

Bydgoszcz 24.08.2014 r.

dr hab. inż. Grzegorz Kłosowski, prof. nadzw.
Zakład Biotechnologii
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

**RECENZJA rozprawy doktorskiej mgr Marty Pietruszki
pt. : "Jakość destylatów rolniczych z krajowych odmian żyta",
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa St. Szopy
oraz promotora pomocniczego dr inż. Katarzyny Pielech-Przybylskiej**

Przedstawioną mi do zrecenzowania rozprawę doktorską mgr Marty Pietruszki pt. „Jakość destylatów rolniczych z krajowych odmian żyta” oceniam bardzo pozytywnie. Za trafny i aktualny uważam wybór tematyki rozprawy. Pomimo, że fermentacja alkoholowa jest jednym z procesów biotechnologicznych o najdłuższej historii jej różnorodne wykorzystanie w produkcji napojów alkoholowych oraz etanolu na cele techniczne stwarza nadal wiele problemów, pomimo dobrej znajomości podstaw biochemicznych procesu. Wiele kwestii związanych z aspektami mikrobiologicznymi i biochemicznymi wymaga nadal wyjaśnienia w ramach badań podstawowych lub aplikacyjnych, z uwagi na wykorzystywanie zmieniających się surowców i biokatalizatorów jak również mikroorganizmów, których metabolizm podlega wielu złożonym mechanizmom regulacyjnym, z których nie wszystkie są w pełni poznane.

O ile główny szlak biochemiczny procesu fermentacji alkoholowej prowadzonej z wykorzystaniem drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* jest dobrze poznany, to nadal istnieje potrzeba prowadzenia badań nad wieloma czynnikami wywierającymi wpływ na aktywność metaboliczną drożdży powiązaną z głównym szlakiem fermentacji alkoholowej. Badania takie, w których nurt wpisuje się recenzowana rozprawa, pozwalają na stopniowe uzupełnienie obecnego stanu wiedzy na temat wpływu składu podłoża fermentacyjnego, użytych biokatalizatorów lub dodatków o charakterze aktywatorów procesu czy też inhibitorów na przebieg fermentacji. Jako szczególnie istotne postrzegam badania służące wyjaśnieniu przyczyn i mechanizmów powstawania produktów ubocznych fermentacji, będących efektem aktywności metabolicznej użytych drożdży lub obcej mikroflory jak

również powstających w trakcie realizacji poszczególnych operacji i procesów jednostkowych składających się na proces technologiczny produkcji. Również tej, ciągle aktualnej tematyce badawczej poświęcona jest przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska

Struktura rozprawy i uwagi ogólne

Tekst rozprawy liczy łącznie 244 strony i został przygotowany bardzo starannie pod względem edytorskim. Całość opatrzone precyzyjnym spisem treści obejmującym rozdziały i podrozdziały, których układ określiłbym, jako klasyczny dla prac eksperymentalnych tj. obejmujący: Streszczenie, Wstęp, Część teoretyczna, Cel i zakres badań, Metody badań i surowce, Wyniki badań ich omówienie i dyskusja, Wnioski i Literatura (w języku polskim tym terminem określa raczej tzw. literaturę piękną, dlatego bardziej adekwatne byłoby jak sądzę określenie Piśmiennictwo,) oraz Aneks zawierający bardzo liczne tabele i wykresy zamieszczone na ponad 100 stronach (strony od 137 do 244) przedstawiające wyniki badań.

Cytowane piśmiennictwo, w znacznej części anglojęzyczne, jest obszerne i wyczerpujące, dobrane poprawnie zarówno pod kątem części teoretycznej jak również metodycznej i dyskusji, zawiera również najnowsze pozycje z ostatnich pięciu lat.

Praca napisana jest poprawnie pod względem językowym. Treść przekazana jest generalnie w sposób zwięzły i zrozumiały. Autorka w kilku miejscach nie uniknęła całkowicie drobnych usterek edytorskich, językowych, niezręcznych sformułowań i przejęzyczeń. Jednym z przykładów jest zdanie znajdujące się na stronie 22 o następującej treści : „Ich wzrost oraz rozwój (z kontekstu wynika, że dotyczy to drożdży) zachodzi korzystniej w **mieszaniu aminokwasów**, niż w obecności azotu amonowego”. Wyjaśnienia wymaga, co doktorantka rozumie przez wzrost i rozwój drożdży w mieszaniu aminokwasów. Zapewne stwierdzenie dotyczy określonego zakresu dostępności azotu amonowego (tzw. FAN) w podłożu fermentacyjnym zawierającym mieszaninę różnych wolnych aminokwasów. W pracy zauważyłem niewielką liczbę błędów literowych, których jednakże trudno całkowicie uniknąć w tego typu opracowaniach, a z uwagi na brak ich wpływu na wartość merytoryczną nie widzę potrzeby ich wyliczania. Stosowna korekta powinna być jednak dokonana na etapie przygotowania publikacji.

W rozprawie można napotkać również pewne usterki natury semantycznej. Doktorantka w wielu miejscach w treści całej rozprawy używa określenia „zawartość” (np. tabele XLI-LXXX na stronach 159-198) prezentując wyniki dotyczące głównie występowania lotnych związków w badanych zacierach i używa przy tym jednostki [mg/l zacieru] lub [mg/l sp. 100%] przy wynikach odnoszących się do badanych destylatów. Dla takiego sposobu wyrażenia ilości jednego związku chemicznego w jednostce objętości

lub jednostce masy roztworu właściwsze wydaje się użycie określenia „stężenie” a nie „zawartość”.

WSTĘP

Ten rozdział jest sformułowany poprawnie, zwięźle i nie budzi zastrzeżeń. Pewną uwagę mam do zdania na stronie 11 o następującej treści: „Zanieczyszczenia chemiczne obecne w spirytusach surowych są głównie produktami ubocznymi fermentacji etanolowej, ale mogą również pochodzić ze stosowanego surowca”. Użyte określenie wydaje mi się nieprecyzyjne i jest zapewne pewnym skrótem myślowym. Z biochemicznego punktu widzenia fermentacja alkoholowa to w istocie dwie reakcje podlegające katalizie enzymatycznej, z których pierwsza obejmuje nieoksydacyjną dekarboksylację wytworzonego w trakcie glikolizy pirogronianu do aldehydu octowego a druga redukcję powstałego aldehydu do etanolu. Jedynym zanieczyszczeniem spirytusu, który może powstać w wyniku tych reakcji jest wyłącznie aldehyd octowy. Pozostałe produkty zanieczyszczające spirytus nie są więc w istocie rzeczy produktami ubocznymi samej fermentacji etanolowej jak napisała doktorantka a raczej efektem aktywności metabolicznej drożdży i innych mikroorganizmów, zawsze obecnych w mniejszej lub większej ilości w fermentujących zacierach lub przemian chemicznych zachodzących w trakcie poszczególnych procesów jednostkowych podczas produkcji etanolu. Takie nieprecyzyjne sformułowania dotyczące pochodzenia lotnych produktów ubocznych można spotkać w wielu pracach i publikacjach i nie ustrzegła się go również autorka recenzowanej rozprawy. W odniesieniu do wyżej cytowanego zdania interesujące byłoby udzielenie przez doktorantkę informacji jakie produkty uboczne uważa za pochodzące z samego surowca – w dalszej treści części teoretycznej zwłaszcza w punktach 3.2.1. oraz 3.3.1. dotyczącej surowców gorzelnicznych nie odnalazłem informacji na ten temat.

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Ta część rozprawy obejmuje 31 stron. Interesujące jest uwzględnienie podrozdziału opisującego w skrócie historię i przemiany strukturalne i własnościowe, które dokonały się w polskim gorzelnictwie. Następnie scharakteryzowano, w kontekście rozprawy, główne skrobiowe surowce wykorzystywane w gorzelnictwie. W tymże rozdziale poświęconym charakterystyce surowców, co jest nieco zaskakujące, umiejscowiono podrozdział omawiających główne mechanizmy biochemiczne prowadzące do powstawania lotnych produktów ubocznych. Być może doktorantka zrealizowała pewną koncepcję układu logicznego rozprawy, która nie dla wszystkich jest jasna. Obszerny podrozdział poświęcono

szczegółowemu omówieniu czynników wpływających na powstawanie produktów ubocznych co jest uzasadnione w kontekście tematyki rozprawy. Część teoretyczną kończy przegląd wiedzy na temat wpływu zakażeń mikrobiologicznych na dynamikę fermentacji i jakość destylatów, również nawiązujący do tematyki badań.

Uwagi do części teoretycznej

Na stronie 18 nie w pełni precyzyjna jest informacja jakoby ziarno żyta zawierało ponad 60 % skrobi. Liczne źródła literaturowe wskazują że zawartość skrobi w ziarnie żyta waha się w szerokich granicach począwszy od 55 do nawet 65 %.

Jednym z materiałów źródłowych wykorzystanych przez doktorantkę jest pozycja figurująca pod nr 12 w spisie literatury zatytułowana: „Analiza towaroznawcza i skład chemiczny ziarna wybranych polskich odmian żyta, pochodzących z trzech kolejnych lat uprawy”- autorstwa: Krzysztofa Buksa, Anny Nowotnej, Haliny Gambuś, Jana Krawontka, Renaty Sabat, Mieczysława Nogi.

Sposób wykorzystania tej pozycji piśmienniczej jest nie do końca poprawny. W tabeli 4 „Skład chemiczny odmian żyta” na stronie 55 w ostatniej kolumnie podane są liczbowe wartości poszczególnych parametrów w oparciu o dane literaturowe odwołujące się do wskazanej pozycji nr 12 ze spisu literatury, a dotyczące składu chemicznego ziarna żyta tj.: wilgotności, białka, cukrów redukujących, skrobi i popiołu. Intencją autorki było zapewne porównanie wyników badań własnych z danymi opublikowanym przez innych naukowców, co należy uznać za jak najbardziej poprawne. Problem w tym, że w cytowanym artykule próżno szukać danych dotyczących zawartości cukrów redukujących w badanych próbkach różnych odmian żyta. Ponadto materiałem do badań opublikowanych w treści pozycji literaturowej nr 12 było ziarno jedynie 5 odmian populacyjnych żyta ozimego: Amilo, Dańkowskie Złote, Kier, Walet i Warko, co stanowi nadzwyczaj skromny materiał porównawczy, a ponadto opublikowane w artykule wartości liczbowe poszczególnych parametrów składu chemicznego nie pokrywają się z danymi umieszczonymi przez doktorantkę w ostatniej kolumnie tabeli.

Stosunkowo obszerne cytowanie z pozycji literaturowej nr 12 znaleźć można natomiast na stronie 18 wiersze 1-6. W oryginale fragment ten przedstawia się następująco: „W Polsce zajmuje ono drugi po pszenicy (27,3%) areał uprawy (16,3%) spośród wszystkich gatunków i form zbóż, w zasiewach ogółem (Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2010). W skali światowej czołowymi producentami żyta są: Rosja (25,4%), Niemcy 21,1%, Polska 19,4%, Białoruś i Ukraina odpowiednio 8,4 i 5,9%. Łączna produkcja tych 5 państw stanowi 2/3 światowej produkcji ziarna żyta (Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej

2010).” Pomimo zacytowania w swojej rozprawie przytoczonego fragmentu pochodzącego z w/w źródła, doktorantka nie zamieściła stosownego odnośnika literaturowego we właściwym miejscu pomimo, że pozycja ta figuruje wykazie literatury. Powyższe uwagi dotyczące wykorzystania pozycji literaturowej nr 12 oraz 17, do której odnoszę się w dalszej części recenzji omawiając metody badań, mogą wskazywać na pewien brak precyzji w wykorzystaniu i cytowaniu materiałów źródłowych. Nie jest to jednakże zarzut dużej wagi, gdyż nie zauważyłem podobnych nieścisłości w przypadku pozostałych 132 pozycji literaturowych wykorzystanych w rozprawie.

CEL I ZAKRES BADAŃ

Część teoretyczną kończą bardzo ogólnie sprecyzowany cel pracy, oraz zakres badań, stanowiące odrębny rozdział. Pewien niedosyt powoduje brak precyzyjnie określonych hipotez badawczych, co moim zdaniem prowadzi do tego, że sformułowane wnioski niewątpliwie istotne z naukowego i praktycznego punktu widzenia, nie do końca w sposób bezpośredni odpowiadają w jaki sposób osiągnięto główny cel zmierzający do optymalizacji parametrów technologicznych w celu ograniczenia zawartości produktów ubocznych fermentacji. Zostało to w moim osobistym odczuciu pozostawione w pewnym stopniu czytelnikowi do własnej interpretacji.

METODY BADAŃ I SUROWCE

Metody badawcze i analityczne jak również surowce użyte w trakcie realizacji badań zostały szczegółowo opisane i moim zdaniem są właściwie dobrane w kontekście możliwości poprawnej, pełnej realizacji założonego celu badań. Umożliwia to pełne wyobrażenie jak przebiegały prace eksperymentalne i jak zadbano o rzetelność uzyskanych wyników. Opis stosowanych metod jest jasny i dokładny, stwarzający możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń. Stosowane procedury zostały zaprezentowane w bardzo przejrzysty sposób. Wiarygodność uzyskanych wyników podnosi wykorzystanie nowoczesnych metod analizy instrumentalnej, zwłaszcza w zakresie kapilarnej chromatografii gazowej, użytej do analizy jakościowej i ilościowej lotnych produktów ubocznych obecnych w zacierach i uzyskanych destylatach a powstających podczas procesu fermentacji alkoholowej.

Doktorantce nie udało się jednakże uniknąć w tej części pracy pewnych nieścisłości, na które zwracam uwagę poniżej:

- Strona 45 –cytowana pozycja literaturowa oznaczona numerem 17- nie wspomina się w cytowanej pracy o pożądanej zdolności drożdży do syntezy

- enzymów amylolitycznych. Nastąpiła zapewne nieumyślna zamiana cytowanych pozycji literaturowych być może z pozycją nr 66.
- Strona 46- charakterystyka preparatu enzymatycznego o nazwie handlowej Shearzyme 500L jest nie w pełni precyzyjna, gdyż sugeruje, że preparat wykazuje wyłącznie aktywność hydrolityczną w stosunku do pentozanów, uwalniając wyłącznie cukry liczące pięć atomów węgla w cząsteczce, nie przyswajalne w praktyce dla drożdży *S. cerevisiae*. Tymczasem zgodnie z informacją producenta preparatu jest to oczyszczony preparat ksylanazy (pentozanazy) wytwarzanej przez genetycznie modyfikowany szczep *Aspergillus oryzae*. Preparat rozkłada rozpuszczalne pentozany **oraz inne PNS**, charakteryzujące się wysoką lepkością w roztworach wodnych.
 - Strona 47 punkt 5.2.1.1. Przygotowanie zacierów słodkich metodą ciśnieniowo-termiczną - Istotne byłoby udzielenie informacji czy tę procedurę realizowano w skali laboratoryjnej czy technologicznej? Z lektury treści zawartej w punkcie 5.2.1.2. można domniemywać, że ten etap procesu realizowano w skali laboratoryjnej.
 - Strona 48 Rys. 5 - dwukrotnie powtarza się na schemacie informacja o dozowaniu enzymatycznego preparatu scukrzającego. Pierwsza dawka powinna zapewne dotyczyć dozowania preparatu zawierającego α -amylazę tzw. upłynniającego a nie scukrzającego. Jest to etap niezbędny do prawidłowego przeprowadzenia procesu scukrzania zdekstrynizowanej skrobi z użyciem glukoamylazy. Kolejne pytanie dotyczy temperatury zacieru prezentowanej na schemacie. Po zakończeniu procesu zacierania realizowano operację chłodzenia zacieru do temp. 30-35°C, po czym po inokulacji drożdżami i dodatku pożywek mineralnych rozpoczynano proces fermentacji w temp. 28-30°C. Dostrzegam tu pewną rozbieżność parametrów temperaturowych wymagającą komentarza. Jednocześnie wymaga wyjaśnienia, dlaczego stosując w badaniach drożdże termofilne zdecydowano się na stosunkowo niską temperaturę fermentacji?
 - Strona 49 punkt 5.2.2. Dlaczego zastosowana dawka drożdży As-4 i D-2 oraz I-7-43 była wyższa od zalecanej w instrukcji oraz publikacjach IBPRS wynoszącej 0,1g/L ? Dlaczego zdecydowano się na różnicowanie dawek drożdży produkcji krajowej (As-4, D-2, I-7-43) w stosunku do preparatu

Fermiol i EthanolRed? Czy taka procedura nie powodowała różnej liczebności komórek drożdży na etapie zafermentowania i czy nie mogło to powodować różnic w szybkości przebiegu procesu fermentacji, szczególnie w początkowym etapie? Pytanie jest zasadne szczególnie w odniesieniu do wniosku nr 1, w którym doktorantka stwierdza między innymi, że „dynamika fermentacji zacierów żytnich jest uwarunkowana zastosowanym preparatem suszonych drożdży gorzelnicznych. W tym kontekście przedstawienie dodatkowego wyjaśnienia wydaje się zasadne.

- Strona 51 punkt 5.2.5. Destylacja zacierów - uzyskane stężenie etanolu w destylatach w wyniku destylacji prostej (z kolei w punkcie 6.2.2. podano informację, że zatężano na birektyfikatorze-to jest pewna niespójność), nie upoważnia do nazywania go destylatem rolniczym a tym bardziej spirytusem (str. 121, pkt. 6.4.2.) gdyż zgodnie z wymaganiami określonymi w Polskiej Normie PN-A-79523:2002 destylat rolniczy (melasowy, zbożowy, ziemniaczany) powinien charakteryzować się stężeniem etanolu (mocą) nie mniejszym niż 88% v/v. Ta rozbieżność może stanowić pewien problem z bezpośrednim transferem wyników badań do skali technologicznej, gdyż sposób odpędu i moc destylatu mają istotny wpływ na skład lotnych produktów ubocznych. Oczywiście zastosowanie jednakowej, powtarzalnej procedury destylacji w zrealizowanych badaniach zapewnia możliwość porównania wyników uzyskanych w różnych wariantach i nie podważa wniosków sformułowanych w oparciu o te dane.
- Strona 54- pkt. 5.3.3.1. – uwaga dotyczy nazewnictwa chemicznego. Fazą stacjonarną w kolumnach HP-Innowax firmy Agilent jest glikol polietylenowy a nie „polietylen glikolu” jak podaje doktorantka.
- Pytanie dotyczące podrozdziału 5.3.3.2. Dlaczego nie analizowano w badaniach stężenia acetalowych form aldehydów np. acetalu dietylowego aldehydu octowego oraz aldehydu akrylowego (2-propenalu)? To związki wywierające istotny, negatywny wpływ na wyniki oceny organoleptycznej. Jest to parametr coraz częściej badany i podlegający ocenie przez odbiorców destylatu rolniczego

WYNIKI BADAŃ, ICH OMÓWIENIE I DYSKUSJA

Wyniki pracy przedstawiono w sposób przejrzysty, jednoznaczny i zrozumiały. Zilustrowano je czytelnymi wykresami, a kluczowe informacje zestawiono w bardzo dobrze skonstruowanych tabelach. Prezentacja wyników według zasady „od ogółu do szczegółu” ułatwia przedstawienie czytelnikowi najważniejszych efektów w pracy, mimo niezwykle obszernego zakresu danych eksperymentalnych będących podstawą tego opracowania. To bardzo ważna umiejętność zasługująca na podkreślenie, która na pewno ułatwi wyselekcjonowanie najważniejszych wyników do publikacji naukowych, które będą zapewne efektem tej dysertacji.

Prezentując wyniki badań doktorantka dokonała oceny przydatności użytych do sporządzania zacierów odmian żyta dla procesu fermentacji alkoholowej, jak również porównała ich zastosowanie z uwzględnieniem różnych technologii i szczepów drożdży. Na podkreślenie zasługuje wzbogacenie klasycznych pomiarów parametrów technologicznych fermentujących zacierów o analizę chromatograficzną z wykorzystaniem techniki GC-headspace w celu monitoringu stężeń lotnych produktów ubocznych. Interesujące są również wyniki dotyczące zastosowanych pożywek mineralnych oraz obecności kultur bakterii mlekowych na przebieg fermentacji oraz skład jakościowy i ilościowy lotnych produktów ubocznych w zacierach i destylatach. Wyniki tych badań stanowią niewątpliwie oryginalny wkład doktorantki w rozwój wiedzy dotyczący wpływu różnych czynników na kształtowanie się składu lotnych produktów ubocznych powstających w trakcie procesu fermentacji alkoholowej.

Przedstawiona przez autorkę pracy dyskusja jest elementem rozprawy, który zwraca na uwagę w pozytywnym aspekcie. Nie tylko sposób omawiania poszczególnych elementów będących przedmiotem analizy w pracy ale układ i kolejność omawianych zagadnień zasługują na uznanie. Niemalże jak doświadczony naukowiec z długoletnim doświadczeniem, doktorantka sprawnie omawia i analizuje uzyskane wyniki biorąc pod uwagę różne analizowane zmienne. Świadczy to również o umiejętności sprawnego prowadzenia dyskusji na temat niezwykle złożony, jakim są niewątpliwie mechanizmy biochemiczne i czynniki wpływające na powstawanie lotnych produktów ubocznych podczas procesu fermentacji alkoholowej. Sprawnie zrealizowana dyskusja wykazuje równocześnie na dobrą znajomość literatury w obszarze tematyki rozprawy, co w połączeniu z dobrym poziomem językowym tego trudnego rozdziału stanowi, że cała praca zasługuje na wyróżnienie.

WNIOSKI

Sposób zredagowania wniosków powinien być zgodny z celem pracy, udzielać odpowiedzi na sformułowane w pracy pytania badawcze ewentualnie stanowić potwierdzenie lub zaprzeczenie postawionych hipotez. Sposób sformułowania wniosków jest generalnie poprawny a ich strona merytoryczna znajduje uzasadnienie w analizie prezentowanych wyników badań. Drobne uwagi krytyczne do tej części pracy sformułowałem powyżej omawiając rozdział CEL I ZAKRES BADAŃ na stronie 4 niniejszej recenzji. Sugeruję aby w przypadku publikacji wyników badań podkreślić w sposób bardziej jednoznaczny w jaki sposób wnioski wynikające ze zrealizowanych badań mogą być wykorzystane w celu optymalizacji procesu fermentacji alkoholowej ukierunkowanej na redukcję stężeń produktów ubocznych.

Podsumowanie

Praca została napisana w sposób zwięzły i zrozumiały oraz sprawnie zredagowana pod względem merytorycznym jak również językowym i edytorskim.

Podsumowując stwierdzam, że dysertacja jest wartościowym opracowaniem nie tylko biorąc pod uwagę bardzo ciekawe wyniki, które stanowią rozszerzenie aktualnej wiedzy na temat czynników wpływających na skład lotnych produktów ubocznych powstających podczas procesu fermentacji alkoholowej ale również biorąc pod uwagę potencjalną aplikacyjność uzyskanych rezultatów. Doktorantka sprawnie sformułowała temat i cel pracy, poprawnie zaplanowała i przeprowadziła prace eksperymentalne służące jego realizacji, umiejętnie wykorzystwała narzędzia badawcze, analityczne i statystyczne, co podnosi znacząco wiarygodność ustaleń naukowych prezentowanych w rozprawie. Reasumując, większość aspektów przedłożonej mi do recenzji dysertacji oceniam bardzo pozytywnie i mimo kilku krytycznych uwag przedstawionych powyżej stwierdzam, że stanowi ona opracowanie spełniające wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z obowiązującym prawem. Na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Marty Pietruszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, zwracając się jednocześnie do Wysokiej Rady Wydziału z wnioskiem o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Marty Pietruszki.

