

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr. inż. Eweliny Sapińskiej** pt: „Enzymy wspomagające proces zacierania surowców skrobiowych” przedstawionej Radzie Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechniki Łódzkiej.

Gorzelnictwo rolnicze w Polsce po latach intensywnego rozwoju, przechodzi obecnie trudny okres spowodowany niedoinwestowaniem i niskimi cenami importowanego alkoholu przemysłowego. W okresie transformacji było 900 gorzelnii rolniczych, pod koniec 2013 r. zostało 104, a faktycznie działa około 50 i kolejne są zamykane. Po unijnych decyzjach o dodawaniu biokomponentów do paliw płynnych można było spodziewać się rozwoju tej branży. Jednak niską cenę alkoholu dyktują koncerny paliwowe, dbające jedynie o własny zysk. Sprowadzany bioetanol jest tani, a państwo dopłaca miliard złotych rocznie z tytułu zwolnienia go od podatku akcyzowego w wysokości 1,56 zł za litr. Z wyliczeń Polskiego Przemysłu Spirytusowego wynika, że Polacy piją 18 mln litrów (w przeliczeniu na 100%) alkoholu z nielegalnych źródeł, co stanowi 15% rynku i powoduje straty budżetu na około 1,2 mld zł rocznie.

Aktualna sytuacja gospodarcza i ekonomiczna powoduje wzrost zainteresowania bardziej wydajnymi oraz ekologicznymi metodami wytwarzania spirytusu surowego. Szczególnie energooszczędne procesy upłynniania i scukrzana skrobi z przetwarzanych surowców zbożowych, wydają się być obiecującym kierunkiem badań i wdrożeń przemysłowych. Metoda beciśnieniowego uwalniania skrobi z zastosowaniem „zimnego zacierania” przy użyciu nowoczesnych urządzeń do rozdrabniania ziarna (entoleter), może okazać się ekonomicznie uzasadnioną alternatywą w stosunku do energochłonnej metody ciśnieniowo-termicznej. Stosowanie metody beciśnieniowej jest możliwe poprzez wykorzystanie kompleksu termoopornych enzymów, działających w zakresie temperatur 80-90° C. Pozwala to uzyskać wzrost wydajności alkoholu do ok.1 litra ze 100 kg ziarna, skrócenie czasu fermentacji oraz zaciery o jaśniejszej barwie, w porównaniu do metody ciśnieniowo-termicznej. Technologia ta przynosi również znaczne oszczędności w zużyciu energii do około 30%. Zwiększa się także wartość paszowa wywaru, z uwagi na wyższą zawartości suchej masy i białka o około 20%. Zrozumiałe jest zatem zainteresowanie technologów możliwością doskonalenia procesów zacierania surowców skrobiowych metodą beciśnieniową przez stosowanie dodatków preparatów enzymatycznych, spełniających funkcje pomocnicze i usprawniające te procesy.

W recenzowanej pracy doktorskiej mgr. inż. E. Sapińska podjęła próbę oceny wpływu dodatku preparatów enzymatycznych do zacierów zbożowych, prowadzonych metodą beciśnieniową. Zbadała skład chemiczny surowców, właściwości fizyczne (reologia), przebieg i wydajność procesu fermentacji oraz produkty uboczne w otrzymanych destylatach.

Doktorantka dokonała również analizy oceny aktywności stosowanych preparatów enzymatycznych oraz określiła ich wpływ na właściwości reologiczne i skład zacierów słodkich i odfermentowanych, a także prześledziła przebieg i wydajność procesu fermentacji. W prowadzonych badaniach zacieru sporządzano z ziarna żyta, kukurydzy i pszenżyta, proces katalizowano dodatkiem enzymów amylolitycznych, jako pomocnicze stosowano hydrolazy nieskrrobiowych polisacharydów, a także użyto pullulanazę oraz proteazę. Fermentację prowadzono przy użyciu drożdży gorzelniczych *S. cerevisiae* As4. Prowadzone badania pozwoliły wykazać, że dodatek enzymów wspomagających skrócił czas fermentacji, spowodował lepsze wykorzystanie cukrów, oraz zapewnił wyższy stopień odfermentowania. Uzyskane destylaty nie wykazały wzrostu poziomu zawartości produktów ubocznych, w odniesieniu do spirytusu otrzymanego z fermentacji bez dodatku enzymów wspomagających. Przeprowadzone próby wykazały słuszność postawionej tezy badawczej dotyczącej przydatności dodatku enzymów wspomagających do przygotowania zacierów zbożowych i uzyskania korzystnych efektów prowadzonej w takich warunkach fermentacji. Rozprawa doktorska mgr. inż. Eweliny Sapińskiej jest starannie przygotowanym pod względem merytorycznym, naukowym i redakcyjnym opracowaniem. Obejmuje 164 strony druku, podzielona jest, zgodnie z zasadami pisania prac naukowych, na następujące rozdziały: wstęp – zawierający również część teoretyczną, cel i zakres badań, metodykę badań, wyniki badań i ich omówienie, dyskusję wyników, wnioski oraz literaturę. Informacje dotyczące materiałów i metod fermentacji oraz uzyskane w prowadzonych badaniach rezultaty zamieszczono w 55 tabelach i przedstawiono graficznie na 13 rysunkach. Na podkreślenie zasługuje ogromny wkład pracy laboratoryjnej poniesiony na wykonanie zamieszczonych w pracy wyników badań. W pracy znajduje się 50 tabel z oryginalnymi wynikami różnych analiz, w każdej tabeli jest średnio 50 wyników oznaczeń, daje to 2 500 rezultatów analiz. Jeżeli przyjmiemy, że każdy wynik to średnia z przynajmniej 2 powtórzeń, to na ich uzyskanie trzeba było wykonać 5 tysięcy analiz – jest to bez wątpienia ogromna praca laboratoryjna.

Recenzowana rozprawa opiera się na obszernej literaturze przedmiotu. Autorka korzystała ze 150 pozycji, uwzględniając najważniejsze publikacje naukowe dotyczące opracowywanej tematyki. W **części teoretycznej** stanowiącej wprowadzenie do planowanych badań, zamieszczono najważniejsze informacje dotyczące użytych surowców, metod uwalniania i scukrzania skrobi w gorzelnictwie, zwracając szczególną uwagę na technologię procesu bezcisnieniowego zacierania. Wnikliwie scharakteryzowano enzymy stosowane w gorzelnictwie, uwzględniając zwłaszcza wspomagające proces hydrolizy polisacharydów nieskrrobiowych. Omówiono również w/w polisacharydy oraz produkty uboczne występujące w destylatach otrzymanych w gorzelniach rolniczych.

Rozdział „**cel i zakres badań**” w sposób syntetyczny przedstawia zadania analityczne, jakie planując eksperymenty, postawiła sobie Autorka rozprawy. W założeniach tych mieści się ocena wpływu dodatku pomocniczych preparatów enzymatycznych zastosowanych do zacierów zbożowych, przygotowanych metodą bezcisnieniowego uwalniania skrobi. W ramach oceny procesu fermentacji zaplanowano analizę składu fizyko-chemicznego, badanie właściwości reologicznych zacierów, kontrolę przebiegu i wydajności fermentacji, a także zawartości produktów ubocznych w otrzymanych destylatach. Zakres pracy

podzielono na 7 zadań roboczych szczegółowo wyjaśniających czynności prowadzone w kolejnych etapach badań.

W następnym rozdziale „**surowce i materiały**” dokonano szczegółowej charakterystyki użytych w procesie fermentacji surowców skrobiowych. Szkoda że nie podano na jakiej podstawie do badań wybrano konkretne odmiany żyta, pszenżyta i kukurydzy. Można było przyjąć za kryterium wyboru np. zawartość skrobi, czy aktywność amylolityczną ziarna pszenżyta. Zastosowane preparaty enzymatyczne, dostosowane do potrzeb gorzelnictwa, w większości pochodziły z firmy Novozymes. Oznaczono aktywność użytych preparatów. Do fermentacji zacierów stosowano suszone drożdże gorzelnicze w dawce 0,3 g/l zacieru, a podłoże wzbogacano fosforanem diamonu w ilości 0,4 g/l zacieru. Procesy technologiczne takie jak przygotowanie zacierów, namnażanie drożdży, fermentacje zacierów, prowadzono według zaprezentowanych schematów, z uwzględnieniem szeregu wariantów dotyczących dodawanych enzymów wspomagających jak i ich dawek. Przebieg fermentacji kontrolowano wagowo, analizowano również stopień odfermentowania, ubytek cukrów i stężenie alkoholu. Destylację odfermentowanych zacierów przeprowadzono stosując zestaw laboratoryjny, a przy większych objętościach (15 l) zacieru użyto miedziany aparat odpędowy ogrzewany przepływem.

W kolejnym rozdziale „**metodyka badań**” Autorka opisała stosowane w pracy postępowanie analityczne dotyczące przeprowadzonych oznaczeń chemicznych. Przedstawiła szczegółowo metodykę oznaczania aktywności użytych w badaniach preparatów enzymatycznych. W kolejnych podrozdziałach omówiła metodykę analiz zacierów słodkich i odfermentowanych oraz zawartości alkoholu i dekstryn. Należy zwrócić uwagę na zastosowanie nowoczesnej metodyki chromatografii gazowej do określenia zawartości produktów ubocznych, obecnych w uzyskanych destylatach. Analizę ilościową destylatów rolniczych przeprowadzono metodą wzorca zewnętrznego z wykorzystaniem oprogramowania Agilent Chemstation. Rozdział przeprowadzono na kolumnie kapilarnej HP-Innowax z polarną fazą stacjonarną, a jako gaz nośny zastosowano hel.

Obszerną i bardzo szczegółową prezentację wyników przeprowadzonych badań zawiera rozdział „**wyniki badań i ich omówienie**”. Na 79 stronach w ośmiu podrozdziałach poddano szczegółowej analizie wyniki przeprowadzonych doświadczeń. Najważniejsze rezultaty badań, które mogą przynieść określone korzyści ekonomiczne, można ująć w następujących punktach.

- Uzyskanie wysokiej wydajności alkoholu po fermentacji zacierów żytnich o zawartości 16% ekstraktu z dodatkiem enzymów celulolitycznych i celobiazy. Otrzymano 92% wydajności teoretycznej tj. 41 litrów etanolu ze 100 kg surowca zbożowego. Dodatek enzymów wspomagających (za wyjątkiem ksylanazy) spowodował również skrócenie czasu fermentacji do 48 godzin, podczas gdy fermentacja próby kontrolnej trwała 72 godz.
- Fermentacja zacierów żytnich o zawartości 23% ekstraktu z dodatkiem celulazy i celobiazy dała jeszcze lepsze rezultaty tj. 43 litry alkoholu/100kg surowca, czyli 92 % wydajności w porównaniu do teoretycznej. Natomiast dodatek ksylanazy, również w tym przypadku nie przyniósł poprawy efektywności fermentacji.

– Po fermentacji zacierów kukurydzianych o 24 % zawartości ekstraktu z dodatkiem proteazy uzyskano objętościowo najwyższe wydajności tj. 48 litrów alkoholu ze 100 kg surowca, co stanowi 89% wydajności teoretycznej.

– W zacierach pszenżytnich o zawartości ekstraktu 25-26% z dodatkiem enzymów pomocniczych, po fermentacji uzyskano również znaczący wzrost wydajności alkoholu, w porównaniu do prób kontrolnych. Najwyższą wydajność 91% teoretycznej stwierdzono przy dodatku pullulanazy i proteazy. Pozwoliło to otrzymać 39 litrów spirytusu ze 100 kg surowca.

Kolejnym etapem badań była analiza chromatograficzna otrzymanych destylatów rolniczych. Produktami ubocznymi w destylatach był szereg aldehydów, z których najwięcej oznaczono aldehydu octowego. Stwierdzono także obniżenie zawartości octanu etylu w analizowanych próbach w porównaniu do kontroli. Zastosowanie enzymów pomocniczych poza celulazą nie wpłynęło na zwiększenie stężenia metanolu w uzyskanych destylatach.

Należy jednak zaznaczyć, że są to rezultaty uzyskane w badaniach prowadzonych w skali laboratoryjnej, a przeniesienie procesu do skali technicznej może okazać się mniej wydajne. Kierunek poszukiwań możliwości zwiększenia wydajności procesów zacierania surowców zbożowych, wspomaganego enzymatycznie jest ciekawym tematem badawczym i może zainteresować przemysł spirytusowy. Sprawdzenie w skali technicznej rezultatów badań może być kierunkiem dalszych działań w ramach współpracy z gorzelnictwem rolniczym. Te osiągnięcia uważam za bardzo wartościowy rezultat ocenianej pracy doktorskiej, mogą być kierunkiem dalszych badań w ramach współpracy z gorzelniami rolniczymi. Uważam, że mgr. inż. E. Sapińska wniosła duży wkład w możliwości poprawy trudnej sytuacji gorzelnictwa rolniczego, co powinno zostać uwzględnione przy końcowej ocenie recenzowanej rozprawy.

W kolejnym rozdziale „**dyskusja wyników**” w sposób dojrzały, świadczący o znajomości problematyki, przeprowadzono szczegółową analizę uzyskanych rezultatów, porównując je z pracami badawczymi innych autorów. Zawartość skrobi w analizowanych zbożach była wysoka, co znajduje potwierdzenie w literaturze, a jednocześnie wskazuje na dobrą jakość surowca, umożliwiającą uzyskanie wysokiej wydajności alkoholu. Ziarno żyta będące podstawowym surowcem w prowadzonych badaniach wykazuje najwyższą wśród nich zawartość polisacharydów nieskrobiowych, co utrudnia i wydłuża czas prowadzenia procesu hydrolizy, utrudnia mieszanie, wymianę ciepła oraz destylację. Problemy te omawiane są również w literaturze przedmiotu, a zaproponowane przez Autorkę przeciwdziałanie polega na zastosowaniu enzymów wspomagających ich rozkład w procesie beztlenowego scukrzania skrobi. Wyniki uzyskane podczas fermentacji badanych zacierów mają duże znaczenie praktyczne z uwagi na możliwość skrócenia czasu tego procesu. Podobne działanie enzymów wspomagających na intensyfikację i skrócenie czasu fermentacji obserwowane było we wcześniejszych badaniach prowadzonych w Zakładzie Spirytusu i Drożdży PŁ, co potwierdza słuszność przyjętych założeń pracy. Wysokie wydajności alkoholu po przefermentowaniu zacieru żytniego z dodatkiem celulazy i celobiozy są efektem hydrolizy enzymatycznej polisacharydów i wykorzystania przez drożdże uzyskanych cukrów prostych.

Rezultaty tych badań można uznać za wartościowe osiągnięcia Autorki rozprawy. Stwierdzony w badaniach efekt zmiany lepkości pszenżytnich zacierów słodkich, spowodowany dodatkiem enzymów hydrolizujących polisacharydy ścian komórkowych ziarna, został już opisany przez innych autorów. W przeprowadzonych badaniach wykazano również, że na zawartość aldehydów występujących w destylatach rolniczych ma wpływ pH, temperatura, stężenie cukrów w zacierach oraz przebieg fermentacji alkoholowej. Podobnie wcześniejsze badania wykazały, że im wyższa jest gęstość zacieru słodkiego, tym wyższe będzie końcowe stężenie aldehydów. W przeprowadzonych badaniach wykazano, zgodnie z teorią Erlicha, wzrost zawartości alkoholi wyższych w destylatach uzyskanych z zacierów suplementowanych proteazą, gdzie nastąpił rozkład aminokwasów leucyny i waliny. W dyskusji wyników mgr. inż. E. Sapińska prezentuje szeroką znajomość problematyki technologii fermentacji. Zaproponowane usprawnienia polegające na zastosowaniu hydrolaz polisacharydów nieskrobiowych, w tym celulaz, wpływają na obniżenie lepkości zacierów. Jest to osiągnięcie umożliwiające poprawę procesu fermentacji przez wykorzystania zacierów o wyższej gęstości i zwiększenie wydajności alkoholu, przy obniżeniu ilości otrzymanego wywaru. Badania wykazały, że stosowanie enzymów pomocniczych do zacierania pozwala zachować dobrą jakość otrzymanych destylatów. Rezultaty te wnoszą duże możliwości aplikacyjne i mogą być wykorzystane w praktyce przemysłowej, co należy uznać za bardzo istotne osiągnięcie prowadzonych badań. Należy także podkreślić, że większość rezultatów ocenianej rozprawy doktorskiej charakteryzuje się oryginalnością i nowym ujęciem badawczym. Z tego powodu trudno było nowatorskie badania porównać z wykonanymi poprzednio pracami. Jednak Autorka poradziła sobie w tej sytuacji, przeprowadzając dyskusję wyników w sposób dojrzały i wyczerpujący.

W podsumowaniu przeprowadzonych badań przedstawiono 6 wniosków końcowych, syntetycznie ujmujących najważniejsze rezultaty wykonanych badań. Zwięzła forma redakcji wniosków pozwala na szybkie zapoznanie się z najważniejszymi rezultatami. Wnioski w całości oparte są na przeprowadzonych badaniach i analizach. Zawierają podsumowanie korzystnych efektów technologicznych uzyskanych przy dodatku pomocniczych preparatów enzymatycznych do zacierów zbożowych. Autorka stwierdziła, że enzymy te w sposób zróżnicowany oddziałują na skład fizyko-chemiczny zacierów, przebieg i wydajność fermentacji oraz zawartość produktów ubocznych otrzymanych w destylatach. Wykazała również, że przeprowadzone badania potwierdzają celowość suplementacji zacierów zbożowych, zwłaszcza o podwyższonej gęstości, preparatami enzymów wspomagających.

- W recenzowanej rozprawie kilka zagadnień wymaga wyjaśnienia lub korekty:
- na jakiej podstawie wybrano do badań konkretne odmiany surowców zbożowych?
 - w tabeli 4 brak jest odnośnika literaturowego do stosowanych metod badania aktywności enzymatycznej,
 - na stronie 44 napisano „kleikuje skrobie rozpuszczalną”, czym zatem różni się skrobia rozpuszczalna od natywnej?
 - na stronie 58 podano wzór opisujący lepkość. Nie sprecyzowano jednak jaka to jest lepkość; kinematyczna czy jakaś inna?

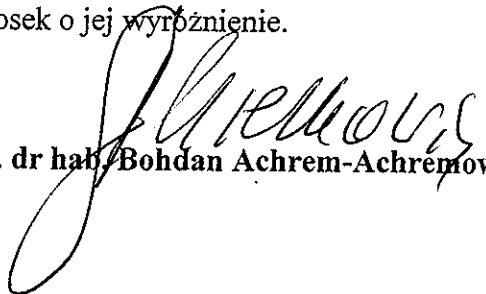
- na stronie 79 opisano fazę adaptacyjną (czas indukcji), brak opisu jak ten czas został wyznaczony,
- wykresy przedstawiające ubytek dwutlenku węgla (dynamika fermentacji) nie zawierają słupków błędów, dlaczego?

Przedstawione powyżej zastrzeżenia mają charakter korektorski i ich poprawienie powinno prowadzić do lepszego zaprezentowania wyników pracy w przygotowywanych publikacjach. Nie umniejszają one wysokiej oceny merytorycznej jaką stawiam recenzowanej rozprawie doktorskiej.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr. inż. Eweliny Sapińskiej jest interesującym opracowaniem naukowym, dotyczącym możliwości i korzyści ekonomicznych wynikających z zastosowania dodatku enzymów wspomagających proces zacierania surowców zbożowych, prowadzony metodą bezciśnieniowego scukrzania skrobi. W rozległych i szczegółowo przeprowadzonych badaniach potwierdzono celowość stosowania takich preparatów podczas przygotowania zacierów żytnich, kukurydzianych oraz pszenżytnich o podwyższonych gęstościach, metodą bezciśnieniowego uwalniania skrobi. Przygotowanie rozprawy w formie przedstawionej do recenzji, świadczy o dojrzałości Autorki, dobrym przygotowaniu i znajomości procesów technologicznych oraz metod analitycznych. Praca zawiera obszerną literaturę przedmiotu, starannie opracowane szczegółowe wyniki badań oraz właściwie sformułowane wnioski końcowe.

Na szczególne podkreślenie zasługuje duży wkład pracy włożony w przeprowadzenie rozlicznych prób fermentacyjnych, przy wielu zmiennych parametrach badań, oraz szeroki zakres wykonanych analiz. Zwłaszcza analizy produktów destylacji wykonane z zastosowaniem chromatografii gazowej mają dużą wartość naukową. Można również uznać, że uzyskane rezultaty badań mają dużą wartość praktyczną. Mogą przyczynić się do poprawy efektywności i wydajności gorzelni rolniczych, poprawiając trudną sytuację ekonomiczną w jakiej znajdują się obecnie te zakłady. Uwzględniając znaczenie naukowe i aplikacyjne wykonanych badań, należy stwierdzić, że Autorka wykazała bardzo dobre przygotowanie merytoryczne, wiedzę fachową i umiejętności pozwalające na kontynuację i dalszy rozwój pracy naukowej. Podsumowując całokształt badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej mgr. inż. Eweliny Sapińskiej stwierdzam, że spełnia ona wymagania stawiane w „ustawie o stopniach i tytule naukowym” z 2003 r. i zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk i Żywności Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uznając ocenianą rozprawę za wykonaną na wysokim poziomie naukowym i wnosząc istotne i nowatorskie usprawnienia aplikacyjne w działalności gorzelnictwa rolniczego, stawiam wniosek o jej wyróżnienie.


Prof. dr hab. Bohdan Achrem-Achremowicz