



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Poznań University of Life Sciences

**Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Autoreferat

Wojciech Białas

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Poznań 2017

1. **Imię i nazwisko:** Wojciech Białas
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

Doktor inżynier nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia człowieka, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu; 2007. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Optymalizacja separacji membranowej zawiesin i homogenatów komórkowych”.

Magister inżynier rolnictwa, specjalność biotechnologia, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Rolniczy, 2001. Temat pracy magisterskiej: „Optymalizacja współczynnika podziału ferryrytyny w wodnych układach dwufazowych siarczan magnezu glikol polietylenowy” .

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.**

2005-2007 Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, instruktor.

2007 - 2008 Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, asystent.

2008 do chwili obecnej Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (wcześniej Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu), Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, adiunkt

4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

a) **tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:**

### **Badania nad wpływem wybranych modyfikacji technologicznych na proces produkcji bioetanolu I generacji**

b) **(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),**

*(wartość podanego wskaźnika impact factor zgodna z rokiem opublikowania)*

1. **W. Bialas**, D. Szymanowska, W. Grajek: Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling. *Bioresource Technology* 2010, 101 (9), 3126-3131.

**IF = 4,365 MNiSW<sub>2016</sub> = 45 pkt.**

2. G. Lewandowicz, **W. Bialas**, B. Marczewski, D. Szymanowska: Application of membrane distillation for ethanol recovery during fuel ethanol production. *Journal of Membrane Science* 2011, 375 (1-2), 212-219.

**IF = 3,85 MNiSW<sub>2016</sub> = 45 pkt**

3. **W. Bialas**, E. Celińska, R. Dembczyński, D. Szymanowska, M. Nowacka, T. Jesionowski, W. Grajek: Cross-flow microfiltration of fermentation broth containing native corn starch. *Journal of Membrane Science* 2013, 427, 118-128.

**IF = 4,908 MNiSW<sub>2016</sub> = 45 pkt.**

4. **W. Bialas**, A. Czerniak, D. Szymanowska-Powalowska: Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation of corn starch for ethanol production. *Acta Biochimica Polonica*, 2014, 61(1), 153-162.

**IF = 1,153 MNiSW<sub>2016</sub> = 30 pkt**

Sumaryczny IF prac wskazanych jako osiągnięcie: **14,27**; suma punktów MNiSW<sub>2016</sub>: **150**;  
**liczba cytowań (WoS): 75**

- c) **omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

## **Wprowadzenie**

Obserwowane w ostatnich latach zwiększone zainteresowanie biopaliwami związane jest z nieustannym wzrostem zapotrzebowania na energię oraz koniecznością zachowania stabilnych warunków klimatycznych i ekologicznych w skali globalnej. Chodzi tu przede wszystkim o kontrolę oraz ograniczenie emisji gazów cieplarnianych takich jak CO<sub>2</sub> oraz N<sub>2</sub>O. W latach 2009-2015 podstawowym aktem prawnym określającym drogę rozwoju rynku biopaliw w Unii Europejskiej była Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/28/WE z 23 kwietnia 2009 r. w sprawie promowania stosowania energii ze źródeł odnawialnych

(OZE). Zobowiązywała ona kraje członkowskie do opracowania krajowego planu działania w zakresie energii ze źródeł odnawialnych. W trosce o ochronę środowiska naturalnego każde państwo członkowskie zapewniło między innymi, że udział energii ze źródeł odnawialnych we wszystkich rodzajach transportu w 2020 r. wynosił będzie co najmniej 10 % końcowego zużycia energii w transporcie w tym państwie członkowskim. W Polsce cel określony w dyrektywie jest realizowany głównie poprzez modyfikację składu paliw ciekłych polegającą na zastosowaniu dodatku odpowiednich biokomponentów I generacji, bioetanolu oraz biodiesla. Według danych przedstawionych w Krajowym Planie Działania w zakresie energii ze źródeł odnawialnych, bioetanol II generacji będzie stosowany na szeroką skalę jako biokomponent dopiero po 2017 roku. Natomiast według założeń „Polityki energetycznej Polski do 2030 roku” rozpoczęcie produkcji bioetanolu II generacji, biodiesla II generacji i biowodoru planowane jest dopiero na lata 2020-2025. Tym samym wydaje się, że szczególnie istotne z punktu widzenia obligatoryjnego zwiększania udziału OZE w transporcie, będzie wspieranie działań mających na celu udoskonalanie istniejących, jak i opracowywanie nowych technologii produkcji biopaliw zarówno I, jak i II generacji. Ze względu na to, że produkcja biopaliw I generacji bazujących na roślinach spożywczych i paszowych związana jest z ryzykiem pośredniej zmiany użytkowania gruntów Unia Europejska wprowadziła pewne ograniczenia związane z wykorzystaniem wspomnianych biokomponentów. Zgodnie z dyrektywą 2015/1513 z dnia 9 września 2015 r., zmieniającej dyrektywę 2009/28/WE udział energii z biopaliw wyprodukowanych z roślin zbożowych i innych roślin wysokoskrobiowych, roślin cukrowych i oleistych oraz roślin uprawianych przede wszystkim do celów energetycznych na użytkach rolnych jako uprawy główne nie może przekraczać 7 % końcowego zużycia energii w sektorze transportu w państwach członkowskich w 2020 r. Dyrektywa zwraca jednak uwagę na to, że dopuszczalne są pewne wyjątki od wspomnianej reguły. Dotyczy to np. sytuacji w której produkcja danego biopaliwa równa jest ilości dodatkowej produkcji osiągniętej przez inwestowanie w lepszą produktywność, przekraczającą poziom, które zostałyby osiągnięte w oparciu o dotychczas stosowane rozwiązania. Tym samym państwa członkowskie i Komisja za pośrednictwem wspomnianej dyrektywy zachęcają do opracowywania i wykorzystywania technologii czy systemów zgodnych z szeroko pojętą polityką zrównoważonego rozwoju. Technologia produkcji biokomponentów takich jak bioetanol to zwykle trzy następujące po sobie etapy polegające na konwersji wyjściowego surowca (skrobiowego lub celulozowego) do substratu łatwo ulegającego fermentacji (najczęściej glukozy), fermentacji przy użyciu odpowiedniego biokatalizatora (komórek drożdży lub bakterii) oraz separacji i oczyszczaniu produktu. Każdy

z tych etapów może podlegać określonym modyfikacjom, w wyniku których uzyskujemy całkowicie nowy proces, o potencjalnie lepszych parametrach technologicznych.

### **Cel pracy**

W pracach wskazanych jako osiągnięcie naukowe, moje zainteresowania skupiały się na ocenie wpływu wybranych modyfikacji technologicznych na proces produkcji bioetanolu I generacji. Prace badawcze dotyczyły między innymi optymalizacji procesu jednoczesnej hydrolizy i fermentacji skrobi kukurydzianej nie podanej procesowi kleikowania. W ramach prowadzonych badań opracowano także model matematyczny opisujący kinetykę wspomnianego procesu. W kolejnym etapie zbadano wpływ wybranych zabiegów technologicznych mających na celu ograniczenie zużycia wody procesowej na wydajność produkcji bioetanolu. Ostatni etap badań związany był z oceną możliwości zastosowania wybranych technik membranowych (mikrofiltracji oraz destylacji membranowej) w procesie separacji bioetanolu z płynów pofermentacyjnych.

### **Wyniki badań**

W celu uzyskania praktycznie całkowitej konwersji skrobi do cukrów fermentujących wymagane jest zastosowanie dwóch enzymów:  $\alpha$ -amylazy oraz glukoamylazy [1]. Surowiec skrobiowy jest mieszany z wodą oraz termostabilną  $\alpha$ -amylazą i podgrzewany do temp. 110°C za pomocą pary wodnej. Po upływie około 15 min. mieszaninę chłodzi się do temp. 80 - 90°C i dodaje kolejną porcję  $\alpha$ -amylazy. Wysoka temperatura oraz obecny w mieszaninie enzym powodują, że skrobia ulega procesowi kleikowania i upłynniania, czemu towarzyszy wyraźny spadek lepkości zacieru. W trakcie tego procesu następuje hydroliza skrobi głównie do maltozy, maltotriozy oraz dekstryn. Po schłodzeniu mieszaniny do temperatury około 60°C podawana jest glukoamylaza, co ma na celu konwersję wymienionych wyżej związków do glukozy i maltozy [2]. W trzecim etapie do zacieru, po jego uprzednim schłodzeniu do temperatury około 30 - 32°C, wprowadza się zawiesinę drożdży gorzelniczych. Istotną wadą opisanego procesu jest wysokie zużycie energii podczas etapu zacierania. Według stosownych szacunków, energia zużywana w trakcie przygotowania substratu stanowi około 30 - 40 % całkowitej wartości energii wymaganej do wyprodukowania bioetanolu [3]. Istnieje kilka alternatywnych rozwiązań pozwalających na znaczne zmniejszenie zużycia energii podczas produkcji bioetanolu. Jedną z proponowanych metod jest zastosowanie enzymów amylolitycznych o całkowicie nowych właściwościach, pozwalających na hydrolizę natywnej skrobi, nie poddanej procesowi kleikowania. Stosowane dotychczas amylazy wykazują wysoką aktywność hydrolityczną wyłącznie w stosunku do skleikowanej skrobi. Jednak Sandsted i Gates [4] dowiedli, że istnieje możliwość hydrolizy natywnej skrobi, a stopień

konwersji ziaren skrobiowych do cukrów fermentowalnych zależy zarówno od pochodzenia enzymu jaki i botanicznego pochodzenia samego substratu. Badania prowadzone przez Ueda i wsp., [5], Miah i Ueda [6] oraz Mikami i wsp., [7] sugerowały, że źródłem tego rodzaju enzymów mogą być między innymi *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae* oraz *Aspergillus kawachi*. Dzięki postępowi jaki dokonał się w ostatnich latach w biologii molekularnej, na rynku pojawił się preparat enzymatyczny wykazujący aktywność amylolityczną w stosunku do natywnej skrobi, STARGEN 001. Preparat stanowi kompleks dwóch enzymów: termostabilnej  $\alpha$ -amylazy pochodzącej z *Aspergillus kawachi*, a produkowanej przez zmodyfikowany szczep *Trichoderma reesei* oraz glukoamylazy izolowanej z *Aspergillus niger*. Zastosowanie tego preparatu umożliwia pominięcie energochłonnego etapu kleikowania i upłynniania skrobi prowadzonego na gorąco, co tym samym znacznie zmniejsza całkowite koszty procesu. Poza badaniami, mającymi na celu opracowanie nowych preparatów enzymatycznych dużo uwagi poświęca się także optymalizacji samego procesu fermentacji. Powszechnie wiadomo, że hydroliza skrobi katalizowana przez enzymy amylolityczne podlega silnej represji przez uwalniany w jej trakcie produkt. Jedną z metod pozwalających na wyeliminowanie tego niekorzystnego zjawiska jest jednoczesna hydroliza i fermentacja (ang. SSF, simultaneous saccharification and fermentation), podczas której glukoza jest na bieżąco metabolizowana przez komórki drożdży. Proces jednoczesnej hydrolizy i fermentacji jest bardzo złożony, bowiem w tym samym czasie i środowisku mają miejsce różnego rodzaju wzajemnie ze sobą powiązane przemiany prowadzące w rezultacie do powstania produktu końcowego jakim jest etanol. Złożoność układu może być zilustrowana faktem, że zmniejszenie szybkości jednej z przemian powoduje zazwyczaj hamowanie kolejnej w skutek niedoboru substratu lub nagromadzenia jednego z pośrednich produktów. Z tego względu w pierwszym etapie podjęto prace mające na celu określenie optymalnych warunków jednoczesnej hydrolizy i fermentacji zacierów kukurydzianych nie poddanych wcześniej procesowi kleikowania przy użyciu enzymów hydrolizujących natywną skrobię i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, rasy Ethanol Red<sup>®</sup>. Należy zauważyć, że poszukiwanie optymalnych warunków dla prowadzenia tego rodzaju procesów klasyczną, jednowymiarową metodą, gdzie modyfikacji podlega tylko jeden z czynników, podczas gdy pozostałe przyjmują stałe wartości jest bardzo czasochłonne i kosztowne. Poza tym istotną wadą tego rodzaju podejścia do badań jest brak możliwości wykrycia ewentualnych interakcji jakie mogą występować pomiędzy poszczególnymi czynnikami. W takim przypadku alternatywą dla podejścia klasycznego jest zastosowana w omawianych badaniach metoda powierzchni odpowiedzi (ang. RSM, Response Surface Method) stanowiąca zestaw technik

matematycznych i statystycznych. RSM jest szczególnie użyteczna, gdy badane zjawisko podlega wpływowi wielu czynników i gdy celem jest określenie optymalnych parametrów procesu spełniających założone na wstępie kryteria. W badaniach wykorzystano trzyczynnikowy ( $k = 3$ ), pięciopoziomowy centralny plan kompozycyjny (CCD). Jako zmienne niezależne w eksperymencie przyjęto stężenie surowca w zacierze ( $25 < X_1 < 35\%$ ), dawkę enzymów ( $0,75 < X_2 < 3,0$  ml/kg s.m. substratu) oraz pH zacieru ( $3,5 < X_3 < 5,0$ ). Analizowanymi zmiennymi zależnymi było stężenie bioetanolu oraz całkowita wydajność procesu.

Uzyskane podczas badań końcowe stężenia bioetanolu w zacierach odfermentowanych zawierało się w zakresie 79,09 – 120,02 g/L. Maksymalne stężenie uzyskano w hodowli, w której stężenie surowca w zacierze wносиło 35%, podczas gdy dawka enzymu była równa 3 ml/kg s.m. mąki. Natomiast minimalne stężenie uzyskano w hodowli, o stężeniu zacieru równym 30% i dawce enzymu 0,3 ml/kg s.m. mąki. Stężenie bioetanolu było dodatnio skorelowane ze stężeniem zacieru, wpływ pH uznano natomiast za nieistotny statystycznie ( $p > 0,05$ ) i dlatego też ten czynnik został usunięty z modelu regresji. W przypadku dawki enzymu za istotne statystycznie uznano zarówno efekty liniowe jak i kwadratowe, przez co zależność pomiędzy tym czynnikiem a zawartością bioetanolu miała kształt nieliniowy, z wyraźnie zaznaczonym maksimum odpowiadającym dawce nieznacznie przekraczającej 2,0 ml/kg s.m. mąki. Na podstawie analizy regresji stwierdzono ponadto, że najistotniejszy wpływ na końcowe stężenie bioetanolu ma dawka stosowanego preparatu enzymatycznego. Nie stwierdzono natomiast istotnego związku pomiędzy stężeniem bioetanolu i całkowitą wydajnością procesu wyznaczoną w stosunku do wydajności teoretycznej (współczynnik korelacji  $r = 0,22$  przy  $p = 0,35$ ). Dla wielu wariantów hodowli zaobserwowano, że zwiększaniu stężenia zacieru towarzyszy z jednej strony wzrost końcowego stężenia bioetanolu, przy jednoczesnym znacznym spadku wydajności. Maksymalną wydajność procesu fermentacji wynoszącą 86,91 % uzyskano w hodowli o stężeniu zacieru równym 23 % i dawce enzymu 1,875 ml/kg s.m. mąki, natomiast najniższą wydajność równą 51,23% zanotowano, gdy stężenie zacieru wynosiło 30 %, a dawka enzymu była równa 0,3 ml/kg s.m. mąki. Zdecydowanie silniejszy wpływ na wydajność miało stężenie zacieru aniżeli dawka preparatu enzymatycznego. Jest to więc odwrotna prawidłowość do tej, jaką zanotowano w przypadku analizy zmian stężenia bioetanolu. Uzyskane dane potwierdzają tym samym, że czynnikiem decydującym o osiągnięciu wysokiego stężenia bioetanolu była dostępność cukrów fermentujących związana z szybkością hydrolizy skrobi, zależną z kolei od zastosowanej dawki preparatu enzymatycznego. Tym samym podczas optymalizacji należało

poszukiwać parametrów (wartości zmiennych niezależnych) stanowiących kompromis pozwalający na uzyskanie wysokiej koncentracji bioetanolu w zacierze odfermentowanym oraz wysokiej wydajności przy możliwie minimalnej zawartości nieodfermentowanej skrobi oraz cukrów fermentujących. Podczas optymalizacji zastosowano procedurę opracowaną przez Derringer [8], która zakłada przekształcenie wartości każdej z wielkości wyjściowych w wartości użyteczności, które mogą się zmieniać od 0,0 dla niepożądanych do 1,0 dla bardzo pożądanых. Dzięki temu jednoczesna optymalizacja dwóch wielkości wyjściowych uprościła się do znalezienia wartości wielkości wejściowych, które maksymalizują całkowitą użyteczność odpowiedzi wielkości wyjściowych. W rezultacie wykonanych obliczeń stwierdzono, że optymalne parametry prowadzenia procesu to stężenie zacieru ( $X_1$ ), dawka enzymu ( $X_2$ ) oraz pH ( $X_3$ ) wynoszące odpowiednio: 25 %, 2,05 ml/kg s.m. mąki oraz pH równe 5,0.

Proces jednoczesnej hydrolizy i fermentacji, zastosowany na szeroką skalę po raz pierwszy w latach siedemdziesiątych jest stosunkowo dobrze poznany i opisany w literaturze przedmiotu, o czym świadczą liczne prace naukowe [9, 10]. Niewiele jest jednak danych na temat modelowania kinetyki tego procesu w przypadku gdy substratem jest skrobia natywna. Z tego względu zdecydowano się na opracowanie modelu opisującego kinetykę tej przemiany. Podstawą do sformułowania modelu były dane eksperymentalne zebrane podczas fermentacji prowadzonej w bioreaktorze oraz równanie kinetyki Michaelisa-Menten uwzględniające zjawiska inhibicji związane z substratem (stała  $K_{St}$ ) oraz produktem (stała  $K_{Glu}$ ). W trakcie badań nad tym zagadnieniem przyjęto między innymi, że kompleks enzymatyczny składający się z  $\alpha$ -amylazy oraz glukoamylazy stanowi jednorodny układ katalityczny, którego właściwości opisane są za pomocą odpowiednich stałych kinetycznych. Tego rodzaju uproszczenie zastosowano także w innych pracach związanych z badaniem kinetyki jednoczesnej hydrolizy i fermentacji skrobi [11, 12]. Poza tym założono, że właściwa szybkość wzrostu komórek drożdży oraz wytwarzania bioetanolu zależy od początkowego stężenia skrobi oraz szybkości uwalniania glukozy. Wartości poszczególnych stałych kinetycznych wyznaczono metodami estymacji nieliniowej korzystając z programu Matlab i Simulink (The Mathworks, USA).

Na podstawie analizy wartości stałych kinetycznych stwierdzono, że enzymy wchodzące w skład badanego kompleksu enzymatycznego są hamowane wyłącznie przez glukozę ( $K_{Glu} = 0.0857 \text{ kg/m}^3$ ), wpływ stężenia substratu można natomiast pominąć ( $K_{St} = 999.98 \text{ kg/m}^3$ ). Potwierdzono tym samym, że w procesie jednoczesnej hydrolizy i fermentacji można stosować zacier o wysokim początkowym stężeniu substratu. Zauważono jednak, że



szybkość hydrolizy natywnej skrobi wyrażona za pośrednictwem stałej  $k_{st}$  jest blisko 100-krotnie niższa aniżeli szybkość analogicznej przemiany prowadzonej na skleikowanym substracie. Proces hydrolizy natywnej skrobi jest bardzo złożony, zakłada się, że na skutek aktywności glukoamylazy początkowo w strukturze granul tworzą się niewielkie otwory, w obrębie których następnie adsorbuje się  $\alpha$ -amylaza. Na skutek jej działania do roztworu uwalniane są oligosacharydy, stanowiące substrat dla glukoamylazy, która hydrolizuje je do glukozy. Jak wskazują zdjęcia wykonane techniką skaningowej mikroskopii elektronowej dzięki synergistycznemu działaniu obu enzymów liczba otworów, stanowiących swego rodzaju miejsca aktywne oraz ich średnica sukcesywnie rośnie, co w rezultacie prowadzi do postępującej w czasie degradacji struktury granul skrobiowej. Warto zauważyć, że łączenie procesu hydrolizy z fermentacją pozwala na utrzymanie stosunkowo niskiego stężenia glukozy w zacierze, co znacznie ogranicza stres osmotyczny działający na komórki w trakcie tradycyjnej fermentacji. Przeprowadzone badania udowodniły, że proces jednoczesnej hydrolizy i fermentacji może przebiegać wydajnie dla zacierów skrobiowych, bez stosowania wcześniejszej obróbki termicznej, która mogła zostać wyeliminowana dzięki zastosowaniu nowoczesnych preparatów enzymatycznych, scukrzających skrobię natywną. Poza tym produkcja bioetanolu w oparciu o technologię SSF pozwala znacznie zredukować koszty inwestycyjne, bowiem hydroliza i fermentacja prowadzone są w niskociśnieniowym bioreaktorze, wyposażonym w mieszadło oraz układ pozwalający na utrzymanie stałej temperatury na poziomie 32-35°C.

#### **Omówione wyżej wyniki opisano w pracy [13]:**

W. Białas, A. Czerniak, D. Szymanowska-Powałowska, Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation of corn starch for ethanol production, *Acta Biochim Pol*, 61 (2014) 153-162.

Ograniczenie obróbki termicznej substratu poprzedzającej fermentację to jedna z metod obniżenia kosztów produkcji bioetanolu. Innym, równie istotnym problemem związanym z funkcjonowaniem przemysłu fermentacyjnego jest bardzo duża ilość generowanych ścieków. Jest ona zależna od stopnia zaawansowania technologii produkcji i w skrajnych wypadkach może wynosić nawet 20 litrów na litr wyprodukowanego bioetanolu [14]. Poziom zużycia wody można obniżyć chociażby poprzez recyrkulację wybranych strumieni. Dotyczy to przede wszystkim zawracania wywaru uzyskiwanego po separacji frakcji stałej. Pewnym ograniczeniem dla tego rozwiązania może być akumulacja

niskocząsteczkowych substancji organicznych o temperaturze wrzenia wyższej od bioetanolu (przede wszystkim glicerolu) oraz rozpuszczalnych soli nieorganicznych. Dlatego też celem kolejnej fazy badań była ocena możliwości zastosowania procesu recyrkulacji wywaru podczas jednoczesnej hydrolizy i fermentacji zacierów zawierających nieskleikowaną skrobię kukurydzianą. Proces prowadzono metodą okresową w bioreaktorze laboratoryjnym o pojemności 5 litrów. Stosowano zacier o składzie ustalonym w wyniku optymalizacji stanowiącej pierwszy etap badań. Każdorazowo po zakończeniu fermentacji płyn pohodowlany poddawano destylacji okresowej na kolumnie destylacyjnej (UOP3CC, Armfield, UK). Uzyskaną w ten sposób ciecz wyczerpaną chłodzono do temp. 30°C i wirowano w wirówce laboratoryjnej. Supernatant wykorzystywano podczas przygotowywania zacieru dla kolejnej fermentacji. Stopień recyrkulacji wywaru wynosił 75%, wykonano 20 pełnych cykli produkcyjnych. Po zakończeniu każdej fermentacji analizowano skład zacierów odfermentowanych pod kątem zawartości etalonu, skrobi, glukozy, glicerolu, kwasu mlekowego, octowego, wybranych jonów metali oraz ciśnienia osmotycznego. Badano także liczebność komórek drożdży oraz bakterii kwasu mlekowego. Uzyskane wyniki porównano z wynikami hodowli prowadzonymi bez recyrkulacji wywaru.

Na podstawie zebranych danych stwierdzono, że recyrkulacja wywaru nie ma negatywnego wpływu na końcowe stężenie jak i produktywność bioetanolu. Porównywalne były także wydajności konwersji skrobi do bioetanolu, które wynosiły dla procesu z recyrkulacją oraz bez recyrkulacji odpowiednio  $83,38 \pm 4,62$  % oraz  $84,6 \pm 3,98$  %. Każdy kolejny proces produkcyjny był zbliżony do poprzedniego pod względem wydajności, pozostałości nieodfermentowanej skrobi oraz końcowego stężenia produktu. Istotne różnice zanotowano jedynie w odniesieniu do glukozy, w przypadku której końcowa zawartość w zacierze odfermentowanym obniżała się każdorazowo o około 0,49 g/l. Część glukozy była wykorzystywana do produkcji substancji ubocznych takich jak glicerol oraz kwas mlekowy, którego stężenie wzrastało w każdej kolejnej fermentacji średnio o 0,12 g/l. Odnotowany istotny wzrost stężenia tego metabolitu wynikał z obecności bakterii kwasu mlekowego pochodzących z surowców. Ich liczebność wynosiła w początkowej fazie procesu średnio  $1,0 \times 10^5$  jtk/ml i obniżała się trakcie fermentacji o cztery rzędy logarytmiczne. Wspomniana redukcja liczby komórek była prawdopodobnie wynikiem działania antybiotyku, którego stężenie w zacierze wynosiło 50 µg/l. Antybiotyk stosowano ponieważ zakładano, że eliminacja obróbki termicznej w pierwszej fazie procesu technologicznego może mieć w pewnym stopniu negatywne skutki dla wydajności fermentacji, zwiększa się bowiem ryzyko zakażenia mikrobiologicznego. Obróbka termiczna poza tym, że ma na celu skleikowanie

surowca powoduje również inaktywację niepożądaną mikroflorę bytującą na przykład na jego powierzchni. Warto zauważyć, że tego rodzaju praktyka związana ze stosowaniem antybiotyków jest powszechnie stosowana w warunkach przemysłowych, bez szkody dla późniejszego wykorzystania produktów odpadowych na cele paszowe [15]. Innym związkiem, którego ilość zwiększała się sukcesywnie z każdą recyrkulacją wywaru był glicerol, trzeci obok etanolu i dwutlenku węgla produkt fermentacji. Jego stężenie zwiększało się średnio o 1,4 g/l i po zakończeniu cyklu badawczego wynosiło około 35 g/l. Według danych literaturowych końcowe stężenie glicerolu uzyskiwane podczas fermentacji zacierów kukurydzianych z pominięciem recyrkulacji strumieni wynosi zwykle od 12 do 15 g/l [16]. Należy dodać, że stężenie glicerolu było silnie skorelowane z ciśnieniem osmotycznym. Glicerol zaliczany jest do substancji osmogennych, których zadaniem jest między innymi zwiększanie turgoru komórki w warunkach szoku osmotycznego. Istotny wzrost tempa jego produkcji może być wyraźnym sygnałem, że komórki poddawane są działaniu szoku osmotycznego [17]. Biorąc pod uwagę wspomniany na wstępie brak różnic pomiędzy podstawowymi parametrami związanymi z wydajnością konwersji skrobi do bioetanolu dla obu typów procesu (z recyrkulacją i bez recyrkulacji wywaru) można założyć, że obserwowany relatywnie stały wzrost stężenia glicerolu w kolejnych fermentacjach pozostawał bez wpływu na metabolizm komórek drożdży. Specyficzne właściwości fizyczne glicerolu uniemożliwiają jego separację podczas destylacji etanolu w standardowych warunkach procesowych, stąd obserwowana akumulacja tej substancji w płynie pochodzącym podczas kolejnych recyrkulacji. Podobnie było w przypadku analizowanych jonów: potasu, magnezu oraz żelaza, które także akumulowały się w recyrkulowanym wywarze. Jedynie stężenie miedzi oraz cynku pozostawało na podobnym poziomie, co mogło być związane z adsorpcją tych jonów do frakcji stałej wywaru zawierającej między innymi białka, tłuszcze oraz pozostałości struktur komórkowych, które następnie były usuwane podczas wirowania poprzedzającego recyrkulację tego strumienia. Obecność wspomnianych jonów w wywarze nie miała znaczącego wpływu na przebieg kolejnych fermentacji. Zebrane dane potwierdzają zatem, że wprowadzone modyfikacje do procesu produkcji bioetanolu nie mają negatywnego wpływu na wydajność, która mimo kolejnych recyrkulacji wywaru utrzymywała się na poziomie 83,88 %. Pozytywnym aspektem proponowanych zmian jest natomiast istotna redukcja zużycia wody i tym samym ilości produkowanych ścieków. Poza tym zastosowanie enzymów hydrolizujących natywną skrobię umożliwiło także redukcję zużycia energii, co doskonale wpisuje się we wspomnianą na wstępie politykę zrównoważonego rozwoju.

### **Omówione wyżej wyniki opisano w pracy [18]:**

W. Białas, D. Szymanowska, W. Grajek, Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 3126-3131.

Eliminacja procesu kleikowania w procesie jednoczesnej hydrolizy i fermentacji prowadzonym przy użyciu preparatów enzymatycznych wykazujących aktywność w stosunku do natywnej skrobi pozwala teoretycznie na zastosowanie zacierów o znacznie wyższych stężeniach, sięgających 40 % (w/w). Zacierzy te w przypadku pominięcia procesu kleikowania mają stosunkowo niską lepkość. Z technologicznego punktu widzenia podwyższenie początkowego stężenia substratu pozwala na uzyskanie wyższego stężenia etanolu z jednostki objętości zacieru, co poprawia opłacalność procesu. Niestety ograniczeniem dla tego rodzaju modyfikacji jest ograniczona odporność komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na etanol. Metabolit ten powoduje między innymi istotny spadek właściwej szybkości wzrostu komórek, jest także przyczyną obniżenia aktywności lub wręcz denaturacji wybranych białek enzymatycznych biorących udział w glikolizie. Etanol ma także niekorzystny wpływ na strukturę membran komórkowych, zmienia się bowiem stosunek nienasyconych do nasyconych kwasów tłuszczowych [19]. Zastosowanie zacierów o stężeniu sięgającym 40 % jest zatem możliwe pod warunkiem, że proces ten będzie przebiegał w układzie pozwalającym na selektywne usuwanie etanolu z hodowli. Jednym z rozwiązań tego problemu jest zastosowanie bioreaktora membranowego wyposażonego w moduł destylacji membranowej. Destylacja membranowa jest procesem selektywnego rozdzielania składników, w którym siłą napędową stanowi gradient prężności parcyjnych składników w fazach ciekłych lub gazowych rozdzielonych hydrofobową, mikroporowatą membraną. Hydrofobowy charakter membrany zapobiega wnikaniu cieczy i tym samym zwilżaniu jej porów. Występowanie wspomnianego gradientu jest związane z różnicą temperatur nadawy oraz filtratu. Wewnątrz porów membrany ma miejsce dyfuzja par od strony gorącej (nadawa) do strony zimnej (permeat), gdzie następuje ich kondensacja [20]. W ostatnich latach znacząco wzrosła liczba prac naukowych dotyczących zastosowania destylacji membranowej w procesach odsalania wody, oczyszczania ścieków, zagęszczania ciekłych składników żywności oraz produkcji bioetanolu przeznaczonego do wytwarzania biopaliw płynnych [20, 21]. Zdecydowana większość badań związanych z wykorzystaniem destylacji membranowej w produkcji bioetanolu dotyczy układów modelowych, gdzie stosuje się roztwory czystych

substancji (etanol - woda) lub proste układy fermentacyjne oparte na substratach, takich jak glukoza czy sacharoza [22]. Ograniczona jest zatem liczba danych dotyczących możliwości zastosowania destylacji membranowej w układach rzeczywistych, zawierających poza zasadniczym substratem, stanowiącym źródło węgla także inne związki chemiczne pochodzenia roślinnego takie jak tłuszcze, białka, polifenole czy barwniki, które mogą przyczyniać się do powstania zjawiska foulingu, negatywnie wpływającego na wydajność separacji. To powoduje, że technika ta nie doczekała się jak dotąd pełnej komercjalizacji.

Dlatego też podczas kolejnej fazy badań oceniano jaki wpływ na przebieg fermentacji prowadzonej w warunkach zbliżonych do rzeczywistych ma usuwanie etanolu ze środowiska reakcji za pomocą bezpośredniej kontaktowej destylacji membranowej. W badaniach zastosowano polipropylenową membranę kapilarną o powierzchni  $0,1\text{m}^2$ . Natomiast substratem w procesie fermentacji była brzeczka pozyskana z lokalnego browaru zawierająca głównie maltozę (86,27 g/l) oraz glukozę (16,07 g/l), fruktozę (5,65 g/l) i maltotriozę (21,33 g/l). W ciągu pierwszych 20 h bioreaktor pracował bez udziału modułu do destylacji membranowej. Następnie uruchomiono moduł oraz automatyczny system do zasilania bioreaktora w świeżą pożywkę. Przez kolejnych 50 h układ pracował w sposób ciągły. Podczas fermentacji monitorowano strumień permeatu, selektywność separacji etanolu, produktywność objętościową bioreaktora oraz wybrane parametry charakteryzujące metabolizm komórek drożdży: ich liczebność, żywotność oraz stężenie etanolu, cukrów i glicerolu. Po raz pierwszy dokonano także oceny wpływu warunków panujących podczas destylacji membranowej na produkcję metabolitów stanowiących wskaźnik poziomu stresu środowiskowego działającego na komórki w trakcie fermentacji. Badano między innymi stężenie wewnątrzkomórkowej trehalozy oraz poziom białek szoku cieplnego Hsp70 i Hsp104.

Zastosowanie destylacji membranowej pozwoliło na zwiększenie wydajności produkcji etanolu oraz stopnia konwersji substratu do produktu. Podczas kontrolnej fermentacji okresowej uzyskano wydajność na poziomie 0,38g/g natomiast w bioreaktorze membranowym wydajność była równa 0,45g/g. Istotne różnice zanotowano także w odniesieniu do produktywności objętościowej. Maksymalną produktywność w systemie połączonym z destylacją membranową zanotowano w 30h trwania fermentacji, wynosiła ona 2,15 g/lh i była półtora razy wyższa od produktywności uzyskanej podczas hodowli okresowej. Istotne jest także to, że w przypadku zastosowania destylacji membranowej produktywność utrzymywała się na relatywnie stałym poziomie od momentu uruchomienia modułu membranowego aż do zakończenia procesu. Warto zauważyć, że zastosowanie

membrany w układach ciągłych eliminuje ryzyko wymycia komórek z bioreaktora, a szybkość rozcieńczania staje się praktycznie funkcją powierzchni membrany oraz parametrów procesu, w szczególności różnicy temperatur po stronie nadawy oraz permeatu. Zakładając, że system pracuje w warunkach brzegowych określonych z jednej strony przez optymalną temperaturę wzrostu komórek drożdży, a z drugiej przez możliwości techniczne związane z wydajnością systemów stosowanych do chłodzenia strumienia permeatu, nadrzędnym elementem odpowiedzialnym za szybkość rozcieńczania staje się moduł membranowy. W przypadku omawianych badań zjawisko foulingu, rozumiane jako zapychanie membrany, miało marginalny wpływ na strumień permeatu, który przez cały czas trwania procesu utrzymywał się na poziomie 1,1 l/m<sup>2</sup>h. Bardzo niskie stężenie substratu w płynie fermentacyjnym (1,73g/l), wskazuje ponadto, że układ przy tak dobranych parametrach membrany pracował w sposób optymalny. Można przypuszczać, że zwiększenie stężenia substratu w pożywce zasilającej bioreaktor pozwoliłoby na uzyskanie wyższego stężenia etanolu, co powinno w rezultacie poprawić opłacalność procesu. Warto zaznaczyć, że istotnym aspektem destylacji membranowej jest jej zdolność do selektywnej separacji substancji lotnych, co w praktyce oznacza, że ewentualny nadmiar substratu zostanie zatrzymany w bioreaktorze po stronie nadawy. Tym samym ryzyko związane z zanieczyszczeniem produktu substratem staje się marginalne.

Bardzo ważnym elementem prezentowanych badań jest analiza odpowiedzi komórek drożdży na warunki panujące podczas fermentacji okresowej oraz fermentacji w bioreaktorze membranowym. Według Lentini i wsp. [23] najbardziej widoczną oznaką stresu u komórek drożdży wywołanego etanolem lub ciśnieniem osmotycznym związanym z wysokim stężeniem substratu jest ekspresja genów odpowiedzi na stres. Geny te kodują białka ochronne zaliczane do grupy białek szoku cieplnego, jak również enzymy odpowiedzialne za syntezę kompatybilnych substancji rozpuszczalnych, takich jak trehaloza i glicerol, które równoważą utratę wody w komórce [24]. Według danych Scanes i wsp., [25] w warunkach stresowych około 4-10 % substratu przekształcane jest przez komórki w glicerol, co powoduje, że straty w produkcji etanolu mogą sięgać nawet 7-10 %. Z ekonomicznego punktu widzenia nadprodukcja glicerolu jest zatem niepożądana. Jak wskazują wyniki zebrane podczas fermentacji okresowej prowadzonej bez udziału modułu membranowego osmolalność była wyraźnie skorelowana z stężeniem etanolu, co oznacza, że gdy stężenie substratu obniżyło się do bardzo niskiego poziomu etanol stanowił główny czynnik odpowiedzialny za poziom stresu osmotycznego w fermentującym zacierze. Należy dodać, że etanol, ze względu na niską masę cząsteczkową ma znacznie większy wpływ na ciśnienie

osmotyczne aniżeli cukry takie jak maltoza czy glukoza. W bioreaktorze membranowym po uruchomieniu modułu membranowego stężenie etanolu po stronie nadawy obniżyło się z 52 g/l do 33 g/l, czemu towarzyszyła także znacząca redukcja osmolalności i wspomniany wzrost wydajności syntezy etanolu. W rezultacie zmniejszyć powinna się także ilość syntetyzowanego glicerolu, trehalozy oraz białek szoku cieplnego. Rzeczywiście, ilość glicerolu syntetyzowanego podczas fermentacji prowadzonej w bioreaktorze membranowym była znacznie niższa od ilości jakie zanotowano w przypadku fermentacji okresowej. Podobne relacje zaobserwowano w odniesieniu do trehalozy. Istotne zmiany zanotowano także w odniesieniu do ekspresji białek szoku cieplnego Hsp104 oraz Hsp70 odpowiedzialnych między innymi za ochronę komórek przed negatywnym wpływem etanolu i podwyższonej temperatury [26]. Poziom ekspresji białka Hsp104 w komórkach drożdży podczas procesu prowadzonego w bioreaktorze membranowym był dwukrotnie niższy od ekspresji tego białka w komórkach pobranych z hodowli okresowej. Potwierdza to zatem hipotezę zgodnie, z którą destylacja membranowa ogranicza negatywny wpływ czynników stresowych na komórki drożdży. W przypadku białka Hsp70 nie odnotowano tak znaczących różnic, co może być związane ze specyficzną funkcją jaką pełnią oba białka względem siebie. Hsp104 interakuje bowiem z Hsp70 oraz Hsp40 w naprawie skutków stresu środowiskowego przez rozwinięcie agregatów białkowych o nieuporządkowanej, amorficznej strukturze i umożliwienie prawidłowego zwinięcia się tworzącym je białkom. Wiadomo, że w określonych warunkach białka te ściśle ze sobą współpracują, brak jednak szczegółowych danych na temat ich wzajemnej relacji ilościowej warunkującej efektywne pełnienie wspomnianych funkcji naprawczych [27, 28]. Na podstawie prezentowanych wyników wykazano, że ciągła fermentacja prowadzona w bioreaktorze membranowym wyposażonym w moduł do destylacji membranowej pozwala na uzyskanie wyższej produktywności etanolu w porównaniu do procesów okresowych, przy jednoczesnym znaczącym obniżeniu ilości produkowanego glicerolu. Należy jednak zauważyć, że proces destylacji membranowej wymaga dość wysokich nakładów energetycznych związanych chociażby z koniecznością utrzymywania możliwie wysokiej różnicy temperatur pomiędzy strumieniem nadawy i permeatu. Zastosowanie destylacji membranowej będzie zatem opłacalne wówczas, gdy możliwe będzie wykorzystanie ciepła generowanego na innym etapie danego procesu technologicznego (np. podczas destylacji bioetanolu w kolumnach destylacyjnych) lub ciepła pochodzącego z energii słonecznej czy źródeł geotermalnych.

### **Omówione wyżej wyniki opisano w pracy [29]:**

G. Lewandowicz, W. Białas, B. Marczewski, D. Szymanowska, Application of membrane distillation for ethanol recovery during fuel ethanol production, Journal of Membrane Science, 375 (2011) 212-219.

Badania dotyczące zastosowania bioreaktora membranowego wyposażonego w moduł do destylacji membranowej w procesie produkcji bioetanolu zostały wykonane na brzeczce piwnej. Zaletą tego rodzaju substratu jest to, że wszystkie składniki w nim zawarte są bardzo dobrze rozpuszczalne, co zdecydowanie ułatwia separację komórek poprzedzającą dalsze analizy związane z oceną omówionych wyżej markerów poziomu stresu komórkowego. W rzeczywistości zacier kukurydziany, niezależnie od tego czy proces jest prowadzony z uwzględnieniem lub z pominięciem obróbki termicznej surowca, zawierają dużą ilość cząstek stałych zróżnicowanych pod względem kształtu i charakteryzujących się bardzo szerokim rozkładem wielkości. Destylacja membranowa zacierów zawierających tego rodzaju materiały może stanowić poważny problem wynikający z ograniczonej wytrzymałości mechanicznej membran polipropylenowych stosowanych podczas tego procesu, na co zwraca uwagę także producent membran. Jest to poważny problem, który dotyczy praktycznie wszystkich instalacji przemysłowych bazujących na membranach wykonanych z materiałów polimerowych, pracujących w trudnych warunkach, gdzie zawartość cząstek stałych o właściwościach ściernych jest relatywnie wysoka [30]. Mając na uwadze potencjalne trudności wynikające z ograniczenia trwałości membran wykorzystywanych podczas destylacji membranowej zdecydowano się w ostatnim etapie na wykonanie badań mających na celu optymalizację parametrów pracy instalacji membranowej do separacji wspomnianych zawiesin, bazującej na ceramicznych membranach mikrofiltracyjnych o nominalnej średnicy porów równej  $0,45\mu\text{m}$ . Surowcem stosowanym do badań był odfermentowany zacier wyprodukowany podczas jednoczesnej hydrolizy i fermentacji mąki kukurydzianej. W badaniach uwzględniono dwie zmienne niezależne: ciśnienie transmembrarowe (TMP,  $0,35 < X_1 < 1,4$  bar) oraz prędkość styczną nadawy ( $V$ ,  $1 < X_2 < 5$  m/s). Eksperymenty wykonano według centralnego planu kompozycyjnego. Jedną ze zmiennych zależnych poddanych analizie statystycznej był znormalizowany strumień permeatu  $J_N$  wyznaczony w 60 min trwania procesu separacji. Jego wartość niestety nie odzwierciedla w pełni zjawisk, które mają miejsce w początkowej fazie filtracji, gdzie zwykle obserwuje się gwałtowny spadek strumienia permeatu. Stąd, do opisu zjawisk występujących podczas separacji wykorzystano model matematyczny wyprowadzony w oparciu o równania opisujące proces blokowania



porów oraz filtracji w obecności placka filtracyjnego (ang. combined pore-blockage cake-filtration model). Analizę statystyczną wykonano w odniesieniu do następujących parametrów modelu wyznaczonych metodami estymacji nieliniowej: współczynnika blokowania porów  $\alpha$ , współczynnika charakteryzującego tworzenie się placka filtracyjnego na powierzchni membrany  $f'R'$ , współczynnika określającego opór pierwszej warstwy osadu pojawiającego się na membranie na skutek zjawiska foulingu  $R_{p0}$  oraz współczynnika wyrażającego prędkość transportu masy od membrany do otaczającego roztworu  $J_{back}$ .

Jak wskazują wyniki eksperymentów zwiększenie TMP powodowało spadek względnego strumienia permeatu  $J_N$ . Wartość tego parametru, wyznaczona w 60 min trwania procesu, zawierała się w zakresie 0,034 - 0,779 i była najniższa w przypadku filtracji przy TMP równym 1,4 bar i szybkości stycznej wynoszącej 1 m/s. Również szybkość styczna powodowała istotne zmiany w wielkości tego parametru. Współczynnik  $J_N$  wskazuje jaka jest relacja początkowego strumienia permeatu i końcowego, wyznaczonego w stanie, który można uznać za pseudo-ustalony, nie pozwala natomiast na ocenę dynamiki zapychania membrany. Do tego celu wykorzystano współczynnik  $\alpha$ , którego wartość jest uzależniona od kształtu krzywej filtracji w początkowej fazie procesu separacji i charakteryzuje szybkość z jaką następuje blokowanie porów membrany oraz odkładanie agregatów na jej powierzchni. Generalnie im wyższa jest jego wartość tym większe jest nachylenie krzywej filtracji i szybszy spadek strumienia. Prezentowane wartości  $\alpha$ , zawierały się w bardzo szerokim zakresie, od 184 do 2358  $\text{m}^2\text{kg}^{-1}$  i były zdecydowanie wyższe od analogicznych wartości wyznaczonych dla białek takich jak np. BSA czy lizozym, które wynosiły odpowiednio 0,23 i 0,41  $\text{m}^2\text{kg}^{-1}$  [31]. Wartość tego współczynnika rosła wraz ze wzrostem TMP i malała ze wzrostem szybkości stycznej, przy czym zależności te miały charakter nieliniowy. Tym samym wykazano, że prowadzenie mikrofiltracji przy wysokiej szybkości stycznej nadawo ograniczało wiązanie separowanych cząstek do membrany i sprzyjało usuwaniu ich z jej powierzchni. W celu określenia, które z cząstek zawartych w filtrowanym zacierze są w głównej mierze odpowiedzialne za proces zapychania membrany wykonano analizę rozkładu wielkości cząstek oraz zdjęcia techniką skaningowej mikroskopii elektronowej. Średnica cząstek w próbkach pobranych na początku fermentacji zawierała się w zakresie od 0,5 do kilkuset  $\mu\text{m}$ . Po zakończeniu procesu fermentacji zaobserwowano zwiększenie udziału frakcji o średnicach w zakresie 0,5 – 5  $\mu\text{m}$ . Znaczące przesunięcie w kierunku mniejszych średnic zanotowano także w próbkach zacieru odfermentowanego po mikrofiltracji. Na wstępie zakładano, że wspomniane zmiany w wielkości cząstek są rezultatem postępującej fragmentacji granul skrobiowych podczas SSF oraz mikrofiltracji. Analiza rozkładu wielkości

częstek wykonana w odniesieniu do granul wyizolowanych z mąki przed i po hydrolizie enzymatycznej nie potwierdziła tej teorii. Szczegółowa analiza zdjęć mikroskopowych wskazywała, że fragmentacja dotyczy przede wszystkim nierozpuszczalnych białek prolaminowych (zein) stanowiących około 60 % wszystkich białek obecnych w mące. Hydrofobowy charakter tych białek sprzyjał prawdopodobnie ich adsorpcji do powierzchni membrany oraz wnętrza jej porów, co w rezultacie powodowało obserwowany spadek strumienia permeatu. W celu ustalenia jaki jest mechanizm procesu filtracji szczegółowej analizie poddano krzywe przedstawiające zależności  $d^2t/dV^2$  od  $dt/dV$ . Na ich podstawie ustalono, że w początkowej fazie procesu separacja odbywała się zgodnie z mechanizmem blokowania porów. Po upływie określonego czasu, zależnego od parametrów procesu, następowało przejście od mechanizmu blokowania porów do filtracji w obecności placka filtracyjnego. W przypadku omawianych badań czas, po którym następowała zmiana mechanizmu był negatywnie skorelowany z ciśnieniem transmembranowym i dla TMP 0,35, 0,875 i 1,4 bar wynosił odpowiednio 6, 15 i 25s. W ten sposób udowodniono, że proces separacji powinien być prowadzony przy możliwie niskim ciśnieniu transmembranowym. Stwierdzenie to potwierdziła także analiza zmian współczynnika charakteryzującego tworzenie się placka filtracyjnego na powierzchni membrany  $f'R'$  oraz współczynnika określającego opór pierwszej warstwy osadu pojawiającego się na membranie na skutek zjawiska foulingu  $R_{p0}$ . Wartości obu parametrów zwiększały się wraz ze wzrostem ciśnienia transmembranowego. Obecność warstwy osadu na powierzchni membrany potwierdzono za pomocą zdjęć mikroskopowych. Należy dodać, że analiza zdjęć przedstawiających powierzchnię membrany po procesie separacji prowadzonym przy szybkości stycznej wynoszącej 1 oraz 5 m/s oraz porównanie względnego strumienia permeatu wyznaczonego po myciu membrany wodą wskazywała, że proces powinien być prowadzony przy możliwie wysokiej szybkości stycznej. Wartość tego parametru miała bowiem istotny wpływ na strukturę oraz grubość placka filtracyjnego.

Ostatnim etapem badań związanym z mikrofiltracją zacierów odfermentowanych była optymalizacja procesu pod kątem uzyskania maksymalnej wartości  $J_N$  oraz minimalizacji wartości współczynników modelu charakteryzujących proces zapychania membrany ( $\alpha$ ,  $f'R'$  oraz  $R_{p0}$ ). Podobnie jak w przypadku badań dotyczących optymalizacji parametrów jednoczesnej hydrolizy i fermentacji zastosowano metodę opracowaną przez Derringer [8]. Optymalne ciśnienie transmembranowe oraz prędkość styczna wynosiły odpowiednio 0,35 bar oraz 4,55 m/s. Zgodnie z wartością funkcji użyteczności wyznaczone optimum spełniało w około 94 % przyjęte na wstępie kryteria optymalizacji. Pomimo, że ciśnienie

transmembranowe jest siłą napędową procesu mikrofiltracji, wyniki optymalizacji wskazują, że w przypadku tego rodzaju złożonych układów biologicznych jakimi są zacierzy odfermentowane zdecydowanie korzystniej jest prowadzić procesy separacji w warunkach niskiego ciśnienia transmembranowego. Warto dodać, że w przypadku dużej koncentracji cząstek stałych celowym staje się poszukiwanie wielkości krytycznego strumienia filtratu, co jednocześnie pozwala na wyznaczenie maksymalnego ciśnienia transmembranowego, przy którym nie obserwuje się tworzenia warstwy polaryzacyjnej osadu na membranie. Zgodnie z wyznaczonymi parametrami optymalizacji czynnikiem, który pozwala ograniczyć intensywność tego niekorzystnego zjawiska jest stosowanie wysokich szybkości przepływu stycznego nadawy nad membraną. Generowane wówczas naprężenia ścinające ograniczają dynamikę z jaką o filtrowane cząstki osadzają się na membranie.

#### **Omówione wyżej wyniki opisano w pracy [32]:**

W. Białas, E. Celińska, R. Dembczyński, D. Szymanowska, M. Nowacka, T. Jesionowski, W. Grajek, Cross-flow microfiltration of fermentation broth containing native corn starch, *Journal of Membrane Science*, 427 (2013) 118-128.

#### **Podsumowanie**

Aby biopaliwa mogły konkurować z paliwami kopalnymi wymagana jest ciągła modyfikacja technologii ich produkcji pozwalająca w rezultacie na istotną redukcję kosztów. Jak wykazano na podstawie prezentowanych badań istnieje szereg modyfikacji związanych między innymi z nowoczesnymi metodami prowadzenia fermentacji, połączonej z równoczesną hydrolizą surowca, recyrkulacją wybranych strumieni procesowych oraz integracją procesów fermentacyjnych z technikami membranowymi. Przy odpowiednio dobranych parametrach każda z tych modyfikacji może mieć znaczący wkład w poprawę bilansu procesu. Zastosowanie nowych rozwiązań pozwala pominąć energochłonny etap kleikowania i upłynniania skrobi, ograniczyć zużycia wody i ilość generowanych ścieków, co w oczywisty sposób powinno przyczynić się do mierzalnych oszczędności. Warto zauważyć, że dla fermentacji ciągłej zintegrowanej z procesem destylacji membranowej uzyskane wyniki dotyczące produktywności etanolu były około dwukrotnie większe od wyników zanotowanych w fermentacjach okresowych. W praktyce przemysłowej przy obliczeniach produktywności w procesach okresowych bierze się pod uwagę czas trwania fermentacji a także czas wymagany na jej przygotowanie (mycie aparatury przed i po procesie, przygotowanie medium, sterylizacja pożywki). Sporadycznie natomiast uwzględnia się te

dane w publikacjach naukowych. Gdyby uwzględnić te czynności produktywność fermentacji ciągłej w porównaniu do fermentacji okresowej byłaby zapewne zdecydowanie większa. Ponadto porównując ilości produkowanego glicerolu w stosunku do wyprodukowanego etanolu możemy stwierdzić, że proces fermentacji w bioreaktorze membranowym pozwala na istotne zmniejszenie ilości tego metabolitu. Jest to szczególnie istotne, ponieważ glicerol obniża wydajność procesu fermentacji, a poza tym stanowi także odpad w wielu innych procesach biotechnologicznych (produkcja biodiesla) i jego zagospodarowanie wymaga dodatkowych nakładów. Modyfikacja procesu idąca w kierunku ograniczenia produkcji tego metabolitu stanowi zatem jedno z głównych osiągnięć prezentowanych badań.

**Za najważniejsze osiągnięcia uzyskane w prezentowanych pracach uważam:**

1. Optymalizacje warunków jednoczesnej hydrolizy i fermentacji z wykorzystaniem enzymów hydrolizujących natywną skrobię oraz opracowanie modelu matematycznego opisującego kinetykę tego procesu.
2. Wykazanie możliwości wielokrotnego wykorzystania wywaru uzyskanego po procesie destylacji zacieru odfermentowanego wyprodukowanego w procesie jednoczesnej hydrolizy i fermentacji z wykorzystaniem enzymów hydrolizujących natywną skrobię.
3. Potwierdzenie, że destylacja membranowa jest metodą pozwalającą uzyskać poprawę wydajności konwersji cukrów do etanolu.
4. Wykazanie, że zastosowanie destylacji membranowej może w istotny sposób obniżyć poziom stresu komórkowego podczas fermentacji i tym samym przyczynić się do redukcji ilości produkowanego glicerolu.
5. Adaptacja matematycznego modelu filtracji obejmującego proces blokowania porów oraz filtracji w obecności placka filtracyjnego do opisu procesu mikrofiltracji zacierów odfermentowanych i optymalizacja warunków separacji.

**Literatura uzupełniająca**

[1] T. Senn, H.J. Pieper, Classical Methods: Sections 1–4, in: The Biotechnology of Ethanol, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 6-45.

[2] N. Nichols, S. Bruce, R. Bothast, A. Cotta, Alcoholic Fuels, The Corn Ethanol Industry, Taylor&Francis, Boca Raton, (2006) 59-78.

[3] L.H. Lim, D.G. Macdonald, G.A. Hill, Hydrolysis of starch particles using immobilized barley  $\alpha$ -amylase, Biochemical Engineering Journal, 13 (2003) 53-62.

- [4] R.M. Sandstedt, R.L. Gates, Raw starch digestion: a comparison of the raw starch digesting capabilities of the amylase systems from four alpha-amylase sources, *J Food Sci*, 19 (1954) 190-199.
- [5] S. Ueda, R. Ohba, S. Kano, Fractionation of the Glucoamylase System from Black-koji Mold and the Effects of Adding Isoamylase and Alpha-amylase on Amylolysis by the Glucoamylase Fractions, *Starch - Stärke*, 26 (1974) 374-378.
- [6] M.N.N. Miah, S. Ueda, Multiplicity of Glucoamylase of *Aspergillus oryzae* Part 2. Enzymatic and Physicochemical Properties of Three Forms of Glucoamylase, *Starch - Stärke*, 29 (1977) 235-239.
- [7] S. Mikami, K. Iwano, S. Shiinoki, T. Shimada, Purification and Some Properties of Acid-stable  $\alpha$ -Amylases from Shochu koji (*Aspergillus kawachii*), *Agr Biol Chem Tokyo*, 51 (1987) 2495-2501.
- [8] G. Derringer, Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of quality technology*, 12 (1980) 214-219.
- [9] G. Verma, P. Nigam, D. Singh, K. Chaudhary, Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21, *Bioresource Technology*, 72 (2000) 261-266.
- [10] K. Öhgren, A. Rudolf, M. Galbe, G. Zacchi, Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content, *Biomass and Bioenergy*, 30 (2006) 863-869.
- [11] A.D. Kroumov, A.N. Módenes, M.C.d.A. Tait, Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain, *Biochemical Engineering Journal*, 28 (2006) 243-255.
- [12] R.A. Davis, Parameter Estimation for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Food Waste Into Ethanol Using Matlab Simulink, *Appl Biochem Biotech*, 147 (2008) 11-21.
- [13] W. Białas, A. Czerniak, D. Szymanowska-Powałowska, Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation of corn starch for ethanol production, *Acta Biochim Pol*, 61 (2014) 153-162.
- [14] S. Prasad, A. Singh, H.C. Joshi, Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues, *Resources, Conservation and Recycling*, 50 (2007) 1-39.
- [15] D.M.P. Compart, A.M. Carlson, G.I. Crawford, R.C. Fink, F. Diez-Gonzalez, A. DiCostanzo, G.C. Shurson, Presence and biological activity of antibiotics used in fuel ethanol and corn co-product production<sup>1</sup>, *Journal of Animal Science*, 91 (2013) 2395-2404.
- [16] I. Russell, Understanding yeast fundamentals, *The alcohol textbook*, 4 (2003) 531-537.

- [17] J. Fiedurek, M. Trytek, Wpływ stresu kwasowego i osmotycznego na wytwarzanie metabolitów przy użyciu mikroorganizmów, *Postępy Mikrobiologii*, 55 (2016).
- [18] W. Białas, D. Szymanowska, W. Grajek, Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 3126-3131.
- [19] D. Stanley, A. Bandara, S. Fraser, P.J. Chambers, G.A. Stanley, The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Applied Microbiology*, 109 (2010) 13-24.
- [20] R.W. Schofield, A.G. Fane, C.J.D. Fell, Heat and mass transfer in membrane distillation, *Journal of Membrane Science*, 33 (1987) 299-313.
- [21] V.A. Bui, L.T.T. Vu, M.H. Nguyen, Simulation and optimisation of direct contact membrane distillation for energy efficiency, *Desalination*, 259 (2010) 29-37.
- [22] M. Gryta, The fermentation process integrated with membrane distillation, *Separation and Purification Technology*, 24 (2001) 283-296.
- [23] A. Lentini, P. Rogers, V. Higgins, I. Dawes, M. Chandler, G. Stanley, P. Chambers, The Impact of Ethanol Stress on Yeast Physiology, in: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Blackwell Science, 2008, pp. 23-38.
- [24] G.M. Walker, P. Van Dijck, Physiological and Molecular Responses of Yeasts to the Environment, in: A. Querol, G. Fleet (Eds.) *Yeasts in Food and Beverages*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006, pp. 111-152.
- [25] K. Scanes, S. Hohmann, B. Prior, Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review, *South African Journal for Enology and Viticulture*, 19 (1998) 17-24.
- [26] P.W. Piper, The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap, *FEMS Microbiology Letters*, 134 (1995) 121-127.
- [27] Z. Wyzewski, K.P. Gregorczyk, L. Szulc-Dabrowska, J. Struzik, J. Szczepanowska, M. Niemialtowski, [Cooperation between heat shock proteins in organizing of proteins spatial structure], *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 68 (2014) 793-807.
- [28] J.R. Glover, S. Lindquist, Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A Novel Chaperone System that Rescues Previously Aggregated Proteins, *Cell*, 94 (1998) 73-82.
- [29] G. Lewandowicz, W. Białas, B. Marczewski, D. Szymanowska, Application of membrane distillation for ethanol recovery during fuel ethanol production, *Journal of Membrane Science*, 375 (2011) 212-219.

[30] P. Le-Clech, Membrane bioreactors and their uses in wastewater treatments, *Appl Microbiol Biot*, 88 (2010) 1253-1260.

[31] L. Palacio, C.-C. Ho, A.L. Zydney, Application of a pore-blockage—Cake-filtration model to protein fouling during microfiltration, *Biotechnol Bioeng*, 79 (2002) 260-270.

[32] W. Białas, E. Celińska, R. Dembczyński, D. Szymanowska, M. Nowacka, T. Jesionowski, W. Grajek, Cross-flow microfiltration of fermentation broth containing native corn starch, *Journal of Membrane Science*, 427 (2013) 118-128.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moją aktywność naukową realizowałem w kilku obszarach biotechnologii, na które składały się badania związane z:

- ekstrakcją i separacją białek pochodzenia roślinnego, zwierzęcego oraz mikrobiologicznego w wodnych układach dwufazowych,
- ekstrakcją i oczyszczaniem oraz charakterystyką substancji bioaktywnych,
- ukierunkowaną hydrolizą enzymatyczną surowców skrobiowych,
- biodegradacją zanieczyszczeń środowiskowych,
- wykorzystaniem odpadów przemysłowych w procesie ich mikrobiologicznej konwersji do bioetanolu oraz 1,3-propanediolu,
- wykorzystaniem suszenia rozpyłowego i liofilizacji do utrwalania preparatów bakterii probiotycznych oraz ich metabolitów,
- zastosowaniem technik membranowych w biotechnologii,
- tworzeniem biofilmów bakteryjnych na powierzchniach stałych.

Wiele z tych badań realizowałem we współpracy zarówno z pracownikami Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu jak i innymi ośrodkami naukowymi w kraju m.in.: Politechniką Poznańską, Uniwersytetem im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, Instytutem Katalizy i Fizykochemii Powierzchni Polskiej Akademii Nauk, Uniwersytetem Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Uniwersytetem Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Współpracę tą potwierdzają liczne publikacje wymienione w zał. 5.

Na początku mojej pracy naukowej zainteresowałem się zastosowaniem wodnych układów dwufazowych (ATPS) do separacji i oczyszczania białek pochodzenia roślinnego. Ekstrakcja w ATPS stanowi atrakcyjną alternatywę dla tradycyjnych metod izolacji i oczyszczania biomolekuł. Układy te zbudowane są z dwóch bogatych w wodę, znajdujących się w stanie równowagi faz. Są one używane nie tylko do separacji, ale także do opisu

aktywności biologicznej makromolekuł oraz rozdziału komórek. Główną ich zaletą, w odniesieniu do tradycyjnej ekstrakcji jest prowadzenie procesu w warunkach sprzyjających zachowaniu właściwości biologicznych rozdzielanych cząstek. Badania, które prowadziłem podczas realizacji pracy magisterskiej dotyczyły wykorzystania ATPS do oczyszczania ferrytyny, białka biorącego udział w regulacji wewnątrzkomórkowego i tkankowego poziomu żelaza, pełniącego jednocześnie funkcję magazynu tego pierwiastka. Wodne układy dwufazowe stosowałem także do oczyszczania nukleazy pochodzącej z soku mlecznego glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus*), laktoperoksydazy znajdującej się w siarze oraz mleku krowim, inwertazy z komórek drożdży *Saccharomyces cereviae* oraz lizozymu z białka jaja kurzego. Obecnie uczestniczę w pracach zespołu zajmującego się oceną możliwości zastosowania ATPS do separacji rekombinowanej  $\alpha$ -amylazy z wołka ryżowego, która jest produkowana przez modyfikowane genetycznie drożdże *Yarrowia lipolytica*. Poza tym prowadzę badania nad ekstraktywną biokonwersją fenyloalaniny do 2-fenyloetanolu, substancji zapachowej produkowanej także przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. Podczas badań wykorzystuję zarówno układy typu glikol polietylenowy/polimer, glikol polietylenowy/sól nieorganiczna oraz polimer termoseparujący/sól nieorganiczna. Na podstawie licznych doświadczeń przeprowadzonych w odniesieniu do wymienionych substancji stwierdziłem, że najistotniejszym czynnikiem decydującym o kierunku migracji danej biomolekuły jest jej masa cząsteczkowa oraz hydrofobowość. W przypadku większości prowadzonych badań potwierdziła się reguła, zgodnie z którą współczynnik podziału jest odwrotnie proporcjonalny do masy cząsteczkowej separowanego białka. Wyniki badań związanych z zastosowaniem ATPS prezentowano na konferencjach (**Zał. 5. II K4; II K6; III B2; III B6; III B7; III B9**) oraz opisano w licznych pracach naukowych (**Zał. 5. II A2; II A3; II A8; II A12; II A13; II A14; II D11**). Ponadto opracowano metodę separacji lizozymy, która stanowi przedmiot zgłoszenia patentowego, którego jestem współautorem (**Zał. 5. II C1**).

Jeden z pierwszych projektów badawczych realizowanych przeze mnie po rozpoczęciu pracy naukowej dotyczył oceny przydatności modyfikowanych skrobi do produkcji wybranych produktów spożywczych (**Zał. 5. II. I3**). Celem projektu było opracowanie przemysłowej technologii produkcji maltodekstryn z wykorzystaniem procesu ekstruzji połączonego z hydrolizą enzymatyczną oraz analiza właściwości uzyskanych produktów. Podczas badań stosowano preparaty enzymatyczne pochodzenia grzybowego oraz bakteryjnego. Jako członek zespołu badawczego brałem udział w badaniach związanych z charakterystyką reologiczną uzyskanych produktów (reologia i tekstura) oraz możliwością ich praktycznym wykorzystaniem. Wyprodukowane maltodekstryny różniły się istotnie pod



względem reologicznym, co związane było z rodzajem stosowanego enzymu oraz warunkami panującymi podczas reakcji hydrolizy (temperatura, czas, ilość oraz skład preparatu enzymatycznego). Część z nich miała charakterystykę typową dla cieczy lepkich, podczas gdy inne wykazywały właściwości lepkosprężyste. Wyniki wspomnianych badań i innych prac związanych z reologią układów skrobiowych oraz jej pochodnych zostały opublikowane (**Zał. 5. II. A26, Zał. 5. II. D2, D3, D6, D7, D14, D27**), a także prezentowano je na konferencjach tematycznych (**Zał. 5. II. K1, K2**). Aktualnie uczestniczę w pracach zespołu badawczego zajmującego się reologią układów lepkosprężystych stosowanych w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Prace badawcze skupiają się w obrębie nowoczesnych matryc występujących w postaci termoodwracalnych mikroemulsji stosowanych do kontrolowanego uwalniania substancji czynnych (**Zał. 5. II. A 29, A33**). Z kolei doświadczenie oraz umiejętności związane z praktycznym zastosowaniem enzymów, zdobyte podczas realizacji projektu związanego z enzymatyczną modyfikacją skrobi, wykorzystywałem w pracach związanych enzymatyczną hydrolizą produktów odpadowych pochodzących z przemysłu spożywczego (**Zał. A. II. D27, D31**) oraz w pracach dotyczących produkcji rekombinowanej  $\alpha$ -amylazy przez genetycznie modyfikowany szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* (**Zał. 5. A. II 19, A20, A30, A35**).

Brałem także udział w pracach zespołu zajmującego się procesami bioremediacji oraz fitoremediacji ksenobiotyków. Badania miały na celu ocenę skuteczności wspomnianych wyżej metod w aspekcie rozkładu zanieczyszczeń organicznych lub zmniejszenia ich toksyczności w warunkach *in situ*. Badania w głównej mierze dotyczyły substancji ropopochodnych (**Zał. 5. II A6; II A7; II A15**) oraz herbicydów (**Zał. 5. II A1; II A5; II. A10**). W przypadku biodegradacji substancji ropopochodnych analizowano wpływ szeregu czynników związanych między innymi z charakterystyką stosowanych mikroorganizmów, dostępnością ksenobiotyków dla mikroorganizmów, rodzajem gleby, substancji odżywczych, temperatury, pH, obecności tlenu lub innego akceptora elektronów. Zebrane dane poddawałem obróbce matematycznej mającej na celu wyznaczenie stałych opisujących kinetykę zmian stężenia badanych ksenobiotyków. Analiza stałych kinetycznych wykazała, że szybkość biodegradacji substancji ropopochodnych (oleju napędowego) jest zależna od udziału biokomponentów (biodiesla). Stwierdzono także, że biokomponenty są preferencyjnie metabolizowane przez komórki mikroorganizmów. Wykazano także, że dodatek substancji powierzchniowo czynnych (ramnolipidów) ma istotny wpływ na szybkość biodegradacji biokomponentów, natomiast nie wpływa na kinetykę rozkładu czystego oleju napędowego. Zasadność stosowania metod biologicznych w usuwaniu zanieczyszczeń organicznych

potwierdzono także w badaniach prowadzonych na atrazynie. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najwyższą zdolność do biodegradacji tego herbicydu wykazywały szczepy mikroorganizmów *Stenotrophomonas maltophilia* oraz *Botrytis cinerea*. Należy zauważyć, że skażenie wody oraz gleby tą substancją stanowi jedno z większych zagrożeń dla zdrowia ludzi i zwierząt. Badania prowadzone na liniach komórkowych (Caco-2) jednoznacznie potwierdziły niekorzystny wpływ tego herbicydu na wzrost, żywotności i różnicowanie się komórek enterocytów. Wykazano także, że substancja ta ma działanie mutagenne.

Bardzo ważnym elementem mojej pracy naukowej były badania związane z pozyskiwaniem, oczyszczaniem oraz charakterystyką substancji bioaktywnych. Badania przeprowadzone przez nasz zespół dotyczyły zarówno surowców spożywczych (owoce jagodowe i warzywa) jak i surowców odpadowych generowanych przez przemysł spożywczy (wytłoki owocowe, sok ziemniaczany). Brałem udział w opracowaniu zintegrowanych technologii pozyskiwania i oczyszczania antocyjanów, związków polifenolowych oraz składników białkowych i niebiałkowych soku z ziemniaka z wykorzystaniem metod różnych ekstrakcyjnych, chromatograficznych oraz kriokoncentracji. Dzięki zastosowaniu procesów niskotemperaturowych produkowane preparaty cechowały się bardzo dobrą stabilnością oraz wysoką zawartością substancji aktywnej. Czystość preparatów uzyskiwanych z zastosowaniem opracowanych technologii wynosiła ponad 90%. Zostały one wykorzystane w badaniach na liniach komórkowych. Wyniki tych badań wskazywały, że preparaty te mają ukierunkowane działanie przeciwnowotworowe i można je stosować między innymi w profilaktyce nowotworów jelita grubego. Wyniki wspomnianych wyżej prac badawczych opublikowano w licznych publikacjach naukowych (**Zał. 5. II. A17; A24; A25; A27; A32; II. D19; D20; D22; D28; D29; D30; D37; D38**) oraz prezentowano na konferencjach naukowych (**Zał. 5. III. B3; III. B11-13**). Na bazie soku z ziemniaka opracowano także sześć grup produktów spożywczych dedykowanych dla konsumentów cierpiących na nieswoiste zapalenie jelit. Produkty te zostały opatentowane na terenie Polski (**Zał. 5. II. B1-6**). Należy zaznaczyć, że badania dotyczące zastosowania antocyjanów oraz związków fenolowych są kontynuowane przez nas zespół w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Celem projektu jest ocena możliwości zastosowania ekstraktów z owoców jagodowych w prewencji otyłości i zaburzeń zespołu metabolicznego (**zał. 5. II. I15**). Wiedzę i doświadczenie jakie zdobyłem podczas realizacji tych badań wykorzystałem także w pracach związanych z pozyskiwaniem substancji bioaktywnych z roślin zielarskich. Byłem członkiem zespołu składającego się z pracowników naukowych Uniwersytetu im. Adama

Mickiewicza w Poznaniu, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu zajmującego się badaniem właściwości glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus*) oraz kokoryczy puste (*Corydalis cava*). Badania były ukierunkowane na analizę aktywności biologicznej soku mlecznego glistnika jaskółcze ziele, ekstraktów pozyskanych z wymienionych roślin oraz frakcji zawierających białka o aktywności nukleaz, oczyszczonych za pomocą chromatografii powinowactwa. Badano potencjał przeciwutleniający, zawartość substancji polifenolowych, aktywność nukleaz, właściwości antimikrobiologiczne oraz cytotoksyczność wybranych frakcji. Wykazano, że wyizolowane białka o aktywności nukleaz zaliczane są do grupy białek PR (ang. pathogenesis-related proteins) i wykazują cytotoksyczność w odniesieniu do komórek HeLa. Wynik badań związanych z oczyszczaniem jak i aktywnością uzyskanych substancji opublikowano w kilku pracach naukowych (**Zał. 5. II. A4; II. A31; II. D11; II. D34**) oraz prezentowano na konferencjach (**Zał. 5. III. B2; III. B8; III. B17; III. B42**).

Istotnym elementem mojej aktywności naukowej były także badania związane z biotechnologiczną konwersją odpadów przemysłowych do bioetanolu (**Zał. 5. III. I6**), 1,3-propanodiolu (**Zał. 5. III. I9**) oraz 2,3-butanediolu (**Zał. 5. III. A2**). Badania realizowano w ramach projektów finansowanych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka oraz międzynarodowego programu FP6 ERA-IB. Celem badań było opracowanie nowych, energooszczędnych technologii produkcji wymienionych wyżej związków chemicznych w oparciu o zastosowanie surowców odpadowych takich jak wycierka ziemniaczana, glicerol odpadowy, serwatka, wyciągi jabłkowe oraz wysłodki buraczane. Mój udział w pracach zespołów badawczych realizujących poszczególne projekty związany był między innymi z optymalizacją metody wstępnej obróbki surowców z zastosowaniem enzymów amylolitycznych, celulolitycznych oraz pektynolitycznych (**Zał. 5. III. I6**). Poza tym kierowałem pracami zespołu zajmującego się optymalizacją składu podłoży produkcyjnych stosowanych do produkcji 1,3-propanodiolu oraz 2,3-butanediolu z wykorzystaniem statystycznych metod planowania eksperymentów. W przypadku projektu związanego z produkcją 1,3-propanodiolu przygotowywałem także projekt linii technologicznej korzystając z oprogramowania SuperPro Designer (Intelligen, USA). Podczas projektowania linii technologicznej wykorzystywałem doświadczenia zdobyte w trakcie szkolenia w Delft University of Technology. Projekt stanowił podstawę do przygotowania dokumentacji niezbędnej do wyceny wartości technologii oraz przeprowadzenia procesu komercjalizacji opracowanych rozwiązań. Wiedza oraz umiejętności zdobyte podczas realizacji wcześniejszych projektów pozwoliły mi także na

prorowadzenie badań związanych z powiększaniem skali procesu biosyntezy 1,3-propanodiolu oraz testowaniem nowych szczepów w hodowlach bioreaktorowych. Rezultaty tych prac zostały opublikowane (**Załącznik 5. II. A16, A21, A37, Załącznik 5. II. D25, D30**) i były prezentowane na konferencjach (**Załącznik 5. II. K13, Załącznik 5. III. B15-16**).

Aktualnie moje zainteresowania naukowe związane są z zagadnieniami dotyczącymi przemysłowego wykorzystania prebiotyków oraz bakterii probiotycznych (**Załącznik 5. II. I15**). Masowa produkcja antybiotyków przyczyniła się pośrednio do zwiększenia ich wykorzystania w hodowli zwierząt jako środków terapeutycznych i antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW). Powszechne nadużywanie i nieodpowiedzialne stosowanie antybiotyków doprowadziło do ograniczenia ich skuteczności w leczeniu chorób wywoływanych przez bakterie. W trosce o zdrowie przyszłych konsumentów poszukuje się alternatywnych strategii żywienia zwierząt. Bardzo dużym zainteresowaniem cieszą się naturalne dodatki paszowe zawierające w swym składzie poza probiotykami także dodatek prebiotyków, które stymulują wzrost oraz aktywności bakterii probiotycznych. Dotychczasowe wyniki badań realizowanych w ramach projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju są bardzo obiecujące i potwierdzają synergiczny efekt probiotyków i prebiotyków w redukcji liczebności bakterii odpowiedzialnych za jelitowe schorzenia zwierząt oraz przenoszonych przez żywność. Efektywność preparatów synbiotycznych stosowanych w charakterze dodatków paszowych przeznaczonych dla zwierząt monogastrycznych zależy jednak od szeregu czynników. Podstawowe problemy, jakie możemy napotkać podczas stosowania tego rodzaju preparatów związane są z warunkami jakie panują w początkowych odcinkach przewodu pokarmowego zwierząt monogastrycznych. Bardzo niskie pH oraz wysokie stężenie soli żółciowych, prowadzi do inaktywacji komórek bakterii probiotycznych. Równie niekorzystny wpływ na mikroorganizmy probiotyczne mogą wywierać substancje o charakterze konserwantów i detoksykantów zawarte w paszach. Innym problemem są także warunki przechowywania gotowych do użycia mieszanek paszowych. Podwyższona wilgotność i zmienna temperatura w trakcie magazynowania może powodować spadek stabilności szczepów probiotycznych. Dlatego też w ramach wspomnianego projektu prowadzę badania mające na celu opracowanie nowej metody mikrokapsułkownia szczepów probiotycznych zawartych w preparatach synbiotycznych w celu ich ochrony przed niekorzystnym oddziaływaniem wymienionych czynników. Oczekuje się, że opracowana metoda utrwalania będzie nie tylko efektywna, ale także relatywnie prosta i tania, co pozwoli na zdobycie przewagi konkurencyjnej na rynku krajowym i europejskim. Na skuteczną realizację zadań badawczych związanych omawianą tematyką pozwala mi wiedza oraz

doświadczenie zdobyte podczas wcześniejszych projektów mających na celu opracowaniem przemysłowej metody wytwarzania preparatów bakteriocyn dla przemysłu spożywczego oraz probiotyku wykorzystywanego w hodowli ryb (**Zał. 5. II. I5**) a także preparatów eubiotycznych dla zwierząt gospodarskich (**Zał. 5. II. I14**). Jako członek zespołu badawczego odpowiedzialnego za te projekty prowadziłem badania związane z optymalizacją składu podłoża hodowlanych, powiększaniem skali procesu produkcyjnego oraz utrwalaniem uzyskanych produktów metodą suszenia sublimacyjnego i rozpyłowego. Na podstawie uzyskanych danych potwierdzono, że zastosowana strategia powiększania skali polegająca na wykorzystaniu kryterium związanego z mocą mieszania przypadającą na jednostkę objętości podłoża jest poprawna. Wykazano także, że zarówno suszenie rozpyłowe jak i sublimacyjne, przy zastosowaniu odpowiednich nośników lub ich kompozycji, pozwala na uzyskanie stabilnych preparatów zawierających w swym składzie bakteriocyny oraz biomasę komórkową (**Zał. 5. II. D13, D16 i D17**). Technیکę kapsułkowania zastosowano także do utrwalania biomasy komórek bakterii *Lactobacillus rhamnosus GG*. W pierwszej fazie komórki umieszczano w wodnej emulsji dwufazowej typu glikol polietylenowy/dekstran lub poliwinylpirolidon/dekstran, a następnie utrwalano metodą suszenia sublimacyjnego i rozpyłowego. Badano wpływ warunków formowania kapsułek oraz metody utrwalania na przeżywalność komórek po suszeniu oraz przechowywaniu w różnych temperaturach. Wykazano, że najistotniejszy wpływ na przeżywalność preparatów w trakcie przechowywania miał skład kapsułek, temperatura była natomiast czynnikiem nieistotnym statystycznie (**Zał. 5. II. D21**). Bardzo nowatorskie podejście do procesów kapsułkowania zastosowano także w badaniach mających na celu opracowanie stałej matrycy umożliwiającej zakapsułkowanie substancji ciekłych takich jak witaminy (A, E) oraz olejów rybich bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe (**Zał. 5. II. I9**). W charakterze matrycy zastosowano komórki drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* poddane obróbce wstępnej mającej na celu zwiększenie szybkości wnikania wymienionych wyżej substancji. Komórki poddawano łagodnej lizie poprzez działanie podwyższoną temperaturą, rozpuszczalnikami organicznymi oraz enzymami. Zoptymalizowano także warunki procesu kapsułkowania pod względem temperatury, intensywności mieszania oraz ilości detergentów dodawanych do kapsułkowanej zawiesiny. W rezultacie uzyskano bardzo stabilne preparaty witamin oraz olejów w postaci suchej, gotowej do aplikacji w różnego rodzaju produktach spożywczych (**Zał. 5. II. A22, Zał. 5. II. E1**).

Doświadczenie z zakresu kapsułkowania komórek oraz substancji bioaktywnych wykorzystałem także podczas badań mających na celu opracowanie metody

nanokapsułkowania ekstraktów z czarnego bzu (*Sambucus nigra*) w liposomach (**Zał. 5. II. D35-36**). Zespół, którego byłem członkiem wykorzystywał do tego celu techniki membranowe, stanowiące także jeden z ważniejszych obszarów moich zainteresowań naukowych. Wykazano między innymi, że zastosowanie membran mikrofiltracyjnych o średnicy porów wynoszącej 1,4 $\mu$ m, powleczonych lecytyną pozwala na formowanie liposomów z wydajnością na poziomie 38%. Techniki membranowe stosowałem również podczas formowania emulsji typu olej w wodzie. Celem badań był ocena możliwości zastosowania hydrofobowych membran mikrofiltracyjnych w procesie tworzenia emulsji stanowiących nośnik dla substancji bioaktywnych. Zakładano, że testowana metoda, dzięki niskim nakładom inwestycyjnym oraz prostocie wykonania i łatwości powiększania skali będzie mogła stanowić atrakcyjną alternatywę dla innych, powszechnie wykorzystywanych metod opartych w głównej mierze na mieszalnikach typu rotor/stator czy homogenizatorach wysokociśnieniowych. Zastosowanie tej techniki pozwoliło na uzyskanie homogennej emulsji o rozkładzie wielkości cząstek w zakresie 0,25 – 0,5  $\mu$ m przy 30% udziale fazy rozproszonej (**Zał. 5. II. D41**). Techniki membranowe stosowałem także w badaniach związanych z recyrkulacją składników układu dwufazowego wykorzystywanego do separacji lizozymu. Wykazano, że dzięki zastosowaniu membran mikro oraz ultrafiltracyjnych możliwa jest wydajna recyrkulacja fazy polimerowej oraz fazy bogatej w sól (**Zał. 5. II. A12**). Techniki te stosowałem także w badaniach mających na celu ocenę możliwości zastosowania membran do separacji białek zawartych w odcieku powstającym podczas przemywania mięsa oddzielonego mechanicznie oraz odzysku wody stosowanej podczas tego procesu. Wykazano, że do odpowiedniego oczyszczenia wody procesowej wymagane jest zastosowanie kilku technik membranowych, takich jak mikrofiltracja, ultrafiltracja oraz próżniowa destylacja membranowa. Dzięki zastosowaniu tej kombinacji udało się kilkukrotnie zredukować ilość produkowanych ścieków, a permeat uzyskiwany po ostatnim etapie procesu charakteryzował się jakością porównywalną do permeatu uzyskiwanego podczas stosowania odwróconej osmozy. Całkowity odzysk białka rozpuszczalnego znajdującego się w badanym surowcu po zastosowaniu wspomnianego procesu wynosił około 84 % (**Zał. 5. II. A18**). Ultrafiltrację stosowałem także w badaniach związanych z oczyszczaniem soków owocowych z aronii (*Aronia melanocarpa*). Wysoka zawartość związków polifenolowych we wspomnianym surowcu powoduje, że ma on bardzo cierpki smak, co tym samym negatywnie wpływa na jakość sensoryczną. Zastosowanie ultrafiltracji pozwoliło na znaczną poprawę właściwości sensorycznych, przy relatywnie niewielkiej redukcji właściwości przeciwutleniających (**Zał. 5. II. D 32**). Sok z aronii stanowił także surowiec w badaniach modelowych dotyczących

zagęszczania ciekłych produktów żywnościowych metodą próżniowej destylacji membranowej. W badaniach zastosowano plan D- optymalny, a jako zmienne przyjęto ciśnienie po stronie destylatu oraz temperaturę nadawy. Oceniano wpływ wspomnianych zmiennych na strumień destylatu, stężenie antocyjanów, związków polifenolowych ogółem oraz właściwości antyoksydacyjne soku. Na podstawie analizy danych stwierdzono, że najistotniejszy wpływ na przebieg procesu miało ciśnienie, wskazano także na występowanie interakcji pomiędzy zmiennymi niezależnymi. Dzięki zastosowaniu destylacji membranowej otrzymano koncentrat o stężeniu 65,7°Bx. Pod tym względem uzyskany produkt był porównywalny z koncentratami dostępnymi na rynku, produkowanymi metodą odparowania wody przy pomocy wyparek wielodziałowych (**Załącznik 5. II. D 33**). Procesy membranowe stosowałem także w badaniach związanych z optymalizacją separacji membranowej zawiesin i homogenatów komórkowych oraz białek z surowców odpadowych przemysłu spożywczego (**Załącznik 5. II. K3, K7, K8, Załącznik 5. III. B1, B5, B10**). Zdobytą wiedzę oraz doświadczenie związane z zastosowaniem procesów membranowych wykorzystałem także podczas realizacji badań stanowiących osiągnięcie naukowe opisane szerzej w pierwszej części niniejszego autoreferatu (**Załącznik 5. I. A3-4**). Opracowałem także urządzenie do regeneracji wody stosowanej do mycia polimerowych płyt fleksograficznych. Korzystając z funduszy przyznanych mi w ramach projektu "Inkubator Innowacyjności" koordynowanego przez Fundację Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu stworzyłem projekt, a następnie prototyp w pełni zautomatyzowanego systemu membranowego opartego na procesie mikrofiltracji stycznej dedykowanego do oczyszczania wody stosowanej w procesie mycia płyt fleksograficznych. Badania oraz prace projektowe nad systemem trwały ponad rok, w tym czasie przygotowałem dokumentację techniczną (rysunki wykonawcze CAD), na podstawie której wykonano prototyp. Opracowane rozwiązanie zostało zgłoszone do urzędu patentowego RP (**zgłoszenie nr P.413800**), a także **skomercjalizowane poprzez sprzedaż licencji wyłącznej**. Warto dodać, że efektem aktywności publikacyjnej związanej z tą tematyką było zaproszenie naszego zespołu do udziału w przygotowaniu projektu związanego z produkcją bioetanolu z surowców odpadowych (**EU FP7 Research for SMEs, FP7-SME 2012**). Konsorcjum ubiegające się o finansowanie w ramach 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej składało się z przedsiębiorstw oraz jednostek naukowych z Danii, Hiszpanii oraz Niemiec.

Od początku mojej pracy naukowej jestem także zaangażowany w prace zespołu badawczego zajmującego się procesami formowania biofilmów bakteryjnych na powierzchniach stałych (**Załącznik 5. II. I2**). Mój udział w omawianych badaniach związany jest w

główniej mierze z statystycznym planowaniem eksperymentów oraz analizą uzyskanych danych eksperymentalnych. Błony biologiczne obecne na powierzchni aparatury procesowej mogą być przyczyną skażenia żywności przeznaczonej do spożycia i tym samym stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Prace, w których uczestniczę ukierunkowane są na badanie czynników odpowiedzialnych za formowanie biofilmów oraz poszukiwanie skutecznych metod zapobiegania temu zjawisku. Analizowany jest wpływ dostępności składników odżywczych, rodzaju szczepu bakterii, materiału z którego wykonana jest aparatura procesowa na kinetykę formowania biofilmów. Oceniana jest także skuteczność działania wybranych środków myjących i dezynfekcyjnych stosowanych w przemyśle spożywczym i biotechnologii mających na celu wyeliminowanie tego zjawiska. Wyniki tych badań zostały opublikowane w licznych pracach naukowych (**Zał. 5. II. A23, A28, A34, Zał. 5. II. D5, D8, D10**).

Istotnym elementem mojej aktywności naukowej są badania związane z praktycznym wykorzystaniem procesów biotechnologicznych w przemyśle, realizowane we współpracy z przedsiębiorcami. W ciągu ostatnich siedmiu lat brałem udział w pięciu dużych projektach badawczych i badawczo-rozwojowych mających na celu opracowanie nowych procesów biotechnologicznych z udziałem wyselekcjonowanych szczepów mikroorganizmów bądź enzymów. W trzech z tych projektów pełniłem funkcję kierownika (**Zał. 5. III. F1-5**). Dzięki udziałowi w wielu tego rodzaju przedsięwzięciach udało mi się znacznie poszerzyć swoją wiedzę na temat praktycznych aspektów związanych ze sterowaniem oraz kontrolą przebiegu procesów biotechnologicznych. Szeroki przekrój podejmowanych zagadnień oraz presja czasu związana z realizacją prac badawczych dla podmiotów zewnętrznych spowodowała także, że znacznie poszerzyłem swoją wiedzę na temat praktycznego zastosowania nowoczesnych narzędzi informatycznych w biotechnologii. Dzięki temu z powodzeniem stosuję aplikacje do statystycznego planowania eksperymentów (Design Expert, **Zał. 5. II. A9, A22, D24, D25**), projektowania i analizy procesów technologicznych i zakładów produkcyjnych (SuperPro Designer, Autodesk Factory Design Suite, **Zał. 5. II. E3**). Posiadaną wiedzę praktyczną staram się także przekazać studentom kierunku biotechnologia, dla którego prowadzę między innymi zajęcia z przedmiotu Projektowanie procesów biotechnologicznych i biowytwórci, aparaturoznawstwo oraz inżynierię bioprocusową (**Zał. 5. III. I**).



### Zestawienie dorobku naukowego

Rodzaj aktywności	Ilość	IF	Punkty MNiSW
Prace oryginalne	75	108,012	1765
Rozdziały w monografiach	5	-	19
Patenty przyznane	6	-	-
Zgłoszenia patentowe	2	-	-
Referaty na konferencjach tematycznych	13	-	-
Komunikaty na konferencjach krajowych i międzynarodowych	21	-	-
<b>Łącznie</b>	<b>122</b>	<b>108,012</b>	<b>1784</b>

\*Opublikowane prace cytowano **324 razy**. Indeks Hirscha **12** (wg Web of Science, na dzień 15.09.2017)

*H. Bielecki*