

Dr hab. Barbara Stachowiak  
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny Paszkot  
pt. „Projektowanie piw ciemnych o wysokim potencjale antyoksydacyjnym”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab.  
Joanny Kawy-Rygielskiej

**PODSTAWA FORMALNO-PRAWNA PRZYGOTOWANIA RECENZJI**

Niniejszą recenzję wykonano w odpowiedzi na Uchwałę nr 35.2023.TZZ (z dn. 26.09.2023 r.) podjętą przez Radę Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz pisma Przewodniczącej Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienie Człowieka prof. dr hab. Agnieszki Kity z dn. 27.09.2023. Recenzję wykonano w oparciu o przepisy Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 ze zmianami).

Przesłana do recenzji dokumentacja:

- wydruk rozprawy doktorskiej
- elektroniczna wersja rozprawy doktorskiej, autoreferatu (1 str), raportu dorobku (2 str.), streszczenie w j. polskim (3 str.) i angielskim(3 str.) – pliki zapisane na płycie CD

**INFORMACJE OGÓLNE O KANDYDATCE**

Pani mgr Justyna Paszkot jest absolwentką Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, który ukończyła w 2018 roku uzyskując dyplom magistra inżyniera na podstawie pracy pt. „Projektowanie piw o wysokim potencjale antyoksydacyjnym”. W tym samym roku na tej Uczelni podjęła studia doktoranckie w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Badania w ramach pracy doktorskiej zrealizowała w Katedrze Technologii Fermentacji i Zbóż pod kierunkiem Prof. dr hab. Joanny Kawy-Rygielskiej. Od roku 2021 Pani Justyna Paszkot została zatrudniona na stanowisku asystenta badawczo-dydaktycznego w tejże Katedrze.

Zakres zainteresowań badawczych Doktorantki obejmuje tematy związane z projektowaniem receptur i technologii produkcji żywności fermentowanej (głównie piw), wpływem surowców podstawowych (w tym słodów specjalnych), dodatków, różnych ras drożdży i samego procesu technologicznego na parametry fizykochemiczne, sensorykę i profil związków lotnych piw. W kręgu jej zainteresowań pozostają również związki bioaktywne obecne w piwie, zwłaszcza fenolowe i ich przemiany jakościowe i ilościowe podczas procesu fermentacji. Badania w tym zakresie zamierza rozwijać.

Doktorantka jest współautorką 14-stu publikacji naukowych (w tym 9 zostało opublikowanych w czasopismach z listy JCR) o sumarycznej ilości pkt. MEiN 1200 oraz IF 46,713; 9-ciu wystąpień i posterów prezentowanych na konferencjach naukowych, w tym posteru wyróżnionego jako najlepszy na I

Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej pn. „Dolny Śląsk jako lider w sektorze nutraceutyków, żywności prozdrowotnej i suplementów diety”. Publikacje Doktorantki cieszą się dużym zainteresowaniem (Sukcesy publikacyjne Doktorantki zostały docenione w roku akademickim 2020/2021 – podniesiono jej stypendium doktoranckie z dotacji projakościowej, a w roku 2021 otrzymała dofinansowanie w ramach projektu badawczego „Innowacyjny Doktorat” na rodzimym Uniwersytecie. Ukończyła trzy kursy doszkalające z zakresu analizy sensorycznej żywności, w tym jeden o zasięgu międzynarodowym.

### **OCENA FORMALNA PRACY**

Przedłożona do recenzji praca doktorska w formie wydruku liczy 130 stron i można w niej wyodrębnić dwie części. Pierwsza zawiera streszczenie w j. polskim (3 str.) i angielskim (3 str.), część teoretyczną, czyli wprowadzenie do tematyki badawczej (12 str.); cel pracy (1 str.) i hipotezy badawcze (1 str.); syntetyczny opis postępowania eksperymentalnego obejmujący przyjęty model badawczy, stosowane materiały i metody badań (10 str.); oraz opis wyników z krótką dyskusją, które uzyskano w badaniach przedstawionych szczegółowo w publikacjach zamieszczonych w drugiej części opracowania (18 str.), podsumowanie (3 str.), wnioski (3 str.) i spis literatury (7 str.). Ta część rozprawy ma więc układ typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym i pod względem formalnym nie budzi zastrzeżeń.

W drugiej części dysertacji zamieszczono kopie czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (56 str.), wraz z oświadczeniami współautorów nt. ich wkładu w powstałe artykuły (11 str.):

- (1) Gašior, J., Kawa-Rygielska, J., & Kucharska, A.Z. (2020). Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains. *Molecules*, 25(17), p. 3882. (punkty MNiSW: 140, IF 4,412)
- (2) Paszkot, J., Kawa-Rygielska, J., & Anioł, M. (2021). Properties of dry hopped dark beers with high xanthohumol content. *Antioxidants*, 10(5), p. 763. (punkty MNiSW: 100, IF 7,675)
- (3) Paszkot, J., Kawa-Rygielska, J. (2022). Yeast strains and wort color as factors affecting effects of the ethanol fermentation proces. *Molecules*, 27(13), p. 3971. (punkty MNiSW: 140, IF 4,6)
- (4) Paszkot, J., Gasiński, A., & Kawa-Rygielska, J. (2023). Evaluation of volatile compound profiles and sensory properties of dark and pale beers fermented with different strains of brewing yeast. *Scientific Reports*, 13(1), p. 6725. (punkty MNiSW: 140, IF 4,6)

Prace te stanowią zbiór powiązanych tematycznie artykułów naukowych o charakterze eksperymentalnym i zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych z listy Journal Citation Reports (JCR) w latach 2020-2023. Sumaryczny IF publikacji wynosi 21,287, a łączna suma punktów, zgodnie z wykazem MNiSW z roku publikacji 520. Uzyskanie tak wysokich parametrów naukometrycznych, uważam za duży sukces Doktorantki. Pomimo, że prace są wieloautorskie (dwóch i trzech współautorów), to należy podkreślić, że we wszystkich publikacjach jest Ona zarówno pierwszym, jak i korespondencyjnym autorem. Analizując oświadczenia wszystkich współautorów publikacji, wnioskuję, że Jej udział w tworzeniu publikacji był znaczący i polegał na współtworzeniu koncepcji badań, planowaniu metodologii badań, samodzielnym wykonaniu brzeczek i piw laboratoryjnych, przygotowaniu próbek do analiz i samodzielnym wykonaniu większości analiz laboratoryjnych oraz współuczestniczeniu w wykonaniu pozostałych. Doktorantka miała znaczący udział w analizie i interpretacji wyników badań, w tym analizie statystycznej, wykonała wykresy i

schematy zawarte w publikacjach. Przygotowywała również tekst manuskryptu stanowiący rozprawę doktorską. Pozwala to na stwierdzenie, że mgr inż. Justyna Paszkot uzyskała efekty kształcenia przewidziane wg Europejskich Ram Kwalifikacyjnych dla ósmego (doktoranckiego) poziomu kształcenia. Posiada umiejętność opracowania koncepcji badań, potrafi zaplanować i wykonać eksperyment, umie także opracować wyniki badań oraz przygotować artykuł do druku w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Należy zaznaczyć, że rola recenzenta w przypadku tego rodzaju rozprawy jest mocno ograniczona, gdyż poszczególne publikacje przeszły już szczegółową ocenę w wydawnictwach czasopism.

## **OCENA MERYTORYCZNA PRACY**

### Dobór tematyki badawczej

Poprawa aktywności przeciwutleniającej żywności i napojów jest obecnie promowaną strategią w poprawie ludzkiego zdrowia. Obecność antyoksydantów w diecie przyczynia się do neutralizacji wolnych rodników i redukcji stresu oksydacyjnego, którego udział w patogenezie chorób cywilizacyjnych (m. in. układu krążenia, pokarmowego, nowotworowe, neurodegeneracyjne, cukrzyca, otyłość, osteoporoza) jest bezsprzeczny. Piwo z uwagi na powszechność konsumpcji (trzeci po herbacie i kawie najbardziej popularny napój spożywany na świecie) może być doskonałym ich źródłem. Wśród przeciwutleniaczy piwa wymienić należy: SO<sub>2</sub> produkowany przez drożdże podczas fermentacji, melanoidyny (powstają głównie podczas suszenia i prażenia słodu, lecz również zacierania i gotowania brzeczki), witaminy B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, E oraz selen i liczne związki polifenolowe. Badania naukowe wskazują, że istnieje istotna dodatnia korelacja między ich poziomem a aktywnością antyoksydacyjną piwa. Zawartość polifenoli w piwie zależy od rodzaju użytego słodu, chmielu oraz zastosowanej metody produkcji. Wskazuje się, że aż 70-80% tych związków pochodzi ze słodu, a 20-30% – z chmielu. Zawartość ekstraktu ma wpływ na aktywność przeciwutleniająca piw. Piwa ciemne mają znacznie wyższą zawartość polifenoli i aktywność antyoksydacyjną niż piwa jasne. Aktywność przeciwutleniająca wybranych piw komercyjnych kształtuje się następująco: piwo bezalkoholowe < lager < pilzner < pszeniczne < ale < abbey < koźlak < porter (Yang D., Gao X. 2021: Research progress on the antioxidant biological activity of beer and strategy for applications. Trends in Food Science and Technology 110: 754-764).

Flawonoidy prenylowane zaliczyć należy do najważniejszych polifenoli piwa. W grupie tych związków najliczniejszy jest ksantohumol o wielokierunkowym, działaniu prozdrowotnym i terapeutycznym wynikającym z wysokiej aktywności przeciwutleniającej zbliżonej do katechin z zielonej herbaty i kilkukrotnie silniejszej niż aktywność witaminy C i E. Wykazano, że piwa ciemne zawierają znacząco więcej ksantohumolu niż piwa jasne, co przypisuje się ograniczeniu jego izomeryzacji do izoksantohumolu (związku o niższej aktywności biologicznej) przez wysokocząsteczkowe związki Maillarda zawarte w sładach ciemnych użytych do ich produkcji.

Zatem dobór surowców do produkcji piwa pod kątem zawartości przeciwutleniaczy oraz sposób jego otrzymywania stwarzają możliwość świadomego kreowania potencjału przeciwutleniającego produktu finalnego. Uwzględniając trendy konsumenckie, taki kierunek rozwoju branży piwnej powinien być rozwijany. A zatem podjęta w ramach przygotowanej rozprawy doktorskiej tematyka badawcza jest aktualna, istotna i uzasadniona.

## Wprowadzenie

Pierwszy rozdział pracy Wprowadzenie jest wyczerpujące i wskazuje na bardzo dobrą orientację Doktorantki w poruszanej tematyce badawczej. Stanowi wnikliwe, przemyślane i dojrzałe studium literaturowe nt. surowcowych i technologicznych aspektów dotyczących aktywności przeciwutleniającej piw. Przedstawione treści pozwalają w znakomity sposób zrozumieć, prześledzić i ocenić zamysł badawczy Doktorantki, sposób jego realizacji, interpretację otrzymanych wyników badań, i wyciągnięte na ich podstawie konkluzje. Wprowadzenie zostało przygotowane na podstawie aktualnych i prawidłowo dobranych źródeł literaturowych. Tę część pracy oceniam bardzo wysoko.

## Cel pracy i hipotezy badawcze

Głównym celem badań Doktorantki była ocena potencjału wykorzystania sódów ciemnych i prażonych ziaren zbóż, dobór technologii produkcji oraz szczepów drożdży w kształtowaniu jakości piw ciemnych o zwiększonej zawartości związków fenolowych i aktywności antyoksydacyjnej. Realizację tego celu Doktorantka zaplanowała poprzez wyodrębnienie następujących celów szczegółowych:

- I. Określenie potencjału wykorzystania sódów ciemnych i prażonych ziaren zbóż w procesie technologicznym pozyskiwania brzeczek laboratoryjnych o zwiększonym potencjale przeciwutleniającym
- II. Opracowanie receptury i technologii produkcji piw ciemnych o wysokiej zawartości ksantohumolu
- III. Analiza wpływu doboru szczepu drożdży oraz zastosowania ciemnych sódów na efekty procesu fermentacji etanolowej
- IV. Określenie wpływu doboru szczepu drożdży oraz zastosowania ciemnych sódów na kompozycję lotnych związków oraz cechy sensoryczne piw

Nakreślone przez Doktorantkę cele zostały jasno sprecyzowane. Dla lepszej percepcji, formułując cel szczegółowy III i IV pominęłabym jednak słowo „doboru” oraz „zastosowania”. Zdecydowanie lepiej brzmią zdania:

Ad. III: Analiza wpływu szczepu drożdży oraz ciemnych sódów na efekty procesu fermentacji etanolowej

Ad IV: Określenie wpływu szczepu drożdży oraz ciemnych sódów na kompozycję lotnych związków oraz cechy sensoryczne piw.

Sposób realizacji celów szczegółowych przedstawiony został w publikacjach 1-4. Przeprowadzając zaplanowane badania, Doktorantka postawiła hipotezy badawcze, w których założyła, że:

- I. Zastosowanie ciemnych sódów lub ziaren zbóż prażonych w technologii piwowarstwa stanowi metodę zwiększenia zawartości związków fenolowych o działaniu przeciwutleniającym w brzeczkach
- II. Profil węglowodanowy, zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu oraz barwa brzeczek są kształtowane przez zastosowanie ciemnych sódów lub ziaren zbóż prażonych w recepturze zasypu słodowego
- III. Modyfikacja składu surowców i przebiegu procesu technologicznego pozwala na otrzymanie piw ciemnych o zwiększonej zawartości ksantohumolu
- IV. Przebieg procesu fermentacji, cechy fizykochemiczne, potencjał przeciwutleniający oraz zawartość związków fenolowych w piwach ciemnych zależą od doboru szczepów drożdży piwowarskich stosowanych w procesie fermentacji

- V. Profil związków lotnych i właściwości sensoryczne piw są kształtowane przez kompozycję zasypu słodowego oraz dobór szczepów drożdży piwowarskich zastosowanych w procesie fermentacji

Sformułowane hipotezy są spójne z założonymi celami badań.

### Postępowanie eksperymentalne

W tym punkcie Doktorantka przedstawiła szczegółowy zakres prac badawczych w postaci schematu 1. Wydzielone etapy badawcze (1-4) stanowią de *facto* realizację celów szczegółowych wyodrębnionych w pracy. Szkoda, że nie zostało to zaznaczone na rysunku (zamiast etap, powinien być wpisany cel szczegółowy). Wprowadza to niepotrzebną dezorientację u czytelnika, zwłaszcza, że tytuły etapów 2-4 zostały zmienione i uszczegółowione w odniesieniu do odpowiednich celów szczegółowych (Etap 2: zamiast zawartości ksantohumolu użyto sformułowania „zawartości związków biologicznie aktywnych”; Etap 3: zamiast „Analiza wpływu doboru szczepu drożdży oraz zastosowania ciemnych słodów na efekty procesu fermentacji etanolowej” wpisano „Ocena wpływu doboru materiału biologicznego na parametry fizykochemiczne piw jasnych i ciemnych górnej i dolnej fermentacji”; Etap 4: zamiast „Określenie wpływu szczepu drożdży oraz ciemnych słodów na kompozycję lotnych związków oraz cechy sensoryczne piw” wpisano „Badanie wpływu doboru materiału biologicznego na profil związków lotnych piw jasnych i ciemnych górnej i dolnej fermentacji”).

Uważam to za niepotrzebny zabieg, tym bardziej, że realizowany zakres prac badawczych w poszczególnych etapach wskazuje wyraźnie na rodzaj wykonywanych badań i analiz.

Pkt. 4.2 Model badawczy uważam za zbędny. Nie wnosi on nic nowego do pracy i być może został omyłkowo włączony do pracy, na co wskazuje niespójna numeracja tej części rozprawy? Proszę o ustosunkowanie się do tego przypuszczenia.

W pkt. 4.3 W tabelach 1-3 Doktorantka przedstawia materiał badawczy wykorzystany w ramach realizacji niniejszej pracy korzystając z informacji podanych przez producenta lub ogólnodostępnych, stąd z tytułów tabel usunęłabym słowo „Charakterystyka”.

W pkt. 4.4. przedstawiono aparaturę badawczą i stosowane metody analityczne podczas realizacji pracy. Informacje tam zawarte opisano szczegółowo w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

### **CYKL PUBLIKACJI**

W pracy wykorzystane zostały trzy rodzaje słodów ciemnych: czekoladowy jasny (JC), czekoladowy ciemny (CC), pszeniczny czekoladowy (PC) oraz prażone ziarna zbóż: jęczmień prażony (PJ) i jęczmień brown (JB), a także chmiele: Marynka, Lubelski, Amarillo, Cascade, Centennial, Galaxy oraz drożdże o zróżnicowanej charakterystyce metabolicznej: klasyczne drożdże piwowarskie dolnej fermentacji *Saccharomyces pastorianus* S23 i górnej fermentacji *S. cerevisiae* S04 oraz niekonwencjonalne drożdże górnej fermentacji *S. cerevisiae* var. *diastaticus* oraz *S. cerevisiae* typu kveik (rozprawa: pkt. 4.3 tab. 1-3).

### **Publikacja (1)**

Celem pracy była ocena możliwości kształtowania właściwości piw na etapie produkcji brzezki browarniczej z wykorzystaniem różnego rodzaju słodów specjalnych (czekoladowy jasny, czekoladowy ciemny, pszeniczny czekoladowy, jęczmień brązowy) oraz prażonych ziaren jęczmienia.

W 1 publikacji Doktorantka skupiła się na określeniu wpływu w/w słodów ciemnych i prażonych ziaren jęczmienia na jakość brzezki piwowarskiej. Brzezki otrzymano metodą infuzyjną w wyniku filtracji zacierów wytworzonych z 90% słodu pilzneńskiego oraz 10% dodatku wybranego słodu ciemnego lub prażonego ziarna jęczmienia (I seria doświadczeń) oraz zacierów wytworzonych z 60-80% słodu pilzneńskiego oraz 20-40% słodu czekoladowego ciemnego. Próbę kontrolną stanowiła brzezka przygotowana ze 100% słodu pilzneńskiego (II seria doświadczeń). Jako determinanty jakości brzezki Doktorantka wskazała: profil węglowodanowy (glukoza, maltoza, maltotrioza, dekstryny), zawartość związków fenolowych (TPC), właściwości przeciwutleniające (zdolność do redukcji jonów żelaza FRAP, aktywność antyrodnikowa ABTS<sup>•+</sup>), indeks brązowienia i zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu jako miara zawartości produktów reakcji Maillarda.

**Jako osiągnięcie naukowe przeprowadzonych badań, Doktorantka uznała wskazanie zmian w parametrach technologicznych i właściwościach przeciwutleniających brzeczek piwowarskich spowodowanych dodatkiem ciemnych słodów lub prażonych ziaren zbóż.**

Uzyskane w ramach pracy wyniki wykazały, że zastosowanie słodów czekoladowych lub prażonych ziaren jęczmienia w dawce 10% do zasypu, zwiększa zawartość związków fenolowych i potencjału przeciwutleniającego brzeczek (odnotowano wzrost wartości FRAP i ABTS<sup>•+</sup>) przy niewielkich zmianach w profilu węglowodanowym. W tym wypadku, najwyższe wartości wymienionych parametrów odnotowano dla wariantów brzeczek CC i JP. Rodzaj słodowanego zboża miał wpływ na badane parametry brzeczek. Brzezka PC (zasyp z dodatkiem słodu pszenicznego) charakteryzowała się niższą zawartością węglowodanów w porównaniu z pozostałymi brzeczkami wytwarzanymi ze słodów lub ziaren jęczmienia. Wraz ze zwiększającym się udziałem słodu czekoladowego ciemnego w zasypie (badany zakres dodatku 20-40%) autorzy obserwowali obniżenie zawartości cukrów fermentujących w brzezce, wzrost wartości indeksu brązowienia, zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu, ogólnej zawartości związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej. Ciekawe informacje o czynnikach wpływających na aktywność przeciwutleniającą brzeczek uzyskano w wyniku analizy korelacji. Wykazała ona, że zdolność do redukcji jonów żelaza (FRAP) i zdolność do neutralizacji rodnika ABTS<sup>•+</sup> jest silnie dodatnio skorelowana z zawartością polifenoli, poziomem indeksu brązowienia i zawartością dekstryn, a ujemnie z zawartością maltotriozy i maltozy. Zatem obecność słodów ciemnych w recepturze piwa poprawia aktywność przeciwutleniającą brzezki i wpływa na charakterystykę gotowego piwa.

Analizując wszystkie otrzymane wyniki do kolejnego etapu badań autorzy wytypowali brzeczkę CC, tj. wytworzoną z 10% udziałem słodu czekoladowego ciemnego.

Otrzymane przez autorów wyniki badań wnoszą szereg wartości praktycznych (konkretne wartości badanych parametrów są istotne dla piwowarów) i są zgodne z danymi literaturowymi.

Po analizie publikacji, proszę Doktorantkę o odniesienie się do następujących uwag:

- pkt. 4.2. (Materiały i metody) został zatytułowany Preparation of the Congress Worts, jednak przedstawiona tam metodologia nie jest zgodna z przyjętą metodologią EBC – Proszę o wyjaśnienie?
- W jaki sposób ustalano ekstrakt brzezki podstawowej na 12 °Blg w badanych wariantach brzeczek? (w publikacji podano taką informację – pkt. 4.2, akapit 2). Czy znane są ekstrakty wytworzonych brzeczek przed regulacją tego parametru? – w pracy nie zostały podane. Czy w tabeli 1 podano profil węglowodanowy brzeczek po ustaleniu tego ekstraktu na 12 °Blg? Jeżeli tak, to czy mogło to wpłynąć na interpretację prezentowanych w tabeli 1 wyników, a także na inne badane w ramach pracy parametry?
- w tabeli 1 zaznaczono brak istotnych różnic pomiędzy zawartością maltozy w brzezce CJ i PC – czy to jest błąd?

Jak rozumieć zdanie w publikacji (w tłumaczeniu na polski):

- pkt. 2.3, akapit 2: Zawartość HMF wzrastała wraz ze wzrostem czasu obróbki termicznej i temperatury? Czy informacja dotyczy obróbki słodu? Skąd autorka zna parametry tej obróbki?
- pkt. 3.1. akapit 4: Według Briggsa i in. [ 33 ] dodatek specjalnych sładów obniża ekstrakt brzeczki podstawowej, na który składa się zawartość cukrów, takich jak glukoza, fruktoza, sacharoza, maltoza i maltotrioza [ 31 ]. – dlaczego w tekście, fruktoza i sacharoza zostały wymienione jako składniki ekstraktu brzeczki piwnej.
- pkt. 3.1. akapit 4: Proszę wyjaśnić, jak Doktorantka rozumie zdanie - Dodatek sładów ciemnych nie wpłynął znacząco na ekstrakt pozorny brzeczki?

## **Publikacja (2)**

Celem badań było określenie wpływu procesu technologicznego na właściwości przeciwutleniające piw ciemnych o wysokiej zawartości ksantohumolu. Doktorantka wskazuje, że **osiągnięciem naukowym przeprowadzonych badań jest określenie kluczowych etapów procesu technologicznego dla kształtowania zawartości związków fenolowych i potencjału przeciwutleniającego oraz zaprojektowanie receptury piwa ciemnego o wysokiej zawartości ksantohumolu.**

W pracy wytworzono cztery piwa z dodatkiem różnych odmian chmielu aromatycznego. Do produkcji brzeczki piwnej użyto sład pilznański (90% zasypu) i czekoladowy ciemny (10% zasypu). Zacieranie prowadzono metodą dwuetapowej dekokcji. Brzeczkę chmielono z dodatkiem chmielu goryczkowego Marynka, a następnie z odmianą: A – Amarillo, B – Cascade, C – Centennial, D – Galaxy) i gotowano. Odmiany te wykorzystano również do chmielenia na zimno po procesie fermentacji głównej na etapie dofermentowania. Proces fermentacji przeprowadzono z wykorzystaniem drożdży piwnych górnej fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* S04. Analizowane piwa zostały poddane refermentacji w butelkach. Piwa dojrzewały/leżakowały przez 4 tygodnie w temperaturze 4°C. Próby do analiz pobrano po następujących etapach technologicznych: chmieleniu, fermentacji, dofermentowaniu, leżakowaniu/dojrzewaniu. W próbach analizowano: zawartość etanolu, ekstrakt rzeczywisty i pozorny, stopień odfermentowania, gęstość, poziom goryczki, profil węglowodanowy (glukoza, maltoza, maltotrioza, dekstryny), zawartość związków fenolowych (TPC), właściwości przeciwutleniające (zdolność do redukcji jonów żelaza FRAP, aktywność antyrodnikowa ABTS<sup>•+</sup>), indeks brązowienia i zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu.

Otrzymane wyniki wskazują, że zawartość polifenoli podczas wytwarzania piwa zwiększała się na etapie chmielenia, fermentacji i dofermentowania, natomiast znacząco obniżyła w trakcie dojrzewania/leżakowania piwa. Stwierdzono wzrost zdolności badanych prób piwa do redukcji jonów żelaza (FRAP) na kolejnych etapach procesu technologicznego. Odwrotną tendencję zaobserwowano w przypadku zdolności antyoksydacyjnej wyrażonej jako zdolność neutralizacji rodnika ABTS<sup>•+</sup>. Obecność 5-hydroksymetylofurfuralu odnotowano jedynie w brzeczkiach. Proces fermentacji etanolowej doprowadził do całkowitej redukcji zawartości 5-HMF i znacznych zmian w barwie piwa. Podczas fermentacji i dojrzewania obniżyła się intensywność barwy piwa. Otrzymane piwa charakteryzowały się wysoką zawartością ksantohumolu w zakresie 1,77-3,83 mg/L oraz 0,85-1,19 mg/L izoksantohumolu. Zawartość prenyloflawonoidów oraz goryczka w piwie zależała od odmiany użytego chmielu.

**Otrzymane wyniki badań umożliwiają zaproponowanie receptur i technologii produkcji piw ciemnych o wysokiej zawartości ksantohumolu.** Największą zawartość ksantohumolu stwierdzono w piwie D4 chmielonym odmianą chmielu Galaxy, a najmniejszą w piwie B4 chmielonym taką samą dawką chmielu Cascade. W publikacji wskazano również, że zastosowanie zacierania dekokcyjnego poprawia wydajność ekstrakcji związków barwnych ze słodu. Ponieważ ilość melanoidów w brzeczce wzrasta, straty ksantohumolu podczas gotowania brzeczki są niższe (melanoidyny ograniczają izomeryzację ksantohumolu do izoksantohumolu). Dodatkowo, w badaniach zastosowano proces chmielenia na zimno, tym samym wykluczono czynnik termiczny sprzyjający izomeryzacji ksantohumolu. Dzięki temu, uzyskano wyjątkowo wysoką zawartość prenyloflawonoidów w finalnym piwie. Zaproponowane podejście jest niewątpliwie innowacyjne i stanowi bezprzecywny sukces w wytwarzaniu piw o wysokiej zawartości ksantohumolu. Badania zawartości ksantohumolu polskich piwach wskazują na jego zawartość w przedziale 0,006–0,22 mg/l, a najwyższe wyniki uzyskano dla piw ciemnych i niefiltrowanych piw jasnych o zawartości ekstraktu większej niż 12,5%.

Po analizie publikacji, proszę Doktorantkę o odniesienie się do następujących uwag:

- Dlaczego nie badano stabilności koloidalnej piw? Czy w związku z wysoką zawartością polifenoli były one klarowne?
- pkt. 3.1. Tab. 1 Czy podany w tabeli ekstrakt pozorny (Apparent extract) był mierzony w leżakowanym piwie czy jest to ekstrakt brzeczki podstawowej?
- pkt. 3.1. proszę o wyjaśnienie czego dotyczy akapit 2 w tym punkcie? Treści tam przedstawione są dla mnie niezrozumiałe i nie wiem do czego się odnoszą (nie widzę związku z tabelą 1). Dlaczego Doktorantka używa sformułowania apparent extract dla brzeczki (pierwsze zdanie akapitu)?
- Czy do refermentacji piwa użyto glukozę czy sacharozę? Istnieje sprzeczność w informacjach podanych w pkt. 2.1.3. (przedostatnie zdanie), a pkt. 3.1. (trzeci akapit, ostatnie zdanie).

### **Publikacja (3)**

**Celem pracy była analiza wpływu doboru materiału biologicznego oraz zastosowania specjalnych słodów ciemnych na efekty procesu fermentacji etanolowej prowadzonej przez różne szczepy drożdży.**

W pracy wytworzono piwa jasne (słód pilzneński 100 % zasypu) oraz ciemne (słód pilzneński 90% zasypu i czekoladowy ciemny 10% zasypu). Zacieranie prowadzono metodą infuzyjną. Do chmielenia zastosowano chmiel gorczykowy Marynka. Do fermentacji brzeczek wykorzystano 4 szczepy drożdży piwnych o zróżnicowanej charakterystyce metabolicznej, tj. dolnej fermentacji *Saccharomyces pastorianus* Saflager S-23, oraz górnej fermentacji: *Saccharomyces cerevisiae* „Safale S-04, *Saccharomyces cerevisiae* „Voss” (kveik) Po fermentacji głównej i dofermentowaniu, piwa zabutelkowano z dodatkiem glukozy w celu refermentacji i wysycenia CO<sub>2</sub>. W celu scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych otrzymanych piw przeprowadzono analizę profili węglowodanowych, zawartości produktów fermentacji (etanolu i glicerolu), ekstraktu, stopnia odfermentowania kaloryczności i wartości pH, Brzeczki i piwo poddano analizie pod kątem zawartości związków fenolowych ogółem oraz aktywności przeciwutleniającej. Charakterystykę morfologiczną komórek drożdży w biomacie pofermentacyjnej badano za pomocą analizatora komórek Scepter Cell Counter. .

W mojej opinii cel pracy nie jest precyzyjny. Użyte sformułowanie „materiał biologiczny” jest bardzo szerokie i nie wskazuje co jest przedmiotem badań. Tymczasem z pracy wynika, że kryją się pod nim 4 szczepy drożdży browarniczych o zróżnicowanym metabolizmie. Tak więc cel pracy powinien być uszczegółowiony. Mógłby np. brzmieć „Analiza wpływu szczepu drożdży oraz zastosowania ciemnych



słodów na efekty procesu fermentacji etanolowej” (podobnie jak jak cel szczegółowy III). Na udział drożdży w badaniach wskazuje wyraźnie tytuł pracy, lecz w mojej opinii niefortunnie zastosowano tam sformułowanie „...wort color as factors affecting effects fermentation process”. Barwa brzezki i piwa sama w sobie jest parametrem zależnym od wielu czynników (m. in. użytych surowców, zastosowanej technologii produkcji i parametrów procesu technologicznego). Zatem parametr barwa nie może być uznany jako bezpośredni czynnik wpływający na przebieg procesu technologicznego i zmiany badanych parametrów. W niniejszej pracy barwa brzezki i piwa jest wynikiem zastosowania konkretnych słodów i szczepów drożdży i to są czynniki determinujące przebieg procesu fermentacji.

Z tego samego powodu niefortunne są tego typu sformułowania stosowanymi w całej treści pracy, a tym samym z konkluzjach, gdzie podano, np.:

- „Jednakże barwa piw wpływała na poziom odfermentowania, co skutkowało różnicami w zawartości etanolu i ekstraktu pozornego oraz kaloryczności pomiędzy wariantami”
- „Ciemna barwa piw związana z dodatkiem specjalnych słodów wpływała na rozkład wielkości komórek w biomacie pofermentacyjnej drożdży dolnej fermentacji i drożdży kveik”.
- „Zastosowanie ciemnej brzezki zwiększało liczbę dużych komórek w biomacie drożdży *S. cerevisiae* kveik i obniżało ich liczbę w biomacie drożdży *S. pastorianus* dolnej fermentacji” .

Doktorantka wskazała, że innowacyjnym elementem pracy było wykazanie różnic w przebiegu i efektach procesu fermentacji brzezki w zależności od zastosowania dodatku słodu ciemnego w technologii produkcji oraz doboru szczepu drożdży piwowskich. Dodatek słodów ciemnych w zasypie obniżył całkowitą ilość węglowodanów w brzezce, natomiast rodzaj drożdży użytych do fermentacji miał wpływ na profil węglowodanowy otrzymanych piw. Piwa ciemne charakteryzowały się niższym stopniem odfermentowania niezależnie od użytego szczepu drożdży w porównaniu do piw jasnych, jak również wyższą całkowitą zawartością związków fenolowych i potencjałem przeciwutleniającym niż piwa jasne. Ponadto piwa różniły się potencjałem przeciwutleniającym w zależności od użytego szczepu drożdży

Osobiście, za bardzo interesujące uważam badania dotyczące morfologii komórek drożdży pofermentacyjnych, choć czuję pewien niedosyt w tym zakresie. Pozwoliły one stwierdzić, że rozmiar komórek drożdży po procesie fermentacji zależał od zawartości etanolu w piwie. W prowadzonych badaniach, wraz ze wzrostem stężenia etanolu, obserwowano zwiększenie udziału mniejszych komórek w biomacie, co potwierdzają dane literaturowe. Pofermentacyjne drożdże *S. cerevisiae* var. *diastaticus* charakteryzowały się największym udziałem komórek małych o średnicy (3-4,5  $\mu\text{m}$ ). Stanowiły one aż 81-85% wśród wszystkich analizowanych komórek. W piwie tym stężenie etanolu było najwyższe. Największym zróżnicowanie pomiędzy wielkością komórek drożdży w biomacie pofermentacyjnej w badanych piwach jasnych i ciemnych odnotowano w przypadku drożdży kveik (w piwie ciemnym komórki były mniejsze).

Dane literaturowe wskazują, że drożdże różnią się morfologią w zależności od zastosowanego szczepu oraz zawartości etanolu i glukozy w pożywce. Są to również determinanty liczebności komórek mikroorganizmów. Czy badano może w pracy ten parametr? W mojej opinii zbadanie liczebności komórek drożdży i ich żywotności oraz analiza korelacji tych parametrów z pozostałymi badanymi, mogłoby być cennym uzupełnieniem podjętych badań. Co Doktorantka myśli na ten temat? Być może konfrontacja liczebności komórek, ich wielkości oraz aktywności przeciwutleniającej piw dałaby odpowiedź czy istnieje związek pomiędzy tymi parametrami.

Doktorantka stara się znaleźć odpowiedź na to pytanie w pkt. 2.3, jednak w kontekście zamieszczonych tam treści, problemu nie można wyjaśnić bez zbadania stanu fizjologicznego komórek drożdży. Autorzy

publikacji zdają sobie z tego sprawę, formułując konkluzje, że ciekawym obszarem dalszych badań jest zbadanie wpływu stanu fizjologicznego drożdży podczas fermentacji na aktywność przeciwutleniającą i zawartość związków fenolowych w kontekście obecności w piwie związków Maillarda i warunków stresu etanolowego. Być może w tych badaniach należałoby również uwzględnić wpływ CO<sub>2</sub> i ciśnienia na stan fizjologiczny komórek drożdży.

Mam jeszcze pytanie, w kontekście tytułu pracy: „Projektowanie piw ciemnych o wysokim potencjale przeciwutleniającym”: dlaczego w tych badaniach nie wykorzystano wyników wypracowanych w poprzednich publikacjach, które wskazują na wysoki potencjał przeciwutleniający piw chmielonych na zimno, z użyciem chmielu Galaxy i wykorzystaniem dekokcyjnej metody zacierania. W konkluzjach podano również informację, że badane piwa różniły się potencjałem przeciwutleniającym w zależności od użytego szczepu drożdży, ale nie wskazano szczepu, który najsilniej przyczynił się do wzrostu tej aktywności. Wyniki badań wskazują, na wysoki potencjał w tym obszarze *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, jednak tylko w przypadku fermentacji piw z dodatkiem siodu czekoladowego. W przypadku piw jasnych taki efekt uzyskano dla szczepu *S. cerevisiae* S04. Proszę o komentarz w tym zakresie.

Mam również uwagę co do treści zawartych w konkluzjach. Tu wskazano, że „Głównymi węglowodanami zidentyfikowanymi w brzeczках i piwach były dekstryny, niezależnie od szczepu drożdży użytego do fermentacji”. Zamieszczone w tabeli 1 dane wskazują, że w brzeczках niechmielonych i chmielonych dominowała maltoza, co jest oczywiste w przypadku prawidłowo przeprowadzonego procesu zacierania. Po jej fermentacji, w otrzymanych piwach pozostały cukry nie ulegające fermentacji – dla większości szczepów drożdży piwowarskich należą do nich dekstryny, co potwierdziły wyniki Doktorantki. Proszę o wyjaśnienie co Doktorantka miała na myśli w tym przypadku? Prawdopodobnie jest to pomyłka.

#### **. Publikacja (4)**

Celem badań była analiza wpływu zastosowania ciemnego siodu i różnych szczepów drożdży piwowarskich górnej i dolnej fermentacji na profil związków lotnych i właściwości sensoryczne piwa. Badania w tym zakresie Doktorantka przeprowadziła na 8 piwach będących przedmiotem badań publikacji 3. Doktorantka wskazuje, że osiągnięciem naukowym publikacji 4 jest wskazanie kluczowych różnic w profilu związków lotnych piw ciemnych i jasnych fermentowanych z zastosowaniem różnych szczepów drożdży piwowarskich górnej i dolnej fermentacji, w tym niekonwencjonalnych drożdży *S. cerevisiae* Kveik oraz *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA.

#### **Do tej części badań nie mam uwag krytycznych.**

W pracy porównano profil związków lotnych i wyniki oceny sensorycznej piw wytworzonych piw. We analizowanych piwach dominującą grupą związków były alkohole (56,41–72,17%), następnie estry (14,58–20,82%), aldehydy (8,35–20,52%), terpeny i terpenoidy (1,22–6,57%) oraz ketony (0,42%–1,00%). Dominującymi wyższymi alkoholami były 2-metylopropan-1-ol, 3-metylobutanol, alkohol fenetylowy, wśród aldehydów furfural, dekanal, nonanal, a wśród estrów octan etylu, octan fenyletylu i octan izoamylu. Piwa fermentowane z udziałem drożdży górnej fermentacji *S. cerevisiae* S04 oraz *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA charakteryzowały się najwyższą zawartością substancji lotnych, a piwo fermentowane z udziałem drożdży dolnej fermentacji *S. pastorianus* S23 – najniższą. Dodatek siodu ciemnego do zasypu nie miał wpływu na ogólną zawartość substancji lotnych w piwach, jednak spowodował istotne różnice w całkowitej zawartości estrów w piwach fermentowanych przez *S. cerevisiae* S04 oraz *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA oraz terpenów i terpenoidów w piwach fermentowanych przez *S. cerevisiae* S04, *S. pastorianus* i *S. cerevisiae* kveik.

Za cenną informację wynikającą z przeprowadzonych badań uważam, że większy wpływ na profil związków lotnych badanych piw miał zastosowany szczep drożdży piwowarskich niż kompozycja zasypu słodowego. Kluczowe różnice w profilu związków lotnych piw fermentowanych z zastosowaniem różnych szczepów drożdży wynikały z różnic w zawartości estrów i alkoholi wyższych.

## **PODSUMOWANIE**

Przedstawiona do recenzji rozprawa została napisana poprawnym językiem polskim i właściwie zredagowana. Wprowadzenie do pracy zostało opracowane na podstawie obszernej, aktualnej i właściwie dobranej literatury tematu. Wskazuje na ogromną wiedzę i dojrzałość naukową Doktorantki w zakresie poruszanej tematyki badawczej i zasługuje na wyróżnienie. Cel pracy zostały nakreślone prawidłowo. Hipotezy badawcze zostały sformułowane adekwatnie do celów badań i prawidłowo zweryfikowane. Badania zostały zrealizowane w oparciu o prawidłowo dobrane, aktualne metody badawcze. Analizę statystyczną przeprowadzono prawidłowo. Interpretacja wyników i obszerna dyskusja pozwoliła na sformułowanie 11 wniosków spójnych z celami i zakresem badań nakreślonych przez Doktorantkę. Praca wnosi nowe elementy wiedzy w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, co znalazło swoje odzwierciedlenie w opublikowaniu wyników badań w czasopismach z listy JCR i cytowaniach tych prac (31 cytowań wg WoS na dzień 28.11.2023).

Przedstawiony cykl prac badawczych pozwala na potwierdzenie potencjału sładów ciemnych, a także etapu fermentacji (rodzaj użytych drożdży) w projektowaniu piw o podwyższonej zawartości związków fenolowych i oraz aktywności przeciwutleniającej. Tym samym założony cel pracy został zrealizowany. Na uznanie zasługuje bardzo duża, wielokierunkowa i dojrzała wiedza Doktorantki z zakresu browarnictwa, co przejawia się w obszernej i wnikliwej dyskusji otrzymanych wyników badań. Wszelkie wskazane w recenzji niedociągnięcia nie umniejszają wartości przedłożonego do recenzji materiału.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca spełnia wymogi formalne stawiane dysertacjom na stopień doktora.

## **WNIOSEK KOŃCOWY**

Całość pracy oceniam pozytywnie, spełnia ona wymóg oryginalnego rozwiązania problemu badawczego oraz wskazuje na bardzo dobrą wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie poruszanej tematyki badawczej. Na podstawie zakresu przeprowadzonych badań można również stwierdzić, że dobrze opanowała warsztat badawczy i jest przygotowana do samodzielnej pracy naukowej.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani Justyny Marii Paszkot pt. „Projektowanie piw ciemnych o wysokim potencjale antyoksydacyjnym” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm. W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Justyny Marii Paszkot do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podpisała  
Dr hab. Barbara Stachowiak