

prof. dr hab. inż. Małgorzata Krzywonos
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
Wydział Zarządzania
Katedra Zarządzania Procesami
ul. Komandorska 118/120, 53 –345 Wrocław
kom: +48 692 696 992
email: malgorzata.krzywonos@ue.wroc.pl

Wrocław, dnia 06.12.2022r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Justyny Anny Rębas pt.: „Optymalizacja procesu otrzymywania etanolu pod kątem stosowanych enzymów, parametrów ich pracy oraz warunków prowadzenia procesu. Zależność pomiędzy procesem hydrolizy enzymatycznej, fermentacją alkoholową, a jakością uzyskiwanego DDGS-u”, która została zrealizowana na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Joanny Kawy-Rygielskiej. Rozprawa realizowana była w ramach II edycji programu „Doktorat Wdrożeniowy”. Opiekunem pomocniczym był mgr inż. Zbigniew Ułanowski z firmy Chemat sp. z o.o w Koninie.

Ocena strony formalnej pracy

Formalny układ rozprawy jest typowy dla prac naukowych o charakterze doświadczalnym. Praca liczy 131stron, a jej treść podzielono na następujące, kolejne części: spis treści; streszczenie w j. polskim i w j. angielskim; wstęp; cel i zakres pracy; materiały i metody badawcze; wyniki badań, dyskusja; wnioski; bibliografia; raporty i załączniki. W pracy nie zamieszczono spisu zamieszczonych tabel i schematów i wykresów.

Autorka zamieściła 10 tabel i 54 wykresy, 6 zdjęć, 14 schematów, 7 raportów i dwa załączniki. Zamieszczone tabele, schematy i wykresy uzupełniają treść pracy doktorskiej. W dysertacji zacytowano 90 prac, w tym jedną norma i akt prawny. Dobór bibliografii jest odpowiedni i obejmuje najważniejsze pozycje literatury tematu z ostatnich lat: tylko 16 z przywołanych pozycji jest sprzed 2012 roku, a 19 zacytowanych prac jest w języku polskim. Nie przywoływano żadnych materiałów zamieszczonych na stronach internetowych. Z recenzenckiego obowiązku muszę stwierdzić, że w przypadku kilku pozycji literaturowych brak pełnych danych; np. dla poz. 14, brak informacji, czego dotyczy przywołana ustawa, podobnie dla pozycji 65, która dotyczy normy. Nie przyjęto też jednolitego sposobu cytowania literatury. W niektórych pozycjach tytuły czasopism podawane są raz skrótami (np. pozycja 2: Eur. Food Res. Technol.) a raz w pełnym brzmieniu (np. poz.1. Progress in Energy ad Combustion Science). W pozycji 10, zbędne są skróty „Vol.” i “No.” W niektórych pozycjach brak numeru wolumenu lub zeszytu, brak stron lub są niepełne dane (poz. 3, 17, 56) albo podane są tylko strony, bez wolumenu i zeszytu (poz. 8, 18, 27, 48). Nazwy drobnoustrojów powinny być pisane kursywą. W tytule artykułu

przywołanego jako poz. 33, str. 118, jest błędna nazwa „Dacharomyces Cerevisiae”; powinno być „*Saccharomyces cerevisiae*”.

Pod względem edytorskim praca jest przygotowana z poprawnie, z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o drobnych uchybieniach redakcyjnych. Na stronie 48 pojawia się „furfualnu” powinno być „furfuralu”. Doktorantka stosuje różne oznaczenia dla jednostek objętości: raz cm³ raz ml. Pojawiają się błędy interpunkcyjne i stylistyczne. Autorka stosuje formy osobowe, choć w publikacjach naukowych powinno unikać się tego typu form (dla przykładu s. 10 „wyróżniamy”, s. 11 zaliczamy”, s. 15 „moja, „projektuję”, „wdrażam”; s. 112 i 113 „moja”, „podejmuję”, „opracowałam, zbadałam”). Lepiej zastosować formy bezosobowe. Tabele i wykresy nie zawsze zostały odpowiednio przywołane w tekście rozprawy. Dla przykładu wykresy są w innej kolejności niż zaprezentowane w tekście rozprawy (np. najpierw wykres 29, potem 27, i 30), lub są wcześniej zaprezentowane, a dopiero później opisane w tekście (np. Wykresy 1-6; oraz Wykresy 19-22), albo nie są wcale przywoływane np. wykres 20 i 28. Nie przywołano też zdjęć w tekście rozprawy (np. zdjęcia 4-6). Na niektórych wykresach są zbędne tytuły np. Wykresy 37-41. Są to jednak uchybienia, które nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. Podsumowując, od strony formalnej praca nie budzi moich zastrzeżeń.

Ocena strony merytorycznej pracy

W ocenianej rozprawie Autorka podjęła się trudnego zadania, przeniesienia skali badań z prowadzonych w laboratorium, do skali technicznej. Tytuł, choć rozbudowany, dobrze oddaje zawartość pracy. Mam jednak wątpliwość, czy nie lepiej byłoby zamiast „etanolu” użyć „spirytusu surowego”, ponieważ produktem w gorzelnii jest spirytus surowy a nie sam etanol. Streszczenie jest częściowo przygotowane poprawnie. Brak w nim wprowadzenia nakreślającego ważność podejmowanego tematu. Rozpoczyna się ono od części metodycznej, gdzie Autorka rozprawy wskazuje na sposób prowadzenia badań, po czym informuje o celu pracy, a następnie powraca do części metodycznej, opisując jakich dokonano analiz i co badano. Na końcu streszczenia zabrakło wskazania, czy założony cel został zrealizowany i jakie są najważniejsze wnioski.

Przegląd literatury zamieszczony we wstępie pracy podkreśla ważkość i aktualność podjętego tematu badawczego. Autorka rozprawy informuje (s. 8), że przeprowadzono „szereg badań” i „opublikowano wiele prac”, ale nie poparła tych stwierdzeń odpowiednimi przykładami z literatury. Brakuje informacji, jakie wyniki uzyskano w procesach jednostkowych, jakie surowce analizowano, jaką wydajność uzyskiwano, jakie zastosowano enzymy w tych procesach, jaka była ich efektywność. Uważam, że ta część powinna być bardziej rozbudowana i lepiej osadzona w literaturze przedmiotu, zwłaszcza, że Autorka stwierdza, że wyniki te rzadko były weryfikowane w skali przemysłowej, a jednym z istotnych elementów tej rozprawy jest skalowanie procesu do skali przemysłowej.

Następnie Autorka przedstawia krótko historię gorzelnictwa oraz panujące trendy związane ze stosowanymi surowcami do produkcji etanolu oraz wyzwaniem, jakie stoją przed gorzelniami, które chcą stosować różne surowce i szybko reagować na ich zmiany związane z dostępnością surowców, które stanowią niejednokrotnie ponad 50% kosztów ponoszonych przez gorzelnie. Doktorantka wskazała też ważność etapu przygotowania surowca, zwłaszcza procesu hydrolizy; wspomniała o typowych enzymach stosowanych w tym procesie. Następnie pokrótce przybliżyła, jakie powstają produkty uboczne, skupiając uwagę na wywarze gorzelnicznym, oraz jego frakcjach i produkcie paszowym – DDGS. Omówiła technologię SSF, oraz wady i zalety stosowania technologii VHG. Następnie wskazała i omówiła główne czynniki stresowe wpływające na wydajność drożdży w fermentacji alkoholowej, wspomniała o badaniach nad zmniejszeniem negatywnego wpływu warunków środowiska na komórki drożdżowe, oraz wskazała na konieczność badań nad poprawą efektywności produkcji etanolu.

Podsumowując, przegląd literatury jest generalnie osadzony na tle osiągnięć innych badaczy, nakreśla postawiony problem badawczy, wskazuje konieczność jego rozwiązania, co jest niezwykle istotne i trudne zwłaszcza ze względu na przeskalowanie procesu. Uważam jednak, że Autorka rozprawy słabo definiuje lukę badawczą, można było wyraźniej zaakcentować elementy nowości.

Za cel pracy Doktorantka przyjęła optymalizację procesu otrzymywania spirytusu surowego pod kątem stosowanych enzymów, parametrów i warunków prowadzenia procesu. Druga część celu w mojej opinii, jest stwierdzeniem, dokonanych czynności, a nie celem. W mojej opinii lepszym sformułowaniem byłoby np. „ocena i zbadanie wpływu procesu hydrolizy enzymatycznej na proces fermentacji alkoholowej oraz jakość uzyskiwanego DDGSu” zamiast „opis zależności pomiędzy procesem hydrolizy enzymatycznej, fermentacją alkoholową a jakością uzyskiwanego DDGSu”. Następnie sformułowano poprawnie cztery cele szczegółowe, oraz pięć hipotez badawczych. Szkoda, że dotyczą one tylko procesów w skali przemysłowej.

W kolejnym rozdziale dokonała charakterystyki stosowanych surowców, oraz zawarła opis metodyki badań. Podrozdział 3.1 nazwała „Surowce i odczynniki”, ale nie zawarła w nim opisu stosowanych odczynników. Na stronach 17-19, Doktorantka przedstawiła wybrane właściwości organoleptyczne zastosowanego surowca. Uważam jednak, że część ta mogła być lepiej dopracowana, ponieważ przypomina raport z badań: zdjęcia 1 i 2 nie są przywołane w tekście pracy, podobnie jak tabela 2. Procedura zakupu i kisenia, nie jest zrozumiała. W odniesieniu do „Analiza jakości surowca” – nie wiadomo kiedy ona ma nastąpić, ale wiadomo, że jeden rękaw ma pojemność 40 ton. W podrozdziale 3.1.2 Autorka na podstawie kart charakterystyki produktów przedstawiła zastosowane enzymy, następnie scharakteryzowała zastosowane drożdże, ale w obu przypadkach nie podała ich producentów.

Dalej Doktorantka przedstawiła wystarczająco dokładnie zakres prowadzonych badań; bardzo pomocne są zamieszczone schematy (1-8) do każdej części. W sposób przejrzysty obrazują one przyjętą koncepcję, co bardzo ułatwia jej zrozumienie. Uważam jednak, że powinny być one umieszczone zaraz po pierwszym przywołaniu. W manuskrypcie zostały one umieszczone dość daleko od pierwszej wzmianki w tekście, prawdopodobnie ze względu na to, że Autorka chciała zachować pełny schemat na stronie, bez jego „złamania”, a stosowany program do edycji nie pozwolił na lepsze sformatowanie tekstu.

Przebieg prac eksperymentalnych Doktorantka opisała wystarczająco dokładnie. Schematy uzupełniają tabele, które zestawiają warianty prowadzonych eksperymentów, co pomaga lepiej zrozumieć przyjętą koncepcję.

W kolejnym kroku Doktorantka przedstawiła proces technologiczny, jaki został zastosowany w zakładzie, w którym prowadzono badania w skali przemysłowej. Na schemacie 9, obrazującym etapy otrzymywania etanolu, jako ostatni Autorka wskazała „Instalacja obróbki wywaru”, co w procesie produkcji nie jest etapem, (etapem jest „obróbka”, nie „instalacja”). Na stronie 36 zamieściła wskaźniki, jakie będą kontrolowane i monitorowane w trakcie fermentacji etanolowej, i tu mam zastrzeżenia, co do sformułowania „spadek zawartości węglowodanów” i „wzrost stężenia etanolu”, ponieważ parametrem jest „zawartość węglowodanów” i „stężenie etanolu”.

Następnie Autorka opisała przebieg procesu zacierania i procesu fermentacji alkoholowej, który uzupełniła o zestawienie urządzeń wchodzących do instalacji i schematy blokowe. Dodatkowo dla działu fermentacji zaprezentowała schemat procesowy, wskazała też jakie parametry będą monitorowane. Następnie przeszła do opisu przebiegu procesu destylacji i produkcji DDGS, wskazała jakie urządzenia wchodzi w skład układu destylacji, oba procesy zilustrowała schematami blokowymi.

W kolejnym podrozdziale Autorka pracy zaprezentowała metody analityczne, jakie wykorzystywała do oceny skuteczności zaproponowanego rozwiązania. Na stronie 44, Zdjęcie 4 nie jest przywołane w tekście rozprawy. Na tej stronie też jest pierwsze równanie, które nie zostało oznaczone numerem. Na stronie 45 Autorka podaje parametry dotyczące wirowania, ale nie wskazała, jaki został użyty model wirówki. Lepiej byłoby podać wartość siły odśrodkowej, można wtedy szybko adaptować wartości do innego modelu wirówki.

Przy opisie zastosowanego zestawu do chromatografii, nie przywołano dwóch zamieszczonych zdjęć 5 i 6. Nie wskazano też jaki detektor był zastosowany do analiz, wymiarów kolumny, eluentu, jego szybkości przepływu oraz zastosowanych standardów. Doktorantka poprawnie przygotowała zaś opis dotyczący pomiaru etanolu, oraz aldehydów, estrów, metanolu, olejów fuzlowych furfuralu i izopropanolu z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej. W części dotyczącej metod zabrakło mi opisu stosownych metod statystycznych do oceny uzyskanych wyników.

Podsumowując, mimo uchybień, część metodyczna opisana jest zrozumiałym językiem, zawiera niezbędne informacje pozwalające na odtworzenie prac w laboratorium, a zastosowane metody analityczne są poprawnie dobrane. Dodatkowo, przedstawione schematy ułatwiają podążanie za koncepcją autorki. Zaplanowane badania są logiczne i układają się w całość.

W kolejnym rozdziale Autorka zaprezentowała uzyskane wyniki wraz z ich omówieniem. Rozpoczęła od prezentacji rezultatów, jakie uzyskała dla testów w skali laboratoryjnej. Przeanalizowała, jak zmieniała się zawartość węglowodanów w zacierach upłynnionych. Moje zastrzeżenie do tej części dotyczy dość późnego przywołania wykresów; można też było przygotować wykres zbiorczy podsumowujący wyniki, co ułatwiłoby porównanie wariantów eksperymentów. Uzyskane wartości nie zostały poddane analizie statystycznej, np. ANOVA, ale dobrze, że na wykresach zamieszczono odchylenia standardowe.

. W kolejnym podrozdziale zamieszczono wyniki dotyczące optymalizacji procesu hydrolizy. Zamieszczone wykresy są czytelne i dobrze obrazują treść, choć znów są przywołane zbyt późno w stosunku do ich prezentacji. Pojawiło się w tym miejscu kilka wątpliwości. Autorka stwierdziła, że przeprowadziła „analogiczne próby”, ale nie podaje czego dotyczy analogia (s. 53); podobne stwierdzenie zamieściła na s. 56 („analogiczne testy”).

Dalej Doktorantka przeszła do omówienia przebiegu procesu fermentacji alkoholowej, analizowała zawartość ekstraktu pozornego, etanolu, stan fizjologiczny komórek stosowanych drożdży w zależności od przyjętego wariantu eksperymentu. Wyniki przedstawiono w postaci dobrze dobranych wykresów, do których jak poprzednio mam uwagę dotyczącą zbyt późnego ich przywoływania w stosunku do pierwszej wzmianki w tekście. Ten podrozdział można było zakończyć krótkim podsumowaniem wprowadzającym do następnego etapu badań.

Następnie Autorka analizowała dynamikę procesu fermentacji dla stosowanych drożdży poprzez ocenę ubytku CO₂, w trakcie trwania eksperymentów. Oprócz opisu, dobrze zaprezentowała graficznie uzyskane wyniki i zamieściła trafne podsumowanie. Stwierdziła, że rodzaj zastosowanych drożdży miał wpływ na dynamikę procesu, pomógł też dodatek enzymu: czas trwania fermentacji był krótszy i aktywność fermentacyjna wyższa, niż w próbach bez wspomaganie dodatkową dawką enzymu.

Poddała ocenie wydajność procesu fermentacji i jakość uzyskanego etanolu w zależności od zastosowanego rodzaju drożdży dla każdego eksperymentu badań laboratoryjnych.

W tabeli 7 pokazała wyniki dotyczące mocy oraz zawartości aldehydów estrów, metanolu olejów fuzlowych oraz furfuralu i izopropanolu. Uzyskane wyniki poprawnie skomentowała z odniesieniem do wytycznych zawartych w Polskiej Normie PN-A-79523. Ten etap badań można było zakończyć podsumowaniem, jakie parametry zostały przyjęte do badań w skali przemysłowej.

W następnej części rozprawy Doktorantka dokonała oceny rezultatów uzyskanych w procesach w skali przemysłowej. Tylko w tym miejscu Autorka pracy odnosi się do postawionych przez siebie hipotez (wcześniej wspomina o jednej w części dotyczącej metod na s. 29). W obu jednak miejscach nie przywołuje dokładnie postawionej hipotezy, a prezentuje ją w postaci zmienionej (por. s.16 i s. 29 i 81). Proszę o wskazanie czy postawione hipotezy zostały zrealizowane i która część prezentowanych wyników jest tego dowodem.

Autorka przeanalizowała, jak sposób dozowania enzymów wpływa na lepkość zacierów, szczególnie uwagę zwróciła na eksploatację urządzeń wchodzących w skład instalacji. Złe dobranie parametrów w etapie kleikowania i upłynniania może skutkować zbyt dużym obciążeniem i w konsekwencji powodować awarię instalacji. Jest to niezwykle cenne z punktu widzenia realnej pracy zakładu, nie do zweryfikowania w skali laboratoryjnej. Doktorantka wykazała, że dodanie enzymu już na etapie mielenia surowca spowodowało zmniejszenie lepkości zacieru. To pozwoliło na zmniejszenie ilości koniecznych postojów produkcyjnych, mniejszym obciążeniem silników elektrycznych, co w się przekłada na mniejsze zużycie energii elektrycznej. Dalej oceniła skuteczność działania enzymów, poprzez analizę zawartości węglowodanów w zacierach. Przeanalizowała zmiany stężenia dekstryn, maltotriozy, maltozy i glukozy w zależności od zastosowanego preparatu enzymatycznego, a następnie sprawdziła jaki był wpływ pH, temperatury i czasu prowadzenia reakcji, na jakość otrzymanego zacieru, parametry wzrostu drożdży gorzelniczych, przebieg procesu fermentacji, ilość powstających produktów ubocznych, oraz jakość powstającego produktu finalnego (Doktorantka posługuje się w odniesieniu do produktu finalnego terminem „alkohol etylowy”, lepiej byłoby „spirytus surowy”).

Doktorantka analizowała też jaki miał wpływ dodatek enzymów oraz użycie konkretnych szczepów na drożdży na przebieg procesu fermentacji alkoholowej. W tym celu prześledziła jak zmienia się ekstrakt pozorny, zawartość etanolu, oraz jaki był stan fizjologiczny stosowanych drożdży. Dokonała też oceny

dynamiki procesów poprzez kontrolę ubytku CO₂.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka dysertacji ustaliła parametry procesowe dla skali przemysłowej.

Doktorantka dla każdego z wariantów zbadała jakość otrzymanego spirytusu surowego. W tym celu oznaczyła moc alkoholu, zawartość aldehydów, estrów, metanolu, olei fuzlowych, furfuralu oraz izopropanolu. Ta część opisu zawiera elementy dyskusji, np. akapit pod Tabelą 10a str. 98, oraz część akapitu 2 od „Istnieje wiele teorii (..)” do końca.

Otrzymane produkty charakteryzowały się mocą w zakresie 93,5 – 94,6% obj. Nie wykryto obecności izopropanolu i furfuralu, ich zawartość była poniżej dopuszczalnej wartości zdefiniowanej w Polskiej Normie.

Następnie autorka dokonała oceny jakości DDGS. Pierwszy i drugi akapit na stronie 101, powinien znaleźć się części teoretycznej, ponieważ stanowi ważne uzasadnienie podjętego tematu badawczego. Ocena dotyczyła zawartości białka ogólnego, tłuszczu, włókna surowego, skrobi, obecności bakterii *Salmonella*, oraz barwy. Zdecydowanie wyższe wyniki ze względu na zawartość białka oraz tłuszczu i skrobi uzyskano dla próbki IA, w żadnej nie odnotowano obecności bakterii *Salmonella*. Nie stwierdzono, też oznak przegrzania i przypalenia w trakcie procesu suszenia, a barwę określono jako złoto-brunatną.

Podsumowując, ta część pracy została opisana logicznie i zwięźle, a moje uwagi mają charakter dyskusyjny, nie mają wpływu na ocenę końcową przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej.

Następnie Autorka przeszła do dyskusji wyników, która jest przemyślana, prowadzona w sposób logiczny i rzeczowy. Autorka umiejętnie dobrała literaturę i poprawnie dokonała interpretacji własnych wyników badań, przeanalizowała oraz zestawiała z uzyskanymi przez innych autorów. Świadczy to o umiejętności analizy i interpretacji własnych wyników badań w świetle osiągnięć przedstawionych w literaturze przedmiotu.

Na zakończenie Autorka sformułowała wnioski przedstawiające jej osiągnięcia wraz z rzeczowymi do nich komentarzami. Moim zdaniem zabrakło wniosków dotyczących jakości uzyskanego DDGS-u.

Oceniana praca doktorska jest niewątpliwie oryginalnym dziełem naukowym, w którym Doktorantka wykazała przygotowanie teoretyczne, w tym wiedzę w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie technologia żywności i żywienia, samodzielność w prowadzeniu badań naukowych, znajomość metod analitycznych i badawczych; umiejętność obiektywnej oceny z krytycznym komentarzem oraz interpretacji wyników badań. Docenić należy pracę wykonaną w skali przemysłowej, ze względu na koszty takich prób jak i wyniki, jakie w tej części uzyskała, nie do przetestowania w skali laboratoryjnej. Rzadko zdarzają się okazje, w których doktorant ma okazję przeskalować proces i testować założenia w realnych warunkach produkcyjnych. Z tego powodu wysoko oceniam wdrożenie przedstawionego w rozprawie rozwiązania.

Podsumowując, przekazaną mi pracę do recenzji oceniam pozytywnie. Wyniki badań udokumentowano w sposób, który nie budzi wątpliwości czytelnika. Określony w pracy cel badawczy został zrealizowany. Zagadnienie właściwie umiejscowiono na tle literatury przedmiotu i poprawnie dobrano metody badawcze. Zawarte w recenzji uwagi mają charakter głównie redakcyjny i dyskusyjny, nie mają wpływu na ocenę końcową przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. Rozprawa spełnia warunki określone w art. 1487 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 poz. 85 ze zm.). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Justyny Anny Rębas do dalszych etapów postępowania prowadzącego do otrzymania stopnia naukowego dra nauk rolniczych w zakresie technologia żywności i żywienia.

Wrocław, dnia 06.12.2022 r.



Małgorzata Krzywonos