

Płock, 10 października 2022

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Kacprzak
Politechnika Warszawska,
Wydział Budownictwa, Mechaniki i Petrochemii,
09-400 Płock, Łukasiewicza 17

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Wiolety Mikuckiej

zatytułowanej

**“VALORIZATION OF DISTILLERY STILLAGE BY RECOVERING
POLYPHENOLIC COMPOUNDS”**

Przygotowana na podstawie pisma z 30 września 2022

profesora Marcina Dębowskiego, Przewodniczącego Rady Dyscypliny

Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Promotorzy: dr hab.inż. Magdalena Zielińska, prof. uczelni

dr hab.inż. Izabela Witońska, prof. uczelni

1. Problem badawczy i główny cel pracy

Na całym świecie wzrasta produkcja etanolu. W trakcie procesu średnio powstaje około 13 dm³ (8–20 dm³ dla etanolu opałowego) wywaru gorzelniczego na każdy dm³ wytworzonego alkoholu. Tak więc w typowej dużej gorzelnii produkującej 150m³/dobę etanolu, dodatkowo - 1950m³ wywaru gorzelniczego. W wywarach gorzelnicznych występują takie związki jak ligniny, cukry, hemicelulozy, dekstryny, żywice i kwasy organiczne. Kolor wywaru gorzelniczego wynika głównie z obecności melanoidyny, polifenoli, alkalicznych produktów degradacji heksoz oraz karmelu.

Substrat zawiera średnio 5% suchej masy, w zależności od surowca użytego do produkcji alkoholu. Typowa wartość chemicznego zapotrzebowania na tlen (COD) waha się od 80 000 do 150 000 mg/l. Tak więc wywar gorzelniczny (znany również jako: młóto, odpad gorzelniany

lub wywar melasowy) jest złożonym organicznym produktem ubocznym, który ma poważny potencjał do zanieczyszczenia środowiska.

Z drugiej strony ten produkt uboczny zawiera wiele cennych składników odżywczych. Zawartość azotu jest wysoka ($3,3 \text{ kg/m}^3$, głównie w postaci białek), a ponadto ok. $0,9 \text{ kg / m}^3 \text{ P}_2\text{O}_5$ i $1,8 \text{ kg / m}^3 \text{ K}_2\text{O}$.

Szerokie wprowadzenie zasad gospodarki o obiegu zamkniętym CE zaowocowało szeroko zakrojonymi badaniami nad poszukiwaniem nowych technologii odzyskiwania materii z różnych strumieni odpadów. Destylatory gorzelniane są już wykorzystywane jako substraty w biogazowniach, ponadto jako surowiec paszowy dla zwierząt lub jako substytut nawozów mineralnych. Mogą być jednak ważnym źródłem związków takich jak polifenole o wysokich właściwościach antyoksydacyjnych. Technologia odzyskiwania kwasów fenolowych może być przydatna do efektywnego gospodarowania wywarami gorzelnicznymi, ponieważ związki te uważane są również za inhibitory fermentacji metanowej i odzysku energii.

Wioleta Mikucka przedstawiła rozprawę doktorską dotyczącą oceny potencjału wywaru gorzelnicznego jako źródła bioaktywnych polifenoli, możliwości ich odzysku oraz wpływu kwasów fenolowych na produkcję metanu z wywaru gorzelnicznego.

W literaturze brakuje publikacji naukowych skupiających się na tej tematyce, niektóre podobne prace zostały opublikowane raczej w kontekście kompleksowego podejścia do oczyszczania wywarów gorzelnicznych jako trudnych ścieków przemysłowych. Stąd moim zdaniem problem badawczy jest aktualny, ważny i kluczowy nie tylko z punktu widzenia gospodarki o obiegu zamkniętym, ale także jako element wyzwań zrównoważonego rozwoju. Nowość jak i poziom naukowy pracy jest bardzo dobry, biorąc pod uwagę wagę tematu badań oraz wymagania i potencjał rynku.

2. Cel pracy

Głównym celem badań było: „*określenie potencjału wywaru gorzelnicznego jako źródła bioaktywnych polifenoli, możliwości ich odzysku oraz wpływu kwasów fenolowych na produkcję metanu z wywaru gorzelnicznego*”.

Sformułowano następujące hipotezy badawcze:

„...Hipoteza 1: *Metody i warunki ekstrakcji oraz rodzaj i stężenie rozpuszczalników wpływają na wydajność, skład i aktywność przeciwutleniającą polifenoli odzyskiwanych z wywaru gorzelnicznego*...

Hipoteza 2: *...THFA i biowęgiel wytworzone z frakcji stałej odpadów z przetwórstwa zbóż można wykorzystać do odzysku kwasów fenolowych z frakcji ciekłej tych odpadów.*

Hipoteza 3: *Potencjał metanowy wywaru gorzelnicznego zależy od rodzaju i stężenia kwasów fenolowych...*”.

Aby zweryfikować hipotezę badawczą i odpowiedzieć na postawione pytania badawcze, w zakresie pracy uwzględniono wiele metod analitycznych i statystycznych, w tym współczynnik

korelacji rang Spearmana, parametr rozpuszczalności Hansena (HSP), analizę głównych składowych (PCA) czy też metodę powierzchni odpowiedzi (RSM).

3. Zawartość pracy

Niniejsza rozprawa jest napisana w języku angielskim i składa się z 271 stron uporządkowanych w następujący sposób: 6 opublikowanych artykułów, 1 zgłoszony oraz wstęp zawierający: a) krótki opis aktualnego stanu wiedzy na temat przedmiotu badań, b) cele i hipotezy pracy, c) materiały i metody d) opis wyników eksperymentalnych i weryfikacja hipotez badawczych. Rozprawa uzupełniona jest także wykazem skrótów, symboli i odniesień. Ogólnie układ pracy doktorskiej i kolejność rozdziałów uważam za właściwy. Każda opublikowana praca zawiera swoje główne wnioski, a rozdział wstępny zawiera już szczegółowe podsumowanie wyników całej rozprawy doktorskiej oraz proponowane przyszłe kierunki badań lub metody, które mogą dodatkowo poszerzyć naszą wiedzę na temat wprowadzania zasad gospodarki o obiegu zamkniętym w przetwarzaniu i zagospodarowywaniu wywarów gorzelnianych. **Proponuję jednak, aby rozdział wprowadzający w temat i prezentujący ogólny stan wiedzy uzupełnić podrozdziałem zawierającym zebrane wnioski końcowe.**

Wszystkie artykuły zawarte w rozprawie doktorskiej **zostały już opublikowane w uznanych na arenie międzynarodowej, recenzowanych czasopismach naukowych** (Applied Biochemistry and Biotechnology IF 3,094, Scientific Reports IF 4,379, International Journal of Environmental Research and Public Health IF 4,614, Journal of Environmental Management IF 8,91 (2 artykuły), Energies IF 3,252, Chemosphere IF 8,943 (zgłoszone). W każdym z nich pierwszą autorką jest Wioleta Mikucka. Pozostali współautorzy (głównie promotor) przedstawili oświadczenia, z których wynika, że jej zaangażowanie w przygotowanie tych artykułów **to nie mniej niż 60%** i moim zdaniem jest to wkład znaczący. **Wszystkie opublikowane artykuły były już cytowane (z autocytatami) łącznie 36 razy (Scopus), co potwierdza naukową wagę i nowość publikacji, biorąc pod uwagę, że artykuły ukazywały się w latach 2020-2022.**

Sześć opublikowanych prac (P1 – P6) stanowi najważniejszy element rozprawy doktorskiej, każda z nich zawiera analizę zagadnień badawczych związanych z obecnością fenoli w wywarach gorzelnicznych, w tym charakterystykę i metody ekstrakcji:

P1. Mikucka Wioleta, Zielińska Magdalena, 2020. Distillery stillage: characteristics, treatment and valorization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 192(3), 770–793.

P2. Mikucka Wioleta, Zielinska Magdalena, Bulkowska Katarzyna, Witonska Izabela, 2022. Recovery of polyphenols from distillery stillage by microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional solid-liquid extraction. *Scientific Reports* 12, 3232.

P3. Mikucka Wioleta, Zielinska Magdalena, Bulkowska Katarzyna, Witonska Izabela, 2022. Processing of distillery stillage to recover phenolic compounds with ultrasound-assisted and microwave-assisted extractions. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(5), 2709.

P4. Mikucka Wioleta, Zielinska Magdalena, Bulkowska Katarzyna, Witonska Izabela. Valorization of distillery stillage by polyphenol recovery using microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional extractions. Accepted for publication in *Journal of Environmental Management*.

P5. Mikucka Wioleta, Zielinska Magdalena, Bulkowska Katarzyna, Witonska Izabela, 2022. Subcritical water extraction of bioactive phenolic compounds from distillery stillage. *Journal of Environmental Management* 318, 115548.

P6. Mikucka Wioleta, Zielinska Magdalena, 2022. Individual phenolic acids in distillery stillage inhibit its biomethanization. *Energies* 15, 5377.

Uzupełnieniem powyższych prac jest publikacja złożona w czasopiśmie *Chemosphere*, która skupia się bardziej na ogólnej koncepcji gospodarki o obiegu zamkniętym w gorzelniach:

P7. Mikucka Wioleta, Witonska Izabela, Zielinska Magdalena, Bulkowska Katarzyna, Binczarski Michał. The concept for the circular economy in an ethanol production plant. Submitted to *Chemosphere*.

Pierwsza praca P1 zatytułowana *Distillery stillage: characteristics, treatment and valorization* skupia się na opisie różnych biologicznych, chemicznych i fizycznych metod wywaru gorzelniczego. Szczególną uwagę zwrócono na scharakteryzowanie wywaru gorzelniczego jako źródła cennych związków, takich jak polisacharydy, lotne kwasy tłuszczowe (LKT), naturalne antyoksydanty, w tym polifenole. Moim zdaniem artykuł jest bardzo dobrym kompendium aktualnie dostępnej wiedzy na temat możliwości przetwarzania i zagospodarowania wywaru gorzelniczego w kontekście odzysku ważnych surowców. Jest również dobrym materiałem wyjściowym do dalszych badań nad waloryzacją tego produktu ubocznego.

W pracach P2-P5 (stanowiących główną część rozprawy) autorka zajmuje się porównaniem różnych metod ekstrakcji polifenoli (UAE wspomagany ultradźwiękami, wspomagany mikrofalami, MAE i metoda konwencjonalna). Do każdej metody zastosowano inny rodzaj rozpuszczalnika (etanol, metanol, octan etylu:etanol:woda, aceton, woda) i różne warunki prowadzenia eksperymentów (stężenie rozpuszczalnika, stosunek substancji stałej do rozpuszczalnika, czas ekstrakcji, temperatura ekstrakcji).

Wykonano i opracowano wyniki dla szeregu kombinacji badawczych. Co ciekawe, oprócz kryterium efektywności samego wydobycia, doktorantka przeanalizowała również ekonomikę procesu i możliwe oddziaływania na środowisko.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że metody wspomagane ultradźwiękami (UAE) i mikrofalami (MAE) nadają się do efektywnej ekstrakcji polifenoli (P2). Porównując obie metody (i ich możliwe modyfikacje) najwyższą sumaryczną zawartość polifenoli, flawonoidów i kwasu fenolowego uzyskano przy krótkim czasie ekstrakcji -10 min UAE i 5 min MAE przy stosunku frakcji stałej do acetonu 1:15 (s:v). ZEA wydaje się lepszym rozwiązaniem dla efektywniejszej ekstrakcji fenoli. Co ciekawe, oprócz kryterium efektywności samej ekstrakcji, w pracy przeanalizowano również ekonomikę procesu i możliwe oddziaływania na środowisko. Biorąc pod uwagę równowagę pomiędzy wydajnością polifenoli a energochłonnością procesu –

najbardziej odpowiednim rozwiązaniem są ZEA (P3). Natomiast w przypadku zastosowania do ekstrakcji octanu etylu (EA) najwyższe wydajności całkowitej zawartości polifenoli uzyskano w warunkach: 8 min MAE i 70% EA (P4). Dalsze badania MAE z użyciem wody destylowanej jako rozpuszczalnika wykazały, że w określonych warunkach temperatury i czasu ekstrakcji możliwe jest uzyskanie polifenolu na poziomie 3,04 (4,99) mg GAE/g suchej biomasy (P5). Ogólnie praca potwierdza, że najskuteczniejszymi roztworami były: 80% metanol i etanol, 60% aceton i 70% octan etylu. Niezależnie od zastosowanej procedury ekstrakcji kwasy fenolowe występowały głównie w postaci wolnej.

W pracy P6 przedstawiono wyniki oceny wpływu rodzaju i stężenia kwasów fenolowych (oddzielnie i w mieszaninach) na potencjał metanowy wywaru gorzelniczego. Praca potwierdza, że obecność kwasów fenolowych oddziałuje hamująco na metanogenezę, a tym samym zmniejsza się potencjał metanowy i tempo produkcji metanu. Największy negatywny wpływ odnotowano dla kwasów: wanilinowego, p-kumarowego, syringowego i ferulowego.

Natomiast, w pracy P7 potwierdzono zastosowanie alkoholu tetrahydrofurfurylowego (THFA) i biowęgla wytwarzanego z frakcji stałej odpadów z przetwórstwa zbóż (w tym frakcji stałej z wywaru gorzelniczego) do odzysku kwasów fenolowych z frakcji ciekłej wywaru gorzelniczego. Ważne jest, aby wydajność procesu była porównywalna z innymi stosowanymi wcześniej rozwiązaniami. Ponadto aktywność przeciwutleniająca ekstraktów THFA była na podobnym poziomie jak ekstraktów otrzymanych z metanolem i etanolem.

4. Znaczenie dla praktyki i rozwoju dyscypliny:

Dane przedstawione w rozprawie doktorskiej uzupełniają wiedzę z dyscypliny inżynieria środowiska (gospodarka odpadami); biotechnologia środowiskowa (odzyskiwanie związków bioaktywnych) i chemia analityczna (metodologia ekstrakcji). o możliwości efektywnego odzysku polifenoli z wywaru gorzelniczego. Doktorantka wykonała ogromną pracę porównawczą analizując duże zbiory danych przy pomocy kilku programów statystycznych i znajdując różne korelacje między całkowitą zawartością flawonoidów TFC, całkowitą zawartością polifenoli TPC, stężeniami kwasów fenolowych i wieloma innymi parametrami. **Moim zdaniem rozprawa stanowi doskonałą bazę do dalszych badań dotyczących optymalizacji procesu odzysku polifenoli jako alternatywy dla produktów handlowych oraz projektowania instalacji do zastosowań praktycznych.**

5. Pytania i uwagi

Autorka starannie przedstawiła uzyskane wyniki, uzupełniając je pogłębioną analizą i krytyczną dyskusją. Biorąc pod uwagę wysoką jakość, która generalnie charakteryzuje treść przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej, poniżej wymieniono jedynie kilka punktów i uwag pobocznych, a raczej pytań do dyskusji:

- w każdej serii eksperymentalnej zastosowano wywar z jednej z polskich destylarni. Czy to był dokładnie ten sam produkt uboczny?. Mam na myśli to, że partia wywaru została pobrana raz z destylarni, czy też próbki były pobierano osobno dla każdej serii testów?

- wywar gorzelniczy może pochodzić z różnych substratów wyjściowych (głównie kukurydzy i żyta, mniej pszenicy), co jest związane z ich składem. Jak uniwersalna jest metoda ekstrakcji polifenoli zaprojektowana i zbadana przez Autorkę rozprawy?

- w artykule P6 Autorka opisuje, że polifenole hamują metanogenczę. Jednocześnie podaje stężenia poszczególnych kwasów i ich mieszanin, które wykazały największy efekt. Jaki był udział poszczególnych kwasów w najbardziej „toksycznej” mieszaninie?

- w manuskrypcie P7 Autorka opisała zastosowanie frakcji stałej odpadów z przetwórstwa zbóż do przygotowania alkoholu tetrahydrofurfurylowego (THFA) i biowęgla (BC), a następnie do ekstrakcji i odzysku polifenoli z ekstraktów. Wydajność była bardzo wysoka – ok. 92%. W poprzednich eksperymentach stosowano i szeroko badano inne rozpuszczalniki. Dlaczego do serii II eksperymentu nie uwzględniono wcześniej badanych rozpuszczalników?

6. Podsumowanie

Prace eksperymentalne i ich wyniki opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej charakteryzują się doskonałym stopniem oryginalności, kompletności i trafności i w mojej ocenie są cenne zarówno dla nauk analitycznych, jak i nauk o środowisku. Autorka pracy wykazała się dużą wiedzą teoretyczną (potwierdzoną opublikowaną artykułem przeglądowym), umiejętnościami praktycznymi (wszystkie eksperymenty były dobrze zaprojektowane i wykonane, a techniki i metody pomiarowe prawidłowo zastosowane) oraz wysoką motywacją do przeprowadzenia pracy badawczej.

W końcowej konkluzji stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki i wymogi niezbędne do uzyskania stopnia doktora. Na podstawie tego zgodnie z polskim prawem stawiam wniosek o jej dopuszczenie do obrony przed odpowiednią komisją.

Biorąc pod uwagę wagę problemu naukowego, duży zakres wykonanej pracy, jakość wyników i oddziaływanie dla dyscypliny naukowej, **pragnę wystąpić o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.**



Małgorzata Kacprzak