



Prof. dr hab. Beata Gutarowska,
Katedra Biotechnologii Środowiskowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

Łódź, 13.02.2024

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Tomasza Szymczaka

*Opracowanie metody otrzymywania lipazy drogą biotechnologiczną
o potencjale zastosowania w skali przemysłowej*

wykonanej pod kierunkiem

promotora: dr hab. inż. Justyny Cybulskiej, prof. IA PAN
oraz opiekuna pomocniczego: dr Marcina Podleśnego
w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie

1. Celowość podjęcia problemu naukowego

Jedną z najczęściej stosowanych klas enzymów w biotechnologii przemysłowej i chemii organicznej są lipazy, które katalizują m.in. reakcje hydrolizy wiązania estrowego tłuszczów, olejów i estrów z uwolnieniem wolnych kwasów tłuszczowych, diglicerydów, monoglicerydów i glicerolu. Są wykorzystywane w przemyśle spożywczym, papierniczym, skórzanym, tekstylnym, kosmetycznym, farmaceutycznym oraz do produkcji detergentów i biopaliw. Ze względu na lepszą stabilność, specyficzność substratową i niższy koszt produkcji w porównaniu do innych źródeł tych enzymów (roślinnych, zwierzęcych) najczęściej wytwarzane są lipazy pochodzenia mikrobiologicznego. W handlu dostępne są lipazy pochodzenia mikrobiologicznego (m.in. Novozym 435, Novozyme SP 435, Amano PS-30), w których enzym pochodzi od rekombinantów genetycznych i występuje w postaci immobilizowanej na nośnikach polipropylenowych. Najczęściej do tego celu stosuje się bakterie i drożdże np. *Burkholderia cepacia*, *Candida antarctica* ale również dostępne są lipazy pochodzące z grzybów strzępkowych. Ceny tych preparatów zgodnie z wykonaną w pracy doktorskiej analizą rynku są stosunkowo wysokie, koszt wynosi ok. 150 - 170 zł za 100 mg enzymu.

Rosnące zapotrzebowanie na lipazę mikrobiologiczną w różnych gałęziach przemysłu, wzrost liczby pacjentów cierpiących na choroby trzustki, wymagających enzymatycznej terapii są istotnymi czynnikami warunkującymi wzrost rynku lipaz mikrobiologicznych w nadchodzących latach.

W ramach recenzowanej pracy doktorant skupił się na wykorzystaniu lipaz do prowadzenia reakcji Baeyera–Villigera, która polega na utlenianiu ketonów do odpowiednich laktonów lub estrów, na przykład epsilon–kaprolaktonu, który jest wykorzystywany do produkcji tworzyw biodegradowalnych. W reakcji prowadzonej klasyczną metodą chemiczną stosowane są silne czynniki utleniające, które cechują się niską stabilnością, wysoką ceną a także brakiem bezpieczeństwa dla środowiska. Doktorant wskazał na zastosowanie alternatywnego rozwiązania, w postaci stabilnego, bezpiecznego biokatalizatora w formie enzymu lipazy. Ponadto lipaza umożliwia prowadzenie procesu w warunkach łagodnych, co znacznie ogranicza nakłady energetyczne oraz ilości generowanych odpadów. Zgodnie z ideą tzw. „zielonych technologii” produkcja lipaz może być prowadzona na podłożach hodowlanych opartych na surowcach odpadowych pochodzących z przemysłu rolno–spożywczego.

Przesłanki te wytyczyły cel recenzowanej pracy doktorskiej, której hipoteza zakładała możliwość uzyskania lipaz przy użyciu mikroorganizmów na podłożach z wykorzystaniem produktów odpadowych, charakteryzujących się niższym kosztem biosyntezy enzymu niż obecne rozwiązania.

Cele szczegółowe pracy obejmowały:

1. Selekcję szczepów mikroorganizmów wykazujących największą aktywność enzymatyczną,
2. Wytypowanie odpowiednich warunków hodowli mikroorganizmów, a także surowców odnawialnych i odpadowych pochodzących z przemysłu rolno–spożywczego oraz Grupy Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” S.A. jako składników do podłoża fermentacyjnego mających znaczny wpływ na biosyntezę enzymu lipazy przez mikroorganizmy,
3. Wytypowanie poszczególnych procesów jednostkowych do izolacji i koncentracji uzyskanego preparatu enzymatycznego,
4. Przeprowadzenie skalowania procesu biosyntezy lipazy w bioreaktorach,
5. Opracowanie metodyki wykonania chemo–enzymatycznej wersji reakcji Baeyera–Villigera,
6. Zbadanie skuteczności uzyskanego preparatu enzymatycznego w reakcji Baeyera–Villigera w stosunku do komercyjnie dostępnego preparatu.

Badania w pracy były realizowane w ramach doktoratu wdrożeniowego, a ich wymiernym efektem było opracowanie innowacyjnej i kosztowo efektywnej technologii produkcji enzymu lipazy do zastosowań przemysłowych, w szczególności do bezpiecznej dla środowiska metody otrzymywania ϵ –kaprolaktonu.

Podjęcie się trudnego problemu badawczego w pracy doktorskiej wdrożeniowej przez pana mgr inż. Tomasza Szymczaka dotyczącego opracowania metody otrzymywania mikrobiologicznej lipazy z wykorzystaniem surowców odpadowych uważam za nowatorskie, odważne i uzasadnione z punktu widzenia krajowego przemysłu. Jednocześnie chciałabym zwrócić uwagę, iż jest to zagadnienie wpisujące się w rozwój nowych technologii w ramach bioinżynierii i biotechnologii przemysłowej.

2. Formalna ocena pracy

Praca doktorska jest opracowaniem obejmującym 125 stron maszynopisu, 31 tabel, 51 rysunków oraz spis piśmiennictwa. W bibliografii ujęto 236 pozycji, w tym 98%

stanowią prace w języku angielskim, około 50% to literatura z ostatnich dziesięciu lat. Część teoretyczna została opublikowana również w artykule przeglądowym: Szymczak, T., Cybulska, J., Podleśny, M., Frąc, M. (2021). Various perspectives on microbial lipase production using agri-food waste and renewable products. *Agriculture*, 11(6), 540. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060540>, w monografii została rozszerzona i zaprezentowana na 21 stronach, jest przeglądem aktualnej wiedzy na temat występowania, struktury i specyficzności lipaz, reakcji katalizowanych przez lipazy mikrobiologiczne, zastosowania tych enzymów w przemyśle oraz analizy rynku lipaz. Przegląd literatury uwzględnia ponadto opis technik fermentacji stosowanych do otrzymywania lipaz, w tym omówienie stosowanych w pracy fermentacji wstępnej oraz na podłożu stałym jak również omówienie potencjału odpadów oleistych, lignocelulozowych i ścieków przemysłowych do produkcji enzymów lipolitycznych. Część teoretyczna kończy omówienie reakcji Baeyera–Villigera oraz charakterystyka i analiza rynku ϵ -kapolaktonu i poli(ϵ -kapolaktonu).

Pozostałe części pracy dotyczące metodyki badawczej, omówienia i dyskusji wyników, wniosków oraz streszczenia w swej kolejności odpowiadają strukturze rozpraw o charakterze eksperymentalnym.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Badania przeprowadzono na 12 szczepach bakterii z rodzajów: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* i drożdży *Candida*, *Moesziomyces*, *Yarrowia* pochodzących z międzynarodowych Kolekcji Czystych Kultur DSMZ, ATCC oraz 5 szczepów bakterii z rodzajów *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* wyizolowanych ze środowiska naturalnego, należących do Kolekcji Czystych Kultur drobnoustrojów Grupy Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” S.A. Wybór szczepów w większości nie budzi wątpliwości, zgodnie z przeglądem literatury dotąd do produkcji lipaz wykorzystywano szczepy bakterii z rodzajów *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Streptomyces* oraz drożdże z rodzajów: *Candida*, *Yarrowia* a także wiele szczepów pleśni, nie uwzględnionych w pracy doktorskiej. Mam pytanie do doktoranta: dlaczego do screeningu aktywności lipolitycznej wykorzystano również szczepy z rodzaju *Staphylococcus*, a szczególnie gatunek *S.aureus*, znany ze swoich właściwości patogennych. Moje wątpliwości budzą też gatunki należące do 2 grupy zagrożenia zgodnie z klasyfikacją wg Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki (Dz.U. z 2005 r., poz. 716, ze zm.) np. *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Jednocześnie w pracy wykorzystano 5 szczepów mikroorganizmów środowiskowych nie zdiagnozowanych do gatunku o nieznanym patogeniczności.

Część pracy dotycząca skryningu aktywności lipolitycznej 17 szczepów wykonana zarówno metodami jakościowymi przy zastosowaniu 3 podłoży agarowych z dodatkiem oliwy z oliwek oraz rodamininy B, tributyriny, Tweenu 80, a także metodą ilościową z wykorzystaniem substratu: palmitynianu p-nitrofenolu oraz analizy spektrofotometrycznej stanowią cenną charakterystykę mikroorganizmów. Na podstawie screeningu spośród badanych mikroorganizmów, wybrano pięć szczepów mikroorganizmów: trzy pochodzące z kolekcji DSM: *Burkholderia cepacia* 7288, *Pseudomonas aeruginosa* 50071; ATCC: *Moesziomyces antarcticus* 28323 oraz dwa

pochodzące z kolekcji Grupy Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” S.A.: 17 *Burkholderia* spp., 18 *Pseudomonas* spp. Kryterium wyboru stanowiła głównie aktywność lipolityczna specyficzna mierzona w jednostkach [U/mg]. O ile była ona wysoka dla czterech szczepów *P.aeruginosa* 50071 (38,4 U/mg), 18 *Pseudomonas* spp. (15,2 U/mg), 17 *Burkholderia* spp. (12,4 U/mg), *Burkholderia cepacia* 7288 (10,8 U/mg), o tyle w przypadku szczepu *Moesziomyces antarcticus* ATCC 28323 była raczej na niskim poziomie (1,6 U/mg), jak zatem wytłumaczyć wybór tego szczepu do kolejnych badań? Gatunek drożdży *Moesziomyces antarcticus* jest znany z literatury jako producent aktywnych lipaz, natomiast badany szczep nie wykazywał aktywności lipolitycznej na tym etapie badań, czym to może być to spowodowane?

W kolejnym zadaniu badawczym scharakteryzowano wytypowane szczepy mikroorganizmów pod względem profili metabolicznych przy użyciu systemu Biolog®. W oparciu o tą metodę poprzez analizę wskaźników aktywności biologicznej, wskazano różnice w wykorzystaniu poszczególnych grup substratów węglowych w trakcie hodowli badanych mikroorganizmów w czasie 72 godzin. Badane mikroorganizmy przeanalizowano pod kątem wykorzystania sześciu grup substratów: 1. aminokwasów, peptydów, polipeptydów, 2. cukrów, 3. polioli i in., 4. kwasów cukrowych i ich związków, 5. kwasów karboksylowych i estrów, 6. pochodnych cukrów. Analiza pozwoliła na określenie fizjologii wzrostu drobnoustrojów i wykorzystania różnych źródeł węgla. Szczep *Moesziomyces antarcticus* ATCC 28323 na mikroplacie GEN III w 48 godzinie inkubacji charakteryzował się największą różnorodnością wykorzystania substratów (wykorzystywał aż 46 różnych substratów). Tej części pracy poświęcono dużą uwagę, a analiza statystyczna wyników (analiza skupień, dendrogram przedstawiający podobieństwo w wykorzystaniu źródeł węgla) zasługuje na uznanie. Uzyskane informacje zgodnie z założeniem w pracy zostały wykorzystane przy kolejnym etapie pracy - doborze podłoży hodowlanych zawierających odnawialne surowce tłuszczowe i ich pochodne oraz produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego. Proszę o precyzyjne określenie w jaki sposób wyniki uzyskane w tym etapie pracy (system Biolog) korelują z wyborem podłoży hodowlanych z dodatkiem substancji odpadowych zastosowanych w kolejnych etapach badawczych.

W pracy wykonano również testy wrażliwości chemicznej na antybiotyki, wybrane związki organiczne, substancje toksyczne oraz na różne warunki pH i zasolenia podłoża. Badane szczepy bakterii i drożdży charakteryzowały się podobnym poziomem zahamowania wzrostu w stosunku do czynników stresowych z grupy antybiotyków, związków organicznych, a także przy zróżnicowanym pH podłoża oraz różnego stopnia zasolenia na poziomie ok. 20-25%. Jakie aspekty praktyczne płyną z uzyskanych wniosków z etapu badań?

Ważnym i pracochłonnym etapem pracy było wykonanie fermentacji węgłbnych na podłożach płynnych i stałych, co pozwoliło dokonać wyboru odpowiednich surowców odpadowych wchodzących w skład podłoża hodowlanego. Łącznie wykonano 75 układów fermentacyjnych na podłożach zawierających substancje odpadowe: podłoże z glicerolem technicznym, destylowanymi kwasami tłuszczowymi, permeatem serwatki, śrutą rzepakową, śrutą słonecznikową, makuchami rzepakowymi, makuchami słonecznikowymi, wyciekami jabłkowymi po produkcji soków oraz ich formy zagęszczonej. Kryterium wyboru szczepów oraz podłoża stanowiła aktywność specyficzna w przeliczeniu na użyte podłoże (U/mg). Stwierdzono, że najwyższą wydajność biosyntezy lipazy uzyskano przy zastosowaniu makuchów słonecznikowych

i rzepakowych jako dodatków do podłoża fermentacyjnego. Na tym etapie spośród pięciu badanych szczepów mikroorganizmów do przeprowadzenia kolejnych badań wybrano dwa szczepy mikroorganizmów: *Moesziomyces antarcticus* ATCC 28323 oraz 18 *Pseudomonas* spp. pochodzący z Grupy Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” S.A.

Proszę o odpowiedź na pytanie dlaczego w toku tej analizy wybrano ponownie szczep drożdży *Moesziomyces antarcticus* ATCC 28323, zamiast *Burkholderia cepacia* DSM 7288, który osiągał znacznie wyższą aktywność enzymatyczną na poziomie 196,7 U/mg na podłożu z glicerolem technicznym i 329,6 U/mg na podłożu z makuchem rzepakowym w porównaniu z niskimi wartościami dla badanych drożdży: jedynie 5,2 – 5,9 U/mg na podłożu z makuchem słonecznikowym, śrutą rzepakową lub śrutą słonecznikową oraz 33,3 U/mg na podłożu z makuchem rzepakowym.

Podobnie proszę o wyjaśnienie dlaczego wykluczono z dalszych badań śrutę rzepakową i glicerol techniczny, na podłożach z dodatkiem tych substratów uzyskiwano również wysokie wartości aktywności lipolitycznej, dla przykładu 18 *Pseudomonas* spp.: 91,7 U/mg lub *Burkholderia cepacia* DSM 7288: 196,7 U/mg.

Kolejnym zadaniem badawczym była optymalizacja procesu biosyntezy lipazy z uwzględnieniem czynników takich jak: źródło węgla i azotu, temperatura inkubacji, pH podłoża hodowlanego. W pierwszym etapie zaplanowano przeprowadzenie hodowli na czterech rodzajach podłoża z wykorzystaniem szczepu 18 *Pseudomonas* spp. Podłoża fermentacyjne zawierały różne źródła węgla: pepton i ekstrakt drożdżowy, źródła azotu: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (produkt nawozowy z Grupy Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” S.A. o nazwie handlowej Pulsar®), mocznik $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (Pulrea®), NH_4NO_3 (Pulan®) oraz sole mineralne: Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 . Zdziwienie budzi brak związków lipidowych w podłożu, w którym po hodowli oznaczano aktywność lipazy, czy zatem pepton i ekstrakt drożdżowy są wystarczającym źródłem lipidów do otrzymywania aktywności lipolitycznej? Mimo to uzyskana aktywność oscylowała w dość dużych zakresach od 67,89 do 92,1 U/mg, nie otrzymywanych na podłożach z dodatkiem odpadów o znacznej zawartości lipidów, jak to wytłumaczyć? czy może to być błąd w opisie metodyki. Większość wyników była na zbliżonym poziomie biorąc pod uwagę średnią i odchylenia standardowe (wartości najniższe: 67,9 - 73,7 U/mg, wartości najwyższe 89,8- 92,1 U/mg) należałoby w oparciu o analizę statystyczną (np. test Tukeya) wyznaczyć wariant optymalny. Czy w tym etapie nie należałoby zoptymalizować stężenie substratu odpadowego lipidowego jakim były makuchy słonecznikowe, rzepakowe lub śruta rzepakowa, a podłoża dodatkowo wzbogacić w związki azotu i składniki mineralne, proszę o opinię.

W dalszym etapie optymalizowano pH i temperaturę hodowli, najlepsze wyniki aktywności lipazy uzyskano przy wyjściowym pH=6,5 i temperaturze 30°C. Uwaga odnośnie braku analizy statystycznej dotyczy również tego badania.

Ważnym etapem badań było przeskalowanie procesu do objętości 0,5l w bioreaktorze. Badanie wykonano dla szczepu 18 *Pseudomonas* spp. na zoptymalizowanym podłożu z dodatkiem makuchów słonecznikowych (30g/l) Po 48 godzinach hodowli uzyskano aktywność enzymu na poziomie 82,7 U/mg i była ona wyższa niż w badaniach skryningowych w kolbach Erlenmayera na tym samym podłożu, ale po 72 godz. (64,2 U/mg).

W kolejnym etapie pracy opracowano metodę izolacji i koncentracji preparatu enzymatycznego z podłoża fermentacyjnego z wykorzystaniem procesów jednostkowych, takich jak wirowanie, wysalanie, dializa oraz metoda kolumn

wirówkowych. W celu wyodrębnienia enzymu lipazy z płynów pofermentacyjnych wykorzystano dwa szczepy 18 *Pseudomonas* spp. i *Moesziomyces antarcticus* ATCC 28323. Hodowle prowadzono: dla bakterii *Pseudomonas* na podłożu z dodatkiem 30 g/l makuchów słonecznikowych, natomiast dla drożdży na podłożu z dodatkiem 30 g/l makuchów rzepakowych oraz na podłożu z dodatkiem 30 g/l oliwy z oliwek. W pracy pojawia się zatem nowe podłoże, które nie było poddane optymalizacji, skąd wynika wybór takiego podłoża?

Okazało się, że warunki przygotowania próbek preparatu enzymatycznego mają duży wpływ na aktywność lipazy mikrobiologicznej. Dzięki zastosowaniu w etapie oczyszczania kolumn wypełnionych złożem jonowymiennym po wysalaniu i dializie dla preparatów enzymatycznych uzyskano większą aktywność oraz wyższą jakość uzyskanego produktu, co potwierdzono w rozdzielach elektroforetycznych w warunkach natywnych (native-PAGE) i denaturujących (SDS-PAGE). Na aktywność miał również wpływ zastosowany bufor oraz wartość pH, dobre efekty uzyskano dla buforu fosforanowego 0,2 M o pH 6,0 oraz buforu cytrynianowo-fosforanowego o pH 8,0 odpowiednio dla drożdży i bakterii.

Stwierdzono, że drożdżowy preparat enzymatyczny, który oczyszczono przy użyciu kolumn wirówkowych, charakteryzował się zbliżoną masą uzyskanych peptydów oraz czystością do komercyjnie dostępnego preparatu lipazy B pochodzącej z *Candida antarctica* (CALB).

Następnie przeprowadzono przegląd warunków prowadzenia reakcji Baeyera-Villigera dla uzyskanych produktów enzymatycznych i wodnego roztworu lipazy B z *Candida antarctica* w oparciu o modyfikacje w rodzaju i ilości rozpuszczalników, prekursorów nadkwasu oraz ketonów w obecności 30 % roztworu nadtlenku wodoru. Ten etap pracy jest wartościowym elementem metodycznym, zasługuje na wyróżnienie, gdyż został opracowany bardzo starannie. Łącznie przygotowano i poddano analizie setki mieszanin reakcyjnych oraz kontrolnych, w wielu mieszaninach reakcyjnych uzyskano produkt ϵ -kaprolakton. Udowodniono, że uzyskane preparaty enzymatyczne mogą być biokatalizatorami w chemo-enzymatycznej reakcji Baeyera-Villigera dzięki syntezie ϵ -kaprolaktonu. W stosunku do komercyjnie stosowanego preparatu CALB, w przypadku otrzymanych lipaz mikrobiologicznych uzyskano niższą wydajność syntezy ϵ -kaprolaktonu, doktorant wskazał drogi dalszego podniesienia wydajności oraz stabilizacji enzymów, np. poprzez immobilizację na nośnikach.

Do watorów recenzowanej pracy należy zaliczyć fakt wykorzystania wielu metodycznych aspektów, dotyczących zarówno mikrobiologii, biotechnologii, jak i chemii, co w konsekwencji czyni pracę multidyscyplinarną, a Autora pracy specjalistą w zakresie produkcji lipaz mikrobiologicznych. Na uwagę zasługuje także bardzo dobra znajomość literatury widoczna w części literaturowej oraz w dyskusji wyników, dotycząca procesów biotechnologicznych i chemicznych produkcji oraz charakterystyki mikrobiologicznych lipaz a także warunków reakcji Baeyera-Villigera.

Za ważne osiągnięcia w pracy uważam wskazanie, które krajowe surowce odpadowe mogą być wykorzystane do konstrukcji podłoża hodowlanych w produkcji lipaz mikrobiologicznych, co wpisuje się w obecny trend zrównoważonego rozwoju, a także szczegółowe opracowanie metody produkcji i oczyszczania lipazy mikrobiologicznej.

Z uwagi na fakt, że recenzowana praca ma charakter wdrożeniowy chciałabym prosić doktoranta o przedstawienie na obronie procesu technologicznego w celu zobrazowania opracowanej metody produkcji i oczyszczania enzymu. Praca wdrożeniowa zakładała

wykorzystanie produktów odpadowych oraz obniżenie kosztu biosyntezy enzymu, dlatego ważne jest dokonanie bilansu ekonomicznego produkcji lipazy oraz oszacowanie ceny produktu. Proszę o przygotowanie takiego bilansu ekonomicznego na obronę.

Uwagi krytyczne, pytania i wątpliwości zamieszczone w recenzji wynikają głównie z dociekliwości recenzenta mają charakter dyskusyjny, a ocena pracy jest pozytywna. Znaczenie poruszanego tematu pracy, zastosowanie wielu metod badawczych, dojrzała dyskusja naukowa świadczą o umiejętności prowadzenia pracy naukowej przez doktoranta.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, iż rozprawa doktorska Pana mgr inż. Tomasza Szymczaka jest oryginalnym, wartościowym opracowaniem i stanowi podstawę do wdrożenia wyników w praktyce przemysłowej.

W moim przekonaniu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. *Opracowanie metody otrzymywania lipazy drogą biotechnologiczną o potencjale zastosowania w skali przemysłowej* mgr inż. Tomasza Szymczaka, spełnia wszystkie warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim wdrożeniowym określonym w art. 13. Ust.1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14.03.2003 (z późniejszymi zmianami).

Wniosuję o przyjęcie rozprawy przez Radę Naukową Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie i dopuszczenie jej Autora do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Beata Guterowska