



Dr hab. Tomasz Janeczko, prof. UPWr  
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 16.01.2026

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr inż. Agnieszki Raczyńskiej**

pt. "Biomasa mikrobiologiczna w procesach modyfikacji 2-fenylometanolu  
i odzysku metali ziem rzadkich"

Dziedzina: nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina: nauki chemiczne

Promotor: dr hab. inż. Małgorzata Brzezińska-Rodak, prof. uczelni

### Ocena doboru tematyki i jej znaczenia w kontekście badań światowych

Tematyka pracy jest aktualna i dobrze osadzona w światowych trendach badawczych na styku biokatalizy całokomórkowej, intensyfikacji bioprocessów oraz odzysku surowców krytycznych. Z jednej strony 2-fenylometanol stanowi łatwo dostępny substrat, który może być przekształcany biokatalitycznie do związków o większej wartości dodanej (m.in. tyrozol oraz chiralne 1-fenylometano-1,2-diole). Z drugiej strony, odzysk pierwiastków ziem rzadkich (REE) jest obecnie jednym z najbardziej dynamicznie rozwijanych kierunków badań związanych z gospodarką o obiegu zamkniętym.

Za zaskakujący element koncepcji badawczej uznaję próbę połączenia dwóch odmiennych, metodologicznie i aplikacyjnie „oddalonych” obszarów (biotransformacji związków organicznych oraz odzysku pierwiastków ziem rzadkich), w jednym ciągu technologicznym. Należy podkreślić, że takie zestawienie jest ambitne, a zarazem obciążone ryzykiem rozproszenia narracji, ponieważ klasycznie oczekuje się, aby rozprawa doktorska stanowiła dzieło zwarte tematycznie i prowadziła do jednego, jasno zdefiniowanego problemu naukowego. W niniejszej pracy spójność jest jednak możliwa do obrony dzięki wspólnemu mianownikowi, jakim jest wykorzystanie biomasy mikrobiologicznej jako narzędzia procesowego oraz zamknięcie strumienia materiałowego w ujęciu gospodarki o obiegu zamkniętym (od biotransformacji 2-fenylometanolu do zagospodarowania biomasy poprocesowej do odzysku REE). Taki układ odpowiada na praktyczną potrzebę minimalizacji odpadów i wpisuje się w paradygmat intensyfikacji i integracji procesów.

### Cele pracy i stopień ich realizacji

Autorka w sposób jasny sformułowała cele badań. W części poświęconej grzybom z rodzajów *Beauveria* i *Cunninghamella* założyła:

- weryfikację przydatności wybranych szczepów do otrzymywania hydroksylowych pochodnych 2-feniloetanolu w skali laboratoryjnej przy różnych stężeniach substratu;
- ocenę wpływu postaci biokatalizatora (biomasa świeża oraz różne metody immobilizacji) na przebieg i efektywność procesu;
- optymalizację czasu trwania biotransformacji;
- weryfikację możliwości praktycznego zastosowania najbardziej obiecujących procesów w skali pół-preparatywnej w bioreaktorze z mieszaniem oraz w uproszczonym układzie przepływowym.

W części dotyczącej *Galdieria sulphuraria* zaplanowano profilowanie katalityczne szczepu wobec 2-feniloetanolu, ocenę wpływu czasu kontaktu biomasy z substratem na zdolność odzysku REE oraz weryfikację procesu kaskadowego obejmującego odzysk La, Ce, Nd i Gd. Z przedstawionych wyników wynika, że cele te zostały w zdecydowanej większości osiągnięte; wyjątek stanowi pełna identyfikacja produktu biotransformacji wytwarzanego przez *G. sulphuraria*, której nie udało się przeprowadzić z uwagi na zbyt małą ilość materiału.

### Ocena układu pracy, przeglądu literatury i jakości opracowania

Rozprawa ma przejrzysty i logiczny układ. Po części wprowadzającej następuje rozbudowany przegląd literatury obejmujący: podstawy biokatalizy i jej znaczenie w zrównoważonym przemyśle, przegląd enzymów katalizujących reakcje hydroksylacji, charakterystykę grzybów *Beauveria* i *Cunninghamella* jako biokatalizatorów oraz wprowadzenie do tematyki REE i zastosowań *Galdieria sulphuraria* w odzysku metali. Przegląd literatury jest adekwatny do tematyki pracy i prowadzi do uzasadnienia doboru modeli biologicznych oraz substratu. Część materiałowo-metodyczna jest obszerna i umożliwia odtworzenie badań. Na uznanie zasługuje wyraźne rozdzielenie procedur dla skali laboratoryjnej i pół-preparatywnej oraz przedstawienie różnych wariantów immobilizacji biomasy.

### Ocena merytoryczna

#### I. *Cunninghamella* spp.

Badania przeprowadzone z udziałem trzech szczepów *Cunninghamella* wykazały istotne różnice w profilu przemian 2-feniloetanolu, zarówno pod względem kinetyki zaniku substratu, jak i rodzaju obserwowanych produktów. Dla *C. elegans* DSM 1908 przy niższych stężeniach substratu obserwowano bardzo szybkie jego usuwanie (stopień przereagowania >99% już po 1 dniu), natomiast przy stężeniu 1,2 mg/mL wykazano powstawanie (*S*)-1-feniloetano-1,2-diolu jako produktu pośredniego (18,91 µg/mL; ee do 84,77% po 3 dniach). W skali pół-preparatywnej uzyskano ten sam produkt w wyższym stężeniu (45,16 µg/mL), jednak przy obniżeniu czystości optycznej (ee 67,26%). Wynik ten należy ocenić jako wartościowy, ponieważ wskazuje na

podatność stereoselektywności układu całokomórkowego (whole-cell) na czynniki procesowe związane ze skalą (m.in. transfer tlenu, mieszanie, gradienty stężeń, strategia kontaktu biomasy z substratem), co jest istotne z punktu widzenia potencjalnej intensyfikacji procesu.

W przypadku *C. blakesleeana* DSM 1906 wykazano hydroksylację w pierścieniu aromatycznym i wytwarzanie tyrozolu już po 1 dniu procesu (maksymalnie 12,38  $\mu\text{g/mL}$  w skali laboratoryjnej oraz 14,23  $\mu\text{g/mL}$  w skali pół-preparatywnej). Z kolei *C. echinulata* DSM 1905 charakteryzował się przede wszystkim szybkim zmniejszeniem stężenia 2-feniloetanolu bez jednoznacznie identyfikowalnych produktów pośrednich w zastosowanym podejściu analitycznym. Zestawienie tych wyników ma wyraźną wartość porównawczą, ponieważ pokazuje, że nawet w obrębie jednego rodzaju mikroorganizmów możliwe jest uzyskanie odmiennych „profilów funkcjonalnych” procesu — od układów, w których obserwuje się akumulację określonego metabolitu, po układy, w których dominuje szybkie usuwanie substratu z fazy ciekłej.

Jednocześnie w tym miejscu należy podkreślić istotny aspekt interpretacyjny: rozróżnienie w pracy nurtu „biotransformacyjnego” i „biodegradacyjnego” jest uzasadnione z perspektywy celu procesu (akumulacja produktu vs eliminacja substratu), jednak w sensie biochemicznym oba zjawiska stanowią elementy tego samego ciągu przemian metabolicznych. Wnioski o biodegradacji oparto głównie na zaniku 2-feniloetanolu, bez identyfikacji dalszych produktów przemian oraz bez bilansu węgla, nie można jednoznacznie rozstrzygnąć, czy zachodzi mineralizacja do  $\text{CO}_2$ , powstawanie metabolitów nieoznaczonych (np. bardziej polarnych, niewykrywalnych w przyjętym oknie analitycznym), czy też częściowa sorpcja i/lub akumulacja substratu albo produktów w biomacie. W konsekwencji tę część wyników należy traktować przede wszystkim jako wiarygodnie udokumentowane „usuwanie z fazy ciekłej” oraz etap selekcji i wstępnej parametryzacji biokatalizatorów, stanowiący dobrą podstawę do dalszych badań pogłębiających (np. screening LC-MS metabolitów, analiza ekstraktów biomasy, pomiary TOC/COD lub respirometria).

Podsumowując, blok dotyczący *Cunninghamella* wnosi cenne informacje o zróżnicowaniu potencjału biokatalitycznego badanych szczepów wobec 2-feniloetanolu oraz o wpływie skali na czystość optyczną produktu, jednak jego znaczenie aplikacyjne ograniczają relatywnie niskie stężenia uzyskiwanych produktów (rzędu  $\mu\text{g/mL}$ ) oraz brak pełnego obrazu dalszych przemian w wariantach, w których obserwowano szybki zanik substratu.

## II. *Beauveria* spp.

W części dotyczącej rodzaju *Beauveria* Autorka przeprowadziła badania w sposób logiczny i „dwutorowy”, rozdzielając dwa zastosowania biologiczne i procesowe: wykorzystanie wysokiej zdolności usuwania 2-feniloetanolu w kontekście biodegradacji/bioremediacji oraz wykorzystanie aktywności stereoselektywnej do otrzymywania chiralnego 1-feniloetano-1,2-diolu. Taki podział uważam za zasadny, ponieważ w przypadku tego samego substratu kryterium sukcesu jest inne: w nurcie bioremediacyjnym kluczowy jest zanik związku w fazie ciekłej i stabilność układu w czasie, natomiast w nurcie biotransformacyjnym – akumulacja produktu o określonej czystości optycznej i przewidywalnym profilu.

W aspekcie biodegradacyjnym, obejmującym *B. brongniartii* DSM 6651, Autorka wykazała bardzo wysoką efektywność eliminacji 2-fenylloetanolu oraz podjęła próbę nadania temu wynikowi wymiaru procesowego poprzez immobilizację biomasy (różne nośniki) i testy w układach modelujących wody stojące i płynące. Jest to podejście wartościowe, ponieważ przenosi badania poza klasyczny schemat „kolbowy” i dotyka zagadnień kluczowych dla ewentualnego zastosowania praktycznego: stabilności biokatalizatora, możliwości jego odzysku i pracy w układach przepływowych. Jednocześnie należy zaznaczyć, że – podobnie jak w innych częściach pracy – sam zanik substratu w supernatancie nie rozstrzyga w sposób jednoznaczny, czy zachodzi pełna mineralizacja do CO<sub>2</sub>, czy też powstają produkty pośrednie które pozostały niewykryte w wyniku zastosowania wybranych metod analitycznych albo następuje częściowa sorpcja/akumulacja w biomacie. Z tego względu wnioski tej części należy traktować przede wszystkim jako wiarygodną demonstrację „usuwania z fazy ciekłej”, natomiast pełne wnioskowanie mechanistyczne wymagałoby uzupełnienia.

Najsilniejszy merytorycznie fragment pracy stanowią badania z udziałem *B. bassiana* DSM 1344, prowadzące do otrzymywania (R)-1-fenylloetano-1,2-diolu o bardzo wysokiej czystości optycznej (ee 99,9%), w tym z próbą przejścia do skali pół-preparatywnej. Uzyskanie produktu chiralnego o tak wysokim nadmiarze enancjomerycznym w kulturze całych komórek biokatalizatora jest wynikiem szczególnie wartościowym, ponieważ stanowi realny argument na rzecz przydatności badanego szczepu jako biokatalizatora syntezy związków chiralnych. Istotne jest również to, że Autorka nie poprzestała na samej demonstracji wysokiego ee, lecz zbadała wpływ postaci biokatalizatora, wykazując, że immobilizacja może radykalnie zmienić wynik procesu: w agar-agarze obserwowano utratę enancjoselektywności (mieszanina racemiczna), natomiast immobilizacja w alginianie wapnia skutkowała brakiem aktywności katalitycznej. Tego typu obserwacje mają dużą wagę procesową, gdyż pokazują, że immobilizacja nie jest neutralnym „zabiegiem technicznym” – może zmieniać dostęp tlenu, dyfuzję substratu i produktu, mikrośrodowisko komórek oraz poziom stresu, a tym samym profil aktywności enzymatycznej i selektywność.

Podsumowując, część dotycząca szczepów z rodzaju *Beauveria* oceniam jako najmocniejszą w całej rozprawie: łączy komponent aplikacyjny (bioremediacja z elementami intensyfikacji procesu poprzez immobilizację i układ przepływowy) z wynikiem o wysokiej wartości poznawczej i praktycznej (enantioselektywna synteza (R)-diolu i wykazanie krytycznego wpływu immobilizacji na stereoselektywność). Ograniczeniem pozostaje brak pełnej charakterystyki szlaku metabolicznego w wariantach degradacyjnych, jednak nie wpływa to na zasadniczo pozytywną ocenę jakości tej części badań.

### III. *Galdieria sulphuraria* i odzysk REE

Ostatnia część rozprawy dotyczy zastosowania biomasy mikroalg *Galdieria sulphuraria* ACUF 002 w zintegrowanym układzie kaskadowym obejmującym: biotransformację 2-fenylloetanolu oraz następujący po niej odzysk pierwiastków ziem rzadkich (La, Ce, Nd i Gd)

z wykorzystaniem tej samej biomasy. Koncepcję tę należy ocenić jako ambitną i nowoczesną, ponieważ łączy klasyczne podejście biokatalityczne z zagadnieniami odzysku surowców krytycznych i wpisuje się w paradygmat gospodarki o obiegu zamkniętym. Jednocześnie dobór *G. sulphuraria* jako organizmu modelowego jest uzasadniony jej znanym potencjałem do wiązania/akumulacji metali w kwaśnym środowisku oraz wysokiej odporności fizjologicznej, co sprzyja rozważaniom aplikacyjnym.

Autorka wykazała aktywność biokatalityczną mikroalgi wobec 2-feniloetanolu, dobierając stężenia substratu (0,12 i 0,6 mg/mL) na podstawie obserwowanej toksyczności. Należy jednak podkreślić, że ilość produktu biotransformacji była niewystarczająca do jego izolacji i jednoznacznej identyfikacji strukturalnej metodami spektroskopowymi (np. NMR). Z perspektywy wartości poznawczej stanowi to istotne ograniczenie tej części pracy, ponieważ bez identyfikacji produktu nie można jednoznacznie określić dominującego toru przemian 2-feniloetanolu w komórkach *G. sulphuraria* ani odnieść go wiarygodnie do literatury. Jednocześnie należy docenić, że Autorka nie ukrywa tej luki, wskazując ograniczenia ilościowe materiału i traktując etap biotransformacji jako wstęp do dalszych badań.

Najbardziej przekonujący wynik tej części stanowi wykazanie, że biomasa po wcześniejszym kontakcie z 2-feniloetanołem charakteryzuje się wyższą efektywnością odzysku REE niż biomasa kontrolna (bez kontaktu z substratem). Jest to obserwacja istotna procesowo, ponieważ sugeruje możliwość „kondycjonowania” biomasy w sposób zwiększający jej zdolność wiązania metali i stanowi realny argument na rzecz sensowności zaproponowanej kaskady. Wartość tej obserwacji rośnie również dlatego, że porównanie wykonano w układzie obejmującym kilka pierwiastków (La, Ce, Nd, Gd), co lepiej odpowiada realnym mieszaninom niż testy jednoskładnikowe.

Interpretację mechanizmu odzysku REE oceniam jako dojrzałą. Autorka słusznie unika uproszczenia wnioskowania wyłącznie do biosorpcji na zewnątrzkomórkowych polisacharydach (EPS), wskazując, że sam poziom EPS nie wyjaśnia w pełni obserwowanych różnic i postulując współdziałanie bioakumulacji. Takie postawienie problemu jest zgodne z aktualnym stanem wiedzy, w którym podkreśla się, że udział biosorpcji, kompleksowania oraz transportu do wnętrza komórki może być zależny od warunków procesu i stanu fizjologicznego biomasy. Jednocześnie należy zaznaczyć, że na obecnym etapie rozprawy rozdzielenie biosorpcji i bioakumulacji pozostaje hipotezą, która wymagałaby doświadczeń rozstrzygających (np. porównanie żywej i inaktywowanej biomasy, testy desorpcji, frakcjonowanie biomasy/oznaczenia frakcji EPS i wewnątrzkomórkowej, bilans w fazie ciekłej i stałej).

Włączenie do dyskusji wątku transportera NREET1 należy uznać za interesujące i aktualne na tle badań światowych, jednak na tym etapie powinno być traktowane jako inspiracja mechanistyczna, a nie przesądzający dowód. Po domknięciu tej części o jednoznacznej identyfikacji produktu biotransformacji oraz o doświadczeniach mechanistycznych rozdzielających biosorpcję i bioakumulację, przedstawiony kierunek badań ma potencjał, aby stanowić podstawę

wartościowej publikacji międzynarodowej z pogranicza bioprocessów, biotechnologii środowiskowej i odzysku surowców krytycznych.

### **Oryginalność, znaczenie naukowe i potencjał aplikacyjny**

Rozprawa wnosi istotny wkład poznawczy i procesowy w obszarze biokatalizy całokomórkowej. Autorka przedstawia zróżnicowany profil przemian 2-fenylotanolu przez wybrane mikroorganizmy, co pozwala na racjonalne przypisanie szczepu do konkretnego celu procesu: selektywnej syntezy metabolitu, stereoselektywnego wytwarzania produktu chiralnego lub szybkiego usuwania substratu z fazy ciekłej. Warto podkreślić, że zaprezentowane różnice nie ograniczają się do prostego „screeningu”, lecz zostały uzupełnione o elementy parametryzacji procesu (wpływ stężenia substratu, czasu, postaci biomasy oraz skali). Za najbardziej wartościowy wynik należy uznać wykazanie możliwości otrzymywania chiralnego 1-fenylotano-1,2-diolu o bardzo wysokiej czystości optycznej, w szczególności (*R*)-diolu o ee 99,9% w układzie z *B. bassiana* DSM 1344, wraz z próbą przełożenia procesu do skali pół-preparatywnej. Istotnym elementem oryginalnym jest także udokumentowanie wpływu immobilizacji na wynik stereochemiczny (utrata enancjoselektywności w określonych wariantach), co ma bezpośrednie znaczenie

dla projektowania procesu i doboru nośnika. Autorka proponuje i wstępnie weryfikuje proces kaskadowy wykorzystujący biomasę poprocesową do odzysku REE. Należy zaznaczyć, że część ta ma charakter eksploracyjny i wymaga dalszego domknięcia mechanistycznego (biosorpcja vs bioakumulacja), jednak już na obecnym etapie stanowi obiecującą podstawę do rozwoju technologii odzysku surowców krytycznych.

Na wysoką aktywność naukową Autorki wskazuje również dorobek powiązany z tematyką rozprawy (publikacje oraz zgłoszenia patentowe), potwierdzający dojrzałość naukową oraz umiejętność przekładania wyników na formy upowszechnienia i ochrony własności intelektualnej.

### **Uwagi krytyczne i zalecenia**

#### **I. Uwagi merytoryczne**

- **Rozróżnienie biotransformacji i biodegradacji oraz szlaki metaboliczne substratu.**

W pracy konsekwentnie rozdzielono procesy ukierunkowane na akumulację określonych produktów (biotransformacja) od procesów, w których obserwowano szybki zanik 2-fenylotanolu (biodegradacja). Należy jednak podkreślić, że z punktu widzenia biochemicznego oba zjawiska stanowią elementy jednego ciągu przemian metabolicznych, a sam zanik substratu w fazie ciekłej nie jest równoznaczny z mineralizacją do CO<sub>2</sub>. W wariantach, w których wnioski o „biodegradacji” oparte są głównie na stopniu przereagowania, bez identyfikacji produktów pośrednich oraz bez bilansu węgla, nie można wykluczyć: powstawania metabolitów niewykrytych w wyniku zastosowanych metod analitycznych, akumulacji/sorpcji substratu lub produktów w biomacie, ani szybkiego przejścia do produktów utlenienia (np. aldehyd/kwas).

Dla wzmocnienia wniosków mechanistycznych wskazane byłoby uzupełnienie tej części o doświadczenia rozstrzygające (np. HPLC-MS ekstraktów z biomasy).

W wariantach interpretowanych jako biodegradacja wnioskowanie oparto głównie na spadku stężenia 2-feniloetanolu w fazie ciekłej. Należy jednak zaznaczyć, że przy zastosowanej procedurze przygotowania próbek (odsączenie biomasy przed ekstrakcją i analizą) nie można wykluczyć, iż część substratu została usunięta z medium na skutek sorpcji lub akumulacji na/w biomacie (np. na strzępkach grzybni lub nośnikach immobilizacji), a nie w wyniku mineralizacji. Dla jednoznacznego rozróżnienia tych mechanizmów wskazane byłoby uzupełnienie badań o analizę ekstraktów biomasy oraz kontrole z biomasą inaktywowaną.

- **Zakres analityki a możliwość wykrycia metabolitów polarnych/sprzężonych.**

Zastosowana metodyka ekstrakcji i analizy (ukierunkowana na określone aglikony identyfikowane na podstawie wzorców) jest adekwatna do potwierdzenia powstawania tyrozolu i 1-feniloetano-1,2-diolu, natomiast nie pozwala wykluczyć obecności metabolitów bardziej polarnych, w tym potencjalnych produktów sprzężania (np. glikozydów lub innych koniugatów), które mogłyby pozostawać w fazie wodnej lub w biomacie. W konsekwencji interpretacja „braku produktów pośrednich” w części układów powinna być formułowana ostrożnie (brak wykrycia w zastosowanej metodyce nie oznacza braku powstawania). W perspektywie dalszych badań wskazane byłoby włączenie analityki kompatybilnej z metabolitami polarnymi (np. RP-LC/LC-MS, analiza fazy wodnej i ekstraktów biomasy).

- **Niskie stężenia produktów a wnioski aplikacyjne.**

W części układów uzyskiwane stężenia produktów (rzędu  $\mu\text{g/mL}$ ) są wystarczające do wykazania zjawiska i selektywności (w tym do oceny ee), jednak ograniczają bezpośrednie wnioskowanie o gotowości procesu do zastosowań produkcyjnych. W pracy zasadnie pokazano przejście do skali pół-preparatywnej, jednak w kontekście potencjału aplikacyjnego warto byłoby mocniej podkreślić, że dalszy rozwój wymaga zwiększenia efektywności procesu (np. strategia podawania substratu, poprawa transferu tlenu, stosując techniki usuwania produktu w trakcie procesu, kontrola toksyczności substratu/produktu).

- **Skalowanie i stabilność stereoselektywności.**

Za cenną obserwację należy uznać wpływ stosowanej skali procesu na czystość optyczną produktu w układach *Cunninghamella* (spadek ee przy skalowaniu) oraz wpływ immobilizacji na stereoselektywność w układzie *B. bassiana* (utrata enancjoselektywności w określonych wariantach immobilizacji). Są to wyniki istotne procesowo, jednak wnioski dotyczące przyczyn (transfer tlenu, dyfuzja, mikrośrodowisko komórek, stres) pozostają w dużej mierze jakościowe. W pracy doktorskiej nie jest to wadą, jednak warto byłoby zaproponować (lub w przyszłości wykonać) proste doświadczenia diagnostyczne, np. porównanie profilu produktu przy różnych

prędkościach mieszania/natlenienia lub kontrola wpływu nośnika immobilizacji na dostęp substratu.

- **Część dotycząca *Galdieria sulphuraria* – identyfikacja produktu i mechanizm odzysku REE.**

Koncepcja procesu kaskadowego biotransformacji badanego związku jako preludeum odzysku REE jest bardzo intrygująca i stanowi element nowatorski rozprawy, jednak jej część poznawcza jest ograniczona przez brak identyfikacji produktu biotransformacji (zbyt mała ilość materiału) oraz przez niekompletne opracowanie mechanizmu odzysku (biosorpcja vs bioakumulacja). Autorka trafnie i uczciwie wskazuje, że EPS nie wyjaśnia w pełni obserwowanych różnic, ale rozdzielenie mechanizmów wymagałoby doświadczeń rozstrzygających (żywa vs inaktywowana biomasa, desorpcja, frakcjonowanie EPS/wewnątrzkomórkowe, bilans w cieczy i biomacie). Włączenie wątku transportera NREET1 należy ocenić jako aktualny trop mechanistyczny, jednak na tym etapie powinien być traktowany jako hipoteza wymagająca weryfikacji.

- **We wstępie** przedstawiono liczne związki oraz schematy przemian, jednak nie wszystkie opisywane reakcje i produkty są zilustrowane na rysunkach. W efekcie czytelnik w kilku miejscach musi „rekonstruować” przebieg procesów wyłącznie na podstawie opisu tekstowego, co utrudnia śledzenie narracji i interpretację przedstawianych mechanizmów.

Podczas omawiania przykładów biotechnologicznego otrzymywania związków, pojawiają się sformułowania, że tyrozol (s. 26) oraz octan benzylu (s. 27) mogą być otrzymywane „z glukozy”. Choć Autorka przywołuje tu prace dotyczące szczepów rekombinowanych, zapis ten może być odebrany jako uproszczenie; korzystniejsze redakcyjnie byłoby jednoznaczne doprecyzowanie, że chodzi o produkcję w ramach inżynierii metabolicznej/fermentacji z glukozą jako źródłem węgla, a nie o bezpośrednią biotransformację glukozy do tych produktów.

## II. Uwagi redakcyjne

Rozprawa jest opracowana starannie i czytelnie, jednak w tekście występują pojedyncze usterki redakcyjne oraz niespójności typograficzne.

- W Tabeli 11 (s. 75) występuje niejednoznaczny zapis składnika „KON” (5,4 mL), który wymaga doprecyzowania (najprawdopodobniej chodzi o KOH o określonej normalności/stężeniu). Ponadto zapis „FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,5 mL” sugeruje niespójność jednostek (sól stała vs objętość roztworu) i wymaga jednoznacznego wskazania, czy stosowano odważkę czy roztwór wzorcowy.

- s. 160 i Wykaz rycin – opis Rycina 37 – literówka w nazwie substratu: „...pik od 2-fenyoetanlu”

- s. 164 i Wykaz tabel – Tabela 39 i Tabela 40 – literówka w nazwie substratu: „...przy początkowym stężeniu 2-fenyoetanolu...”

- s. 192 i Wykaz wykresów – Wykres 12 – zapis objętości jako „50 ml” (małe „l”), podczas gdy w pracy w innych miejscach pojawia się zapis „mL” (i generalnie zaleca się konsekwencję: L jako wielka litera).

- W schematach reakcji pojawia się m.in. strzałka z niewypełnionym (konturowym) grotem, której znaczenie nie jest zdefiniowane. Ponieważ różne typy strzałek mają w chemii odmienne znaczenie (reakcja, równowaga, rezonans, retrosynteza), korzystne byłoby ujednoczenie zapisu do standardowej konwencji albo wprowadzenie krótkiej legendy.

Wskazane uchybienia mają charakter porządkowo-edytorski i nie wpływają na ocenę merytoryczną pracy ani na poprawność sformułowanych wniosków.

### **Pytania do Autorki (do dyskusji w trakcie obrony)**

- **Biodegradacja vs sorpcja/akumulacja na biomasie**

W układach, w których obserwowano szybki zanik 2-fenylloetanolu, próbki były przygotowywane po odsączeniu biomasy. Jak Autorka uzasadnia wnioski o biodegradacji, a nie o sorpcji/akumulacji substratu na (lub w) biomasie? Jakie jedno–dwa doświadczenia kontrolne uznałaby Autorka za rozstrzygające?

- **„Brak produktów pośrednich” a zakres analityki**

W kilku wariantach spadku stężenia substratu w prowadzonych doświadczeniach nie wykryto produktów pośrednich w zastosowanej metodyce. Jakie klasy metabolitów (zwłaszcza bardziej polarne, sprzężone) mogłyby pozostać niewykryte przy przyjętej procedurze ekstrakcji i analiz? Jak Autorka zaprojektowałaby analizę ukierunkowaną na metabolity polarne?

- **Skalowanie i spadek ee u *Cunninghamella elegans***

Co Autorka uważa za najbardziej prawdopodobną przyczynę spadku ee dla (S)-1-fenylloetano-1,2-diolu po przejściu do skali pół-preparatywnej (transfer tlenu, mieszanie, gradienty stężeń, czas kontaktu, toksyczność)? Jakie modyfikacje procesu wdrożyłaby w pierwszej kolejności, aby stabilizować ee?

- **Immobilizacja a enancjoselektywność u *Beauveria bassiana***

Jak Autorka wyjaśnia utratę enancjoselektywności po immobilizacji w agar-agarze (produkt racemiczny) oraz brak aktywności po immobilizacji w alginianie wapnia? Który mechanizm jest jej zdaniem kluczowy: ograniczenia dyfuzyjne, mikrośrodowisko (pH/woda), natlenienie, czy stres komórkowy?

- **Niskie stężenia produktów (µg/mL) – perspektywa zwiększenia efektywności procesu**

Które z narzędzi intensyfikacji procesu Autorka uznałaby za najbardziej obiecujące w celu podniesienia stężeń produktów: strategia porcjowanego podawania substratu, ekstrakcja



*in situ*/układ dwufazowy, zmiana warunków natlenienia, zwiększenie gęstości biomasy, czy inne podejście? Jak Autorka ustaliłaby priorytety?

• ***Galdieria sulphuraria*: identyfikacja produktu biotransformacji przy niskiej zawartości procentowej produktu**

Jaką strategię analityczną (minimalna ilość próbki) Autorka zastosowałaby, aby zidentyfikować produkt biotransformacji 2-fenyletanolu u *G. sulphuraria*?

• ***Galdieria sulphuraria*: mechanizm odzysku REE (biosorpcja vs bioakumulacja)**

Jakie dwa–trzy doświadczenia Autorka uznałaby za najbardziej rozstrzygające dla rozstrzygające biosorpcji (EPS/ściana komórkowa) od bioakumulacji (transport do wnętrza komórki) w odzysku cennych metali?

• **Hipoteza „kondycjonowania” biomasy przez 2-fenyletanol**

Wyniki sugerują, że kontakt biomasy z 2-fenyletanołem zwiększa efektywność odzysku REE. Czy Autorka dopuszcza mechanizm indukcji odpowiedzi stresowej/enzymów hydroksylujących i zmian w profilu EPS/metabolitów zwiększających liczbę ligandów wiążących metale? Jak Autorka zaplanowałaby prostą weryfikację tej hipotezy?

**Konkluzja i wniosek recenzencki**

Przedłożona rozprawa stanowi spójne opracowanie wyników badań własnych Autorki, potwierdza jej bardzo dobrą znajomość problematyki biokatalizy i biotechnologii procesowej oraz wykazuje umiejętność samodzielnego planowania i realizacji badań. Praca zawiera elementy oryginalne (w tym proces kaskadowy z odzyskiem REE) oraz wyniki o istotnym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym (stereoselektywna synteza (*R*)-1-fenyletano-1,2-diolu o ee 99,9% i studium wpływu immobilizacji na selektywność).

Podsumowując, pragnę podkreślić, że cele badawcze postawione w rozprawie zostały w przeważającej mierze osiągnięte, a jakość opracowania – pomimo wskazanych w recenzji uwag krytycznych – oceniam pozytywnie. Na podstawie przeprowadzonej oceny stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Raczyńskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora oraz do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

.....Tomasz Janeczko.....

Wrocław, 16.01.2026