

dr hab. inż. Monika Żubrowska-Sudoł, prof. uczelni
Politechnika Warszawska
Wydział Instalacji Budowlanych Hydrotechniki
i Inżynierii Środowiska

Warszawa, 15 listopada 2022

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Wiolety Mikuckiej
pt. „**Waloryzacja wywaru gorzelniczego przez odzysk związków polifenolowych**”

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Wiolety Mikuckiej wykonana została pod promotorską opieką dr hab. inż. Magdaleny Zielińskiej, prof. uczelni oraz dr hab. inż. Izabeli Witońskiej, prof. uczelni w Katedrze Biotechnologii w Ochronie Środowiska Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Celem pracy było określenie potencjału wywaru gorzelniczego jako źródła bioaktywnych polifenoli, możliwości ich odzysku oraz wpływu kwasów fenolowych na produkcję metanu z wywaru gorzelniczego. Warto przy tym podkreślić, że polifenole jako substancje o działaniu przeciwutleniającym, są szeroko wykorzystywane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym. W tym kontekście tematyka recenzowanej pracy wkomponowuje się w istotny nurt badań współczesnej biogospodarki, gdzie głównym wyzwaniem jest poszukiwanie możliwości odzysku surowców ze strumieni odpadowych powstających przy przetwórstwie biomasy. Wybór tematyki rozprawy uznać należy zatem za trafny i wychodzący naprzeciw oczekiwaniom kierowanym pod adresem środowisk naukowych.

Rozprawa doktorska mgr inż. Wiolety Mikuckiej została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru 7. oryginalnych prac. Pięć prac zostało opublikowanych w latach 2020-2022 w następujących periodykach wymienionych w wykazie czasopism naukowych Ministra Edukacji i Nauki: *Applied Biochemistry and Biotechnology* (praca P1; 70 pkt. MEN; IF=2,926), *Scientific Reports* (praca P2; 140 pkt. MEN; IF=4,996), *International Journal of*

Environmental Research and Public Health (praca P3; 140 pkt. MEN; IF=4,614), *Journal of Environmental Management* (praca P5; 100 pkt. MEN; IF=8,910), *Energies* (praca P6; 140 pkt. MEN; IF=3,252). Jeden z artykułów naukowych został przyjęty do druku w czasopiśmie *Journal of Environmental Management* (praca P4; 100 pkt. MEN; IF=8,910), zaś jedna z prac przedstawionych w dysertacji została wysłana do czasopisma *Chemosphere* (praca P7; data wysłania pracy: 28.08.2022). Zgodnie z oświadczeniami Kandydatki, potwierdzonymi przez współautorów poszczególnych prac, jej wkład naukowy w powstanie ostatecznej wersji publikacji wynosił 70 % (P1, ilość autorów: 2), 65 % (P6, ilość autorów: 2), 60 % (P2-P5, ilość autorów: 4; P7, ilość autorów: 5). Każdorazowo obejmował: współautorstwo w przygotowaniu koncepcji pracy, udział w pisaniu pracy, graficznym przedstawieniu wyników oraz w interpretacji wyników i wnioskowaniu, jak również korektę pracy przed jej złożeniem do druku. W przypadku prac P2 – P7 obejmował także prowadzenie badań i analiz laboratoryjnych a w przypadku publikacji P1 zbieranie materiałów źródłowych. Recenzentka zdaje sobie sprawę z częstokroć długotrwałego procesu publikowania pracy po jej zaakceptowaniu do druku i tym samym uważa, że praca o takim statucie może być brana pod uwagę przy ocenie dysertacji. Ma natomiast wątpliwości co do uznania ostatniej z wymienionych prac (P7), która nie ma statusu przyjętej do druku. Zgodnie bowiem z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce „rozprawę doktorską może stanowić praca pisemna, w tym (...), zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych”. W dalszej części mojej recenzji nie będę brała pod uwagę przedmiotowej pracy (tj. pracy oznaczonej jako P7). Pomimo mojej wątpliwości, którą sformułowałam powyżej już na tym etapie recenzji pragnę podkreślić, że materiał przedstawiony w pracach opublikowanych oraz w pracy przyjętej do druku w pełni odpowiada kryteriom stawianym pracom doktorskim. Potwierdza on bowiem ogólną wiedzę teoretyczną mgr inż. Wiolety Mikuckiej w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, stanowiąc oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jaki w tym przypadku stanowiła waloryzacja wywaru gorzelniczego. Co więcej, ze względu na wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań, w mojej opinii praca zasługuje na wyróżnienie.

Odnosząc się do prac opublikowanych oraz pracy zaakceptowanej do druku należy podkreślić, że badania naukowe Kandydatki zostały docenione przez periodyki naukowe o wysokiej międzynarodowej renomie, a tym samym przez grono międzynarodowych ekspertów oceniających manuskrypty. Sumaryczny IF charakteryzujący przedmiotowy zbiór

prac (P1-P6) wynosi 33,608, a liczba punktów zgodna z wykazem czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MEN: 690.

Analizując kompozycję przedstawionej do oceny dysertacji należy stwierdzić, że zawiera ona wszystkie wymagane elementy. Rozprawa doktorska liczy 271 stron, z czego 28 stron stanowi przewodnik do artykułów naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, podzielony na 7 rozdziałów i dodatkowo zawierający streszczenia w języku angielskim i w języku polskim. Pierwszy rozdział to wprowadzenie, w którym Autorka prezentuje charakterystykę wywaru gorzelniczego i wpływ tego odpadu na środowisko naturalne, omawia różne metody wykorzystywane w celu zagospodarowania tego odpadu oraz dokumentuje zasadność badań własnych, co stanowi logiczny wstęp do sprecyzowanych w rozdziale drugim celu i zakresu pracy. W rozdziale trzecim przedstawiona została metodyka badań, obejmująca w szczególności: koncepcję podziału badań na trzy serie badawcze, omówienie zastosowanych metod ekstrakcji polifenoli z wywaru gorzelniczego, omówienie metodyki testów potencjału metanowego, zakres badań analitycznych wykonywanych w ramach poszczególnych serii badawczych oraz omówienie narzędzi wykorzystanych do analizy uzyskanych wyników. Rozdział czwarty zawiera syntetyczne omówienie wyników. Autorka w rozdziale tym odniosła się do sprecyzowanych hipotez badawczych kierując przy tym czytelnika do publikacji w których zawarta jest wnikliwa analiza wyników. W kolejnym rozdziale, zatytułowanym „Podsumowanie”, Autorka przedstawiła zasadnicze osiągnięcia badań przedstawionych w rozprawie. Przewodnik do artykułów zamyka wykaz skrótów i symboli oraz bibliografia obejmująca 62 pozycje literaturowe tematycznie związane z przedmiotem rozprawy doktorskiej. Po tej części pracy Autorka zamieszcza wspomniane wcześniej artykuły naukowe oraz oświadczenia Doktorantki i pozostałych współautorów o ich udziale w artykułach naukowych, co stanowi kolejne 236 stron.

Szczegółowy zakres prac zaprezentowanych w publikacjach przedstawia się następująco:

1. „Distillery stillage: characteristics, treatment, and valorization”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 192(3), 770–793 (2020);

Publikacja stanowi wnikliwy przegląd literatury w obszarze charakterystyki, metod oczyszczania oraz waloryzacji wywaru gorzelniczego. Do jej przygotowania wykorzystano 133 pozycje literaturowe. Wstępem do przedmiotowych rozważań jest omówienie gospodarczego znaczenia przemysłu gorzelniczego i na tym tle wskazanie konieczności

rozwijania sposobów zagospodarowania wywaru gorzelniczego stanowiącego odpad z produkcji alkoholu. W pracy przedyskutowano biologiczne (tlenowe, beztlenowe), fizyko-chemiczne (koagulację, elektrokoagulację, adsorpcję, pogłębione utlenianie, separację membranową) oraz termiczne metody oczyszczania wywaru gorzelniczego. Zaprezentowano również możliwości odzysku wartościowych produktów, takich jak polifenole, polisacharydy czy lotne kwasy tłuszczowe, wskazując wywar gorzelniczy jako cenny strumień odpadowy dla rozwoju biorafinerii.

Przedstawione w przedmiotowej publikacji informacje uzasadniają celowość badań podjętych przez Kandydatkę (wyniki których zaprezentowano w kolejnych publikacjach) oraz wskazują, że tematyka rozprawy wpisuje się w aktualne trendy rozwoju zrównoważonej cyrkularnej biogospodarki.

2. „Recovery of polyphenols from distillery stillage by microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional solid-liquid extraction”, *Scientific Reports* 12, 3232 (2020);

Przedmiotem niniejszego artykułu były badania nad wpływem rodzaju oraz stężenia rozpuszczalnika, warunków ekstrakcji (czas, temperatura) oraz metody ekstrakcji (ekstrakcja ciała stałe – ciecz (CSLE), ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (UAE), ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MAE)) na wydajność ekstrakcji polifenoli z wywaru gorzelniczego, z uwzględnieniem składu polifenoli, szybkości ekstrakcji oraz aktywności antyoksydacyjnej ekstraktu (jako miary jego jakości). W eksperymentach jako rozpuszczalniki wykorzystano 60 %, 70 %, 80 %, 90 % i 100 % metanol oraz etanol. W pracy wykazano, że ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami oraz mikrofalami pozwala na bardziej efektywny odzysk polifenoli, przy krótszym czasie ekstrakcji i zarazem wyższej aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów w stosunku do prowadzenia procesu ekstrakcji w sposób konwencjonalny. Przedmiotowe osiągnięcie uważam za istotny walor naukowy ocenianej pracy. Za interesujące osiągnięcie pracy uważam również spostrzeżenie, że kwasy fenolowe występowały w ekstraktach głównie w postaci wolnej (dzięki czemu można uniknąć hydrolizy wywaru przed procesem ekstrakcji) przy dominacji kwasu ferulowego i p-kumarowego.

3. „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 (2022);

Kolejna praca stanowi kontynuację badań nad procesem ekstrakcji polifenoli z wywaru gorzelniczego wspomaganej ultradźwiękami i mikrofalami. W tym przypadku jako

rozpuszczalnik wykorzystano wodne roztwory acetonu charakteryzujące się następującymi wartościami stężenia: 40 %, 60 %, 80 % oraz czysty aceton. Ponadto w odróżnieniu do poprzedniej pracy zastosowano różne stosunki cząstek stałych do rozpuszczalnika (1:15 i 1:30; w pracy P2 wartość tego wskaźnika dla każdej ekstrakcji była stała i wynosiła 1:30). Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na stwierdzenie, że najwyższą zawartość polifenoli uzyskuje się dla krótkich czasów ekstrakcji (10 min dla UAE, 5 min dla MAE) prowadząc proces przy wykorzystaniu 60 % roztworu acetonu. Potwierdziły również występowanie kwasów fenolowych w ekstraktach głównie w postaci wolnej. W pracy podkreślono, że taka charakterystyka ekstraktów otwiera różne możliwości przemysłowych zastosowań uzyskanych związków fenolowych, co odpowiada na wyzwania rozwijającej się obecnie zrównoważonej biogospodarki cyrkularnej.

4. „Valorization of distillery stillage by polyphenol recovery using microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional extractions”, *Journal of Environmental Management*, manuscript ref: JEMA-D-22-05107R1, submission date: 10.06.2022, current status: accepted for publication (2022);

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki eksperymentów, w których proces ekstrakcji prowadzono przy zastosowaniu octanu etylu w trzech wariantach tj. jako klasyczna ekstrakcja oraz jako ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami i mikrofalami (analogicznie do pracy P2). Dla każdego z wariantów przeanalizowano wpływ czasu ekstrakcji, stężenia rozpuszczalnika oraz stosunku cząstek stałych do rozpuszczalnika na wydajność odzysku polifenoli oraz na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów. Biorąc pod uwagę przedmiotowe kryteria za najlepsze warunki dla odzysku polifenoli uznano ekstrakcję wspomaganą mikrofalami prowadzoną za pomocą 70% roztworu octanu etylu przez 8 minut. Analogicznie do wyników zaprezentowanych w poprzednich publikacjach stwierdzono, że kwasy fenolowe występowały w ekstraktach głównie w postaci wolnej.

5. „Subcritical water extraction of bioactive phenolic compounds from distillery stillage”, *Journal of Environmental Management* 318, 115548 (2022);

Praca P5 to kolejna publikacja, która pozwoliła Doktorantce na weryfikację jednej ze sformułowanych hipotez. A mianowicie, że wydajność odzysku polifenoli z wywaru gorzelniczego, skład oraz aktywność antyoksydacyjna ekstraktów zależy od metody ekstrakcji, warunków w jakich jest prowadzona oraz od rodzaju i stężenia rozpuszczalnika. W niniejszej pracy waloryzację wywaru gorzelniczego prowadzono za pomocą ekstrakcji wodą w stanie podkrytycznym (SWE). Za istotne osiągnięcie pracy uważam wykazanie, że

zastosowanie ekstrakcji wodą w stanie podkrytycznym, jako alternatywy do ekstrakcji prowadzonej za pomocą rozpuszczalników organicznych, pozwoliło na uzyskanie wysokiej zawartości polifenoli w ekstraktach. Poczynione obserwacje wpisują się w nurt tzw. „zielonej chemii”, w tym wypadku przyczyniając się do rozwoju przyjaznych dla środowiska metod ekstrakcji. Interesującym wnioskiem sformułowany w pracy jest również wykazanie, że czynnikami determinującymi wydajność odzysku polifenoli przy zastosowaniu SWE oraz aktywność antyoksydacyjną ekstraktów są temperatura i czas ekstrakcji. W mniejszym stopniu jest to uzależnione od stosunku cząstek stałych do rozpuszczalnika.

6. „Individual phenolic acids in distillery stillage inhibit its biomethanization”, *Energies* 15, 5377 (2022);

W publikacji P6 Doktorantka potwierdziła słuszność kolejnej hipotezy badawczej, zgodnie z którą rodzaj oraz stężenie kwasów fenolowych wpływają na potencjał metanowy wywaru gorzelniczego. W tym celu przeprowadziła porcjowe testy fermentacji metanowej z dodatkiem wybranych kwasów fenolowych (p-OH benzoowego, synapowego, wanilinowego, p-kumarowego, syringowego i ferulowego) oraz ich mieszanin, każdorazowo zakładając następujące wartości stężenia: 0,5 g/l, 1,0 g/l, 1,5 g/l, 2,0 g/l i 4,0 g/l. Podczas eksperymentów analizowała ilość produkowanego metanu, skład biogazu oraz występowanie metanogenicznych archeonów. W pracy dowiedziono, że analizowane kwasy fenolowe występujące jako indywidualne związki w stężeniu kształtującym się w zakresie 0,5 – 1,0 g/l powodowały dwukrotne zmniejszenie szybkości produkowanego metanu. Analogiczne zjawisko występowało, gdy do hodowli dodawano mieszaninę tych związków, aczkolwiek przy wyższej wartości stężenia (1,5 g/l). Kwasami o najsilniejszych właściwościach inhibitujących okazały się kwasy wanilinowy, p-kumarowy, syringowy i ferulowy. Ponadto wykazano, że obecność kwasów fenolowych zmniejszała liczebność metanogenów acetoklastycznych i wodorotroficznych.

Lektura rozprawy dała podstawę do sformułowania kilku pytań i uwag o polemicznym charakterze. Nie mają one jednak wpływu na moją końcową ocenę wartości merytorycznej rozprawy:

1. W publikacji P1 omawiając procesy fizyko-chemiczne wykorzystywane do oczyszczania wywaru gorzelniczego wymieniono między innymi proces „koagulacji/flokulacji”. Proszę wyjaśnić dlaczego użyto takiej nazwy procesu

(koagulacja składa się z fazy destabilizacji i flokulacji, zatem pod pojęciem „koagulacja” kryje się również „flokulacja”).

2. W pracy oprócz konwencjonalnej ekstrakcji polifenoli z wywaru gorzelniczego wykorzystano ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami oraz mikrofalami. Czy widzi Pani możliwość zastosowania innych metod pozwalających na zwiększenie skuteczności ekstrakcji oraz uzyskanie ekstraktu o jak najwyższej aktywności antyoksydacyjnej.
3. W pracy P6 zakres analityczny obejmował między innymi określenie składu biogazu. Proszę wyjaśnić w jaki sposób uniknięto rozpuszczania CO₂ w reaktorach testowych.
4. Pragnę również zwrócić uwagę na następujące sformułowanie użyte w polskojęzycznym streszczeniu: „wydajność i skład polifenoli”; wydaje się, że stanowi to skrót myślowy dla określenia wydajności ekstrakcji polifenoli czy też wydajności odzysku polifenoli.

Podsumowując, stwierdzam, że oceniana praca doktorska posiada wysoki poziom merytoryczny oraz wnosi nowe elementy poznawcze w obszarze odzysku surowców ze strumieni odpadowych, a w szczególności w zakresie odzysku polifenoli z wywaru gorzelniczego. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dokumentuje znaczną, ogólną wiedzę Doktorantki, a także umiejętność planowania i prowadzenia przez Nią badań naukowych, opracowania i krytycznej dyskusji wyników oraz wyciągania wniosków. Tym samym oceniana rozprawa doktorska spełnia wymagania formalne dla tego typu prac zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Wiolety Mikuckiej do dalszego etapu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie doceniając bardzo wysoki poziom merytoryczny oraz zawarte w rozprawie nowe elementy poznawcze stwierdzam, że w mojej ocenie praca zasługuje na wyróżnienie.

M. Sudar