorze 283 pojedynczych kolonii badanego szczepu mikroalg *Schizochytrium limacinum*. Wykorzystując promieniowanie UV uzyskano 221 kolonii, zaś EMS - 62 kolonii, co udowadnia, iż czynnikiem determinującym wzrost i kondycję alg był testowany związek chemiczny. W dalszej części prac eksperymentalnych stwierdzono, iż oba testowane czynniki finalnie mają negatywny wpływ na przeżywalność komórek. Następnie analizowano poszczególne badane kolonie pod kątem zdolności do wzrostu w pożywkach płynnych zawierających glicerynę techniczną jako jedyne źródło węgla, a w dalszej kolejności pod kątem zdolności akumulacji lipidów w biomacie. W badaniach porównawczych stwierdzono istotnie wyższe końcowe stężenie biomasy w układzie w stosunku do obserwowanego dla szczepu referencyjnego. Najwyższe stężenie lipidów w biomacie w przypadku obu szczepów osiągnięto po 152 h hodowli. W drugim etapie badań porównywano wpływ wybranych zewnętrznych źródeł węgla (gliceryny technicznej, glukozy, oczyszczonej gliceryny technicznej) na szybkość przyrostu biomasy, stężenie biomasy w układzie technologicznym oraz efektywność akumulacji lipidów. Najlepsze efekty związane z szybkością przyrostu biomasy uzyskano w wariacie, w którym zewnętrzne źródło węgla stanowiła glukoza. Gliceryna techniczna okazała się źródłem węgla, które pozwalało na uzyskanie wyższej efektywności przyrostu biomasy w porównaniu do oczyszczonej gliceryny technicznej. Najszybszy wzrost stężenia lipidów oraz najwyższa końcowa wartość stężenia tych związków została osiągnięta dla hodowli, w której zewnętrznym źródłem węgla była glukoza. Nieznacznie wyższe stężenia lipidów w suchej masie komórkowej odnotowano dla hodowli, w której zastosowano glicerynę techniczną w porównaniu do oczyszczonej technicznej. W dalszej części badań udowodniono, iż stosowana temperatura procesu jest parametrem, który ma największy wpływ na końcowe stężenie biomasy oraz lipidów w hodowli. Natomiast najmniejszy wpływ ma stężenie ekstraktu drożdżowego w medium hodowlanym. Otrzymane w pracy wyniki pozwalają stwierdzić, iż wysokie stężenie gliceryny wpływa zarówno na poprawę efektywności produkcji suchej masy komórkowej oraz wysoką

wydajność produkcji lipidów. Z kolei niższa temperatura, niższe stężenie tlenu oraz azotu w hodowli wpływa na poprawę procesu kumulacji lipidów w komórkach. Prace eksperymentalne przeprowadzone w etapie III zmierzały do opracowania jednolitych wytycznych technologicznych przy realizacji eksperymentów w układzie 1- i 2-stopniowym. W stopniu pierwszym zapewniono optymalne warunki hodowli, a w drugim stopniu proces kontynuowano przy zastosowaniu zoptymalizowanych warunków odpowiadających intensyfikacji kumulacji substancji tłuszczowych.

3. Ocena merytoryczna pracy

Mikroalgi, organizmy tworzące biomasę w procesie fotosyntezy, stały się obecnie jednym z najbardziej obiecujących źródeł odnawialnej energii. Algi są dogodnym źródłem biomasy ze względu na szybkie tempo wzrostu oraz stosunkowo dużą zdolność do wiązania dwutlenku węgla. Ich hodowlę można prowadzić w bioreaktorach lub stawach, gdzie utrzymuje się odpowiednie dla ich wzrostu warunki. Pozyskana w ten sposób biomasa może zostać wykorzystana do produkcji biopaliw płynnych, ich komponentów czy biooleju. Sam pomysł wykorzystania mikroalg jako źródła pozyskiwania paliw alternatywnych nie jest nowy. Trwają intensywne prace w kierunku nowoczesnych i opłacalnych ekonomicznie technologii ich pozyskiwania. Dostrzeżono również potencjalne korzyści hodowli alg na cele energetyczne, które pomogłyby w walce z globalnym ociepleniem, poprzez zmniejszenie zużycia paliw kopalnianych oraz wykorzystaniem znacznych ilości CO₂ na swoją produkcję. Z drugiej strony istnieją poważne trudności w produkcji biomasy z mikroalg, np. czystość kolonii i ustalenie składu biomasy, duża zawartość wody, mała przejrzystość zawiesiny komórek glonów, co powoduje kłopoty z ich hodowlą w reaktorach. Ponadto należy zwracać uwagę, aby populacja mikroorganizmów nie osiągnęła stacjonarnej fazy wzrostu, a pozostawała w fazie wykładniczej wzrostu. Autor rozprawy zauważa ograniczenia metod fotoautotroficznych, co generuje konieczność poszukiwania konkurencyjnych technologii produkcji biomasy mikroglonów, których zastosowanie będzie uzasadnione pod względem ekonomicznym oraz technologicznym. Innowacyjność przeprowadzonych przez doktoranta prac polega na określeniu wpływu UV oraz EMS na wydajność przyrostu biomasy i biosyntezy lipidów w komórkach, ustaleniu optymalnego stężenia glicerolu w pożywce oraz określeniu fizyko-chemicznych parametrów hodowli mikroalg zapewniających wysoką wydajności produkcji biomasy oraz lipidów. Ciekawym rozwiązaniem były próby wykorzystania substancji odpadowych stanowiących dodatkowe źródło węgla dla hodowanych kolonii.

Jednoznacznie wykazano, iż glukoza pozwala na najwyższą akumulację lipidów oraz suchej masy komórkowej w hodowli, lecz wymaga poniesienia najwyższych kosztów z uwagi na jej wysoką cenę jednostkową. Z kolei, w wyniku zastosowania gliceryny technicznej, która stanowi materiał odpadowy, odnotowano stężenie suchej masy komórkowej na wyższym poziomie niż przy zadawkowaniu oczyszczonej gliceryny technicznej. Według doktoranta gliceryna techniczna jest lepszym źródłem węgla w porównaniu do oczyszczonej gliceryny technicznej, a uniknięcie dodatkowych etapów oczyszczania surowca pozwala na zmniejszenie kosztów operacyjnych przygotowania podłoża hodowlanego.

Oceniając rozprawę doktorską w zakresie kryteriów merytorycznych i metodycznych stwierdzam, że recenzowana praca dotyczy interesującego i aktualnego zagadnienia. Wybór tematu pracy należy uznać za właściwy głównie ze względów poznawczych. Koncepcja realizacji badań i rozwiązania problemu zwiększenia produkcji biomasy zawarta w pracy jest oryginalna i stanowi osiągnięcie własne doktoranta. Dyskusja wyników oraz wnioski zostały oparte o obszerny materiał doświadczalny świadczący o dobrej znajomości zagadnień związanych zarówno z procesami produkcji mikroalg, jak również technik analitycznych, a także umiejętności interpretacji uzyskanych wyników. Praca ma dobrą konstrukcję, brak jest niepotrzebnych powtórzeń. Przegląd literatury stanowi wymagane 30% treści.

Jednocześnie do w pełni uzasadnionych atutów pracy i wpisywania się jej tematyki w priorytety rozwoju Unii Europejskiej do 2030 należy wymienić kilka uwag krytycznych:

1. Z pracy nie wynika jednoznacznie, czy zmieniano dawkę EMS, czy pracowano wyłącznie na tej samej zmieniając czas inkubacji. Nie podano stężenia wykorzystywanego roztworu EMS oraz procedury jego przygotowania.
2. Metoda Plackett'a–Burman'a jest znaną metodą do identyfikacji najważniejszych czynników we wczesnej fazie eksperymentów, przy niepełnej dostępności pozostałych parametrów badanego układu/systemu. Autor powinien przytoczyć wyjaśnienie zasadności zastosowania tej metody oraz jej porównanie ze stosowanymi innymi metodami statystycznej weryfikacji danych.
3. Przy określeniu wpływu temperatury oraz stężenia tlenu na wydajność hodowli okresowej zastosowano wąski zakres zmian temperatur nie uzasadniając, dlaczego zastosowano tak wąski zakres zmian temperatury. W opinii recenzenta powinny być rozpatrzone brzegowe warunki życia w szerszym zakresie temperatur. Podobnie, niezadowalająco określono wpływ stężenia tlenu w odniesieniu do jego koncentracji

wyrażonej w mgO₂ w 1 dm³ objętości pożywki oraz przyjmowanej przez jednostkę masy mikroglonów.

4. Przedstawiona w rozdziale czwartym (podrozdział 4.6) analiza statystyczna jest dość uboga i potem niezbyt dokładnie analizowana w omówieniu wyników badań. Z drugiej zaś strony prawie połowę opisu uzyskanych wyników badań w podrozdziale 4.4 stanowi statystyczne wyjaśnienie i poszukiwanie rozwiązań optymalnych, do którego nie ma odniesienia w podrozdziale 4.6. Należało położyć nacisk, iż swoistą analizę statystyczną stanowi metoda Plackett'a–Burman'a, która dąży do ukazania istotnych różnic i istotnych parametrów. Kolejną metodą jest powiązana z powyższą metoda CCD oraz dane pozyskane dzięki *Design-Expert* – również nie omówione w podrozdziale 4.6.
5. Dowiedziono, iż powodu zawartości w oleju alg wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, produkt podczas przechowywania, może ulegać stosunkowo szybko utlenianiu, hydrolizie i polimeryzacji, co prowadzi również do zmiany lepkości. Jest to kolejny czynnik (po kosztach inwestycyjnych i eksploatacyjnych instalacji) generujący dodatkowe koszty. Warto zasięgnąć informacji, czy i jak można go wyeliminować.
6. Powtarzany w pracy „efekt technologiczny” powinien być przeliczony i wyrażony procentowo. Odrębną grupę przeliczeniową stanowią parametry analityczne i parametry technologiczne, które nie zostały w rozprawie w wystarczający sposób podkreślone.

Niemniej uwagi przedstawione powyżej nie umniejszają wartości poznawczej rozprawy.

4. Wniosek końcowy

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Szymona Talbierza prezentuje interesujące i cenne wyniki badań i mimo podanych uwag krytycznych, zarówno wybrana tematyka, zastosowana metodyka, przeprowadzenie badań doświadczalnych, ich opis i analiza oraz wnioski są poprawne i na dobrym poziomie merytorycznym. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat metod i warunków hodowli mikroalg, jak też efektów pozyskania lipidów w różnych warunkach prowadzenia procesów i przy wykorzystaniu różnych pożywek.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr inż. Szymona Talbierza nt. „Wpływ promieniowania UV raz metanosulfonianu etylu na przyrost biomasy i kumulację lipidów w heterotroficznej hodowli *Schizochytrium limacinum* na bazie gliceryny technicznej” spełnia wymagania formalne w odniesieniu do prac doktorskich, odpowiada wymogom Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 (Dz.Ustaw nr 65 poz, 595 wraz z późniejszymi zmianami).

Zwracam się, zatem do Rady Wydziału Nauk o Środowisku Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie Pana mgr inż. Szymona Talbierza do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim.