

Autoreferat

dr Dawid Mikulski
Katedra Biotechnologii
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego



Bydgoszcz, 2023

1. Imię i nazwisko.

Dawid Mikulski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

10.02.2015 r. – **doktor nauk biologicznych** (w dyscyplinie naukowej: biologia), Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Biologicznych), rozprawa doktorska pt.: „Wpływ hydrolizy kompleksów fitynowych w podłożach skrobiowych o wysokim ekstrakcie (HG) na aktywność fermentacyjną drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” – promotor dr hab. inż. Grzegorz Kłósowski prof. uczelni

05.07.2007 r. – **magister biologii**, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, Wydział Nauk Przyrodniczych

24.06.2006 r. – **kwalifikacje pedagogiczne**, Kujawsko-Pomorskie Centrum Edukacji Nauczycieli w Bydgoszcz

29.06.2005 r. – **licencjat biologii**, Akademia Bydgoska, Wydział Matematyki, Techniki i Nauk Przyrodniczych

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

01.10.2015 r. – obecnie – **adiunkt badawczo-dydaktyczny** Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, Wydział Nauk Biologicznych, Katedra Biotechnologii

01.10.2009 r. – 30.09.2015 r. – **asystent naukowo-dydaktyczny** Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, Wydział Nauk Przyrodniczych, Zakład Biotechnologii

01.10.2008 r. – 30.09.2009 r. – **starszy technik naukowo-techniczny** Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, Wydział Nauk Przyrodniczych, Zakład Biotechnologii

01.04.2007 r. – 30.09.2008 r. – **starszy technik naukowo-techniczny** Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, Wydział Nauk Przyrodniczych, Zakład Fizjologii i Toksykologii

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć,

jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.

Aktywność metaboliczna drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w procesie biokonwersji hydrolizatów lignocelulozowych uzyskiwanych z biomasy wywarów gorzelnicznych poddanych różnym metodom obróbki wstępnej.

4.2. Cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowego.

Osiągnięcie naukowe składa się z cyklu 7 oryginalnych prac eksperymentalnych opublikowanych w czasopismach naukowych, których sumaryczny *Impact Factor* (IF) wynosi 43,250, a liczba punktów MEiN* 765. Łączna liczba cytowań prac stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi 132 (według bazy *Web of Science* z dnia 08.05.2023 r.) oraz 158 (według bazy *Scopus* z dnia 08.05.2023 r.). Wszystkie prace zaliczane do osiągnięcia naukowego zostały opublikowane w czasopismach przypisanych do dyscypliny **nauki biologiczne** zgodnie z listą czasopism punktowanych MEiN z dnia 9. lutego 2021 roku.

* punktacja prac opublikowanych w latach 2019-2021 zgodna z wykazem stanowiącym załącznik do komunikatu MEiN z dnia 9 lutego 2021 r., natomiast punktacja prac opublikowanych w 2018 roku zgodna z wykazem opublikowanym w komunikacie MNiSW z dnia 25 stycznia 2017 r.

- 4.2.1. Mikulski D., Kłosowski G. 2018. Efficiency of dilute sulfuric acid pretreatment of distillery stillage in the production of cellulosic ethanol. *Bioresource Technology*, 268, 424-433.

IF₂₀₁₈ = 6,669; pkt. MEiN₂₀₁₇ = 45

Mój wkład w wyżej wymienioną publikację polegał na: zaprojektowaniu koncepcji badań; opracowaniu hipotez badawczych; wykonaniu oznaczeń charakteryzujących skład biomasy lignocelulozowej; wykonaniu doboru warunków kwasowej obróbki wstępnej lignocelulozy; opracowaniu optymalnych warunków hydrolizy enzymatycznej; przeprowadzeniu doświadczeń fermentacyjnych; ocenie wpływu detoksykacji na efektywność fermentacji; wykonaniu analiz chromatograficznych HPLC; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników badań; opracowaniu i interpretacji wyników badań; sformułowaniu wniosków; przygotowaniu manuskryptu; przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Udział poszczególnych autorów został potwierdzony stosownymi oświadczeniami (załączniki 3.1a; 3.1b).

- 4.2.2. Mikulski D., Kłosowski G., Menka A., Koim-Puchowska B. 2019. Microwave-assisted pretreatment of maize distillery stillage with the use of dilute sulfuric acid in the production of cellulosic ethanol. *Bioresource Technology*, 278, 318-328.

IF₂₀₁₉ = 7,539; pkt. MEiN₂₀₂₁ = 140

Mój wkład w wyżej wymienioną publikację polegał na: zaprojektowaniu koncepcji badań; opracowaniu hipotez badawczych; ocenie efektywności hydrolizy enzymatycznej celulozy; przeprowadzeniu doświadczeń fermentacyjnych mających na celu określenie dawki drożdży oraz biomasy gwarantującej wysoki poziom biokonwersji; przeprowadzeniu eksperymentów umożliwiających detoksykację uzyskanych podłoży fermentacyjnych; wykonaniu analiz chromatograficznych HPLC; współudziale w wykonaniu analizy statystycznej; opracowaniu i interpretacji wyników badań; sformułowaniu wniosków; przygotowaniu manuskryptu; przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Udział poszczególnych autorów został potwierdzony stosownymi oświadczeniami (załączniki 3.2a; 3.2b; 3.2c; 3.2d).

- 4.2.3. Mikulski D., Kłosowski G. 2020. Microwave-assisted dilute acid pretreatment in bioethanol production from wheat and rye stillages. Biomass and Bioenergy, 136, 105528.**

IF₂₀₂₀ = **5,061**; pkt. MEiN₂₀₂₁ = **100**

Mój wkład w wyżej wymienioną publikację polegał na: zaprojektowaniu koncepcji badań; opracowaniu hipotez badawczych; wykonaniu doboru warunków kwasowej obróbki wstępnej lignocelulozy; ocenie wpływu warunków obróbki wstępnej biomasy różnych wywarów gorzelnicznych na efektywności hydrolizy celulozy; przeprowadzeniu doświadczeń fermentacyjnych; wykonaniu analiz chromatograficznych HPLC; współudziale w wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników badań; opracowaniu i interpretacji wyników badań; sformułowaniu wniosków; przygotowaniu manuskryptu; przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Udział poszczególnych autorów został potwierdzony stosownymi oświadczeniami (załączniki 3.3a; 3.3b).

- 4.2.4. Mikulski D., Kłosowski G. 2020. Hydrotropic pretreatment on distillery stillage for efficient cellulosic ethanol production. Bioresource Technology, 300, 122661.**

IF₂₀₂₀ = **9,642**; pkt. MEiN₂₀₂₁ = **140**

Mój wkład w wyżej wymienioną publikację polegał na: zaprojektowaniu koncepcji badań; opracowaniu hipotez badawczych; analizie wpływu warunków ekstrakcji hydrotropowej na poziom ekstraktywności składników biomasy, wykonaniu hydrotropowej oraz kwasowej obróbki wstępnej lignocelulozy w warunkach podwyższonego ciśnienia; ocenie składu lignocelulozy po obróbce wstępnej; przeprowadzeniu doświadczeń fermentacyjnych; wykonaniu analiz chromatograficznych HPLC (węglowodanów, glicerolu, etanolu oraz produktów ubocznych obróbki wstępnej); wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników badań; opracowaniu i interpretacji wyników badań; sformułowaniu wniosków; przygotowaniu manuskryptu; przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Udział poszczególnych autorów został potwierdzony stosownymi oświadczeniami (załączniki 3.4a; 3.4b).

- 4.2.5. Mikulski D.,** Kłosowski G. 2021. Microwave-assisted hydrotropic pretreatment as a new and highly efficient way to cellulosic ethanol production from maize distillery stillage. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105, 3381-3392.

IF₂₀₂₁ = **5,560**; pkt MEiN₂₀₂₁ = **100**

Mój wkład w wyżej wymienioną publikację polegał na: zaprojektowaniu koncepcji badań; opracowaniu hipotez badawczych; analizie wpływu zmiennych warunków mikrofalowej obróbki hydrotropowej na poziom ekstraktywności biomasy, analizie składu lignocelulozy oraz podatności na hydrolizę enzymatyczną z użyciem celulaz; optymalizacji warunków hydrolizy enzymatycznej celulozy; przeprowadzeniu doświadczeń fermentacyjnych; wykonaniu analiz chromatograficznych HPLC; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników badań; opracowaniu i interpretacji wyników badań; sformułowaniu wniosków; przygotowaniu manuskryptu; przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Udział poszczególnych autorów został potwierdzony stosownymi oświadczeniami (załączniki 3.5a; 3.5b).

- 4.2.6. Kłosowski G., Mikulski D.** 2021. Impact of lignocellulose pretreatment by-products on *S. cerevisiae* strain Ethanol Red metabolism during aerobic and anaerobic growth. *Molecules*, 26(4), 806.

IF₂₀₂₁ = **4,927**; pkt. MEiN₂₀₂₁ = **140**

Mój wkład w wyżej wymienioną publikację polegał na: zaprojektowaniu koncepcji badań; opracowaniu hipotez badawczych; przygotowaniu podłoży hodowlanych oraz wykonaniu hodowli w warunkach tlenowych oraz fermentacji alkoholowej, wykonaniu analiz laboratoryjnych dotyczących oznaczenia metabolitów wewnątrzkomórkowych (białka, ergosterolu i trehalozy) oraz zewnątrzkomórkowych (glicerolu, kwasu octowego); wykonaniu analizy występowania białek HSP w komórkach drożdży metodą immunodetekcji; wykonaniu analiz chromatograficznych HPLC; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników badań; opracowaniu i interpretacji wyników badań; sformułowaniu wniosków; przygotowaniu manuskryptu. Jako autor korespondencyjny uczestniczyłem również w kontakcie z redakcją i przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Udział poszczególnych autorów został potwierdzony stosownymi oświadczeniami (załączniki 3.6a; 3.6b).

- 4.2.7. Mikulski D.,** Kłosowski G. 2022. Integration of first- and second-generation bioethanol production from beet molasses and distillery stillage after dilute sulfuric acid pretreatment. *BioEnergy Research* 15, 454-465.

IF₂₀₂₁ = **3,852**; pkt. MEiN₂₀₂₁ = **100**

Mój wkład w wyżej wymienioną publikację polegał na: zaprojektowaniu koncepcji badań; opracowaniu hipotez badawczych; wykonaniu analizy składu lignocelulozy; przeprowadzeniu obróbki wstępnej biomasy wywarów gorzelnicznych; przygotowaniu podłoży fermentacyjnych sporządzonych z biomasy wywarów gorzelnicznych oraz melasy buraczanej; przeprowadzeniu doświadczeń fermentacyjnych w warunkach

bioreaktorowych ukierunkowanych na maksymalizację produkcji bioetanolu; wykonaniu analiz chromatograficznych HPLC podłoży fermentacyjnych; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników badań; opracowaniu i interpretacji wyników badań; sformułowaniu wniosków; przygotowaniu manuskryptu; przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Udział poszczególnych autorów został potwierdzony stosownymi oświadczeniami (załączniki 3.7a; 3.7b).

4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego.

4.3.1. Wprowadzenie

Aktywność metaboliczna drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jest kluczowym czynnikiem odpowiadającym za efektywną biokonwersję węglowodanów w procesie fermentacji alkoholowej. W wyniku metabolizmu drożdży możliwe jest przeprowadzenie cyklu przemian biochemicznych w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, w wyniku których z węglowodanów na drodze glikolizy a następnie dekarboksylacji pirogronianu i redukcji aldehydu octowego uzyskuje się alkohol etylowy. Etanol jest powszechnie używanym surowcem w przemyśle spożywczym, chemicznym, kosmetycznym, farmaceutycznym, jednak obecnie coraz częściej wykorzystywany jest również jako biopaliwo. Głównym substratem w procesach fermentacyjnych są węglowodany będące źródłem węgla, dzięki którym drożdże są w stanie produkować energię oraz biomasę komórkową. Aktualnie, etanol otrzymuje się głównie z sacharozy oraz polisacharydów zapasowych tj. skrobi, jednak z uwagi na brak bezpośredniej możliwości asymilacji przez drożdże tak złożonego węglowodanu, fermentacja alkoholowa poprzedzona jest uwalnianiem skrobi ze struktur komórki roślinnej oraz hydrolizą enzymatyczną do cukrów prostych z wykorzystaniem enzymów amylolitycznych pochodzenia mikrobiologicznego (Sarris i Papanikolaou, 2016). Wykorzystanie surowców skrobiowych tj. ziarna żyta, pszenicy, kukurydzy i innych, jako substratów w otrzymywaniu etanolu wykorzystywanego na cele paliwowe stwarza pewien problem. Konieczność zwiększonej produkcji odnawialnych nośników energii, wynikająca ze zmniejszających się zasobów paliw kopalnych będzie powodowała wzrost cen surowców wykorzystywanych do otrzymywania etanolu paliwowego, a to będzie miało bezpośredni wpływ na wzrost cen produktów żywnościowych tj. ziarna zbóż lub kukurydzy z których jest produkowany. Rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie łatwo dostępnych, tanich oraz nie wykorzystywanych w produkcji żywności polisacharydów roślinnych w otrzymywaniu etanolu paliwowego. Źródłem węglowodanów spełniającym wszystkie wymienione wymagania jest biomasa lignocelulozowa (Lynd i in., 2017).

Biomasa lignocelulozowa jest zbudowana głównie z celulozy, hemicelulozy oraz lignin, jednak proporcje poszczególnych składników zależą od jej pochodzenia. Zawartość celulozy w biomacie może wynosić od ok. 20% w korze drewna miękkiego i twardego do ok. 90% w biomacie bawełny i lnu. Natomiast zawartość hemicelulozy waha się od 5% w biomacie bawełny, do ponad 50% w biomacie traw. W słomie kukurydzianej udział lignin może wynosić od 3-5%, a w biomacie drewna iglastego do ponad 30% (Balat, 2011). Celuloza jest liniowym, nierozgałęzionym homopolisacharydem zbudowanym z cząsteczek glukozy (od kilkuset do 10 tysięcy podjednostek) połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Dzięki wiązaniom

glikozydowym w konfiguracji β oraz występowaniu wiązań wodorowych (głównie międzycząsteczkowych) łańcuchy celulozy tworzą fibryle celulozowe, charakteryzujące się strukturą krystaliczną oraz obszarami amorficznymi. Drugim polisacharydem strukturalnym występującym w lignocelulozie jest hemiceluloza. Jest ona heteropolisacharydem o silnie rozgałęzionej strukturze amorficznej. Częsteczkę hemicelulozy mogą budować różne węglowodany tj. ksyloza, galaktoza, glukoza, arabinoza, mannoza oraz dodatkowo kwasy uronowe. Cukry proste w cząsteczce hemicelulozy mogą być połączone wiązaniami β -1,3- lub β -1,4-glikozydowymi, tworząc struktury takie jak: ksyloglukany, ksylany, mannany lub galaktany. Hemiceluloza drewna twardego zbudowana jest głównie z ksylanów, natomiast drewna miękkiego z glukomannanów (Singhvi i in., 2019). Ligniny w biomase roślinnej występują jako fenylopropanoid zbudowany z trzech różnych podjednostek monolignoli tj. alkoholu *p*-kumarylowego, koniferylowego i synapylowego, połączonych wiązaniami eterowymi (C – O – C) lub wiązaniami typu C – C. Ligniny obecne w biomase drewna miękkiego zawierają głównie alkohol koniferylowy, natomiast izolowane z drewna twardego głównie alkohol koniferylowy i sinapyłowy. Biomase traw cechuje obecność lignin zbudowanych ze wszystkich trzech podjednostek. Ligniny wykazują właściwości hydrofobowe i cechują się niską reaktywnością. Tworzą struktury otaczające fibryle celulozowe, co zwiększa wytrzymałość mechaniczną biomasy oraz czyni ją odporniejszą na degradację przez czynniki biologiczne (Ponnusamy i in., 2019; Singh i in., 2014; Wang i in., 2019).

Złożona struktura biomasy lignocelulozowej ogranicza jej podatność na degradację biologiczną, co skutecznie utrudnia wykorzystanie polisacharydów strukturalnych w procesach fermentacyjnych. W celu zwiększenia podatności lignocelulozy na hydrolizę enzymatyczną z wykorzystaniem hydrolaz, wprowadzono dodatkowy etap przygotowania biomasy roślinnej nazwany obróbką wstępną (*ang. pretreatment*). Głównym celem obróbki wstępnej biomasy jest rozluźnienie kompleksu lignocelulozy i zwiększenie jej podatności na hydrolizę enzymatyczną. Uzyskuje się to poprzez częściową degradację hemicelulozy i lignin oraz poprzez zmniejszenie zakresu występowania obszarów krystalicznych na rzecz zwiększenia udziału obszarów amorficznych w celulozie, co zwiększa dostępność włókien celulozowych dla enzymów celulolitycznych (Sarkar i in., 2012). Wśród metod obróbki wstępnej biomasy wyróżnia się metody fizyczne (mielenie, ekstruzja, użycie ultradźwięków lub mikrofal), chemiczne (wykorzystanie stężonych kwasów i zasad, cieczy jonowych, rozpuszczalników organicznych, ozonoliza), biologiczne (wykorzystanie grzybów białej lub brązowej zgnilizny). Jednak większą efektywnością oraz niższą uciążliwością dla środowiska naturalnego charakteryzują się metody fizyko-chemiczne, w których wykorzystuje się różnorodne reagenty (np. rozcieńczone kwasy, zasady, cieczy jonowe, substancje powierzchniowoczynne, amoniak, gorącą wodę) w warunkach podwyższonej temperatury oraz ciśnienia (Mood i in., 2013). Stosując metody fizyko-chemiczne, należy zwrócić uwagę na odpowiedni dobór warunków obróbki wstępnej, ponieważ przy źle dobranych parametrach, w szczególności zbyt wysokiej temperaturze oraz nadmiernym stężeniu katalizatora, może dochodzić do powstawania znacznych ilości toksycznych produktów ubocznych (inhibitorów metabolizmu komórkowego drożdży) zaliczanych do trzech grup związków: (I) pochodnych furanów, będących produktami dehydratacji cukrów (furfuralu z ksylozy, 5-hydroksymetylofurfuralu (5-HMF) z glukozy), (II) słabych kwasów organicznych (kwasu lewulinowego z 5-HMF, kwasu mrówkowego z 5-HMF i furfuralu, kwasu octowego z grup acetylowych uwalnianych z hemicelulozy), (III) związków

fenolowych (produktów depolimeryzacji lignin tj. waniliny, kwasu wanilinowego, aldehydu syringowego, kwasu syringowego, 4-hydroksybenzaldehydu i in.) (Almeida i in., 2007; Jönsson i in., 2013; Palmqvist i Hahn-Hagerdal, 2000a). Wymienione związki są identyfikowane jako toksyczne dla drożdży *S. cerevisiae*, a ich podwyższone stężenie obniża ich aktywność metaboliczną. Mechanizm inhibicji metabolizmu komórkowego drożdży przez słabe kwasy opiera się na występowaniu formy niezdysocjowanej tych związków przy pH medium fermentacyjnego na poziomie 5.0-5.5. Słabe kwasy w formie niezdysocjowanej są rozpuszczalne w tłuszczach i mogą swobodnie przenikać białkowo-lipidową błonę komórkową drożdży. W środowisku obojętnym cytozolu, kwasy przechodzą w formę zdysocjowaną i obniżają pH wewnątrzkomórkowe, którego regulacja wymaga wzmożonej aktywności ATP-azy błonowej. Konieczność regulacji pH i zużywanie ATP podczas procesów beztlenowych obniża zdolność komórek drożdży do produkcji etanolu (Palmqvist i Hahn-Hagerdal, 2000b). Zarówno furfural jak i 5-HMF są metabolizowane przez drożdże w trakcie hodowli w różnych warunkach dostępności tlenu (w warunkach tlenowych, z ograniczonym dostępem do tlenu oraz beztlenowych). Furfural jest redukowany z użyciem dehydrogenazy alkoholowej (ADH) do alkoholu furfurylowego. 5-HMF może być również redukowany do odpowiedniego alkoholu (alkoholu 5-hydroksymetylofurfurylowego), jednak odbywa się to z mniejszą wydajnością niż redukcja furfuralu. Udowodniono, że występowanie furfuralu oraz 5-HMF w podłożu fermentacyjnym obniża aktywność ADH, enzymów glikolitycznych, dehydrogenazy pirogronianowej oraz aldehydowej, ograniczając tempo przyrostu biomasy drożdży oraz biosyntezy etanolu (Almeida i in., 2007; Palmqvist i Hahn-Hagerdal, 2000b). Związki fenolowe również wywierają negatywny wpływ na metabolizm drożdży *S. cerevisiae*, jednak dokładny mechanizm inhibicji nie został jeszcze poznany. Sugeruje się, że związki fenolowe mogą wiązać się z błoną komórkową, zmieniając stosunek białek do lipidów błonowych, upośledzając w ten sposób jej funkcję. Związki fenolowe są metabolizowane przez *S. cerevisiae* do form mniej toksycznych, głównie alkoholowych (Jönsson i in., 2013). Należy zwrócić uwagę na fakt, iż produkty uboczne obróbki wstępnej lignocelulozy nigdy nie występują pojedynczo, a dodatkowo potwierdzono zachodzenie synergii w toksycznym oddziaływaniu większej liczby tych inhibitorów. Jednoczesne występowanie kwasu octowego i furfuralu powoduje wzmocnienie efektu toksycznego, przejawiającego się obniżoną produkcją biomasy drożdży. Występowanie w medium hodowlanym oprócz furfuralu również waniliny wzmaga stres oksydacyjny wywołany obecnością furfuralu oraz intensyfikuje fragmentację mitochondriów (Nguyen i in., 2014). W celu zmniejszenia negatywnego wpływu produktów ubocznych na aktywność metaboliczną drożdży stosuje się różne metody detoksykacji hydrolizatów celulozowych, pozwalające na usunięcie substancji toksycznych (ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz oraz ciecz-ciało stałe, podgrzewanie i destylacja) lub zmniejszenie toksyczności produktów ubocznych poprzez zobojętnienie, enzymatyczną lub chemiczną modyfikację (np. redukcję) (Jönsson i in., 2013).

Aktualny rozwój badań nad efektywnością biokonwersji hydrolizatów celulozowych w trakcie fermentacji alkoholowej, dotyczy głównie podatności nowych źródeł lignocelulozy na degradację enzymatyczną i fermentację oraz oceny skuteczności metod obróbki wstępnej i jej wpływu na aktywność metaboliczną drożdży wykorzystywanych w trakcie procesów fermentacyjnych. W swoich badaniach nad aktywnością metaboliczną drożdży w biokonwersji celulozowych podłoża fermentacyjnych skupiłem się właśnie nad oceną nowego źródła

biomasy lignocelulozowej, w postaci frakcji stałej wywaru gorzelniczego, po obróbce wstępnej przy wykorzystaniu rozcieńczonych kwasów i hydrotropów, w warunkach podwyższonego ciśnienia, uzyskiwanego przy użyciu ogrzewania konwencjonalnego oraz promieniowania mikrofalowego.

Jednym z odpadów przemysłu fermentacyjnego jest wywar gorzelniczy, powstający przy produkcji etanolu z surowców skrobiowych tj. ziarna zbóż lub kukurydzy. Wywar gorzelniczy to płynna pozostałość po oddestylowaniu etanolu z zacieru po fermentacji, zawierająca od 7 do 20% suchej masy, w skład której wchodzi głównie włókno, białka, tłuszcz, niezhydrolizowana skrobia oraz martwe komórki drożdży. Wywar gorzelniczy powstaje w ilości ok. 7-10 litrów na każdy litr wytworzonego etanolu (Kim i in., 2016; Wilkie i in., 2000). Jednym ze sposobów zagospodarowania wywaru gorzelniczego jest jego bezpośrednie przeznaczenie na pasze dla zwierząt hodowlanych, głównie bydła, jednak z uwagi na niską zawartość suchej masy i kaloryczność sposób ten jest aktualnie coraz rzadziej stosowany. Wzrasta znaczenie wywaru jako paszy dla zwierząt, poddanego rozdzieleniu na frakcję stałą i ciekłą. Następnie po wysuszeniu frakcji stałej łączy się ją ponownie z odciekami ale poddanym zateżeniu. W ten sposób otrzymywany jest produkt o nazwie DDGS (*ang. Dried Distillers Grains with Solubles*). Alternatywnym sposobem zagospodarowania wywaru gorzelniczego jest poddanie go fermentacji metanowej (Wilkie i in., 2000). W dotychczas opublikowanych wynikach badań nie oceniano frakcji stałej wywaru gorzelniczego jako substratu do otrzymywania hydrolizatów celulozowych i ich podatności na procesy biokonwersji.

Uzyskanie podatnej na hydrolizę enzymatyczną lignocelulozy, wiąże się z koniecznością przeprowadzenia obróbki wstępnej, odpowiedniej dla danego rodzaju biomasy roślinnej. Jedną z najczęściej stosowanych metod obróbki wstępnej biomasy lignocelulozowej jest zastosowanie rozcieńczonych kwasów, w warunkach podwyższonego ciśnienia uzyskiwanego w wyniku ogrzewania konwencjonalnego. Metoda ta jest uważana za stosunkowo tanią i ekonomicznie opłacalną. Można w niej zastosować różne kwasy nieorganiczne (kwas siarkowy, chlorowodorowy, azotowy, fosforowy), jednak najczęściej, z uwagi na niską cenę i wysoką efektywność w degradacji hemiceluloz i innych składników biomasy używany jest kwas siarkowy (Liu i in., 2016; Yang i in., 2013). Obróbka wstępna z wykorzystaniem rozcieńzonego kwasu siarkowego, oprócz korzyści w postaci hydrolizy hemicelulozy do ksylozy, arabinozy, galaktozy, mannozy i częściowej degradacji celulozy, może powodować również powstawanie związków identyfikowanych jako inhibitory fermentacji. Wykorzystanie obróbki wstępnej z zastosowaniem rozcieńczonych kwasów musi być jednak poprzedzone doborami i optymalizacją warunków procesowych tj. temperatury, czasu ekspozycji oraz stężenia kwasu, w celu określenia wpływu zastosowanych parametrów na efektywność obróbki wstępnej, określaną na podstawie skuteczności hydrolizy enzymatycznej celulozy (Noureddini i Byun, 2010). Alternatywnym sposobem ogrzewania biomasy w trakcie obróbki wstępnej może być zastosowanie promieniowania mikrofalowego o częstotliwości od 0,3 do 300 GHz. Podgrzewanie z wykorzystaniem mikrofal jest bardziej efektywne energetycznie w porównaniu z konwencjonalnym podgrzewaniem, gdyż nie polega na wymianie ciepła pomiędzy ośrodkiem a elementem grzejnym, ale powoduje wzrost temperatury w całej objętości ogrzewanego ośrodka w efekcie rotacji dipoli w polu elektromagnetycznym. Daje to wymierne korzyści tj. krótszy czas ogrzewania oraz możliwość prawie natychmiastowego rozpoczęcia i zakończenia procesu. Z drugiej strony specyfika promieniowania mikrofalowego, może prowadzić do

powstawania stref o dużo wyższej temperaturze tzw. miejsc przegrzania (*ang. hotspots*), mogących stwarzać warunki sprzyjające dehydratacji węglowodanów i powodować powstawanie m. in. furfuralu oraz 5-HMF (Asomaning i in., 2018; Bundhoo, 2018). W trakcie obróbki mikrofalowej obserwuje się oprócz efektu termalnego (podgrzewanie biomasy i wzrost ciśnienia) również zjawisko nietermalne, będące skutkiem oscylacyjnego ruchu dipoli, prowadzące do rozrywania wiązań wodorowych pomiędzy włóknami celulozowymi. W celu intensyfikacji degradacji poszczególnych składników biomasy lignocelulozowej stosuje się promieniowanie mikrofalowe połączone z użyciem rozcieńczonych kwasów oraz podwyższonego ciśnienia. W takich warunkach uzyskuje się efekty obejmujące częściową degradację celulozy w podwyższonej temperaturze, hemicelulozy w środowisku słabych kwasów oraz lignin w podwyższonym ciśnieniu i temperaturze (Bundhoo, 2018). Zabiegiem dodatkowo zwiększającym podatność lignocelulozy na hydrolizę enzymatyczną jest usunięcie substancji hydrofobowych, ograniczających dostępność włókien celulozowych dla czynników hydrolitycznych, czyli delignifikacja. Wśród czynników delignifikujących coraz większym uznaniem cieszą się substancje zmniejszające napięcie powierzchniowe i zwiększające rozpuszczalność substancji hydrofobowych tj. ligniny, do których zaliczyć można rozpuszczalniki organiczne, ciecze jonowe oraz hydrotropy (Wang i in., 2013; Yu i in., 2011). W badaniach własnych skupiłem się nad możliwością wykorzystania hydrotropów w warunkach podwyższonego ciśnienia uzyskiwanego z użyciem ogrzewania konwencjonalnego i mikrofalowego w trakcie obróbki wstępnej biomasy wywarów gorzelnicznych. Hydrotropy to małowczątkowe sole sodowe lub potasowe z podstawioną grupą alkilową kwasu benzoowego lub arylosulfonowego o budowie amfifilowej, dzięki czemu wykazują zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego podobnie jak surfaktanty. Jednak w odróżnieniu od surfaktantów, cząsteczki hydrotropów charakteryzują się występowaniem mniejszych fragmentów hydrofobowych i nie wykazują zdolności samoagregacji w micelle (Devendra i in., 2016; Olsson i in., 2019). Najbardziej efektywnymi hydrotropami są ksylenosulfonian sodu (*ang. sodium xylene sulfonate*, Na-XS) oraz kumenosulfonian sodu (*ang. sodium cumene sulfonate*, NaCS). Użycie tych związków umożliwia redukcję zawartości lignin w biomase roślinnej w zależności od jej pochodzenia o ok. 38% w przypadku wiórów eukaliptusa oraz o ok. 47% przy użyciu mieszaniny wiórów bukowych i brzozowych (Mou i Wu, 2016; Olsson i in., 2019). Bardzo istotnym aspektem użycia hydrotropów w procesie ekstrakcji lignin z biomasy lignocelulozowej jest możliwość odzysku substancji rozpuszczonych poprzez rozcieńczenie roztworu hydrotropu, który może być ponownie użyty po zateżeniu (Devendra i Pandey, 2016). Delignifikacja hydrotropowa najskuteczniej zachodzi w warunkach podwyższonego ciśnienia i często musi być łączona z późniejszą obróbką wstępną w środowisku rozcieńczonych kwasów, co oprócz obniżenia udziału lignin, umożliwia też uzyskanie wysokiego stężenia glukozy w wyniku hydrolizy enzymatycznej celulozy (Devendra i in., 2016).

4.3.2. Hipotezy badawcze i cele badań

W świetle przedstawionych powyżej zagadnień zasadne było podjęcie badań, których celem była ocena aktywności metabolicznej drożdży *S. cerevisiae* w trakcie procesu fermentacji alkoholowej hydrolizatów celulozowych uzyskanych z biomasy wywarów gorzelnicznych

(żytniego, pszenicznego i kukurydzianego) po obróbce wstępnej z użyciem rozcieńczonego kwasu siarkowego lub kumenosulfonianu sodu w zmiennych warunkach procesowych przy zastosowaniu ogrzewania konwencjonalnego i mikrofalowego. W ramach przedstawionego osiągnięcia naukowego weryfikowano następujące hipotezy badawcze:

- H1. Hydrolizaty celulozowe uzyskane z biomasy wywarów gorzelnicznych zawierają składniki troficzne umożliwiające uzyskanie wysokiej aktywności metabolicznej drożdży *S. cerevisiae*, gwarantującej całkowitą konwersję cukrów fermentujących na etanol.
- H2. Występowanie inhibitorów fermentacji w hydrolizatach celulozowych uzyskanych z biomasy wywarów gorzelnicznych wpływa na aktywność metaboliczną drożdży oraz generuje stres toksyczny.
- H3. Optymalizacja warunków obróbki wstępnej biomasy wywarów gorzelnicznych ma kluczowe znaczenie dla efektywnej hydrolizy polisacharydów strukturalnych oraz biokonwersji cukrów fermentujących zawartych w hydrolizatach do etanolu celulozowego.
- H4. Skuteczna delignifikacja biomasy wywarów gorzelnicznych umożliwia uzyskanie hydrolizatów celulozowych o wysokiej zawartości cukrów fermentujących oraz przeprowadzenie efektywnej fermentacji alkoholowej z użyciem drożdży *S. cerevisiae*.

W celu weryfikacji postawionych hipotez w kolejnych etapach badań zaplanowano realizację następujących celów szczegółowych:

- C1. Ocena wpływu warunków obróbki wstępnej biomasy wywarów gorzelnicznych na podatność celulozy na hydrolizę enzymatyczną oraz powstawanie inhibitorów metabolizmu komórkowego drożdży.
- C2. Wpływ występowania produktów ubocznych obróbki wstępnej biomasy na aktywność fermentacyjną oraz reakcję metaboliczną drożdży *S. cerevisiae*.
- C3. Ocena redukcji negatywnego oddziaływania inhibitorów metabolizmu komórkowego drożdży, poprzez przeprowadzenie efektywnej detoksykacji hydrolizatów uzyskanych z biomasy wywarów gorzelnicznych.
- C4. Ocena przydatności biomasy wywarów gorzelnicznych poddanej różnym rodzajom obróbki wstępnej do efektywnej biokonwersji z użyciem drożdży *S. cerevisiae*.
- C5. Ocena aktywności metabolicznej drożdży w trakcie fermentacji alkoholowej podłoża o wysokiej zawartości cukrów fermentujących uzyskanych na bazie hydrolizatów celulozowych z biomasy wywarów gorzelnicznych.

4.3.3. Omówienie uzyskanych wyników badań

Publikacja 4.2.1.: Mikulski D., Kłosowski G. 2018. Efficiency of dilute sulfuric acid pretreatment of distillery stillage in the production of cellulosic ethanol. Bioresource Technology, 268, 424-433.

Pierwsze prace badawcze (**publikacja 4.2.1.**) nad oceną aktywności fermentacyjnej drożdży na hydrolizatach celulozowych uzyskanych z wywarów gorzelnicznych prowadzono z udziałem

biomasy po obróbce wstępnej z użyciem rozcieńczonego kwasu siarkowego, w warunkach podwyższonej temperatury uzyskiwanej przy zastosowaniu ogrzewania konwencjonalnego. Ten sposób obróbki wstępnej jest stosunkowo najlepiej opisany w literaturze, dlatego wykorzystano go do pierwszych badań, na całkowicie nowym surowcu jakim była biomasa wywaru żytniego, pszenicznego oraz kukurydzianego. Celem badań była ocena przydatności biomasy wywarów gorzelnicznych jako źródła lignocelulozy w procesie fermentacji alkoholowej prowadzonej z użyciem *S. cerevisiae*, która została poprzedzona badaniami obejmującymi charakterystykę lignocelulozy (określenie zawartości celulozy, hemicelulozy oraz lignin), dobór warunków obróbki wstępnej oraz hydrolizy enzymatycznej celulozy. Badania pozwoliły na wykazanie istotnych różnic pod względem zawartości celulozy, hemicelulozy oraz lignin w biomase wywarów różnego pochodzenia. Najwyższą zawartość celulozy ($32,2 \pm 1,4\%$ SM – suchej masy) oraz najniższą zawartość hemicelulozy i lignin spośród analizowanych wywarów, stwierdzono we frakcji stałej wywaru kukurydzianego. Próby wywaru żytniego i pszenicznego charakteryzowały się zbliżoną zawartością celulozy w przedziale 16,8-18,6% SM oraz podobną zawartością hemicelulozy na poziomie od 29,6 do 34,1% SM. W celu określenia wpływu warunków obróbki wstępnej na ilość uwalnianej z biomasy glukozy oraz podatność biomasy na hydrolizę enzymatyczną z użyciem celulaz, zastosowano kwas siarkowy w stężeniu 0,1 oraz 0,2 M, temperaturę 121 lub 131°C w czasie 30 lub 60 minut. Badania wykazały wyraźny wpływ zmiennych warunków obróbki wstępnej na ilość uzyskiwanej glukozy w wyniku samej obróbki wstępnej. Jednak zmienne warunki realizacji tego etapu obróbki surowca nie miały już tak wyraźnego wpływu na zmianę podatności celulozy na hydrolizę enzymatyczną. Najwyższe stężenie glukozy w wyniku hydrolizy enzymatycznej celulozy stwierdzono dla biomasy wywaru żytniego oraz pszenicznego na poziomie 136-140 mg/g SM po obróbce wstępnej z użyciem 0,2 M H₂SO₄ w temperaturze 121°C w czasie 60 minut, natomiast dla biomasy wywaru kukurydzianego na poziomie $223,2 \pm 2,4$ mg/g SM po obróbce wstępnej z użyciem 0,2 M H₂SO₄ w temperaturze 131°C w czasie 60 minut. Optymalne warunki obróbki wstępnej zostały wykorzystane w trakcie przygotowywania podłoży fermentacyjnych. Zastosowanie zateżnienia hydrolizatów pod obniżonym ciśnieniem, w celu uzyskania podłoży fermentacyjnych o podwyższonej zawartości węglowodanów, skutkowało podwyższonym stężeniem 5-HMF odpowiednio w podłożach z biomasy wywaru pszenicznego na poziomie 0,12 g/l, wywaru żytniego na poziomie 0,25 g/l oraz wywaru kukurydzianego na poziomie 0,46 g/l. Uzyskane stężenie 5-HMF w podłożach z wywarów pszenicznego i żytniego nie spowodowało ograniczenia aktywności metabolicznej drożdży, co przejawiało się pełną biokonwersją glukozy na etanol w czasie 48 godzin fermentacji. Dodatkowo, w podłożu uzyskanym z wywaru pszenicznego zaobserwowano całkowitą redukcję stężenia 5-HMF w trakcie fermentacji, a w podłożu z wywaru żytniego stężenie tego związku zmniejszyło się o 0,17 g/l, co wskazuje na aktywność dehydrogenazy alkoholowej odpowiadającej za redukcję tego związku do formy alkoholowej. Jednak wyższe stężenie tego produktu dehydratacji glukozy, obserwowane w podłożu z biomasy wywaru kukurydzianego, powodowało zahamowanie aktywności fermentacyjnej drożdży i niepełne odfermentowanie glukozy, nawet w czasie 72 godzin fermentacji. Wymusiło to zastosowanie detoksykacji w postaci ekstrakcji z użyciem węgla aktywnego w celu zmniejszenia stężenia 5-HMF w podłożu fermentacyjnym. Uzyskane w wyniku detoksykacji obniżone stężenie 5-HMF (0,17 g/l) ograniczyło negatywne oddziaływanie tego związku na metabolizm drożdży, co przejawiało się dalszą redukcją stężenia 5-HMF i pełną biokonwersją glukozy do etanolu w 48 godzinach trwania fermentacji. Wysoka aktywność metaboliczna drożdży przełożyła się na wysoki poziom biokonwersji, co prowadziło do uzyskania w podłożu z biomasy wywaru

kukurydzianego po detoksykacji stężenia etanolu na poziomie $35,44 \pm 1,45$ g/l. Uzyskane rezultaty badań umożliwiły weryfikację hipotez H1 i H2 oraz potwierdziły celowość wykorzystania wywarów gorzelnicznych po obróbce wstępnej z użyciem rozcieńczonego kwasu siarkowego i podwyższonej temperatury jako substratu w procesie otrzymywania etanolu celulozowego. Jednak uzyskanie wysokiej aktywności metabolicznej drożdży wymaga w przypadku wywaru kukurydzianego zastosowania procesu detoksykacji.

Publikacja 4.2.2.: Mikulski D., Kłosowski G., Menka A., Koim-Puchowska B. 2019. Microwave-assisted pretreatment of maize distillery stillage with the use of dilute sulfuric acid in the production of cellulosic ethanol. *Bioresource Technology*, 278, 318-328.

oraz

Publikacja 4.2.3.: Mikulski D., Kłosowski G. 2020. Microwave-assisted dilute acid pretreatment in bioethanol production from wheat and rye stillages. *Biomass and Bioenergy*, 136, 105528.

Kolejnym etapem badań było wykorzystanie rozcieńczonego kwasu siarkowego w połączeniu z promieniowaniem mikrofalowym do obróbki wstępnej biomasy wywaru pszenicznego, żytniego oraz kukurydzianego i ocena efektywności zaproponowanego sposobu przygotowania surowca w procesie fermentacji alkoholowej. Uzyskane wyniki badań zostały zaprezentowane w dwóch publikacjach (4.2.2. oraz 4.2.3.). W badaniach wykorzystano kwasową obróbkę wstępną, jednak z uwagi na wyniki zaprezentowane we wcześniejszej publikacji (4.2.1.) i lepszą skuteczność wyższego stężenia kwasu siarkowego w obróbce wstępnej biomasy, w badaniach zastosowano ten związek w stężeniu 0,2 M. Pierwsze badania, wykorzystujące promieniowanie mikrofalowe, obejmowały użycie biomasy wywaru kukurydzianego (publikacja 4.2.2.) w zmiennych warunkach obróbki wstępnej. Analizowano wpływ mocy generatora mikrofal (300, 600, 1200 W), ciśnienia (54, 93, 152 PSI) oraz czasu obróbki wstępnej (10, 15, 20 minut) na skuteczność degradacji biomasy oraz jej podatność na dalszą hydrolizę z użyciem enzymów celulolitycznych. Badania wykazały brak istotnego statystycznie wpływu mocy generatora mikrofal na ilość uzyskiwanej glukozy bezpośrednio po obróbce wstępnej biomasy wywaru gorzelnicznego. Natomiast najwyższą efektywność hydrolizy enzymatycznej celulozy po 24 godzinach procesu na poziomie $75,8 \pm 0,9\%$ uzyskano przy mocy generatora mikrofal na poziomie 300 W, ciśnieniu 54 PSI w czasie 15 minut obróbki wstępnej. Stwierdzono również, że wraz ze wzrostem ciśnienia podczas obróbki wstępnej, obniża się podatność celulozy na hydrolizę enzymatyczną, co skutkuje uzyskiwaniem niższego stężenia glukozy (nawet o 100 mg/g SM) powstałej w efekcie hydrolizy celulozy. Wykorzystanie ciśnienia na poziomie 152 PSI obniża ilość pozostałych cukrów uzyskiwanych w wyniku obróbki wstępnej tj. galaktozy i ksylozy oraz arabinozy, co jest związane z występowaniem zjawiska dehydratacji węglowodanów do toksycznych produktów ubocznych obróbki wstępnej. Zastosowanie podwyższonego ciśnienia powoduje wzrost stężenia kwasu lewulinowego (do wartości ok. 25 mg/g SM), 5-HMF (do wartości ok. 15 mg/g SM) oraz furfuralu (do wartości ok. 21 mg/g SM). W kolejnych etapach badań nad wykorzystaniem biomasy wywaru kukurydzianego jako surowca w procesie biosyntezy etanolu celulozowego, wykorzystano mikrofalową obróbkę wstępną gwarantującą uzyskanie najwyższego stężenia glukozy w wyniku hydrolizy enzymatycznej. Badania obejmowały w pierwszej kolejności

dobór wybranych warunków fermentacji, czyli dawkę drożdży oraz stężenie biomasy w podłożu fermentacyjnym. Niezależnie od użytego stężenia biomasy (70, 140, 210 g/l) całkowitą biokonwersję glukozy do etanolu po 24 godzinach fermentacji uzyskiwano nawet przy najniższej dawce drożdży na poziomie 2 g/l. Dalsze badania dotyczące aktywności metabolicznej drożdży w trakcie fermentacji alkoholowej podłoży uzyskanych w wyniku zateżenia hydrolizatów celulozowych z biomasy wywaru kukurydzianego po obróbce wstępnej, prowadzono w zoptymalizowanych warunkach. Z uwagi na stwierdzone podwyższone stężenie 5-HMF w wyniku zateżenia podłoża hodowlanego, próby fermentacyjne prowadzone były również z użyciem podłoży suplementowanych (dodatek związków mineralnych oraz ekstraktu drożdżowego) oraz po detoksykacji z użyciem węgla aktywnego. Występowanie 5-HMF w stężeniu 1,3 g/l powodowało zmniejszoną aktywność metaboliczną drożdży w pierwszych 24 godzinach fermentacji alkoholowej, co przejawiało się obniżonym tempem biokonwersji glukozy do etanolu. Zastosowanie suplementacji podłoża fermentacyjnego nie miało wpływu na tempo asymilacji glukozy oraz redukcję stężenia 5-HMF w porównaniu do podłoża bez suplementacji, jednak ograniczyło produkcję kwasu octowego przez drożdże o ok. 0,2 g/l oraz zwiększyło asymilację galaktozy i ksylozy o ok. 2,5 g/l. Natomiast użycie węgla aktywnego w celu detoksykacji podłoża fermentacyjnego obniżyło początkowe stężenie 5-HMF o ok. 1 g/l, co przełożyło się na wyższą aktywność fermentacyjną drożdży w pierwszych 24 godzinach fermentacji. Badania potwierdziły wpływ 5-HMF na wydłużenie fazy *lag* w trakcie cyklu rozwojowego drożdży *S. cerevisiae* (Tian i in., 2009). Zastosowanie suplementacji lub detoksykacji podłoży fermentacyjnych uzyskanych z biomasy wywaru kukurydzianego po mikrofalowej obróbce wstępnej miało istotny statystycznie wpływ na aktywność fermentacyjną drożdży, co umożliwiło uzyskanie wyższego końcowego stężenia etanolu o ok. 2 g/l oraz wyższej wydajności fermentacji o ok. 5% w stosunku do wariantu kontrolnego.

Dalsze badania nad możliwością wykorzystania mikrofalowej obróbki wstępnej z użyciem 0,2 M kwasu siarkowego jako sposobu przygotowania biomasy lignocelulozowej do procesów biokonwersji z użyciem *S. cerevisiae* prowadzono z użyciem wywaru pszenicznego oraz żytniego i przy wykorzystaniu mocy generatora mikrofal na poziomie 300 W (**publikacja 4.2.3.**). Podobnie jak w przypadku biomasy wywaru kukurydzianego, warunkami mikrofalowej obróbki wstępnej biomasy wywaru pszenicznego i żytniego gwarantującymi uzyskanie najwyższego stężenia glukozy było ciśnienie 54 PSI oraz czas 15 minut. W tych badaniach zwrócono szczególną uwagę na wpływ produktów ubocznych powstających w wyniku mikrofalowej obróbki wstępnej prowadzonej w źle dobranych warunkach na aktywność fermentacyjną drożdży. Badania fermentacyjne obejmowały przygotowanie podłoży hodowlanych w dwóch wariantach tj. zawierających wysokie stężenie węglowodanów oraz zawierających wysokie stężenie inhibitorów fermentacji. W tym celu przygotowano podłoże fermentacyjne z biomasy poddanej mikrofalowej obróbce wstępnej w warunkach gwarantujących wysoką podatność celulozy na hydrolizę enzymatyczną i ograniczone powstawanie inhibitorów fermentacji oraz z biomasy po obróbce wstępnej w podwyższonym ciśnieniu (152 PSI), co sprzyjało dehydratacji glukozy i powstawaniu kwasu lewulinowego oraz 5-HMF. Występowanie produktów dehydratacji cukrów w podłożach fermentacyjnych znacząco ograniczyło aktywność fermentacyjną drożdży. W podłożu z biomasy wywaru pszenicznego zawierającym podwyższone stężenie inhibitorów, końcowe stężenie etanolu wynosiło jedynie ok. 2 g/l. W podłożach z biomasy wywaru żytniego zaobserwowano

praktycznie całkowite zahamowanie procesów fermentacyjnych przez pierwsze 48 godzin w obecności podwyższonego stężenia 5-HMF. Dopiero pomiędzy 48 a 72 godziną fermentacji następował wzrost stężenia etanolu do poziomu ok. 6,5 g/l oraz wzmożona redukcja stężenia 5-HMF. Takie wyniki były wskazaniem do wdrożenia procesu detoksykacji i oceny aktywności metabolicznej drożdży w podłożach o obniżonej zawartości inhibitorów fermentacji. Zastosowanie węgla aktywnego w dwóch dawkach (5 oraz 10 g/100 g biomasy) umożliwiło redukcję początkowego stężenia inhibitorów metabolizmu komórkowego drożdży do poziomu umożliwiającego zachowanie wysokiej aktywności fermentacyjnej drożdży i uzyskanie wysokiego poziomu biokonwersji glukozy na etanol. Maksymalne stężenie etanolu w podłożach po detoksykacji stwierdzono po 48 godzinach, w przypadku wywaru żytniego oraz po 72 godzinach przy wykorzystaniu wywaru pszenicznego. Badania potwierdziły konieczność optymalizacji warunków mikrofalowej obróbki wstępnej z użyciem roztworu kwasu siarkowego w celu ograniczenia występowania inhibitorów procesów fermentacyjnych. W sytuacji występowania podwyższonego stężenia substancji toksycznych będącego efektem źle dobranych warunków obróbki wstępnej, istnieje możliwość ograniczenia ich oddziaływania na komórki drożdży poprzez zastosowanie detoksykacji z użyciem węgla aktywnego.

Zrealizowane badania zaprezentowane w obu publikacjach (**4.2.2. oraz 4.2.3.**) umożliwiły weryfikację hipotez badawczych H1, H2 oraz H3 i wskazały na konieczność oceny aktywności fermentacyjnej drożdży w podłożach celulozowych zawierających podwyższone stężenie inhibitorów metabolizmu komórkowego. Kluczowy jest zatem dobór warunków mikrofalowej obróbki wstępnej biomasy lignocelulozowej w celu ograniczenia powstawania inhibitorów fermentacji. Wykazano również, że hydrolizaty uzyskane z biomasy wywarów gorzelnicznych są komplementarnymi podłożami fermentacyjnymi, które gwarantują wysoki poziom biosyntezy etanolu przy ograniczonym występowaniu produktów dehydratacji cukrów, a zwiększona ich ilość może zostać usunięta poprzez skuteczny proces detoksykacji.

Publikacja 4.2.4.: Mikulski D., Kłosowski G. 2020. Hydrotropic pretreatment on distillery stillage for efficient cellulosic ethanol production. Bioresource Technology, 300, 122661.

Wykorzystanie kumenosulfonianu sodu (NaCS) jako hydrotropu umożliwiającego ekstrakcję składników biomasy wywarów gorzelnicznych i ocena ich przydatności jako substratów w otrzymywaniu etanolu celulozowego było przedmiotem dalszych badań (**publikacja 4.2.4.**). Ekstrakcję składników biomasy wywaru pszenicznego, żytniego oraz kukurydzianego prowadzono w zmiennych warunkach temperaturowych (od 40 do 80°C), stężenia NaCS (od 5 do 20% v/v) w czasie od 1,5 do 6,0 godzin, przy różnym stopniu rozdrobnienia cząstek wywaru (<1,0 mm oraz >2,8 mm). Najwyższy poziom ekstrakcji składników biomasy analizowanych wywarów gorzelnicznych uzyskano przy rozmiarach cząstek poniżej 1,0 mm oraz temperaturze 80°C, 20% v/v NaCS w czasie 3 godzin. Uzyskane rezultaty, dotyczące wzrastającego poziomu ekstrakcji składników biomasy wraz z rosnącą temperaturą, stały się impulsem do dalszych badań nad wykorzystaniem ekstrakcji z użyciem NaCS w podwyższonej temperaturze tj. 121 i 131°C. Zastosowanie podwyższonej temperatury umożliwiło uzyskanie najwyższego poziomu ekstrakcji składników biomasy wywarów na poziomie wynoszącym ok. 25% w przypadku wywaru żytniego i kukurydzianego oraz ok. 36% dla wywaru pszenicznego. Biomasa wywarów charakteryzująca się najwyższym poziomem ekstrakcji z użyciem NaCS posłużyła do dalszych badań nad możliwością jej wykorzystania jako substratu do

przygotowania podłoży fermentacyjnych. Zastosowanie podwyższonej temperatury ekstrakcji z wykorzystaniem hydrotropu, miało wpływ na zawartość podstawowych składników lignocelulozy. Niezależnie od rodzaju wywaru, w wyniku użycia NaCS w podwyższonej temperaturze zaobserwowano wzrost zawartości celulozy o ok. 1-2% SM oraz hemicelulozy o ok. 1,5-5% SM. Wyższa zawartość celulozy oraz hemicelulozy w biomacie po obróbce wstępnej jest efektem ekstrakcji składników biomasy w trakcie procesu obróbki wstępnej, co przekłada się na względny wzrost zawartości tych polisacharydów przy wykorzystaniu stałej naważki analitycznej wykorzystywanej do jego oznaczania (Ziaei-Rad i in., 2021). Uzyskana w wyniku ekstrakcji z użyciem NaCS biomasa wywarów gorzelnicznych została poddana obróbce wstępnej z użyciem 0,2 M kwasu siarkowego w podwyższonej temperaturze oraz hydrolizie enzymatycznej celulozy. Uzyskane hydrolizaty zostały wykorzystane jako podłoża fermentacyjne. Zastosowana metodologia badań pozwoliła uzyskać podłoża fermentacyjne zawierające stosunkowo wysokie stężenia glukozy (nawet 63,5 g/l w przypadku podłoża z wywaru kukurydzianego po ekstrakcji NaCS) bez wykorzystania zateżenia pod obniżonym ciśnieniem. Wszystkie podłoża uzyskane z biomasy po ekstrakcji z użyciem NaCS charakteryzowały się wyższym początkowym stężeniem glukozy (1,5-2 g/l dla podłoża z wywarów żytnich i pszenicznych oraz ok. 7,5 g/l dla podłoża z wywaru kukurydzianego) oraz galaktozy i ksylozy. Hydrolizaty uzyskane z biomasy wywarów po ekstrakcji z użyciem NaCS oraz późniejszej kwasowej obróbce wstępnej stanowiły komplementarne podłoża fermentacyjne, w których niemal całkowita asymilacja glukozy została osiągnięta już po 48 godzinach fermentacji. Wysoka aktywność metaboliczna drożdży znajduje również odzwierciedlenie w tempie biosyntezy etanolu, którego stężenie w podłożu fermentacyjnym uzyskanym z biomasy wywaru kukurydzianego po ekstrakcji NaCS wynosiło w 72 godzinie $30,84 \pm 0,41$ g/l. Redukcji ulega natomiast stężenie produktów ubocznych obróbki wstępnej lignocelulozy. W wyniku aktywności drożdży, całkowitej redukcji ulega stężenie 5-HMF już w 48 godzinach fermentacji. Natomiast stężenie związków fenolowych tj. waniliny, aldehydu syringowego oraz kwasu ferulowego, będących efektem depolimeryzacji lignin, ulega nieznacznemu zmniejszeniu od 2 do 18 mg/l w trakcie trwania całego procesu fermentacji alkoholowej. Uzyskane rezultaty badań wskazują na przydatność wykorzystania hydrotropu w postaci NaCS do obróbki wstępnej biomasy wywarów gorzelnicznych wykorzystywanych w procesach fermentacyjnych. Istotnym jest również fakt, że zastosowanie ekstrakcji z użyciem NaCS nie ma negatywnego wpływu na aktywność metaboliczną drożdży oraz nie sprzyja powstawaniu toksycznych produktów ubocznych obróbki wstępnej. Zaprezentowane w **publikacji 4.2.4.** wyniki badań pozwalają zweryfikować hipotezy H1 oraz H4, a dodatkowo stanowią wstęp do dalszych badań nad opracowaniem nowej metody obróbki wstępnej lignocelulozy z wykorzystaniem hydrotropu jako jedyne go czynnika delignifikującego.

Publikacja 4.2.5.: Mikulski D., Kłosowski G. 2021. Microwave-assisted hydrotropic pretreatment as a new and highly efficient way to cellulosic ethanol production from maize distillery stillage. Applied Microbiology and Biotechnology 105, 3381-3392.

Zaobserwowana we wcześniejszych badaniach, rosnąca wraz ze wzrostem ciśnienia efektywność działania hydrotropu w ekstrakcji składników biomasy wywarów gorzelnicznych, stała się powodem dalszych badań nad jednoczesnym wykorzystaniem kumenosulfonianu sodu (NaCS) oraz promieniowania mikrofalowego w obróbce wstępnej lignocelulozy. Przedstawione w **publikacji 4.2.5.** wyniki badań stanowią kompleksową charakterystykę nowo opracowanej metody obróbki wstępnej lignocelulozy, dotychczas nie opisywanej

w literaturze naukowej. Badania obejmowały określenie wpływu parametrów mikrofalowej obróbki wstępnej z użyciem hydrotropu tj. stężenia NaCS (0, 10, 20% v/v), ciśnienia (39, 78, 117 PSI) oraz czasu (10, 20, 30 minut) na efektywność ekstrakcji składników biomasy wywaru kukurydzianego oraz skład uzyskanej lignocelulozy. Określona została również podatność uzyskanej w wyniku obróbki wstępnej biomasy na hydrolizę z użyciem celulaz. Istotnym elementem opracowywanej metody obróbki wstępnej była analiza aktywności metabolicznej drożdży w trakcie fermentacji alkoholowej podłoży uzyskanych z biomasy po obróbce wstępnej z użyciem NaCS oraz promieniowania mikrofalowego. Badania wykazały, że największy wpływ na poziom ekstrakcji składników biomasy miało ciśnienie oraz stężenie NaCS. Przy wykorzystaniu 20% v/v roztworu kumenosulfonianu sodu oraz ciśnieniu 117 PSI, w trakcie obróbki wstępnej stwierdzono ubytek masy lignocelulozy na poziomie 67%, co przekładało się bezpośrednio na najwyższą obserwowaną zawartość celulozy w biomacie oraz najefektywniejszą delignifikację (redukcja zawartości lignin o ok. 44%). Uzyskana w ten sposób biomasa charakteryzowała się również wysoką podatnością na hydrolizę enzymatyczną, której wydajność wyniosła nawet ok. 80% przy zastosowaniu stężenia biomasy 160 g/l i dawce preparatu celulitycznego 4 FPU (*ang. filter paper units*)/g biomasy. Biomasa wywaru kukurydzianego po mikrofalowej obróbce hydrotropowej okazała się zatem świetnym surowcem do przygotowania hydrolizatu zawierającego wysokie stężenie glukozy na poziomie ok. 80 g/l, uzyskiwane bez konieczności zateżenia pod obniżonym ciśnieniem. Niezależnie od tego, czy podłoże fermentacyjne przygotowano z wykorzystaniem wody czy buforu octanowego, aktywność metaboliczna drożdży była na bardzo wysokim poziomie i umożliwiała całkowitą asymilację glukozy już po 48 godzinach procesu fermentacji. Podłoża hodowlane otrzymane z biomasy wywaru kukurydzianego po mikrofalowej obróbce hydrotropowej charakteryzowało bardzo niskie (poniżej progu oznaczalności) stężenie furfuralu, 5-HMF, aldehydu syringowego, waniliny oraz kwasu ferulowego, co umożliwiło uzyskanie wysokiego poziomu biosyntezy etanolu na poziomie ok. 95% wydajności teoretycznej. Uzyskane wyniki badań jednoznacznie wskazują na wysoką przydatność opracowanej metody obróbki wstępnej biomasy lignocelulozowej do biosyntezy etanolu celulozowego przy użyciu drożdży *S. cerevisiae*. Otrzymane rezultaty (**publikacja 4.2.5.**) pozwalają na weryfikację hipotezy H1, H2 oraz H4 i potwierdzają konieczność poszukiwania nowych oraz przyjaznych środowisku metod obróbki wstępnej lignocelulozy, których wykorzystanie sprzyja otrzymywaniu podłoży fermentacyjnych zawierających niską zawartość inhibitorów metabolizmu komórkowego drożdży. Istotnym jest również opracowanie skutecznej metody delignifikacji biomasy kukurydzianego wywaru gorzelniczego umożliwiającej uzyskanie hydrolizatów o wysokiej podatności celulozy na procesy biokonwersji.

Publikacja 4.2.6.: Kłosowski G., Mikulski D. 2021. Impact of lignocellulose pretreatment by-products on *S. cerevisiae* strain Ethanol Red metabolism during aerobic and anaerobic growth. *Molecules*, 26(4), 806.

Uzyskane we wcześniejszych badaniach rezultaty (**publikacje 4.2.1., 4.2.2., 4.2.3., 4.2.4.**) dotyczące negatywnego oddziaływania produktów ubocznych powstających w trakcie obróbki wstępnej lignocelulozy na aktywność fermentacyjną drożdży, stały się impulsem do dalszych badań nad określeniem wpływu występowania tych związków jako indykatorów stresu toksycznego u drożdży *S. cerevisiae*. Ocenę wpływu występowania produktów ubocznych obróbki wstępnej lignocelulozy na metabolizm drożdży analizowano z udziałem szczepu Ethanol Red, wykorzystywanego we wszystkich prezentowanych badaniach. Prace

eksperymentalne zrealizowano na podłożach modelowych w warunkach hodowli tlenowej oraz fermentacji alkoholowej przy dodatku do podłoża pojedynczych stresorów (kwasu lewulinowego, furfuralu, 5-HMF, kwasu ferulowego, aldehydu syringowego oraz waniliny), jak również mieszaniny tych związków, w celu oceny nasilenia zjawiska synergii stresorów toksycznych. Poddano analizie wytwarzanie wewnątrzkomórkowych indykatorów stresu tj. trehalozy, ergosterolu, białek oraz zewnątrzkomórkowe stężenie kwasu octowego i glicerolu w funkcji odpowiedzi na występowanie stresorów toksycznych. Jednym z aspektów nowości, była też próba określenia udziału białek szoku cieplnego HSP (Hsp 31p oraz Hsp 60) w specyficznej reakcji komórek drożdży na występowanie substancji toksycznych powstających w wyniku obróbki wstępnej lignocelulozy. Istotne, nie tylko z naukowego ale również aplikacyjnego względu, były również rezultaty prezentujące zdolności drożdży do detoksykacji *in situ* podłoża hodowlanych w trakcie 72 godzinnej hodowli w różnych warunkach. Stwierdzono, że odpowiedź komórkowa drożdży na obecność substancji, identyfikowanych jako inhibitory procesów mikrobiologicznych, wykazuje zależność od warunków tlenowych lub fermentacyjnych. Obecność 5-HMF w najwyższym analizowanym stężeniu (5704.8 ± 249.3 mg/l) w warunkach tlenowych, indukuje nadprodukcję ergosterolu i trehalozy. Z kolei w warunkach fermentacji alkoholowej, obserwowano ograniczenie biosyntezy tych indykatorów stresu środowiskowego. Użyty szczep drożdży jest w stanie, niezależnie od warunków hodowli (tlenowych lub fermentacyjnych), metabolizować całkowicie 5-HMF, furfural, aldehyd syringowy oraz wanilinę. Obecność w podłożu hodowlanym aldehydów furanowych (w zastosowanym zakresie stężeń), działa stymulująco na przebieg fermentacji alkoholowej, mimo niskiego stężenia źródła węgla. Wskazuje to na opisywany w literaturze wzrost aktywności dehydrogenazy alkoholowej uczestniczącej w redukcji 5-HMF i furfuralu do substancji mniej toksycznych (Liu, 2011, 2006). Reakcją komórek drożdży na obecność aldehydów furanowych (w zakresie stężeń: 5-HMF ok. 1300-5700 mg/l; furfural ok. 120-1430 mg/l) jest nadprodukcja białek z grupy Hsp60, uczestniczących w kontroli procesów fałdowania białek wewnątrzkomórkowych (Trewick i in., 2000). Uzyskane rezultaty stanowią wkład w poznanie reakcji komórek drożdży na stres środowiskowy wywołany obecnością toksycznych substancji powstających w wyniku obróbki wstępnej biomasy lignocelulozowej. Przedstawione ustalenie naukowe może być pomocne w optymalizacji parametrów procesowych produkcji etanolu celulozowego, ukierunkowanej na ograniczenie zjawisk związanych z powstawaniem i oddziaływaniem toksycznym inhibitorów fermentacji. Przedstawione wyniki badań (**publikacja 4.2.6.**) pozwalają zweryfikować hipotezę H2 i opisują w sposób kompleksowy oddziaływanie związków mogących powstawać w trakcie obróbki wstępnej lignocelulozy na metabolizm komórkowy drożdży. Istotnym jest również wskazanie nadprodukcji wybranych białek HSP jako reakcji metabolicznej drożdży na stres wywołany występowaniem produktów ubocznych obróbki wstępnej biomasy.

Publikacja 4.2.7.: Mikulski D., Kłosowski G. 2022. Integration of first- and second-generation bioethanol production from beet molasses and distillery stillage after dilute sulfuric acid pretreatment. *BioEnergy Research* 15, 454-465.

Ostatnim etapem badań w prezentowanym osiągnięciu naukowym była ocena aktywności metabolicznej drożdży na podłożu fermentacyjnym otrzymanym w wyniku połączenia melasy buraczanej oraz roztworu po kwasowej obróbce wstępnej biomasy wywaru gorzelniczego różnego pochodzenia. Koncepcja badań zakładała wykorzystanie roztworu po kwasowej obróbce wstępnej biomasy wywarów jako rozpuszczalnika dla alkalicznej melasy i stanowiła

próbę połączenia sposobów wytwarzania etanolu paliwowego I i II generacji. Etanol I generacji otrzymywany jest na drodze fermentacji podłoży zawierających sacharozę lub hydrolizaty skrobiowe, natomiast II generacji wytwarzany jest z podłoży celulozowych. Jedną z koncepcji, mającą na celu ograniczenie kosztów produkcji etanolu paliwowego, jest wspólne wykorzystanie założeń obu generacji produkcji etanolu. W zaproponowanym rozwiązaniu wykorzystano roztwór po kwasowej obróbce wstępnej wywarów gorzelnicznych w podwyższonej temperaturze jako medium do rozcieńczenia alkalicznej melasy buraczanej, co miało wyeliminować konieczność regulacji pH do wartości optymalnej dla rozwoju drożdży, czyli 5,5 i zwiększyć pulę cukrów fermentujących w podłożu. W wyniku wprowadzenia założeń, udało się uzyskać podłoże fermentacyjne o odpowiednim pH (bez regulacji) i zwiększonej zawartości węglowodanów na poziomie ok. 190 g/l (wzrost o ok. 10 g/l). W efekcie, uzyskano dla podłoży otrzymanych w wyniku zmieszania melasy i hydrolizatów celulozowych wyższe o ok. 5 g/l stężenie etanolu. Jednoczesne użycie melasy i roztworu po obróbce wstępnej lignocelulozy spowodowało rozcieńczenie inhibitorów metabolizmu komórkowego drożdży, co przełożyło się na wysoką aktywność fermentacyjną drożdży i uzyskanie 94% wydajności w stosunku do teoretycznej. Dodatkowo, chcąc podwyższyć stężenie glukozy w podłożu, wprowadzono dodatek enzymu celulitycznego w celu przeprowadzenia jednoczesnej hydrolizy celulozy i fermentacji (SSF, *ang. Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Nie stwierdzono jednak pozytywnego wpływu zastosowania celulaz na podwyższenie stężenia cukrów fermentujących, co prawdopodobnie było efektem inhibicji produktowej białek enzymatycznych (Teugjas i Våljamäe, 2013). Zastosowanie dodatku celulaz miało natomiast wpływ na metabolizm lotnych produktów ubocznych fermentacji u drożdży. Jedną z możliwości oceny przebiegu fermentacji etanolowej, jest monitorowanie składu jakościowego i ilościowego lotnych produktów ubocznych powstających w trakcie fermentacji, w znakomitej większości jako efekt aktywności metabolicznej drożdży. Pomimo możliwości wnioskowania w zakresie wpływu warunków fermentacji na aktywność metaboliczną drożdży i wytwarzanie określonych grup lotnych produktów ubocznych fermentacji, w dostępnej literaturze naukowej nie są prezentowane wyniki badań obejmujące skład tych związków w destylatach celulozowych. W badaniach stwierdzono wielokrotnie wyższe stężenia aldehydu octowego w destylatach otrzymanych z podłoży, gdzie do melasy dodawano hydrolizaty wywarów po obróbce wstępnej. Wskazuje to jednoznacznie, że w przypadku obecności nawet niskich stężeń w hydrolizatach po kwasowej obróbce wstępnej lignocelulozy substancji o charakterze inhibitorów tj. aldehydów furanowych, należy spodziewać się upośledzenia aktywności dehydrogenazy alkoholowej czyli kluczowego enzymu uczestniczącego w redukcji aldehydu octowego do alkoholu etylowego (Modig i in., 2002). Analiza zmian stężenia octanu etylu w destylatach z różnych wariantów badań wykazała niższe o ponad 120 mg/l stężenie tego związku w destylatach otrzymanych z podłoży melasowo-celulozowych sporządzonych bez dodatku celulaz, w stosunku do destylatu wyłącznie melasowego. Co ciekawe zastosowanie dodatku celulaz do podłoży fermentacyjnych otrzymanych z melasy i hydrolizatów po obróbce wstępnej biomasy wywarów spowodowało średnio czterokrotny wzrost stężenia tego estru w otrzymanych destylatach. Użycie wysokoaktywnych celulaz, może naruszać stabilność ściany komórkowej drożdży i w efekcie wpływać na homeostazę komórkową. To z kolei prowadzi do zakłócenia metabolizmu komórkowego drożdży i może wywoływać podwyższoną aktywność acetylotransferazy, enzymu uczestniczącego w powstawaniu octanu etylu w trakcie fermentacji alkoholowej (Malcorps i in., 1991). Przedstawione w **publikacji 4.2.7.** wyniki badań umożliwiają weryfikację hipotezy H2 i wyraźnie wskazują na wpływ związków występujących

w podłożach zawierających hydrolizaty celulozowe na aktywność metaboliczną drożdży *S. cerevisiae*. Jednocześnie potwierdzono przydatność biomasy wywarów gorzelnicznych jako substratów w produkcji etanolu paliwowego.

4.3.4. Podsumowanie

Przedstawione publikacje (4.2.1. – 4.2.7.) stanowią kompletny cykl prac mających na celu określenie aktywności metabolicznej drożdży w trakcie fermentacji alkoholowej podłoży celulozowych uzyskanych z biomasy wywarów gorzelnicznych. Przeprowadzone badania stanowią kompleksowe opracowanie możliwości wykorzystania biomasy wywarów gorzelnicznych jako substratów w produkcji etanolu celulozowego. Badania obejmowały różnorodne sposoby przygotowania substratu lignocelulozowego. Rozpoczynając od najprostszej metody obróbki wstępnej (kwasowej w środowisku podwyższonej temperatury – publikacja 4.2.1.), poprzez wykorzystanie podwyższonego ciśnienia i obróbki mikrofalowej w środowisku kwaśnym (publikacja 4.2.2., 4.2.3.) oraz hydrotropów i obróbki kwasowej (publikacja 4.2.4.) aż po opracowanie nowej metody obróbki wstępnej biomasy (jednoczesne wykorzystanie mikrofal oraz hydrotropów – publikacja 4.2.5.). Wspólnym mianownikiem wszystkich tych prac było wykorzystanie biomasy wywarów gorzelnicznych jako substratu lignocelulozowego oraz określenie aktywności fermentacyjnej drożdży na podłożach lignocelulozowych. Dodatkowo określono wpływ związków toksycznych powstających w wyniku obróbki wstępnej lignocelulozy na metabolizm drożdży w warunkach modelowych (publikacja 4.2.6.). Ostatnim elementem badań było przeprowadzenie analiz mających na celu określenie aktywności fermentacyjnej drożdży na podłożach uzyskanych w wyniku jednoczesnego wykorzystania biomasy wywarów gorzelnicznych oraz melasy buraczanej w celu wysoce wydajnej produkcji etanolu paliwowego (publikacja 4.2.7.). Opublikowane wyniki badań wnoszą istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczącej wykorzystania nowego źródła lignocelulozy, jakim jest biomasa wywaru gorzelnicznego do produkcji etanolu paliwowego oraz identyfikacji czynników oddziałujących na efektywność biosyntezy etanolu przez drożdże. Efektem znacznego zainteresowania rezultatami opublikowanymi w wymienionych pracach jest liczba cytowań wynosząca **132** (według bazy *Web of Science* z dnia 08.05.2023 r.) oraz **158** (według bazy *Scopus* z dnia 08.05.2023 r.). Najważniejszymi osiągnięciami prezentowanych prac, stanowiącymi istotny wkład w rozwój dyscypliny naukowej – nauki biologiczne, są zatem:

- 1) Hydrolizaty celulozowe uzyskane z biomasy wywarów gorzelnicznych mogą być użyte jako kompleksowe podłoża dla drożdży *S. cerevisiae* do produkcji etanolu II generacji.
- 2) Zastosowanie 0,2 M kwasu siarkowego w warunkach podwyższonej temperatury i ciśnienia uzyskiwanego z użyciem ogrzewania konwencjonalnego oraz promieniowania mikrofalowego jest skutecznym sposobem przygotowania biomasy wywarów gorzelnicznych do procesów hydrolizy enzymatycznej i fermentacji alkoholowej.
- 3) Dobór warunków obróbki wstępnej biomasy wywarów gorzelnicznych jest kluczowym parametrem gwarantującym wysoką podatność celulozy na hydrolizę enzymatyczną oraz determinuje występowanie toksycznych produktów ubocznych.

- 4) Przekroczenie ciśnienia 93 PSI w trakcie mikrofalowej obróbki wstępnej z użyciem kwasu siarkowego powoduje wzrost wytwarzania produktów dehydratacji cukrów (5-HMF, furfuralu, kwasu lewulinowego) oraz zmiany w strukturze celulozy, ograniczające jej podatność na hydrolizę enzymatyczną.
- 5) Aktywność metaboliczna drożdży *S. cerevisiae* w trakcie fermentacji podłoży celulozowych uzyskanych z biomasy wywarów gorzelnicznych może być ograniczana przez występowanie produktów ubocznych obróbki wstępnej lignocelulozy.
- 6) Efektywnym sposobem eliminującym efekt spowolnienia aktywności metabolicznej drożdży obserwowany w warunkach podwyższonego stężenia toksycznych produktów ubocznych obróbki wstępnej biomasy jest, detoksykacja hydrolizatów z użyciem węgla aktywnego w stężeniu 5 g/100 g biomasy.
- 7) Biomasa wywarów gorzelnicznych po ekstrakcji hydrotropowej może być wykorzystywana do przygotowywania hydrolizatów celulozowych wykorzystywanych w procesach fermentacyjnych.
- 8) Nowo opracowana metoda obróbki wstępnej, oparta o jednoczesne wykorzystanie w zoptymalizowanych warunkach promieniowania mikrofalowego oraz kumenosulfonianu sodu, jest skutecznym sposobem delignifikacji biomasy kukurydzianego wywaru gorzelnicznego umożliwiającym uzyskanie hydrolizatów o wysokim stężeniu cukrów fermentacyjnych. Uzyskane hydrolizaty są również efektywnym surowcem w biosyntezie etanolu celulozowego (maksymalne stężenie ok. 41,5 g/l) z użyciem drożdży *S. cerevisiae*.
- 9) Drożdże *S. cerevisiae* szczep Ethanol Red wykazują na podłożach modelowych zdolność do całkowitego metabolizowania (w określonych stężeniach) 5-HMF, furfuralu, aldehydu syringowego oraz waniliny, co umożliwia detoksykację hydrolizatów celulozowych metodą *in situ*.
- 10) Nadprodukcja białek z grupy Hsp60 jest reakcją metaboliczną drożdży *S. cerevisiae* szczep Ethanol Red na podwyższone stężenie aldehydów furanowych.
- 11) Użycie roztworów po kwasowej obróbce wstępnej biomasy wywarów gorzelnicznych jako rozcieńczalnika dla alkalicznej melasy buraczanej jest skutecznym sposobem przygotowania podłoży fermentacyjnych gwarantującym wysoki poziom biosyntezy etanolu na poziomie ok. 90 g/l i wydajności procesu powyżej 94%.
- 12) Użycie roztworów po kwasowej obróbce wstępnej biomasy wywarów gorzelnicznych jako dodatku do podłoży melasowych skutkuje podwyższonym stężeniem aldehydu octowego w otrzymanych destylatach, co jest prawdopodobnie efektem upośledzenia aktywności dehydrogenazy alkoholowej.

4.3.5. Spis literatury

Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82(4), 340-349.

- Asomaning, J., Haupt, S., Chae, M., Bressler, D.C., 2018. Recent developments in microwave-assisted thermal conversion of biomass for fuels and chemicals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92, 642-657.
- Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers Manag* 52, 858–875.
- Bundhoo, Z.M.A., 2018. Microwave-assisted conversion of biomass and waste materials to biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 82(1), 1149-1177.
- Devendra, L.P., Kiran Kumar, M., Pandey, A., 2016. Evaluation of hydrotropic pretreatment on lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 213, 350-358.
- Devendra, L.P., Pandey, A., 2016. Hydrotropic pretreatment on rice straw for bioethanol production. *Renewable Energy* 98, 2–8.
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G.H., Gholami, M., Ardjmand, M., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27, 77-93.
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* 6, 16.
- Kim, S.M., Li, S., Pan, S.C., Ding, Y., Basu, R., van Egmond, P., Singh, V., 2016. A whole stillage sieving process to recover fiber for cellulosic ethanol production. *Industrial Crops and Products* 92, 271–276.
- Liu, Q., Li, W., Ma, Q., An, S., Li, M., Jameel, H., Chang, H.M., 2016. Pretreatment of corn stover for sugar production using a two-stage dilute acid followed by wet-milling pretreatment process. *Bioresource Technology* 211, 435-442.
- Liu, Z.L., 2011. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 809-825.
- Liu, Z.L., 2006. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 27-36.
- Lynd, L.R., Liang, X., Bidy, M.J., Allee, A., Cai, H., Foust, T., Himmel, M.E., Laser, M.S., Wang, M., Wyman, C.E., 2017. Cellulosic ethanol: status and innovation. *Current Opinion in Biotechnology* 45, 202-211.
- Malcorps, P., Cheval, J.M., Jamil, S., Dufour, J.P., 1991. A New Model for the Regulation of Ester Synthesis by Alcohol Acetyltransferase in *Saccharomyces Cerevisiae* during Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49, 47-53.
- Modig, T., Liden, G., Taherzadeh, M.J., 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal* 363, 769-776.
- Mou, H., Wu, S., 2016. Comparison of organosolv and hydrotropic pretreatments of eucalyptus for enhancing enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 220, 637-640.
- Nguyen, T.T.M., Iwaki, A., Ohya, Y., Izawa, S., 2014. Vanillin causes the activation of Yap1 and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117, 33-38.
- Noureddini, H., Byun, J., 2010. Dilute-acid pretreatment of distillers' grains and corn fiber. *Bioresource Technology* 101, 1060-1067.
- Olsson, J., Novy, V., Nielsen, F., Wallberg, O., Galbe, M., 2019. Sequential fractionation of the lignocellulosic components in hardwood based on steam explosion and hydrotropic extraction. *Biotechnology for Biofuels* 12, 1.

- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., 2000a. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxication. *Bioresource Technology* 74, 17-24.
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., 2000b. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74, 25-33.
- Ponnusamy, V.K., Nguyen, D.D., Dharmaraja, J., Shobana, S., Banu, J.R., Saratale, R.G., Chang, S.W., Kumar, G., 2019. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresource Technology* 271, 462-472.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* 37(1), 19-27.
- Sarris, D., Papanikolaou, S., 2016. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Engineering in Life Sciences* 16, 307-329.
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., Srivastava, M., 2014. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 32, 713-728.
- Singhvi, M.S., Digambar, &, Gokhale, V., 2019. Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 9305-9320.
- Teugjas, H., Väljamäe, P., 2013. Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. *Biotechnology for Biofuels* 6, 104.
- Tian, S., Zhou, G., Yan, F., Yu, Y., Yang, X., 2009. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. *Biotechnology Advances* 27, 656-660.
- Treweek, T.M., Lindner, R.A., Mariani, M., Carver, J.A., 2000. The small heat-shock chaperone protein, α -crystallin, does not recognise stable molten globule states of cytosolic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1481, 175-188.
- Wang, H., Maxim, M.L., Gurau, G., Rogers, R.D., 2013. Microwave-assisted dissolution and delignification of wood in 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Bioresource Technology* 136, 739-742.
- Wang, J., Chen, X., Chio, C., Yang, C., Su, E., Jin, Y., Cao, F., Qin, W., 2019. Delignification overmatches hemicellulose removal for improving hydrolysis of wheat straw using the enzyme cocktail from *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 274, 459-467.
- Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M., 2000. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy* 19(2), 63-102.
- Yang, M., Kuitinen, S., Zhang, J., Keinänen, M., Pappinen, A., 2013. Effect of dilute acid pretreatment on the conversion of barley straw with grains to fermentable sugars. *Bioresource Technology* 146, 444-450.
- Yu, Z., Jameel, H., Chang, H. min, Park, S., 2011. The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 102, 9083-9089.
- Ziaei-Rad, Z., Fooladi, J., Pazouki, M., Gummadi, S.N., 2021. Lignocellulosic biomass pre-treatment using low-cost ionic liquid for bioethanol production: An economically viable method for wheat straw fractionation. *Biomass and Bioenergy* 151, 106140.

4.4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moje zainteresowania od początku pracy naukowej były związane z badaniami dotyczącymi aktywności metabolicznej drożdży w trakcie procesów fermentacyjnych i dotyczyły zarówno efektywności biosyntezy etanolu jak i wytwarzania lotnych produktów ubocznych fermentacji alkoholowej. Przebieg mojej kariery naukowej można podzielić na okres przed i po uzyskaniu stopnia doktora. Przy zastosowaniu tego podziału w mojej karierze naukowej uwidacznia się wyraźny podział zainteresowań naukowych. Prace badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora skupiają się głównie wokół efektywności biosyntezy etanolu I generacji z użyciem podłoży uzyskanych z surowców skrobiowych. Natomiast po uzyskaniu stopnia doktora, tematyka badawcza była dużo szersza i dotyczyła m. in. aktywności metabolicznej drożdży wykorzystywanych w produkcji etanolu II generacji (celulozowego), degradacji biomasy lignocelulozowej, oceny efektywności różnych grup mikroorganizmów w biosyntezie wybranych metabolitów tj. enzymów, biosurfaktantów, pirazyny oraz charakterystyce różnych procesów fermentacyjnych.

Okres przed uzyskaniem stopnia doktora:

W początkowym okresie pracy naukowej uczestniczyłem w badaniach dotyczących wpływu mykotoksyn na aktywność metaboliczną drożdży *S. cerevisiae* w trakcie fermentacji alkoholowej. Prace te realizowane były w ramach projektu zatytułowanego „Badania nad stopniem biodegradacji mikotoksyn w procesie fermentacji alkoholowej ziarna kukurydzy, oraz poziomem skażenia wywarów gorzelnicznych, wykorzystywanych w żywieniu zwierząt gospodarskich” (N311 052 31/3420), którego byłem wykonawcą. Badania dotyczyły oceny występowania wybranych mykotoksyn w skrobiowych surowcach gorzelnicznych, wpływu skażenia mykotoksynami podłoży hodowlanych na aktywność fermentacyjną drożdży oraz powstawania lotnych produktów ubocznych fermentacji alkoholowej. Analizy laboratoryjne wykazały istotnie statystycznie wpływ występowania aflatoksyn, ochratoksyny A, zearalenonu oraz deoksyniwalenolu na efektywność fermentacji alkoholowej, co skutkowało niższą nawet o 3 litry etanolu wydajnością procesu. Obecność w podłożach fermentacyjnych aflatoksyn oraz ochratoksyny A skutkowało ponad dwukrotnie wyższym stężeniem aldehydu octowego w otrzymanych destylatach. Zaobserwowane zjawisko jest efektem inhibującego oddziaływania mykotoksyn na aktywność katalityczną dehydrogenazy alkoholowej, kluczowego enzymu uczestniczącego w oddychaniu beztlenowym, odpowiedzialnego za redukcję aldehydu octowego do etanolu. Dodatkowo zrealizowane zostały badania dotyczące wpływu procesu technologicznego na redukcję zawartości mykotoksyn w podłożach hodowlanych oraz ocena możliwości detoksykacji mykotoksyn przez mikroflorę drożdżową w trakcie procesu fermentacji alkoholowej. Efektem realizacji projektu były następujące publikacje:

Artykuły naukowe:

- Kłosowski G., Mikulski D., 2010, The effect of raw material contamination with mycotoxins on the composition of alcoholic fermentation volatile by-products in raw spirits. *Bioresource Technology* 101, 9723-9727 (IF₂₀₁₀ – 4,365, pkt. MEiN₂₀₁₃ – 45).

- Kłosowski G., **Mikulski D.**, Grajewski J., Błajet-Kosicka A., 2010, The influence of raw material contamination with mycotoxins on alcoholic fermentation indicators. *Bioresource Technology* 101, 3147-3152 (IF₂₀₁₀ – 4,365, pkt. MEiN₂₀₁₃ – 45).
- Kłosowski G., Błajet-Kosicka A., **Mikulski D.**, Grajewski J., 2011, Ocena możliwości redukcji stężenia mikotoksyn w procesie produkcji etanolu z ziarna kukurydzy technologią BUS i klasyczną. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2(75), 89-105 (IF₂₀₁₁ – 0,157, pkt. MEiN₂₀₁₃ – 15).

Materiały konferencyjne:

- Kłosowski G., Grajewski J., Błajet-Kosicka A., **Mikulski D.**, Mycotoxin impact on biotechnological factors of maize mashes alcoholic fermentation in PLS technology. 30. Mycotoxin Workshop 2008, Utrecht, The Netherlands, P-70, 133.

Jednocześnie zaangażowany byłem w realizację prac badawczych mających na celu charakterystykę procesów fermentacyjnych. Analizie poddany został wpływ surowca skrobiowego w postaci ziarna żyta, kukurydzy oraz amarantusa na powstawanie alkoholi wyższych w trakcie fermentacji prowadzonej z wykorzystaniem dwóch szczepów drożdży *S. cerevisiae* (D-2 oraz As-4). Określony został również wpływ szerokoprofilowej hydrolizy enzymatycznej z użyciem kompleksu enzymów amylolitycznych, wzbogaconego o pullulanazę, enzymu zmniejszającego lepkość oraz hydrolizującego polipeptydy w podłożach o podwyższonym ekstrakcie, na efektywność biosyntezy etanolu oraz biosyntezę lotnych produktów ubocznych fermentacji alkoholowej. Efektem zastosowania kompleksu enzymów hydrolitycznych na etapie przygotowywania podłoża fermentacyjnego był wzrost stężenia etanolu o ok. 0,5% v/v oraz efektywności fermentacji o ok. 4 litry etanolu ze 100 kg surowca. Zastosowanie szerokoprofilowej hydrolizy enzymatycznej składników surowca fermentacyjnego przełożyło się również na zmniejszone stężenie najważniejszych grup związków zaliczanych do lotnych produktów ubocznych fermentacji alkoholowej tj. związków karbonylowych, alkoholi wyższych oraz estrów. Uzyskane rezultaty potwierdzają pozytywny wpływ wzrostu stężenia substancji odżywczych, będącego efektem zastosowania kompleksu enzymów hydrolitycznych na aktywność metaboliczną drożdży *S. cerevisiae*. Uzyskane rezultaty stały się podstawą do przygotowania publikacji:

Artykuły naukowe:

- Kłosowski G., **Mikulski D.**, Czupryński B., Kotarska K., 2010, Characterisation of fermentation of high-gravity maize mashes with the application of pullulanase, proteolytic enzymes and enzymes degrading non-starch polysaccharides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109, 466-471 (IF₂₀₁₀ – 1,707, pkt. MEiN₂₀₁₃ – 30).
- Kłosowski G., **Mikulski D.**, Macko D., Miklaszewska B., Kotarska K., Czupryński B., 2015, Influence of various yeast strains and selected starchy raw materials on production of higher alcohols during the alcoholic fermentation process. *European Food Research and Technology* 240, 233-242 (IF₂₀₁₅ – 1,387, pkt. MEiN₂₀₁₅ – 25).

W moim dorobku naukowym z tego okresu jest również jedna praca przeglądowa, której tematem była charakterystyka aktualnie rozwijanych rozwiązań procesowych

i technologicznych stosowanych w produkcji biopaliw z biomasy z użyciem metod biotechnologicznych.

Artykuł naukowy:

- Kłosowski G., Macko D., **Mikulski D.** 2010. Rozwój metod biotechnologicznych produkcji biopaliw ze źródeł odnawialnych. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 45, 118-135 (pkt. MEiN₂₀₁₀ – 6).

Tematem badawczym, który stał się również podstawą mojej dysertacji było zagadnienie degradacji enzymatycznej kompleksów fitynowych w skrobiowych podłożach fermentacyjnych oraz oddziaływanie związków uwalnianych z tych kompleksów na metabolizm komórkowy drożdży. Wskazany temat badawczy został doceniony przez panel ekspertów Narodowego Centrum Nauki, który przyznał mi środki finansowe w ramach konkursu Preludium 3 na realizację pod moim kierownictwem projektu badawczego pt.: „Wpływ hydrolizy kompleksów fitynowych z wykorzystaniem fitazy mikrobiologicznej na wskaźniki technologiczne procesu fermentacji alkoholowej prowadzonego z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” (2012/05/N/NZ9/02436). Projekt został zrealizowany pod opieką naukową dra hab. inż. Grzegorza Kłosowskiego prof. uczelni. Badania w ramach projektu podzielone były na trzy etapy, które obejmowały: (I) ocenę występowania kompleksów kwasu fitynowego w różnych surowca wykorzystywanych w procesach fermentacyjnych, (II) efektywność degradacji kompleksów fitynowych przez różne preparaty fitaz pochodzenia mikrobiologicznego w trakcie procesu przygotowania podłoży fermentacyjnych, (III) wpływ substancji uwalnianych z kompleksów kwasu fitynowego na aktywność metaboliczną drożdży oraz efektywność procesu fermentacji alkoholowej. Degradacja enzymatyczna kompleksów fitynowych w trakcie przygotowania podłoży fermentacyjnych o podwyższonym ekstrakcie, połączona była z szerokoprofilową hydrolizą innych składników surowca tj. białek, dekstryn granicznych przy pomocy pullulanazy, co umożliwiło określenie wpływu użycia fitaz na dostępność substancji odżywczych w podłożach fermentacyjnych. Jednoczesne zastosowanie fitazy mikrobiologicznej oraz kompleksu enzymów amylolitycznych umożliwiło uzyskanie wzrostu stężenia cukrów redukujących o ok. 15 mg/ml w porównaniu do podłoża bez hydrolizy kompleksów fitynowych, co jest efektem wzrostu dostępności skrobi związanej w kompleksach kwasu fitynowego. Zastosowanie fitazy w połączeniu z alkaliczną peptydazą potwierdziło wpływ występowania kompleksów fitynowych na dostępność białka w surowcu roślinnym. Zmiana składu podłoża fermentacyjnego będąca efektem jednoczesnego użycie fitazy, peptydazy oraz enzymów amylolitycznych poprawiła efektywność fermentacji alkoholowej o ok. 6 litrów etanolu oraz wywarła wpływ na aktywność metaboliczną drożdży skutkującą zmniejszonym stężeniem alkoholi wyższych oraz estrów w otrzymanych destylatach. W wyniku realizacji projektu przygotowana została moja rozprawa doktorska oraz cykl publikacji:

Artykuły naukowe:

- **Mikulski D.**, Kłosowski G., Rolbiecka A. 2014. Effect of phytase application during high gravity (HG) maize mashes preparation on the availability of starch and yield of the ethanol fermentation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174, 1455-1470 (IF – 1,735₂₀₁₄; pkt. MEiN₂₀₁₄ – 20).

- **Mikulski D.**, Kłosowski G. 2015. Phytic acid concentration in selected raw materials and the analysis of its hydrolysis rate with the use of microbial phytases during the mashing process. *Journal of the Institute of Brewing* 121, 213-218 (IF – 1,017₂₀₁₅; pkt. MEiN₂₀₁₅ – 25).
- **Mikulski D.**, Kłosowski G., Rolbiecka A. 2015. Influence of phytase and supportive enzymes applied during high gravity mash preparation on the improvement of technological indicators of the alcoholic fermentation process. *Biomass and Bioenergy* 80, 191-202 (IF₂₀₁₅ – 3,249; pkt. MEiN₂₀₁₅ – 35).

Materiały konferencyjne:

- **Mikulski D.**, Kłosowski G. „Ocena przydatności surowców skrobiowych wykorzystywanych do przygotowywania podłoża fermentacyjnych z użyciem enzymów z grupy fosfohydrolaz.” VII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 19.-21.06.2013 Toruń, p. 79.
- **Mikulski D.**, Kłosowski G. “The influence of phytase addition during the enzymatic starch hydrolysis process with the use of basic amylolytic enzymes on yield and the course of alcoholic fermentation process.” 5th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 8.-11.10.2013, Kraków, P2.1, p. 14.
- **Mikulski D.**, Kłosowski G., Rolbiecka A. „Wpływ hydrolizy kwasu fitynowego w trakcie przygotowywania podłoża hodowlanego o podwyższonym ekstrakcie (typu HG) na aktywność fermentacyjną drożdży *S. cerevisiae*.” VIII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 25.-27.06.2014 ChmiąŜa Szlachecka, p. 53.
- **Mikulski D.**, Kłosowski G., Rolbiecka A. „Wpływ hydrolizy enzymatycznej kompleksów kwasu fitynowego na aktywność fermentacyjną drożdży oraz skład lotnych produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej.” IX Poznańska Konferencja Naukowa „Chemia – nowe wyzwania dla nauki i przemysłu” PTChem Oddział Poznański, 5.12.2014 Poznań, p. 144.
- **Mikulski D.**, Kłosowski G., Rolbiecka A. „Ocena tempa hydrolizy kwasu fitynowego w trakcie przygotowywania podłoża fermentacyjnych typu HG z wykorzystaniem różnych preparatów fitaz.” 58. Zjazd PTChem, 21.-25.09.2015, Gdańsk, p. 384.

Okres po uzyskaniu stopnia doktora:

Uzyskane wyniki badań w trakcie realizacji ww. projektu stały się impulsem do dalszych prac badawczych na możliwością hydrolizy *in situ* kompleksów fitynowych w trakcie fermentacji alkoholowej przez drożdże *S. cerevisiae*. Celem badań było poszukiwanie szczepu drożdży *S. cerevisiae* zdolnego do produkcji zewnątrzkomórkowych fitaz, charakterystyka biochemiczna izolowanych enzymów oraz ocena możliwości wykorzystania techniki fuzji protoplastów w uzyskaniu fuzanta drożdży gorzelnicznych i szczepu zdolnego produkować enzymy z grupy fitaz. W dalszych etapach badań otrzymany fuzant miał być oceniony pod kątem zdolności degradacji kompleksów fitynowych w trakcie procesu efektywnej fermentacji alkoholowej. Dotychczas zrealizowałem dwa pierwsze etapy badań w wyniku uzyskanego dofinansowania w ramach projektów wewnętrznych tzw. Badań Młodych Naukowców. Badania obejmowały analizy przesiewowe różnych szczepów drożdży z rodzaju *Saccharomyces* wykorzystywanych w procesach fermentacyjnych, pod kątem zdolności produkcji

zewnętrzkomórkowej fitazy oraz charakterystykę katalityczną (określenie optymalnych warunków katalizy, aktywatorów oraz inhibitorów reakcji) uzyskanego enzymu. W wyniku badań wytypowano winiarskie drożdże *S. cerevisiae* szczep Finarome, zdolny do redukcji stężenia kwasu fitynowego o ponad 33%. Wyizolowany szczep drożdży był w stanie zredukować stężenie kwasu fitynowego o ponad 98%, przy zastosowaniu zoptymalizowanych warunków hodowli tj. pH 5,5, temperatury 32°C, przy użyciu mannozy jako źródła węgla oraz kwasu asparaginowego jako źródła azotu. Efektem prac badawczych są następujące publikacje:

Artykuły naukowe:

- **Mikulski D.**, Kłosowski G. 2017. Evaluation of phytic acid utilization by *S. cerevisiae* strains used in fermentation processes and biomass production. *Journal of Basic Microbiology* 57, 87-91 (IF₂₀₁₇ – 1,580; pkt. MEiN₂₀₁₇ – 20).
- Kłosowski G., **Mikulski D.**, Jankowiak O. 2018. Extracellular phytase production by the wine yeast *S. cerevisiae* (Finarome Strain) during submerged fermentation. *Molecules*, 23(4), 1-12 (IF₂₀₁₈ – 3,060; pkt. MEiN₂₀₁₈ – 30).

Materiały konferencyjne:

- **Mikulski D.**, Kłosowski G. “Evaluation of phytic acid utilization by *S. cerevisiae* strains used in fermentation processes and biomass production.” *New Biotechnology*, Volume 33, Supplement, Abstracts of the 17th European Congress on Biotechnology, 3.-6.07.2016, Kraków, S205 (P36-1) (<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.1427>).
- Kłosowski G., **Mikulski D.**, Jankowiak O. “Optimization of native *S. cerevisiae* yeast submerged fermentation (SmF) conditions for phytase production.” 6th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 11.-14.09.2017, Kraków, P14.10 (s.159).

Tematyka prac eksperymentalnych, realizowanych od roku 2017, była skoncentrowana na opracowaniu metod efektywnego wykorzystania biomasy lignocelulozowej w procesach biosyntezy oraz konwersji chemicznej z wykorzystaniem różnorodnych metod obróbki wstępnej. Jednym z głównych problemów do rozwiązania było efektywne przygotowanie surowca lignocelulozowego do procesów fermentacyjnych. Część prac z tego obszaru była ukierunkowana na użycie jako źródła lignocelulozy odpadowego wywaru gorzelniczego różnego pochodzenia. Efekty tych badań zostały opublikowane w formie cyklu stanowiącego podstawę osiągnięcia naukowego opisanego w niniejszym autoreferacie. Dodatkowo w celu pełniejszego wyjaśnienia zmian w strukturze biomasy wywaru pszenicznego w wyniku zastosowania opracowanej metody obróbki wstępnej z użyciem mikrofal i hydrotropu uczestniczyłem w badaniach we współpracy z naukowcami z Department of Biotechnology and Food Science, Durban University of Technology. Dzięki nawiązaniu współpracy naukowej z prof. Santhosh Pillai, udało się zrealizować analizy dotyczące wpływu proponowanej metody obróbki wstępnej na zmianę stopnia krystaliczności biomasy wywaru pszenicznego, a uzyskane wyniki zostały opublikowane:

Artykuł naukowy:

- Kłosowski G., **Mikulski D.**, Bhagwat P., Pillai S., 2022. Cellulosic ethanol production using waste wheat stillage after microwave-assisted hydrotropic pretreatment. *Molecules* 27, 6097 (IF₂₀₂₁ – 4,927; pkt. MEiN₂₀₂₁ – 140).

Materiały konferencyjne:

- **Mikulski D.**, Kłosowski G. “Cellulosic ethanol production using distillery stillage after sodium cumene sulfonate pretreatment.” 3rd International Conference for Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability 17.-19.05.2021, on-line (P1.08).
- **Mikulski D.**, Kłosowski G. “Comparison of barothermal and microwave-assisted pretreatment efficiency in degradation of distillery stillages.” 29th European Biomass Conference and Exhibition 26.-29.04.2021, on-line (3AV.6.15).
- Kłosowski G., **Mikulski D.**, Koim-Puchowska B., Menka A. “Microwave-assisted pretreatment of maize distillery stillage in the production of cellulosic ethanol.” 7th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 23.-25.09.2019, Kraków, P8.7 (s. 33).
- Kłosowski G., **Mikulski D.** “Bioethanol production from wheat and rye stillages after microwave-assisted pretreatment.” 7th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 23.-25.09.2019, Kraków, P8.13 (s. 36).
- **Mikulski D.**, Kłosowski G. “Use of dilute sulfuric acid pretreatment of distillery stillage in the production of cellulosic ethanol.” 7th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 23.-25.09.2019, Kraków, P8.21 (s. 39).
- **Mikulski D.**, Kłosowski G., Menka A., Koim-Puchowska B. “Efficiency of lignocellulose degradation after microwave-assisted pretreatment of maize distillery stillage with the use of dilute sulfuric acid.” 7th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 23.-25.09.2019, Kraków, P8.22 (s. 39).
- **Mikulski D.**, Kłosowski G. “Optimization of the enzymatic hydrolysis process of distillery stillage of various origin subjected to the procedure of acidic pretreatment.” 6th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 11.-14.09.2017, Kraków, P16.5 (s.185).
- **Mikulski D.**, Kłosowski G. “Effects of various parameters of acidic pretreatment on the enzymatic hydrolysis efficiency of distillery stillage of different origin.” 6th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 11.-14.09.2017, Kraków, P16.4 (s.184).

Jednym z aktualnych zagadnień badawczych, na którym skupiłem swoją uwagę, była możliwość wykorzystania promieniowania mikrofalowego w dekompozycji biomasy lignocelulozowej. Badania obejmowały wykorzystanie odpadów przemysłu drzewnego przy użyciu katalizy kwasowej w środowisku promieniowania mikrofalowego i podwyższonego ciśnienia. W wyniku przeprowadzonych analiz udało się opracować warunki kwasowej obróbki mikrofalowej biomasy wiórów drzewnych, które umożliwiły jednoetapową konwersję polisacharydów strukturalnych do kwasu lewulinowego będącego produktem dehydratacji cukrów sześciowęglowych. Związek ten znajduje zastosowanie jako plastyfikator, dodatek do żywności, barwnik do tekstyliów, dodatek do biopaliw, dodatek do pasz, związek o działaniu antybakteryjnym oraz w produkcji żywic polimerowych. Realizowałem również badania nad możliwością wykorzystania promieniowania mikrofalowego, w połączeniu z zastosowaniem różnych katalizatorów kwasowych do dekompozycji lignocelulozy. Zastosowanie kwasu

siarkowego jako katalizatora oraz ciśnienie 225 PSI uzyskanego przy pomocy promieniowania mikrofalowego umożliwia uzyskanie wysokiego poziomu konwersji węglowodanów do kwasu lewulinowego ($64,7 \pm 4,5\%$) w stosunku do wydajności teoretycznej uzyskiwanego dla biomasy wiórów sosnowych. Badania wykazały również, że kwas siarkowy jest katalizatorem umożliwiającym najbardziej efektywną dekompozycję biomasy roślinnej, gwarantującym uzyskanie najwyższych stężeń uwolnionych cukrów prostych. W połączeniu z użyciem promieniowania mikrofalowego możliwe jest uzyskanie wysokiego stężenia glukozy na poziomie $89,8 \pm 3,4$ mg/g wiórów sosnowych oraz $170,4 \pm 2,4$ mg/g wiórów bukowych. Z kolei użycie kwasu azotowego sprzyja degradacji hemicelulozy, co umożliwia uzyskanie wysokiego stężenia galaktozy i ksylozy na poziomie $147,6 \pm 0,6$ mg/g wiórów sosnowych oraz $163,6 \pm 0,4$ mg/g wiórów bukowych przy stosunkowo niskim stężeniu glukozy. Badania potwierdziły przydatność skojarzonego zastosowania mikrofal i katalizy kwasowej w degradacji biomasy roślinnej typu softwood, hardwood oraz non-wood. Uzyskane rezultaty opublikowano w formie:

Artykuły naukowe:

- Kłosowski G., **Mikulski D.**, Menka A. 2019. Microwave-assisted one-step conversion of wood wastes into levulinic acid. *Catalysts*, 9(9), 753 (IF₂₀₁₉ – 3,520; pkt. MEiN₂₀₂₁ – 100).
- Kłosowski G., **Mikulski D.**, Lewandowska N. 2020. Microwave-assisted degradation of biomass with the use of acid catalysis. *Catalysts* 10, 641 (IF₂₀₂₀ – 4,146; pkt. MEiN₂₀₂₁ – 100).

Materiały konferencyjne:

- Kłosowski G., **Mikulski D.** “Conversion of pine and cherry wood chips into levulinic acid using microwave radiation.” 3rd International Conference for Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability 17.-19.05.2021, on-line (P1.10).
- Kłosowski G., **Mikulski D.** “Microwave-assisted degradation of biomass with the use of acid catalysis.” 29th European Biomass Conference and Exhibition 26.-29.04.2021, on-line (3BV.8.12).

Uczestniczyłem również w badaniach, których celem była ocena efektywności metod półilościowych oraz ilościowych w selekcji grzybów strzępkowych zdolnych do produkcji enzymów celulolitycznych przydatnych w dekompozycji biomasy roślinnej.

Artykuły naukowe:

- Miklaszewska B., Macko D., Kłosowski G., **Mikulski D.** 2016. Application of semi-quantitative and quantitative methods for the selection of cellulolytic filamentous fungi isolated from pulp mill materials. *BioTechnologia, Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* 97(3), 169-178 (pkt. MEiN₂₀₁₇ – 13).

Dysponując obiecującymi rezultatami, uzyskanymi z zastosowaniem nowo opracowanej metody obróbki wstępnej lignocelulozy, opartej na łącznym wykorzystaniu podwyższonego ciśnienia generowanego przez promieniowanie mikrofalowe oraz hydrotropu w postaci kumenosulfonianu sodu, zdecydowałem się na przygotowanie wniosku o finansowanie

dalszych badań. Głównym założeniem projektu było poznanie wpływu zaproponowanej metody obróbki wstępnej na zmianę struktury biomasy lignocelulozowej (analizy SEM, FTIR, XRD, NMR), efektywność delignifikacji biomasy oraz jej podatność na hydrolizę enzymatyczną i biokonwersję z użyciem drożdży *S. cerevisiae*. Projekt zatytułowany „Dekompozycja biomasy lignocelulozowej z zastosowaniem zintegrowanej metody delignifikacji hydrotropowej przy użyciu promieniowania mikrofalowego” (2020/37/B/NZ9/00372) uzyskał finansowanie w kwocie 507 000 zł w ramach konkursu Opus 19 ogłoszonego przez Narodowe Centrum Nauki. W wyniku badań stwierdzono, że efektywność ekstrakcji składników biomasy zależy od warunków procesowych podczas obróbki wstępnej. Użycie ogrzewania mikrofalowego skojarzonego z dodatkiem hydrotropu w stężeniu 40% w/v NaCS, przy ciśnieniu 117 PSI w czasie 60 minut, umożliwiło redukcję bezwzględnego stężenia lignin o 36,6% w wiórach sosnowych, o 57,7% w wiórach bukowych oraz o 74,1% w słomie pszenicznej. Dokonano oceny wpływu mikrofalowej obróbki hydrotropowej z użyciem kumenosulfonianu sodu na hydrolizę enzymatyczną celulozy zawartej w biomacie wiórów sosnowych, bukowych oraz słomy pszenicznej oraz efektywność produkcji bioetanolu z uzyskanych hydrolizatów. Skuteczność hydrolizy enzymatycznej celulozy zawartej we wiórach bukowych oraz słomie pszenicznej poddanych obróbce wstępnej w zoptymalizowanych warunkach procesowych wynosiła ok. 55-60%. Efektem było uzyskanie hydrolizatów zawierających glukozę w stężeniu 76-84 g/L, co jest znaczącym osiągnięciem w przypadku hydrolizatów celulozowych. Efektem kierowanego przeze mnie projektu badawczego były następujące publikacje:

Artykuły naukowe:

- **Mikulski D.**, Kłosowski G., 2022. Delignification efficiency of various types of biomass using microwave-assisted hydrothermal pretreatment. *Scientific Reports*, 12, 4561 (IF₂₀₂₁ – 4,996; pkt. MEiN₂₀₂₁ – 140).
- **Mikulski D.**, Kłosowski G., 2023. Cellulose hydrolysis and bioethanol production from various types of lignocellulosic biomass after microwave-assisted hydrothermal pretreatment. *Renewable Energy*, 206, 168-179 (IF₂₀₂₁ – 8,634; pkt. MEiN₂₀₂₁ – 140).
- **Mikulski D.**, Kłosowski G., 2023. High-pressure microwave-assisted pretreatment of softwood, hardwood and non-wood biomass using different solvents in the production of cellulosic ethanol. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16, 19 (IF₂₀₂₁ – 7,670; pkt. MEiN₂₀₂₁ – 200).

Materiały konferencyjne:

- **Mikulski D.**, Kłosowski G. “Changes in the structure of lignocellulose as a result of microwave-assisted hydrothermal pretreatment.” *Global Conference on Biofuels and Bioenergy*, 21.-22.10.2022, on-line (p. 31).
- Kłosowski G., **Mikulski D.** “Composition and SEM analysis of biomass of various types after microwave-assisted hydrothermal pretreatment.” *Global Conference on Biofuels and Bioenergy*, 21.-22.10.2022, on-line (p. 29).
- **Mikulski D.**, Kłosowski G. “Influence of microwave-assisted hydrothermal pretreatment on the level of delignification of various types of biomass.” 2nd edition of *International Conference on Green Chemistry and Renewable Energy*, 16.-17.05.2022, on-line (p. 15).

- Kłosowski G., **Mikulski D.** “Susceptibility of cellulose from various types of biomass after microwave-assisted hydrothermal pretreatment to enzymatic hydrolysis.” 2nd edition of International Conference on Green Chemistry and Renewable Energy, 16.-17.05.2022, on-line (p. 13).

Również w okresie po uzyskaniu stopnia doktora moja aktywność badawcza skupiała się wokół tematyki związanej z oceną aktywności metabolicznej drożdży, w trakcie procesu fermentacji alkoholowej, prowadzonej z wykorzystaniem podłoży skrobiowych. Badania stanowiły rozwinięcie wcześniej realizowanych tematów badawczych dotyczących oceny tempa biosyntezy etanolu na podłożach o podwyższonym ekstrakcie (*ang. High Gravity – HG* oraz *Very High Gravity – VHG*) oraz aktywności metabolicznej różnych szczepów drożdży gorzelnicznych. W tym celu zrealizowano prace badawcze obejmujące wykorzystanie suplementacji podłoży HG związkami mineralnymi i ocenę efektywności metabolicznej drożdży na podstawie tempa biosyntezy etanolu oraz powstawania lotnych produktów ubocznych fermentacji. Wykonano również hodowle w warunkach bioreaktorowych podłoży uzyskanych poprzez zmieszanie różnych surowców skrobiowych i melasy w celu uzyskania komplementarnego medium hodowlanego o wysokiej zawartości węglowodanów. W trakcie hodowli analizowano aktywność fermentacyjną drożdży i biosyntezę lotnych produktów ubocznych fermentacji alkoholowej. Zastosowanie dodatku melasy w ilości 25, 33 oraz 50% w trakcie sporządzania zacierów VHG skutkowało uzyskaniem wyższego stężenia etanolu powyżej poziomu 112 g/l i wydajności fermentacji powyżej 53 l etanolu ze 100 kg węglowodanów. Najwyższe stężenie etanolu na poziomie $129,96 \pm 0,58$ g/l oraz wysoką wydajność fermentacji, w stosunku do wydajności teoretycznej (w przeliczeniu na glukozę) na poziomie $90,47 \pm 0,40\%$ stwierdzono dla zacieru VHG sporządzonego z wszystkich czterech surowców roślinnych w identycznej proporcji (25%). Spirytus surowy uzyskany w wyniku destylacji tego podłoża charakteryzował się również najniższą zawartością aldehydu octowego ($332,8 \pm 8,3$ mg/l EtOH) oraz estrów ($94,3 \pm 1,6$ mg/l EtOH) w stosunku dla próbek spirytusów uzyskanych z zacierów o podobnym stopniu odfermentowania. Przeprowadzono również badania nad biosyntezą związków karbonylowych w trakcie fermentacji alkoholowej podłoży uzyskanych z różnych rodzajów surowców skrobiowych. Uzyskane rezultaty stanowiły podstawę do przygotowania następujących publikacji:

Artykuły naukowe:

- Kłosowski G., **Mikulski D.**, Rolbiecka A., Czupryński B. 2017. Changes in the concentration of carbonyl compounds during the alcoholic fermentation process carried out with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Polish Journal of Microbiology*, 66(3), 349-356 (IF₂₀₁₇ – 0,784; pkt. MEiN₂₀₁₇ – 15).
- **Mikulski D.**, Rolbiecka A., Kłosowski G. 2017. Potential influence of compounds released in degradation of phytates on the course of alcoholic fermentation of high gravity mashes – simulation with analogs of these compounds. *Polish Journal of Chemical Technology* 19(3), 27-34 (IF₂₀₁₇ – 0,550; pkt. MEiN₂₀₁₇ – 15).
- Kłosowski G., **Mikulski D.** 2018. Complementarity of the raw material composition of Very High Gravity (VHG) mashes as a method to improve efficiency of the

alcoholic fermentation process. *Process Biochemistry*, 74, 1-9 (IF₂₀₁₈ – 2,883; pkt. MEiN₂₀₁₇ – 30).

Materiały konferencyjne:

- Kłosowski G., **Mikulski D.** “Influence of the application of variable raw material composition on the process of HG alcoholic fermentation conducted under bioreactor conditions.” 6th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 11.-14.09.2017, Kraków, P16.2 (s.183).

Będąc kierownikiem zadania badawczego zatytułowanego „Skrining, ocena i doskonalenie możliwości biosyntetycznych bakterii z rodzaju *Bacillus*” w ramach projektu „Nauki biologiczne podstawą intensywnego i zrównoważonego rozwoju Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego” („Regionalna Inicjatywa Doskonałości” – 008/RID/2018/19) byłem zaangażowany w realizację prac eksperymentalnych mających na celu izolację ze środowiska bakterii z rodzaju *Bacillus* zdolnych do biosyntezy związków powierzchniowoczynnych oraz ocenę wpływu składu podłoża hodowlanego na efektywność sekrecji biosurfaktantów. W trakcie badań przesiewowych bakterii zdolnych do produkcji związków powierzchniowoczynnych, określono przydatność różnych metod selekcji wykorzystywanych w badaniach nad biosurfaktantami. Zidentyfikowano szczepy bakterii produkujące substancje wywołujące hemolizę (metodą posiewową), określono zdolność tych szczepów do obniżania napięcia powierzchniowego podłoża hodowlanych (metodą tensjometryczną) oraz określono stężenie surfaktyny w podłożach hodowlanych (metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC-DAD). Określono również efektywność produkcji surfaktyny dla wybranego szczepu bakterii *Bacillus subtilis* w warunkach hodowli płynnej z użyciem zoptymalizowanego składu podłoża. Uzyskane rezultaty opublikowano w następującej formie:

Artykuły naukowe:

- Koim-Puchowska B., Kłosowski G., **Mikulski D.**, Menka A. 2019. Evaluation of various methods of selection of *B. subtilis* strains capable of secreting surface-active compounds. *PLoS ONE* 14(11), e0225108 (IF₂₀₁₉ - 2,740; pkt. MEiN₂₀₂₁ – 100).
- Koim-Puchowska B., Kłosowski G., Drózdź-Afelt J., **Mikulski D.**, Zielińska A. 2021. Influence of the medium composition and the culture conditions on surfactin biosynthesis by a native *Bacillus subtilis* natto BS19 strain. *Molecules* 26, 2985 (IF₂₀₂₁ – 4,927; pkt. MEiN₂₀₂₁ – 140).

Materiały konferencyjne:

- Koim-Puchowska B., Kłosowski G., **Mikulski D.**, Menka A., Drózdź-Afelt J. “Evaluation of the ability of native *Bacillus subtilis* natto strains to produce surfactin.” 7th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 23.-25.09.2019, Kraków, P8.15 (s. 36).
- Koim-Puchowska B., Kłosowski G., **Mikulski D.**, Menka A., Drózdź-Afelt J. “Screening of *Bacillus subtilis* natto strains for the ability to synthesis of biosurfactants.” 7th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 23.-25.09.2019, Kraków, P8.14 (s. 36).

Od roku 2020 współpracuję naukowo z Katedrą Technologii Fermentacji i Zbóż Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Efektem współpracy są zrealizowane tematy badawcze dotyczące wpływu procesu słodowania ziarna soczewicy oraz fasoli na występowanie wybranych oligosacharydów (rafinozy, stachiozy, werbaskozy). Prace badawcze dotyczą również występowania izoflawonów roślinnych w słodzie sojowych otrzymanym z wykorzystaniem różnych technik słodowania.

Artykuł naukowy:

- Gasiński A., Kawa-Rygielska J., **Mikulski D.**, Kłosowski G., 2022. Changes in the raffinose family oligosaccharides content in the lentil and common bean seeds during malting and mashing processes. *Scientific Reports*, 12, 17911 (IF₂₀₂₁ – 4,996; pkt. MEiN₂₀₂₁ – 140).

Podsumowując, mój cały dorobek naukowy (na dzień 09.03.2023) składa się z **33 artykułów** w tym 7 prac stanowiących opisane wcześniej osiągnięcie naukowe. **9 prac** zostało zrealizowanych przed uzyskaniem stopnia doktora (w tym 8 prac w czasopismach z listy JCR) oraz **24 prace** opublikowano po uzyskaniu stopnia doktora (w tym 23 prace w czasopismach z listy JCR). **Całkowita punktacja przypisana tym pracom na podstawie list czasopism punktowanych MEiN wynosi 2610**, w tym **765 punktów** obejmują publikację stanowiącą podstawę wniosku habilitacyjnego. **Sumaryczny współczynnik wpływu *Impact Factor*** dla wszystkich opublikowanych artykułów wynosi **131,985** (w tym **43,250** za publikacje stanowiące podstawę wniosku habilitacyjnego). **Łączna liczba cytowań** (z dnia 08.05.2023 r.) opublikowanych przeze mnie pracy wynosi **416** (bez autocytowań = **348**) według bazy *Scopus* oraz **365** (bez autocytowań = **301**) według bazy *Web of Science*. **Index Hirscha** wynosi **10** (bez autocytowań = **10**) według bazy *Scopus* oraz **10** (bez autocytowań = **10**) według bazy *Web of Science*.

Ponadto mój dorobek naukowo-badawczy obejmuje:

- **34 komunikaty naukowe** (22 po uzyskaniu stopnia doktora) prezentowane na międzynarodowych (26) oraz krajowych (8) konferencjach naukowych,
- **209 ekspertyz oraz analiz zleconych** dla podmiotów z otoczenia społeczno-gospodarczego,
- **80 recenzji artykułów naukowych** dla czasopism tj.: *Scientific Reports*, *Environmental Science and Pollution Research*, *Enzyme and Microbial Technology*, *Biomass Conversion and Biorefinery*, *Renewable Energy*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *Bioresource Technology Reports*, *Journal of Cereal Science*, *Fermentation*, *GCB Bioenergy*, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *Journal of Environmental Management*, *Alexandria Engineering Journal*, *Energies*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Foods*, *Journal of Fungi*, *Beverages*, *Applied Nanoscience*, *Processes*, *Applied Sciences*, *Molecules*, *Bioengineering*, *Chemical Papers*, *Biomolecules*, *Sustainability*, *Trends in Food Science & Technology*, *Polish Journal of Microbiology*, *Journal of Microbiology*, *Biotechnology and Food Sciences*, *Journal of Food Processing and Preservation*, *Journal of the Institute of Brewing*,

- Pełnienie gościnnie funkcji edytora w **dwóch numerach specjalnych** w czasopismach Catalysts (Special Issue: Microwave-Assisted Catalysis) oraz Processes (Special Issue: Advances in Biomass Pretreatment),
- Pełnienie funkcji członka **Reviewer Board** czasopisma Foods (ISSN:2304-8158),
- **Członek Komitetu Doradczego** w międzynarodowej konferencji International Conference on Fuel, Energy and Environment (ICFEE 2022) 9-10.06.2022 organizowanej przez Department of Automobile Engineering Kongu Engineering College,
- Udział w projektach badawczych:
 - Projekt badawczy finansowany w ramach konkursu Opus 19 NCN (2020/37/B/NZ9/00372) – **kierownik projektu**,
 - Projekt badawczy finansowany w ramach konkursu Preludium 3 NCN (2012/05/N/NZ9/02436) – **kierownik projektu**,
 - Projekt badawczy finansowany przez MNiSW (N311 052 31/3420) – **wykonawca projektu**,
- **3-miesięczy staż naukowy** w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej.

W latach 2013, 2015, 2017, 2019 moja aktywność naukowa została doceniona przez władze uczelni i przyznano mi wyróżnienia oraz nagrody indywidualne III stopnia Rektora Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego za działalność naukową oraz uzyskanie projektu badawczego (**załącznik 3.8.**).

Zestawienie dorobku naukowego (na dzień 08.05.2023)

Dane	Przed uzyskaniem tytułu doktora	Po uzyskaniu tytułu doktora	Suma
Liczba artykułów w czasopismach ogółem	9	24	33
- z listy JCR	8	23	31
- spoza listy JCR	1	1	2
Liczba doniesień konferencyjnych (w tym w jęz. angielskim)	12 (5)	22 (22)	34 (27)
Liczba zrealizowanych projektów (w tym jako kierownik/wykonawca)	2 (1/1)	1 (1/0)	3 (2/1)
Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania <i>Impact Factor*</i> , w tym:	18,026	113,958	131,984
- dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	0	43,250	43,250
- dla pozostałych publikacji	18,026	70,708	90,456
Liczba punktów MEiN**, w tym:	222	2388	2610
- dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	0	765	765
- dla pozostałych publikacji i innych prac naukowych	222	1623	1845

Liczba recenzji artykułów naukowych	0	80	80
Liczba cytowań (bez autocytowań):			
- wg Web od Science	47 (38)	318 (263)	365 (301)
- wg Scopus	51 (40)	365 (308)	416 (348)
Indeks Hirscha (bez autocytowań):			
- wg Web od Science	3 (3)	10 (10)	10 (10)
- wg Scopus	3 (3)	10 (10)	10 (10)

* Impact Factor zgodny z roku opublikowania

** punktacja prac opublikowanych w latach 2019-2021 zgodna z wykazem stanowiącym załącznik do komunikatu MEiN z dnia 9 lutego 2021 r., natomiast punktacja prac opublikowanych w 2018 roku zgodna z wykazem opublikowanym w komunikacie MNiSW z dnia 25 stycznia 2017 r.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Moja aktywność naukowa poza miejscem mojego zatrudnienia, związana była głównie z dwoma krajowymi wyjazdami naukowymi do Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz Politechniki Łódzkiej.

Pierwszy z nich odbył się w okresie 21.09.- 02.10.2020 r. i obejmował nawiązanie współpracy naukowej z pracownikami Katedry Technologii Fermentacji i Zbóż, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (**załącznik 3.9.** – potwierdzenie pobytu). Celem pobytu było uczestniczenie w realizacji badań dotyczących wpływu dodatku wyłoków z białych winogron odmiany *Solaris* do fermentującego piwa na skład lotnych produktów ubocznych fermentacji alkoholowej oraz związków fenolowych w gotowym piwie. Oceniono również efekt dodatku wyłoków z winogron wykorzystywanych w produkcji wina do brzezki browarniczej, na właściwości antyoksydacyjne otrzymanego piwa. W trakcie badań analizowano skład lotnych produktów ubocznych fermentacji metodą GC-FID, skład węglowodanów, etanolu, glicerolu oraz kwasów organicznych metodą HPLC-RID oraz stężenie związków fenolowych i właściwości antyoksydacyjne otrzymanych piw metodami spektrofotometrycznymi. Zastosowanie dodatku wyłoków z winogron wywarło istotny wpływ na stężenie aldehydu octowego w piwie. Dodatek 10 oraz 20% wyłoków z winogron do piwa spowodował obniżenie stężenia aldehydu octowego z wartości 134,05 mg/l dla wariantu kontrolnego do poziomu 17,43-31,43 mg/l dla piw z dodatkiem wyłoków. Aldehyd octowy będący produktem dekarboksylacji pirogronianu jest produktem pośrednim w konwersji pirogronianu do alkoholu etylowego. Jego obniżone stężenie w otrzymanych piwach z dodatkiem wyłoków z winogron jest prawdopodobnie efektem reakcji z antocyjanami występującymi w skórce winogron, która prowadzi do powstania piranoantocyjanów. Dodatek wyłoków z winogron miał niewielki wpływ na zmianę stężenia analizowanych alkoholi wyższych, jednak spowodował wzrost stężenia estrów tj. octan etylu oraz dekanian etylu. Stwierdzone wyższe stężenie octanu etylu w piwach z dodatkiem wyłoków z winogron jest prawdopodobnie efektem podwyższonego stężenia glukozy uczestniczącej w biosyntezie tego estru. Wyższe stężenie octanu etylu w piwach z dodatkiem wyłoków niepasteryzowanych wskazuje na rozwój mikroflory zdolnej do produkcji octanu etylu oraz kwasu octowego. W piwach z dodatkiem wyłoków z winogron

stwierdzono wyższe stężenie etanolu, co jest efektem wprowadzenia do brzezki piwnej dodatkowej ilości cukrów fermentujących. Przy zastosowaniu 20% dodatku wyłoków z winogron stwierdzono również wzrost stężenia glicerolu o ok. 0,2 g/l będący reakcją drożdży na podwyższone ciśnienie osmotyczne. Zastosowanie dodatku wyłoków z winogron do brzezki piwnej skutkowało podwyższonym stężeniem kwasu jabłkowego w gotowym piwie, co jest efektem występowania tego kwasu organicznego w owocach winorośli. Dodatek pozostałości z owoców winorośli do fermentującego piwa spowodował wzrost właściwości antyoksydacyjnych gotowego produktu. W piwie otrzymanym z brzezki z dodatkiem 20% pasteryzowanych wyłoków z winogron stwierdzono 2,5-krotny wzrost stężenie związków fenolowych oraz właściwości antyoksydacyjnych. Uzyskane rezultaty wskazują, że zastosowanie przy produkcji piwa dodatku odpadów winiarskich w postaci wyłoków z winogron ma wpływ na wzrost właściwości antyoksydacyjnych gotowego produktu i umożliwia uzyskanie gotowego napoju fermentowanego o podwyższonych parametrach prozdrowotnych. Efektem zrealizowanych badań w trakcie pobytu na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu była wspólna publikacja naukowa.

Artykuł naukowy:

- Gasiński A., Kawa-Rygielska J., **Mikulski D.**, Kłosowski G., Głowacki A., 2022. Application of white grape pomace in the brewing technology and its impact on the concentration of esters and alcohols, physicochemical parameters and antioxidative properties of the beer. *Food Chemistry*, 367, 130646 (IF₂₀₂₁ – 9,231; pkt MEiN₂₀₂₁ – 200).

W okresie od 9 lipca do 10 października 2021 r. odbyłem również 3-miesięczny staż krajowy w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej (**załącznik 3.10.** – potwierdzenie pobytu), w celu realizacji badań dotyczących zdolności szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, izolowanych z fermentowanej soi w produkcji związków z grupy pirazyn. Pirazyny są grupą związków organicznych powstających m. in. w wyniku reakcji Maillarda. Charakteryzują się zróżnicowanym, intensywnym aromatem, głównie o charakterze orzechowo-pieczeniowym, ale może występować również nuta pieczonych ziemniaków lub migdałowa i inne. Z tego powodu pirazyny znajdują zastosowanie jako naturalne dodatki aromatyzujące do żywności w przemyśle spożywczym. Pirazyny to heterocykliczne związki organiczne zawierające dwa atomy azotu w pierścieniu. Alternatywą dla syntezy chemicznej pirazyn jest ich biosynteza z użyciem mikroorganizmów, umożliwiająca otrzymywanie tych związków w warunkach przyjaznych środowisku. W biosyntezie pirazyn z wykorzystaniem bakterii z rodzaju *Bacillus*, oprócz cukrów jako źródła węgla, niezbędne jest dostarczenie prekursorów pirazyn w postaci np. L-treoniny (prekursor 2,5-dimetylopirazyny) oraz acetoiny (prekursor 2,3,5,6-tetrametylopirazyny). Występowanie w podłożu hodowlanym wskazanych prekursorów może również stymulować produkcję innych pirazyn. z uwagi na słabo poznany mechanizm biosyntezy tych związków przez różne grupy mikroorganizmów. Efektywna synteza mikrobiologiczna pirazyn wymaga jednak badań przesiewowych umożliwiających izolację wydajnych szczepów produkcyjnych tych związków. Celem badań była ocena zdolności szczepów bakterii *Bacillus subtilis* izolowanych z fermentowanej soi „natto” do biosyntezy szerokiego spektrum alkilopirazyn. W trakcie badań wyizolowano 40 szczepów bakterii zaliczanych do gatunku *B. subtilis*, co potwierdzono użyciem nukleotydowej sekwencji

16S rRNA. Różnice wyizolowanych szczepów *B. subtilis* potwierdzono analizując zmienność sekwencji alleli w obszarze locus *pta* (*ang. phosphate acetyltransferase*) z wykorzystaniem metody MLST (*ang. multi-locus sequence typing*). Hodowla wyizolowanych szczepów bakterii ukierunkowana na biosyntezę pirazyn prowadzona była z wykorzystaniem podłoży modelowych zawierających prekursor pirazyn. Analizę jakościową i ilościową pirazyn przeprowadzono z wykorzystaniem techniki kapilarnej chromatografii gazowej z analizą fazy nad-powierzchniowej sprzężonej z detektorem masowym (HS-GC/MS). Identyfikację związków w badanych próbach podłoży dokonywano przez porównanie otrzymanych widm masowych z widmami masowymi substancji wzorcowych oraz widmami w bibliotece widm masowych. Wykazano zdolność szczepów *B. subtilis* izolowanych z fermentowanej soi "natto" w produkcji 2-metylopirazyny, 2,3-dimetylopirazyny, 2,5-dimetylopirazyny, 2,6-dimetylopirazyny, 2,3,5-trimetylopirazyny oraz 2,3,5,6-tetrametylopirazyny. Badania przesiewowe umożliwiły wyizolowanie dwóch szczepów *B. subtilis* zdolnych do produkcji alkilopirazyn. Szczep BcP4 produkował głównie 2-metylopirazynę, 2,3-dimetylopirazynę oraz 2,6-dimetylopirazynę w sumarycznym stężeniu ok. 3200 µg/L. Natomiast szczep BcP21 jest efektywnym producentem 2,5-dimetylopirazyny, 2,3,5-trimetylopirazyny oraz 2,3,5,6-tetrametylopirazyny w całkowitym stężeniu 558 mg/L. Uzyskane rezultaty wskazują na zróżnicowanie w zakresie predyspozycji szczepów *B. subtilis* do produkcji poszczególnych alkilopirazyn. Wymagane są jednak dalsze badania nad optymalizacją warunków biosyntezy mikrobiologicznej (skład podłoża, parametry procesowe) gwarantujących wysoką wydajność procesu. Efektem realizacji stażu oprócz przedstawionej poniżej publikacji było również poznanie nowej techniki analitycznej HS-GC/MS wykorzystywanej w analizach biologicznych.

Artykuł naukowy:

- Kłósowski, G., Mikulski, D., Pielech-Przybylska, K. 2021. Pyrazines biosynthesis by *Bacillus* strains isolated from natto fermented soybean. *Biomolecules* 11, 1736 (IF₂₀₂₁ – 6,064; pkt. MEiN₂₀₂₁ – 100).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Działalność dydaktyczna

Moja aktywność dydaktyczna była nierozłącznie związana z prowadzonymi zajęciami dydaktycznymi w Katedrze Biotechnologii UKW. Pracę na stanowisku asystenta badawczo-dydaktycznego rozpocząłem w roku 2009 i od samego początku byłem zaangażowany w opracowanie i prowadzenie zajęć laboratoryjnych na nowo otworzonych kierunkach studiów tj. biotechnologia (I stopnia) oraz ochronie środowiska (I stopnia). Brałem aktywny udział w przygotowaniu zaplecza dydaktycznego oraz opracowaniu zajęć laboratoryjnych dla przedmiotów: Biotechnologia ogólna, Inżynieria bioprosesowa, Chemia fizyczna, Technologie fermentacyjne, Enzymologia dla kierunku biotechnologia I stopnia; Optymalizacja procesów fermentacyjnych dla kierunku biotechnologia II stopnia; Problemy inżynierii procesowej dla kierunku ochrona środowiska I stopnia; Techniki chromatograficzne w monitoringu środowiska, Biopaliwa – technologie dla zrównoważonego rozwoju dla kierunku ochrona środowiska II stopnia oraz Biotechnologia dla kierunku biologia I stopnia i Technologie

bioenergetyczne dla kierunku biologia II stopnia. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora w roku 2015 i zatrudnieniu na stanowisku adiunkta badawczo-dydaktycznego, zaangażowałem się w opracowanie i prowadzenie wykładów oraz zajęć laboratoryjnych dla przedmiotów tj.: Odnawialne źródła energii (wykłady) dla kierunku biotechnologia I stopnia, Degradacja związków wielkocząsteczkowych (wykłady i laboratoria), Biosurfaktanty otrzymywane metodami biotechnologicznymi (wykłady) dla kierunku biotechnologia II stopnia; Podstawy biokatalizy (wykłady i laboratoria) dla kierunku biologia II stopnia; Metody doskonalenia szczepów przemysłowych (wykłady) zajęcia realizowane w ramach przedmiotów ogólnouczeniowych. W sumie od roku 2009 zrealizowałem **4778 godzin** dydaktycznych. Pełniłem również rolę opiekuna prac magisterskich oraz promotora prac licencjackich i magisterskich. Od roku 2015 byłem promotorem **6 prac licencjackich** oraz **6 prac magisterskich**, dodatkowo byłem recenzentem 7 prac licencjackich oraz 10 prac magisterskich. Byłem również 4-krotnie opiekunem rocznika kierunku biotechnologia I lub II stopnia. W ramach aktywności dydaktycznej jestem od 2017 roku członkiem Rady Kierunku Biotechnologia, której zadaniem jest zatwierdzanie tematów prac licencjackich oraz magisterskich, wprowadzanie modyfikacji programów kształcenia, modyfikacje efektów uczenia, przygotowywanie corocznych sprawozdań dotyczących realizacji programów kształcenia na kierunku biotechnologia. Moja aktywność dydaktyczna została doceniona i przyznano mi w dniu 18.07.2019 **medal Komisji Edukacji Narodowej** (legitymacja nr 168776 – załącznik 3.11.).

6.2. Działalność organizacyjna

Moja działalność organizacyjna rozpoczęła się w roku 2010 od bycia koordynatorem „Dni Nauki”, czyli imprezy popularyzującej naukę z ramienia Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy (UKW). Również w latach 2011 i 2012 pełniłem rolę koordynatora „Bydgoskiego Festiwalu Nauki” z ramienia Instytutu Biologii Eksperymentalnej UKW oraz w roku 2012 byłem koordynatorem „Drzwi Otwartych” dla kierunku biotechnologia (załącznik 3.12.). W okresie od 11.2014 do 09.2016 byłem członkiem Rady Wydziału Nauk Przyrodniczych (obecnie Biologicznych) UKW. Od roku 2015 byłem zaangażowany w pracę zespołów funkcjonujących przy Instytucie Biologii Eksperymentalnej UKW: Zespołu Projakościowego, Zespołu ds. Dydaktyki i Jakości Kształcenia oraz Zespołu ds. Nagród dla Studentów. W okresie 03.2017 do 09.2019 pełniłem również funkcję Zastępcy Dyrektora Instytutu Biologii Eksperymentalnej (IBE), którego zadaniem była organizacja zajęć dydaktycznych w IBE, dostosowywanie programów kształcenia do wytycznych uczelniowych i ministerialnych, dostosowywanie programów kształcenia do wymogów Polskich Ram Kwalifikacji. W roku 2017 oraz 2018 jako Zastępca Dyrektora IBE byłem członkiem zespołów przygotowujących raporty samooceny dla kierunku biologia i biotechnologia oraz aktywnie uczestniczyłem w spotkaniach z zespołami oceniającymi Polskiej Komisji Akredytacyjnej. Pełniąc funkcję Zastępcy Dyrektora IBE byłem również:

- Członkiem Wydziałowej Komisji ds. Studenckich i Jakości Kształcenia,
- Członkiem Wydziałowej Komisji ds. Nagród i Wyróżnień dla Studentów i Absolwentów,

- Członkiem Wydziałowej Komisji ds. Nagród dla Pracowników Niebędących Nauczycielami Akademickimi,
- Przewodniczącym Instytutowego Zespołu ds. Dydaktyki i Jakości Kształcenia.

W okresie od 10.2019 r. do 09.2020 r. byłem również członkiem Rady Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych. Zgodnie z Uchwałą nr 9/2019/2020 Senatu UKW z dnia 28 stycznia 2020 r. jestem w kadencji 2020-2024 członkiem uczelnianej Komisji Wyborczej, w której pełnię rolę zastępcy przewodniczącego. Od roku 2021 jestem również koordynatorem Wydziału Nauk Biologicznych ds. Współpracy z Gospodarką i w ramach pełnienia obowiązków byłem członkiem Doraźnej Komisji ds. Opracowania Strategii Rozwoju Dyscypliny Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych. Za działalność organizacyjną w latach 2019, 2021 oraz 2022 otrzymałem nagrody Rektora UKW (**załącznik 3.13.**).

6.3. Działalność popularyzująca naukę

W działalność popularyzującą naukę byłem zaangażowany od samego początku pracy na stanowisku naukowo-technicznym w Zakładzie Biotechnologii UKW. W roku 2009 wygłosiłem swój pierwszy wykład pt.: „Organizmy modyfikowane genetycznie (GMO) - perspektywy i zagrożenia.” w trakcie trwających „Dni Nauki” (**załącznik 3.14.**). W kolejnych latach cyklicznie uczestniczyłem w „Bydgoskim Festiwalu Nauki” organizowanym przez m. in. Uniwersytet Kazimierza Wielkiego. W latach 2010 – 2018 w ramach „Bydgoskiego Festiwalu Nauki” zorganizowałem warsztaty o następujących tytułach (**załącznik 3.15.**):

- „Biopaliwa – czyli na czym będziemy jeździć w najbliższej przyszłości”
- „Immobilizacja mikroorganizmów, czyli jak unieruchamia się komórki we współczesnej biotechnologii.”
- „Biodiesel bez tajemnic, czyli wyprodukuj własne biopaliwo.”
- „Cytryna, papryka, czy kapusta kiszona, gdzie kryje się więcej kwasu askorbinowego.”
- „Jak złapać komórki w pułapkę.”
- „Wyścig drożdży.”
- „Trzy, dwa, jeden - drożdże na start!”
- „Barwniki fotosyntetyczne, czyli dlaczego rośliny są zielone.”
- „Reakcje redoks w barwnej odsłonie”

W roku 2013, na zaproszenie Zespołu Szkół Ogólnokształcących nr 1 w Chełmnie wygłosiłem wykład popularnonaukowy w trakcie Debaty Oxfordzkiej pt.: „Organizmy transgeniczne (GMO), czyli cele modyfikacji organizmów żywych.” (**załącznik 3.16.**). W ramach współpracy z Gimnazjum nr 1 im. Kazimierza Jagiellończyka w Człuchowie w roku 2015 przeprowadziłem warsztaty pt.: „Otrzymywanie biodiesla z wykorzystaniem transestryfikacji oleju roślinnego” (**załącznik 3.17.**). Również w roku 2015 z tego samego zagadnienia zorganizowałem zajęcia laboratoryjne dla dzieci ze szkół uczestniczących w Partnerskim Projekcie Szkół Comenius LLP 2013-2015 w ramach programu ERASMUS+ (**załącznik 3.18.**). W latach 2019 – 2022 zrealizowałem serię warsztatów dotyczących produkcji biodiesla oraz rozdziału chromatograficznego barwników fotosyntetyzujących w ramach współpracy uczelni ze szkołami z regionu kujawsko-pomorskiego w projekcie „Z przyrodą za pan brat” (POWR03.01.00-00-T216/18) finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Dodatkowo sprawowałem opiekę naukową na studentami prezentującymi wyniki swoich badań w trakcie cyklicznie organizowanej konferencji studenckiej „Biotechnologia: dziś na Uniwersytecie Technologiczno-Przyrodniczym, jutro w regionie kujawsko-pomorskim.”. W latach 2011 – 2014 oraz 2017 – 2018 studenci będący pod moją opieką merytoryczną (pełnienie funkcji promotora lub opiekuna pracowni magisterskiej) prezentowali badania o następującej tematyce:

- „Wpływ zastosowania różnych form azotu oraz pożywek mineralnych na przebieg i wydajność fermentacji alkoholowej oraz skład lotnych produktów ubocznych.” (Górska B., Kłosowski G., Mikulski D.) 2011.
- „Ocena wpływu immobilizacji szczepu D-2 drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w alginianie wapnia na tolerancję stresu osmotycznego i podwyższonego stężenia etanolu.” (Rolbiecka A., Grykier J., Kłosowski G.) 2012.
- „Wpływ dodatku inozytolu oraz fosforu na stan fizjologiczny oraz aktywność fermentacyjną drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.” (Matusiak M., Mikulski D., Miklaszewska) 2012.
- „Analiza wybranych właściwości fizyko-chemicznych piw dostępnych w handlu detalicznym.” (Mańkowski A., Mikulski D., Kłosowski G.) 2013.
- „Ocena zdolności produkcji fitaz przez wyselekcjonowane szczepy drożdży z rodzaju *Saccharomyces*.” (Milczek K., Mikulski D., Kłosowski G.) 2014.
- „Ocena możliwości wykorzystania biomasy żytniego wywaru gorzelniczego do produkcji etanolu celulozowego z wykorzystaniem kwasowej obróbki wstępnej.” (Grykier D., Mikulski D., Kłosowski G.) 2017.
- „Reakcja metaboliczna drożdży *S. cerevisiae* szczep Ethanol Red na stres środowiskowy wywołany podwyższonym stężeniem furfuralu.” (Jankowiak O., Grykier D., Przygocka A., Mikulski D.) 2017.
- „Optymalizacja warunków hodowli wgłębnej (SmF) natywnych drożdży *S. cerevisiae* ukierunkowanej na produkcję fitaz.” (Jankowiak O., Mikulski D., Kłosowski G.) 2017.
- „Wpływ zastosowania ultradźwięków w trakcie obróbki wstępnej biomasy wywarów gorzelnicznych różnego pochodzenia na wydajność procesu hydrolizy celulozy” 2018.
- „Białka HSP jako indykator stresu chemicznego u drożdży *S. cerevisiae* wywołanego obecnością produktów ubocznych obróbki wstępnej biomasy lignocelulozowej” (Menka A., Mikulski D., Kłosowski G.) 2018.
- „Ocena przydatności ziarna szarłatu wyniosłego (*Amaranthus cruentus* L.) jako surowca do produkcji etanolu z wykorzystaniem fosfohydrolaz.” (Grubich J., Kłosowski G., Mikulski D.) 2018.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

W trakcie kariery zawodowej, oprócz aktywności badawczo-dydaktycznej, starałem się również współpracować z otoczeniem społeczno-gospodarczym. Efektem współpracy było wykonanie licznych ekspertyz oraz analiz zleconych dla następujących przedsiębiorstw:

- Gospodarstwo Rolne Radzicz (obecnie Gorzelnia Radzicz),
- KRAJAN Browary Kujawsko-Pomorskie Sp. z o. o.,

- Skup Zbóż Produkcja Mąk Gorzelnia Kęsowo,
- BIOAGRA S.A.

Wykonane ekspertyzy dotyczyły analizy stężenia związków karbonylowych w próbach spirytusu surowego, oceny wydajności podstawowych oraz nietypowych surowców wykorzystywanych w przemyśle gorzelnicznym, analizy składu lotnych produktów ubocznych w spirytusie surowym oznaczanych metodą kapilarnej chromatografii gazowej, oceny efektywności modyfikacji chemicznej składu lotnych produktów ubocznych fermentacji alkoholowej, oceny możliwości wydłużenia stabilności produktu (poprawy stabilności koloidalnej piwa).

W trakcie kariery zawodowej uczestniczyłem również w licznych seminariach i szkoleniach tj.:

- „Kierunki rozwoju odnawialnych źródeł energii w regionach.” 27.03.2009 r.,
- „Najnowsze rozwiązania dla laboratoriów chemicznych XXI wieku” zorganizowane przez firmę Merck Sp. z o.o. 29.09.2009 r.,
- „Zapewnienie jakości wyników badań mikrobiologicznych” zorganizowane przez firmę Merck Sp. z o.o. 27.10.2009 r.,
- „Optymalizacja produkcji biomasy i związków biologicznie czynnych w bioreaktorach.” zorganizowanym przez firmę Labo Baza oraz uczestnictwo w targach EUROLAB 4.03.2010 r.,
- „Od pomysłu do projektu – myślenie projektowe.” organizowanym przez Biuro Współpracy Międzynarodowej UKW Punkt Kontaktowy ds. Programów Ramowych UE Uniwersytet Kazimierza Wielkiego 15.12.2010 r.,
- „Serwis CORDIS dla zapracowanych” organizowanym przez Biuro Współpracy Międzynarodowej UKW Punkt Kontaktowy ds. Programów Ramowych UE Uniwersytet Kazimierza Wielkiego 7.04.2011 r.,
- „Spotkanie z organizacjami finansującymi badania naukowe” zorganizowanym przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej w dniu 23.05.2014 r.,
- „Zasady prawidłowej realizacji projektów w zakresie zamówień publicznych oraz komercjalizacji wyników prac B+R” organizowanym przez Dział Nauki UKW w dniu 14.03.2016 r.,
- „Ekstrakcja i oczyszczanie białka z materiału biologicznego” organizowanym przez firmę Merck w dniu 30.04.2021 r.

.....
(podpis wnioskodawcy)