

dr hab. Danuta Wojcieszynska, prof. UŚ  
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska  
Wydział Nauk Przyrodniczych  
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice  
tel. 32 2009567  
e-mail [danuta.wojcieszynska@us.edu.pl](mailto:danuta.wojcieszynska@us.edu.pl)

Katowice, dn. 08.02.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Marii Bachosz  
pt. „ Reaktywna konwersja składników biomasy z równoczesną regeneracją kofaktora  
enzymatycznego”**

*Podstawą opracowania recenzji było pismo Dziekana Wydziału Technologii  
Chemicznej prof. dr hab. inż. Ewy Kaczorek z dnia 20.12.2022 w sprawie  
wykonania oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Bachosz.*

Praca doktorska Pani mgr inż. Karoliny Bachosz pt. „Reaktywna konwersja składników biomasy z równoczesną regeneracją kofaktora enzymatycznego” została wykonana pod promotorstwem prof. dra hab. inż. Teofila Jesionowskiego oraz dra hab. inż. Jakuba Zdarty, który sprawował rolę promotora pomocniczego rozprawy. Pani mgr inż. K. Bachosz w rozprawie podjęła się opracowania zagadnienia interesującego w ostatnich latach nie tylko chemików, mikrobiologów i biochemików, ale przede wszystkim biotechnologów. Wynika to z jednej strony z zainteresowania produktami powstałymi w wyniku konwersji biomasy, takimi jak węglowodory, biopaliwa oraz związki o wysokim potencjale użytkowym, a z drugiej strony poszukiwania rozwiązań mających na celu obniżenie kosztów stosowania metod enzymatycznych w konwersji biomasy do poszukiwanych, wartościowych, niskocząsteczkowych produktów. Wysokie koszty takich procesów, czyniące znane rozwiązania mało opłacalnymi, związane są z koniecznością zastosowania synergicznie działających enzymów wchodzących w skład kompleksów celulolitycznych, lignolitycznych czy ksylanolitycznych, niestabilnością stosowanych enzymów oraz wymogiem obecności drogich kofaktorów w reakcjach oksydoredukcyjnych.

Doktorantka w swojej rozprawie doktorskiej podjęła się realizacji celu, którym było wytworzenie systemów biokatalitycznych opartych o enzymy klasy oksydoreduktaz, głównie dehydrogenaz, koimmobilizowanych na nośnikach nieorganicznych i membranach filtracyjnych, pod kątem wykorzystania powstałych układów w procesach jednoczesnej



konwersji składników biomasy i regeneracji kofaktora enzymatycznego oraz separacji produktów. Realizacja tak postawionego celu obejmowała dobór odpowiedniego nośnika, technik immobilizacji, optymalizację warunków prowadzenia koimmobilizacji oraz weryfikację efektywności tego procesu. Uzyskane systemy poddano analizie oraz przetestowano w procesach konwersji biomasy z jednoczesną regeneracją kofaktora. Dalsze etapy obejmowały próby wyodrębniania produktów z mieszaniny poreakcyjnej z wykorzystaniem reaktora membranowego. Zwieńczeniem założonych celów była realizacja działań związanych z opracowaniem układów biokatalitycznych w konwersji składników biomasy prowadzonych z roztworów rzeczywistych po wstępnej obróbce.

Pani mgr inż. Karolina Bachosz swoją rozprawę doktorską przygotowała w formie zestawu pięciu oryginalnych prac opublikowanych w czasopismach o wysokich wartościach Impact factor, - łączna wartość współczynnika oddziaływania prac wchodzących w skład rozprawy wynosi 26,34 wg bazy Journal Citation Reports (JCR), a łączna wartość punktów MEiN to 390. Dwie prace opublikowano w *Bioorganic Chemistry*, którego IF wynosi 5,307 oraz po jednej pracy w czasopismach: *Journal of Environmental Chemical Engineering* (IF 7,968), *Environmental Technology & Innovation* (IF 7,75) oraz *Bioresource Technology Reports*. Udział doktorantki w tych publikacjach jest wiodący, co zostało potwierdzone stosownymi oświadczeniami współautorów publikacji. Do zestawu prac autorka dołączyła obszernie opracowanie zawierające streszczenie w języku polskim i angielskim. Kolejnym rozdziałem jest Wprowadzenie teoretyczne, które rekompensuje brak pracy przeglądowej w zestawie publikacji stanowiących podstawę rozprawy. Dokonany przegląd literatury przez doktorantkę wnosi element wzrastającego zainteresowania czytelnika w miarę poznawania faktów uzasadniających podjęcie tematu pracy doktorskiej i jednocześnie jest monograficznym ujęcie danych literaturowych dotyczących rozprawy. W kolejnym rozdziale znajdujemy ideę poznawczą i precyzyjnie określony cel pracy. W obszernym rozdziale opis i dyskusja osiągnięć badawczych syntetycznie omówiono wyniki, całość zamyka podsumowanie z wnioskami i perspektywy rozwoju badań oraz bogaty spis literaturowy. Ponadto w tej części pracy zamieszczono również informacje o aktywności naukowej doktorantki.

Pod względem merytorycznym prace stanowią jednolity, monotematyczny cykl publikacji i w sposób logiczny wiążą całość przedstawionej problematyki. Z uwagi na fakt, że wszystkie prace zostały już szczegółowo zrecenzowane przez specjalistów z redakcji czasopism, w których je wydrukowano, pozostała mi rola dokonania oceny całościowej znaczenia naukowego każdej z tych prac.

W pierwszej publikacji cyklu zatytułowanej „*Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*” przedstawiono wyniki otrzymane w wyniku koimmobilizacji dehydrogenazy ksylozy z dehydrogenazą alkoholową na materiale kompozytowym magnetyt-krzemionka. Układ ten zapewniał równoczesną konwersję

ksylozy do kwasu ksylonowego i regenerację utlenionej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD<sup>+</sup>). Autorka zoptymalizowała warunki działania układu uzyskując wysoką wydajność produkcji kwasu ksylonowego. Ponadto opracowany system zachowywał po 5 cyklach reakcyjnych ponad 60% początkowej aktywności oraz odznaczał się dużą stabilnością w trakcie przechowywania.

Kolejne prace są produktem konsekwentnie realizowanego celu pracy. W publikacji „*A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions*” Doktorantka kontynuowała badania nad koimmobilizacją dehydrogenazy ksylozy z dehydrogenazą alkoholową na kompozycie magnezyt-krzemionka. W ramach przeprowadzonych badań doktorantka określiła wpływ takich parametrów procesowych, jak stosowany roztwór buforowy, wykazując przewagę stosowania buforu TAPSO. Ponadto zaobserwowała obniżoną wydajność biokonwersji w obecności niektórych kwasów organicznych, a parametry kinetyczne biokatalizy wskazały na zmniejszenie powinowactwa enzymów do substratów po ich unieruchomieniu. Ponadto z powodzeniem wyizolowano z mieszaniny poreakcyjnej produkt- kwas ksylonowy.

W publikacji „*Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor regeneration*” podjęto próbę koimmobilizacji dehydrogenazy ksylozy z dehydrogenazą alkoholową na membranie nanofiltracyjnej XN45 i wykorzystano uzyskany układ w enzymatycznym reaktorze membranowym. W zoptymalizowanych warunkach opracowany układ umożliwiał uzyskiwanie 99% wydajności w procesie biokonwersji ksylozy z równoczesną regeneracją kofaktora oraz separacją produktu.

W kolejnej publikacji „*A novel strategy for the application of levulinic acid with simultaneous NAD<sup>+</sup> regeneration and membrane separation of products*” przedstawiono rezultaty zastosowania, jako enzymu regenerującego kofaktor, dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej. Enzym ten nie tylko umożliwia skuteczną regenerację kofaktora, ale także przekształcenie jednego z inhibitorów procesów konwersji biomasy, jakim jest kwas lewulinowy, do związku o wysokim potencjale użytkowym - kwasu 4-hydroksywalerianowego. Wynikiem przeprowadzonych badań było uzyskanie w optymalnych warunkach 98% wydajności uzyskiwania kwasu 4-hydroksywalerianowego, kwasu ksylonowego i kwasu glukonowego z zachowaniem wysokiej stabilności układu biokatalitycznego.

Ostatnia publikacja cyklu „*Multienzymatic conversion of monosaccharides from birch biomass after pretreatment*” stanowi podsumowanie dotychczasowych badań i pomost pomiędzy badaniami na poziomie nauk podstawowych a praktycznym zastosowaniem wyników. W ramach badań przeprowadzono konwersję ksylozy i glukozy pochodzących z roztworu rzeczywistego po obróbce wstępnej drewna brzozy. W tym celu zastosowano multienzymatyczny system biokatalityczny, oparty na koimmobilizowanych, na powierzchni i w porach mezoporowatej krzemionki SBA-15, dehydrogenazie 3-hydroksymaślanowej,



dehydrogenazie ksylozy i dehydrogenazie glukozy, zdolny do konwersji monosacharydów z jednoczesną regeneracją kofaktora. W zoptymalizowanych warunkach wykazano ponad 95%, wydajność produkcji kwasu ksylonowego, kwasu glukonowego i kwasu 4-hydroksywalerianowego. Opracowany system biokatalityczny pozwalał na jego wielokrotne zastosowanie w biokatalizie bez znaczącego spadku wydajności.

Uzyskane przez mgr inż. K. Bachosz wyniki są niezwykle obiecujące, o dużym znaczeniu praktycznym. Oceniając prezentowany cykl prac chciałabym podkreślić, iż istotnym elementem każdej z nich jest dyskusja wyników, która daje jasny pogląd na teoretyczne i praktyczne znaczenie prowadzonych badań nad enzymatyczną konwersją składników biomasy w systemach opartych na koimmobilizowanych enzymach z możliwością regeneracji kofaktora i separacją produktów.

Po analizie całego zestawu pięciu prac mogę stwierdzić, że powstał on z przemyślanego programu badawczego, a przyjęte założenia dla poszczególnych badanych zagadnień zostały właściwie zweryfikowane i wyjaśnione. Na uwagę zasługuje niezwykle logiczny układ przeprowadzonych badań. Podjęcie przez Doktorantkę tak szerokiego zakresu badań zasługuje na pochwałę, bowiem świadczy o Jej dużej dociekliwości.

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe Doktorantki w zakresie realizowanego kierunku badań uznaję następujące dokonania:

- ✓ Opracowanie systemu koimmobilizacji dehydrogenazy ksylozy z dehydrogenazą alkoholową na membranie nanofiltracyjnej i zastosowanie enzymatycznego reaktora membranowego, co skutecznie poprawiało stabilności biokatalizatorów, umożliwiając ich wielokrotne wykorzystanie, a także pozwalało na wytworzenie układu enzymatycznego zdolnego do skutecznej biokonwersji ksylozy, regeneracji kofaktora i jednoczesnej separacji produktu końcowego.
- ✓ Wykorzystanie dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej do regeneracji kofaktora, co równocześnie umożliwiło przekształcenie jednego z inhibitorów procesów konwersji biomasy, jakim jest kwas lewulinowy, do związku o wysokim potencjale użytkowym, jakim jest kwas 4-hydroksywalerianowy.
- ✓ Uzyskanie multienzymatycznego systemu biokatalitycznego, składającego się z koimmobilizowanych na mezoporowatej krzemionce SBA-15 dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej, dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy glukozy, umożliwiającego biokonwersję ksylozy i glukozy pochodzących z roztworu rzeczywistego po obróbce wstępnej drewna brzozy do wartościowych produktów: kwasu ksylonowego, kwasu glukonowego i kwasu 4-hydroksywalerianowego z dużą wydajnością, równocześnie zachowującego stabilność w kolejnych cyklach procesowych oraz podczas przechowywania.

- ✓ Opracowanie skutecznej metody separacji produktów.

Dysertacja napisana jest z niezwykłą starannością, jednak w opracowaniu nie udało się uniknąć pewnych nieścisłości, takich jak:

- ✓ zamieszczenie na rysunku 12 wzorów form zredukowanych koenzymów nikotynoamidowych, podpisując je jako formy utlenione
- ✓ niezręczne sformułowanie „para elektronów wodorkowych” zamiast jon wodorkowy (str. 53)
- ✓ niejasny mechanizm redukcji  $\text{NAD}^+$ - wskazanie miejsca przyłączenia elektronu do azotu pierścienia nikotynamidu, podczas gdy atak jonu wodorkowego następuje na pozycję czwartą (C-4) tego pierścienia (str. 53)
- ✓ podział enzymów na grupy, zamiast na klasy (str. 10).

Ponadto, celem dyskusji, mam pytania do Doktorantki :

- ✓ Jakie branże wg Doktorantki powinny być zainteresowane opracowanymi systemami opartymi na koimmobilizowanych enzymach z regeneracją kofaktora?
- ✓ Czy Doktorantka rozważała/rozważa wykorzystanie opracowanych układów biokatalitycznych w większej skali i czy zamierza wejść podczas tych badań w kooperację z podmiotami gospodarczymi?

Przytoczone przeze mnie uwagi i pytania nie wynikają z negatywnej oceny tych elementów pracy, a tylko są sugestiami do rozważenia w dalszych badaniach i wynikają z naukowego zainteresowania wynikami uzyskanymi przez Doktorantkę.

Podsumowując, stwierdzam, że oceniana przeze mnie praca jest solidnie wykonaną, interesującą, nie tylko ze względu na problem badawczy, ale również na otrzymane wyniki o dużym znaczeniu praktycznym, dysertacją. Struktura autoreferatu i prac wchodzących w skład jest bez zarzutu, opracowanie metodyczne bardzo dobre, wyniki zestawione w publikacjach wchodzących w skład rozprawy oraz w obszernym opracowaniu je poprzedzającym w postaci tabel, oryginalnych widm, rysunków poglądowych, zdjęć nie budzą zastrzeżeń ani wątpliwości, terminologia właściwa, piśmiennictwo bogate.

Na uwagę zasługuje również, przedstawiony w dysertacji, dorobek naukowy Doktorantki, który jest imponujący. Składa się na niego: 13 publikacji zamieszczonych w indeksowanych czasopismach, 3 rozdziały w monografiach, jedno zgłoszenie patentowe, 4 długoterminowe staże naukowe, udział w projektach naukowych oraz kierownictwo w projekcie finansowanym w ramach programu im. Mieczysława Bekkera, liczne wystąpienia i postery na konferencjach, zarówno krajowych, jak i międzynarodowych.

### Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest wartościowym opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Bachosz spełnia warunki określone Ustawą o stopniach i tytułach naukowych – uwzględnione w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669). Wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Poznańskiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Jednocześnie, w uznaniu wartościowych, oryginalnych wyników, które zostały opublikowane w specjalistycznych, międzynarodowych czasopismach naukowych, rekomenduję wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Signed by /  
Podpisano przez:

Danuta  
Wojcieszńska  
Uniwersytet Śląski w  
Katowicach

Date / Data:  
2023-02-08 14:04

.....  
dr hab. Danuta Wojcieszńska, prof. UŚ

