Kraków, 17.10.2021

prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska,
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Anety Ciosek

pt. „**Technologiczne i mikrobiologiczne aspekty produkcji piw kwaśnych**"

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Aleksandra Poredy, prof. UR

w Katedrze Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

I. Dobór i znaczenie tematu

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Anety Ciosek pt. „**Technologiczne i mikrobiologiczne aspekty produkcji piw kwaśnych**" stanowi spójny tematycznie cykl sześciu publikacji dotyczących opracowania efektywnej i ekonomicznej metody produkcji piw kwaśnych z wykorzystaniem bakterii *Lactabacillus brevis* WLP672. Temat rozprawy jest nowatorski, czego potwierdzeniem jest nadal stosunkowo niewielka liczba publikacji dotyczących wykorzystania bakterii kwasu mlekowego w technologii piwowarstwa. Oprócz aspektów naukowych, wybór tematyki badawczej jest trafny i wartościowy pod względem aplikacyjnym. Silna konkurencja na rynku oraz oczekiwania konsumentów wymagają od producentów żywności poszerzania oferty handlowej o nowe wyroby. W grupie tych produktów na rynku browarniczym bardzo dużym zainteresowaniem cieszą się piwa kwaśne. W technologii produkcji piw kwaśnych kluczową rolę odgrywa zastosowanie konsorcjum mikroorganizmów bakterii i drożdży w procesie technologicznym. Dobór szczepów mikroorganizmów oraz warunków ich propagacji i pracy w środowisku brzeczki piwowarskiej czy wpływ parametrów technologicznych stanowi istotne wyzwanie naukowe i praktyczne dla browarów. Sprawia to, że zarówno przemysł spożywczy, jak i naukowcy poszukują ciekawych rozwiązań technologicznych oraz mikroorganizmów, które mogłyby zostać wykorzystane w technologii piwowarskiej celem produkcji napojów fermentowanych o nowych cechach sensorycznych, ciekawym i stabilnym bukiecie aromatycznych, wysokiej jakości i stabilności cech w trakcie przechowywania, ale przed wszystkim powtarzalności produktu.

W świetle powyższych informacji, badania przeprowadzone przez mgr inż. Anetę Ciosek w ramach pracy doktorskiej, dotyczące opracowania technologii produkcji piw kwaśnych uznaję za aktualne i uzasadnione. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań mogą posłużyć do opracowania technologii produkcji innowacyjnych napojów fermentowanych z wykorzystaniem bakterii kwasu mlekowego, prowadząc w konsekwencji do wdrożenia opracowanych technologii do praktyki przemysłowej. Produkcja takich napojów fermentowanych jest odpowiedzią na oczekiwania konsumentów, a wiedza dotycząca charakterystyki procesu prowadzonego z udziałem konsorcjum bakterii i drożdży niezwykle cenna. Ponadto, wprowadzenie przez polskie zakłady, takie jak browary regionalne/rzemieślnicze do swojej oferty produkcyjnej nowych napojów fermentowanych, może przyczynić się do zwiększenia konkurencyjności tej grupy przedsiębiorstw i ułatwić pozyskiwanie klientów zainteresowanych niestandardowymi produktami.

2. **Formalna ocena pracy**

Rozprawa liczy 35 stron tekstu i zawiera: streszczenie w języku polskim i angielskim, słowa kluczowe, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wstęp, przegląd literatury, cel pracy wraz z hipotezami badawczymi, metodykę badań i wyniki (omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej), metody analityczne wykorzystane w pracy, wnioski, literaturę oraz dodatkowo kserokopie publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 48 pozycji literaturowych, w 90% o zasięgu międzynarodowym. Literatura z ostatnich 5 lat stanowi ok 20 %. Przedstawiona do oceny praca doktorska jest opracowaniem przygotowanym w oparciu o sześć publikacji wydanych w latach 2015-2020 w recenzowanych czasopismach naukowych: 1 publikacja w *Journal of the Institute of Brewing* (IF=1.504, MNISW=40 pkt), 1 publikacja w *Biomolecules* (IF=4,082, MNiSW=100 pkt), 3 publikacje w *Przemyśle Fermentacyjnym i Owocowo-Warzywnym* (MNiSW=5 pkt) oraz 1 rozdział w monografii pokonferencyjnej Szkoły Technologii Fermentacji. Sumaryczny wskaźnik IF publikacji wynosi 5,586, a liczba punktów MNiSW=155. Wszystkie publikacje są opracowaniami zbiorowymi (od 2 do 5 autorów), we wszystkich mgr inż. Aneta Ciosek jest pierwszym autorem. Z oświadczeń współautorów wynika, że Autorka niniejszej rozprawy miała znaczący udział w realizacji prac na poziomie od 55 do 70%, polegał on na projektowaniu eksperymentów, przeprowadzeniu doświadczeń w laboratorium, analizie próbek, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu publikacji.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Tytuł recenzowanej pracy doktorskiej odpowiada tematyce zaprezentowanej w cyklu publikacji. W streszczeniu pracy Doktorantka w sposób syntetyczny, aczkolwiek wyczerpujący, przedstawia genezę, cel badań, zakres badań oraz uzyskane wyniki, ze wskazaniem głównych osiągnięć pracy. Wprowadzeniem w tematykę badawczą realizowaną w ramach pracy doktorskiej jest wstęp oraz przegląd literatury. We wstępie Doktorantka nakreśliła rozwój sektora browarniczego z uwzględnieniem rozwoju rynku nowych produktów, w tym popularnych ostatnio piw kwaśnych, wymieniła metody produkcji tych piw oraz uzasadniła wybór stosowanego w pracy szczepu bakterii *Lactobacillus brevis* WLP672. Przegląd literatury został przygotowany w oparciu o pierwszą publikację wchodzącą w skład rozprawy doktorskiej i został poświęcony charakterystyce bakterii kwasu mlekowego (LAB) w technologii browarniczej. W tej części Doktorantka przedstawiła systematykę bakterii kwasu mlekowego (LAB), charakterystykę wybranych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, omówiła potencjał wykorzystania tych bakterii w produkcji żywności oraz stan wiedzy na temat wykorzystania LAB w browarnictwie. Rozdział „przegląd literatury'' został przygotowany na podstawie publikacji przeglądowej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej opublikowanej w 2015 roku zdaniem recenzenta treść tego rozdziału powinna być uzupełniona o przegląd literatury z ostatnich pięciu lat. Rozdział ten koresponduje z częścią eksperymentalną pracy.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przestawiła cel główny i cele szczegółowe pracy. Głównym celem pracy było opracowanie metody wytwarzania piw kwaśnych z użyciem komercyjnego szczepu bakterii heterofermentatywnych *Lactobacillus brevis* WLP672 w odpowiedzi na potrzeby polskiego przemysłu browarniczego. W pracy postawiono cztery hipotezy badawcze, które poddano weryfikacji w ramach kolejnych eksperymentów, ukierunkowanych na: dobór warunków propagacji bakterii LAB z wykorzystaniem brzeczki słodowej jako podłoża hodowlanego, ocenę wpływu alfa-kwasów w brzeczce na przyrost biomasy bakterii kwasu mlekowego, wpływ sekwencji wykorzystania bakterii i drożdży piwowarskich na efekty fermentacji, a także wpływ suplementacji brzeczki jonami Mg i Zn na aktywność fermentacyjną bakterii LAB i drożdży piwowarskich oraz charakterystykę parametrów fizykochemicznych i profil aromatyczny produktów finalnych.

W rozdziale „Metodyka badań i wyniki" Doktorantka omówiła publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zgodnie z chronologią ich ukazywania w czasopismach naukowych. Prace stanowiące niniejszą rozprawę są tematycznie spójne, Autorka skupiła się na omówieniu najważniejszych założeń oraz rezultatów badań.

Analiza trendów na rynku napojów fermentowanych skłoniła Doktorantkę do podjęcia prac badawczych ukierunkowanych na charakterystykę materiału biologicznego stosowanego w projektowaniu piw kwaśnych. Początkowe prace eksperymentalne zostały poświęcone poszukiwaniu optymalnych warunków propagacji bakterii *L. brevis* WLP672 na brzeczce słodowej. Badania prowadzono w skali laboratoryjnej z wykorzystaniem bioreaktora Biotech Biostat B. Doktorantka i współautorzy wykazali, że liczebność i żywotność bakterii zależała od takich parametrów jak: ekstrakt brzeczki, czas propagacji, temperatura procesu oraz ilość biomasy wykorzystywanej do zaszczepienia brzeczki. Najlepsze efekty uzyskano prowadząc proces propagacji na brzeczce słodowej o zawartości ekstraktu 12°Plato, w temperaturze 25°C przez 3 dni. Uzyskane wyniki opublikowano w publikacjach nr 2 i 3.

W czwartej publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej zamieszczone zostały wyniki badań dotyczące wpływu materiału biologicznego: bakterii *L. brevis* WLP672 i drożdży *S. cerevisiae* Safale US-05 na przebieg i efekty procesu fermentacji podczas produkcji piw kwaśnych. Doktorantka prowadziła procesy fermentacji szczepiąc brzeczkę nastawną materiałem biologiczny w trzech wariantach: (1) bakterie następnie drożdże (2) drożdże następnie bakterie oraz (3) kultury mieszane z udziałem konsorcjum bakterii i drożdży jednocześnie. Doktorantka i współautorzy wykazali, że kolejność i czas szczepienia bakterii i drożdży podczas produkcji piw kwaśnych ma znaczący wpływ na przebieg procesu oraz parametry fizykochemiczne produktów finalnych w tym i.in na: wartość pH, stężenie kwasu mlekowego, zawartość alkoholu czy ekstraktu rzeczywistego. W oparciu o szczegółową analizę wyników, jako wariant optymalny wskazano zaszczepienie brzeczki nastawnej bakteriami LAB, a po 3 dobach fermentacji mlekowej, przeprowadzenie fermentacji etanolowej z udziałem wybranych drożdży piwowarskich.

Przedmiotem badań opisanych w piątej publikacji było określenie wpływu stopnia nachmielenia brzeczki na wzrost i metabolizm bakterii kwasu mlekowego. Zastosowano dwa poziomy nachmielenia brzeczki 4 i 8 IBU, brzeczka niechmielona stanowiła próbę kontrolną.

W badaniach wykazano, że badany szczep *L. brevis* WLP672 jest bardzo wrażliwy na związki chmielu i jego metabolizm był hamowany już przy dawce 4 mg izo-α-kwasów/ litr brzeczki. Otrzymane piwa charakteryzowały się zbyt małym zakwaszeniem pH>4,0 i bardzo niskim stężeniem kwasu mlekowego <0,2 g/L. W przypadku zastosowania badanego szczepu LAB zalecono stosowanie brzeczek niechmielonych lub o niskim stopniu nachmielenia <4 mg izo-α-kwasów/ litr.

W szóstej publikacji, Doktorantka i współautorzy zamieścili rezultaty badań dotyczących oceny wpływu suplementacji brzeczki jonami magnezu i cynku na metabolizm bakterii kwasu

mlekowego *Lactobacillus brevis* WLP672, przebieg i efekty fermentacji z udziałem kultur mieszanych i powstanie związków aromatycznych w piwach kwaśnych. Ta część prowadzonych badań jest najbardziej interesująca i wnosi najwięcej cennych informacji zarówno naukowych jak i praktycznych wskazań. Obejmuje szerokie spektrum badań analitycznych. Niewątpliwym osiągnieciem naukowym badań zaprezentowanych w tej części pracy doktorskiej było przeanalizowanie wpływu jonów cynku na przebieg i efekty fermentacji piw kwaśnych. Stwierdzono, że dodatek jonów cynku do brzeczki negatywnie wpływał na przebieg fermentacji mlekowej, skutkował otrzymaniem piwa o niższej zawartości kwasu mlekowego. Ponadto w próbach suplementowych stwierdzono wyższe stężenie kwasu bursztynowego, który nie jest pożądany, ponieważ obniża pijalność piwa. Ponadto stwierdzono 8-12 krotnie wyższe stężenie związków zapachowych: kwasów tłuszczowych i terpenów. To ważne odkrycie gdyż suplementacja jest standardową procedurą stosowaną w browarach i warto rozważyć ograniczenie lub rezygnację z suplementacji jonami cynku podczas produkcji piw kwaśnych.

W ostatniej części pracy dokonano weryfikacji wyników uzyskanych w skali laboratoryjnej. Na podstawie zebranych danych, opracowano recepturę piwa kwaśnego, które następnie uwarzono w browarze eksperymentalnym Uniwersytetu Przyrodniczego w Krakowie na warzelni o wybiciu 1 hl. Przeniesienie skali jest bardzo istotne dla wdrożenia wypracowanych rozwiązań do warunków przemysłowych i potwierdza w pełni aplikacyjny charakter zrealizowanych badań.

W kolejnym rozdziale Doktorantka zamieściła wykaz metod analitycznych wykorzystanych w pracy. Do analizy i charakterystyki materiału biologicznego oraz składu chemicznego produktów końcowych wykorzystano rekomendowane techniki badawcze, zgodne z analityką EBC oraz właściwą aparaturę badawczą m.in.: cytometr przepływowy BD Accuri, analizator piwa 4500 M, spktrofotometr Beckmana, chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrią mas (GC/MS) oraz chromatograf cieczowy HPLC.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała 8 wniosków. Sposób zredagowania wniosków jest poprawny, a ich strona merytoryczna znajduje uzasadnienie w analizie prezentowanych wyników badań. Treść wniosków potwierdza dokonanie przez Doktorantkę weryfikacji przyjętych hipotez badawczych.

Uwagi ogólne i szczegółowe:

Z obowiązku recenzenta należy wymienić nieliczne drobne uchybienia zauważone podczas lektury niniejszej rozprawy, takie jak błędy literowe i językowe. W spisie literatury wiele

pozycji wymaga korekty edytorskiej, w tym m.in: pisownia nazw gatunkowych mikroorganizmów, powinny być zapisana kursywą (s. 31-35, poz. 13, 16, 19, 30, 34, 39, 47). Podobne uwagi dotyczą publikacji nr 3.

W opinii recenzenta dobrym rozwiązaniem byłoby zamieszczenie w pracy podrozdziału „Modele eksperymentalne" w postaci schematów przedstawiających etapy poszczególnych badań, z jednoczesnym wskazaniem punktów poboru próbek do badań i wykonywanych analiz oraz uzupełnienie części metodycznej o zestawienie i charakterystykę podłóż stosowanych podczas fermentacji z uwzględnieniem parametrów technologicznych ich przygotowania oraz prowadzenia procesów fermentacji na poszczególnych etapach realizacji prac badawczych.

W odniesieniu do pracy proszę Doktorantkę o uzupełnienie informacji lub komentarz w zakresie podejmowanej dyskusji:

- w niektórych eksperymentach brzeczki do przygotowania podłóż pochodziły z browaru w innych pracach przygotowano je w warunkach laboratoryjnych z ekstraktów słodowych. Czy wiadomo, jakie surowce stanowiły podstawę do przygotowania brzeczek? Na jakim etapie technologicznym była pobierana brzeczka z browaru, czy brzeczka była chmielona (tylko w jednej publikacji znajdujemy informację, że nie). Czy podłoża do fermentacji były standaryzowane?. Dlaczego niektóre brzeczki były poddawane dwukrotnie sterylizacji w temp. 121° C przez 20 lub 30 min., inne jednokrotnie. Jak proces sterylizacji może wpłynąć na skład chemiczny i profil węglowodanowy brzeczek? W niektórych etapach pracy do fermentacji stosowano brzeczki o zawartości ekstraktu 8° Plato w innych 12°Plato. W pracy stosowano różne temperatury fermentacji mlekowej 20°C (publikacja 4), 25°C (publikacja 5) oraz 30°C (publikacja 6). Jaki był czas prowadzenia procesu fermentacji etanolowej w pracy nr 6. Po analizie materiału proszę o rekomendacje dotyczące parametrów technologicznych prowadzenia procesów fermentacji mlekowej i etanolowej z użyciem badanych szczepów.
- dlaczego stosując bakterie heterofermentatywne do procesu w pierwszych pracach analizowano wyłącznie zawartość kwasu mlekowego i pH, a ocenę zawartości innych kwasów zwłaszcza kwasu octowego dopiero w ostatniej etapie pracy. W pracy nr 6 zastosowano inną metodę analizy kwasu mlekowego niż w pozostałych pracach.
- w pracy stwierdzono zróżnicowanie pomiędzy wynikami w zakresie ilości wytworzonego kwasu mlekowego - 6 g/l dla wariantu BY72 (publikacja 4) oraz 0,6 – 1,6 g/l (publikacja 6). Jak tłumaczy to Autorka.

Jak wynika z przeprowadzonych badań stosowne w pracy bakterie mlekowe wykazywały dużą wrażliwość na izo-α- kwasy pochodzące z chmielu, co wykazano w pracy nr 5. Czy Doktorantka podejmowała próby wykorzystania technologii „kettle soure'' zakwaszania na etapie przygotowania brzeczki przed chmieleniem w swoich badaniach? Jaka jest opinia Doktorantki w tym temacie?

- proszę o uzupełnienie informacji, jakie stężenie kwasu mlekowego uzyskano w warunkach browaru eksperymentalnego?.

Powyższe uwagi nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej. Oceniana praca doktorska jest niewątpliwie oryginalnym dziełem naukowym, w którym Doktorantka wykazała dobre przygotowanie teoretyczne, samodzielność w prowadzeniu badań naukowych, umiejętność posługiwania się nowoczesnymi metodami analitycznymi. Określony w pracy cel badawczy został zrealizowany. Na podkreślenie zasługuje potencjał aplikacyjny pracy. Zawarte w recenzji uwagi mają charakter uzupełniający, redakcyjny i dyskusyjny, nie mają wpływu na ocenę końcową przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej.

Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anety Ciosek jest oryginalnym i wartościowym opracowaniem. Zawarte w niej wyniki badań są źródłem wiedzy o charakterze naukowym, jak i aplikacyjnym, na temat możliwości wykorzystania bakterii kwasu mlekowego do produkcji piw kwaśnych. Doktorantka sprawnie sformułowała temat i cel pracy, poprawnie zaplanowała i przeprowadziła prace eksperymentalne służące jego realizacji, umiejętnie wykorzystała narzędzia badawcze, analityczne i statystyczne, co podnosi znacząco wiarygodność ustaleń naukowych prezentowanych w rozprawie. Potwierdzeniem tego są publikacje naukowe wchodzące w skład recenzowanej dysertacji. Przedłożoną do recenzji pracę doktorską oceniam pozytywnie i stwierdzam, że rozprawa ta spełnia wszystkie ustawowe wymogi i kryteria. Zwracam się do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Anety Ciosek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, dnia 17.10.2021 r.

Joanna Kawa-Rygielska