

Radom, dn., 26.01.2024

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Kowalska  
Wydział Chemii Stosowanej  
Katedra Chemii Przemysłowej  
Uniwersytet Radomski im. Kazimierza Pułaskiego

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Tomasza Szymczaka

### pt. „OPRACOWANIE METODY OTRZYMYWANIA LIPAZY DROGĄ BIOTECHNOLOGICZNĄ O POTENCJALE ZASTOSOWANIA W SKALI PRZEMYSŁOWEJ”

wykonanej pod kierunkiem naukowym Promotora  
dr hab. inż. Justyny Cybulskiej, prof. IA PAN  
oraz Opiekuna pomocniczego: dr Marcina Podleśnego.

#### **Podstawa formalno-prawna wykonania recenzji:**

Recenzję sporządzono na podstawie pisma Dyrektora Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN z dnia 14 grudnia 2023 informującego o powierzeniu mi wykonania tego zadania zgodnie z Uchwałą Nr 98/P8/2023 Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN z dnia 11.12.2023.

Podstawa prawna:

Art. 190 ust. 3 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 18 lipca 2018 roku (Dz.U. z 2023r. poz. 742 ze zm.).

#### **Ocena zasadności wyboru i znaczenie podjętej tematyki pracy**

Szczególnie ważną biologicznie grupę białek stanowią enzymy. Są to katalizatory żywej komórki mogące przyspieszać lub nadawać odpowiedni kierunek reakcjom biegnącym w komórkach lub poza nimi. Rozpowszechnione są szeroko w mikroorganizmach, roślinach i zwierzętach. Lipazy są użytecznymi biokatalizatorami o bardzo dużym potencjale do zastosowań w wielu gałęziach przemysłu. Ich specyficzność pozwala na kierowanie procesem. Z kolei różnorodność wskazanej specyficzności daje szeroki wachlarz ich wykorzystania. Ostatnie lata pokazują, że istnieje dość duża przestrzeń w zakresie wykorzystania tych katalizatorów ponieważ w większości techniki które wykorzystują te katalizatory wpisują się w techniki bezodpadowe, co w dzisiejszych czasach jest zgodne ze zrównoważonym rozwojem. Zastosowanie biokatalizatorów w postaci lipaz umożliwia prowadzenie procesów w łagodnych warunkach, ograniczając w ten sposób nakłady energetyczne. Aczkolwiek uwzględniając efektywność i wydajność lipaz ciągle pozostaje jedna z barier która może limitować wykorzystanie tych katalizatorów czyli wysoki koszt. Przedstawiona do oceny dysertacja Pana mgr inż. Tomasza Szymczaka wpisuje się w zagadnienia potwierdzenia zasadności wykorzystania lipaz jako katalizatorów przy

jednoczesnym wskazaniu sposobu wytworzenia ich w sposób racjonalny poprzez zastosowanie ekonomicznej metody otrzymywania lipazy mikrobiologicznej z wykorzystaniem surowców odnawialnych i odpadowych jako głównego składnika pożywki dla wzrostu mikroorganizmów. Wybór celu prowadzenia badań w tym zakresie uważam za zasadny i zgodny z obecnie panującymi trendami w zakresie metod przyjaznych środowisku. Próba podjęcia otrzymywania enzymu lipazy na drodze biotechnologicznej przy użyciu mikroorganizmów na podłożach fermentacyjnych z wykorzystaniem produktów odpadowych i odnawialnych w mojej opinii jest zatem właściwa.

### **Ocena formalna pracy**

Przedstawiona do oceny dysertacja jest opracowaniem 125 stronicowym, zawierającym podział na opracowane studium literaturowe oraz część eksperymentalną. Przygotowane przez Doktoranta studium literaturowe dotyczy charakterystyki lipaz, ich występowania, struktury, specyficzności a w tym reakcji przez nich katalizowanych. W tej części pracy została również przygotowana analiza rynku lipaz mikrobiologicznych oraz opisane zostały w szczególności techniki fermentacji, którymi później Doktorant posługiwał się w części eksperymentalnej. Opisana również została produkcja lipaz na odpadach rolno-przemysłowych. Autor pracy przybliżył również mechanizm reakcji Baeyera-Villigera jako narzędzia do potwierdzenia efektywności otrzymanej lipazy. Reasumując pierwsza część pracy stanowi wstęp i rozdziały dotyczące przeglądu literatury związanego z podjętym przez Doktoranta problemem badawczym. Część doświadczalna pracy obejmuje cel prowadzonego doświadczenia, hipotezę oraz cele szczegółowe pozwalające na realizację celu badawczego. Na kolejnych stronach pracy Autor przedstawił opis postępowania doświadczalnego punkt po punkcie uwzględniając metody i materiał wykorzystany w swoich badaniach. Uważam, że prezentacja przygotowania warsztatu badawczego a tym samym zarządzania etapami pracy została skrupulatnie przygotowana przez Autora, co ważne transparentnie przedstawiona. Przedstawione zostały rezultaty badań z poszczególnych części pracy które to dawały wskazanie jakie należy podjąć następujące działania aby realizować właściwe zaplanowany cel pracy. Autor do swojej pracy włączył również dyskusję i doświadczenia prowadzone przez innych badaczy głównie naukowców z zagranicy. Ostatnim końcowym rozdziałem pracy jest podsumowanie i uytylitarne wnioski z przeprowadzonego eksperymentu. Jak w każdej tego rodzaju pracy na końcu znajduje się spis 236 publikacji przywoływanych w pracy z czego ponad 53 % stanowią publikacje z ostatnich 10 ciu lat. Zdecydowana większość prac to prace zagranicznych naukowców (230 pozycji). Przyjęty sposób ich prezentacji oceniam jako poprawny, aczkolwiek w jednym przypadku w publikacji cytowanej jak trzecia (strona 110 pracy) zastanawiam się co oznacza [12]? Generalnie literatura jest poprawnie dobrana i zawiera aktualne zagadnienia z obszaru badawczego którym zajmował się Autor. Uważam, że praca została napisana starannie, zrozumiałym naukowym językiem używając odpowiedniej terminologii z nauk rolniczych. Autor płynnie przechodził do kolejnych rozdziałów wprowadzając w kolejne zagadnienia. Właściwie wprowadził do tekstu odnośniki dotyczące literatury jak również właściwie umieścił odnośniki do tabel i grafiki zamieszczonej w pracy.

## Ocena merytoryczna pracy

Część teoretyczna stanowi wartościowy przegląd piśmiennictwa naukowego dotyczącego tematyki prowadzonych przez Autora badań. Ta część została zwięźle przedstawiona na 35 stronach przedłożonego opracowania. W pierwszej części Pan mgr inż. Tomasz Szymczak dokonał wnikliwego przeglądu w zakresie występowania lipaz i ich pozyskiwania. Przedstawił budowę lipaz ponieważ wg. Autora ta wiedza jest zasadne w ustaleniu mechanizmu procesu katalizowanego przez te enzymy. Szczegółowo opisał poszczególne etapy tego mechanizmu. W tej części pracy zostały również opisane poszczególne reakcje katalizowane przez lipazy. Autor podpierając się doświadczeniem innych autorów właściwie dał przykłady wykorzystania efektywnego tego rodzaju katalizatorów. Jedną z ważniejszych a także atrakcyjnych cech lipaz jest specyficzność. Tej cerze zostały również poświęcone kolejne strony opracowania literaturowego przedłożonej dysertacji. Zastosowanie lipaz czyli potwierdzenie wszechstronności tego rodzaju katalizatorów jest kolejnym rozdziałem uzasadniającym potrzebę pracy z tymi katalizatorami. W pracy również została dokonana wnikliwa analiza rynku lipaz mikrobiologicznych uwzględniająca również prognozy na lata następne. Kolejne krótkie ale interesujące rozdziały przedstawione przez Pana mgr inż. T. Szymczaka dotyczyły technik fermentacji a dokładnie ich szczegółowej charakterystyki, różnic, korzyści. Elementem związanym z pracą było wykorzystanie odpadów rolno-przemysłowych wykorzystywanych do hodowli mikroorganizmów zdolnych do produkcji lipaz. Jednym z ostatnich rozdziałów przedstawianego studium literaturowego była właśnie szczegółowo zaprezentowana charakterystyka, podział różnych odpadów które mogą pełnić funkcje podłoża.

Kolejna część pracy odnosi się do części doświadczalnej którą Autor rozpoczął wskazując następujący cel badawczy: *opracowanie innowacyjnego i kosztowo efektywnego rozwiązania produkcji enzymu lipazy do zastosowań przemysłowych, w szczególności do bezpiecznej dla środowiska chemoenzymatycznej metody otrzymywania  $\epsilon$ -kaprolaktonu.* Jak sam zresztą Autor pracy wskazuje na podstawie przeglądu literatury, postawił hipotezę badawczą:

*Zgodnie z ideą „zielonej” technologii w przemyśle chemicznym efektywna kosztowo produkcja lipazy może być prowadzona na podłożach hodowlanych opartych na surowcach odnawialnych i odpadowych pochodzących z przemysłu rolno-spożywczego.*

W celach szczegółowych pracy uwzględniono w skrócie następujące po sobie sześć etapów pracy:

- selekcję szczepów mikroorganizmów wykazujących największą aktywność enzymatyczną
- 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
- wytypowanie poszczególnych procesów jednostkowych do izolacji i koncentracji uzyskanego preparatu enzymatycznego
- przeprowadzenie skalowania procesu biosyntezy lipazy w bioreaktorach

- opracowanie metodyki wykonania chemo–enzymatycznej wersji reakcji Baeyera–Villigera
- zbadanie skuteczności uzyskanego preparatu enzymatycznego w reakcji Baeyera–Villigera w stosunku do komercyjnie dostępnemu preparatu

Odnosząc się do celu głównego podjętego zadania, celów szczegółowych uważam, że pod względem merytorycznym zostały sformułowane właściwie – poprawnie. Są spójne z tytułem i z założonym zakresem pracy. Odpowiadają także na potrzeby wprowadzania działań nowych w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Jedynie mam luźną sugestię w zakresie prezentacji celów szczegółowych. W mojej opinii prezentacja celów szczegółowych jako schematu byłaby bardziej ciekawa, ponieważ wszystkie działania stanowią pewną chronologiczną całość (jeden etap zostaje zakończony aby drugi mógł się rozpocząć itd.). Właściwie postawiona w pracy hipoteza świadczy o wnikliwej weryfikacji piśmiennictwa i obecnie panujących trendów.

Cele badawcze postawione w pracy skutkowały szeregiem różnych działań ze strony Pana mgr inż. Tomasza Szymczaka tj. opracowaniem nowej metody biosyntezy lipazy poprzez przegląd mikroorganizmów zdolnych do produkcji lipazy, porównaniem metod fermentacji węgłowej i na podłożu stałym z wykorzystaniem surowców odnawialnych i odpadowych pochodzących z przemysłu rolno–spożywczego oraz optymalizacji parametrów fermentacji, a także skalowaniem biosyntezy lipazy w bioreaktorach, oraz wykonaniem optymalizacji warunków prowadzenia reakcji Baeyera–Villigera. Wskazane powyżej postępowanie i działania wskazują na umiejętności w zakresie planowania, zarządzania i prowadzenia eksperymentu oraz potwierdzają posiadaną wiedzę w tym zakresie.

Metodyczna część pracy dotycząca charakterystyki i opisu wykorzystanych w pracy metod, procedur i materiałów w mojej opinii została starannie i czytelnie przedstawiona. Wysoko oceniam wybór grafiki tabel, rysunków, zdjęć oraz graficzną prezentację reakcji chemicznych. Kolejny rozdział dotyczący prezentacji i omówienia wyników został zaprezentowany na 62 stronach opracowania poprzez prezentację ich w 25 tabelach i 31 rysunkach. Prezentacja wyników jest spójna i zgodna z wcześniej zaprezentowanymi celami szczegółowymi.

W pierwszej części rozdziału Autor wykonał oznaczenia aktywności lipolitycznej wybranych mikroorganizmów. Do badań wykorzystał siedemnaście szczepów mikroorganizmów. Z których ostatecznie wybrał pięć o potwierdzonej przez Autora najwyższej aktywności lipolitycznej. Trzy pochodziły z międzynarodowych kolekcji kultur mikrobiologicznych: *Burkholderia cepacia* DSM 7288, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Moesziomyces antarcticus* ATCC 28323 oraz dwa z kolekcji drobnoustrojów Grupy Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” S.A.: 17 *Burkholderia* spp., 18 *Pseudomonas* spp. W kolejnej części pracy doświadczalnej Autor wykazał różnice w charakterystyce metabolicznej wybranych wyżej mikroorganizmów poprzez wskazanie najlepiej utylizowanych substratów węglowych. Informacje, które Doktorant uzyskał w ramach tej części pracy miały wpływ na opracowanie składu podłoża fermentacyjnego pod kątem doboru źródła węgla w postaci surowców odnawialnych i odpadowych jako głównego składnika podłoża fermentacyjnego w procesie biosyntezy lipazy. Jak już wcześniej wspomniałam zaplanowany w pracy przez Pana Doktoranta eksperyment stanowi pewną całość, gdzie każdy następny etap jest początkiem kolejnego. I tak właśnie jest w następnym etapie gdzie Doktorant na podstawie badań

dotyczących opracowania podłoża hodowlanego wyselekcjonował surowce odnawialne i odpadowe pochodzące z przemysłu rolno-spożywczego w postaci makuchów słonecznikowych oraz produkt nawozowy Grupy Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” S.A. (Pulsar®) jako składników podłoża fermentacyjnego wykazujących pozytywny wpływ na **biosyntezę lipazy**. Był to szczep bakteryjny 18 *Pseudomonas* spp. Kolejnym zagadnieniem, które wymagało postępu prezentowanego doświadczenia była przeprowadzona optymalizacja parametrów procesu biosyntezy lipazy, dzięki której udało się Autorowi zaproponować eksperyment w skali większej niż laboratoryjna. Zaproponowane przez Autora odpowiednie metody przygotowawcze tj: wirowanie, wysalanie siarczanem amonu, dializę i zastosowanie kolumn wirówkowych podczas procesu izolacji i koncentracji enzymu z płynu pofermentacyjnego szczepu bakteryjnego 18 *Pseudomonas* spp. pozwoliły na zwiększenie ilości otrzymanego enzymu na poszczególnych etapach oczyszczania opracowanego preparatu enzymatycznego. Ostatecznie udało się Pan mgr inż. Tomaszowi Szymczakowi potwierdzić, że istnieje możliwość wykorzystania preparatów enzymatycznych ***Moesziomyces antarcticus* ATCC 28323 oraz 18 *Pseudomonas* spp. otrzymanych na drodze fermentacji przy zastosowaniu podłoża hodowlanego z dodatkiem makuchów rzepakowych i słonecznikowych, jako biokatalizatorów w reakcji Baeyera-Villigera.**

Po wnikliwej lekturze każdego z etapów tego doświadczenia uważam, że ten rozdział został przygotowany dojrzałe i dobrze. Świadczy to o przemyślanym wcześniej i zaplanowanym każdym ruchu w uzyskaniu tych satysfakcjonujących wyników. Przygotowana dyskusja wyników która została zaprezentowana za rozdziałem „Wyniki” wzmacnia i potwierdza zasadność pożądalności rozwiązań wskazanych w przedłożonej dysertacji.

W obowiązku recenzenta jest również wskazanie (jeśli istnieją) pewnych niezgodności, uwag, czasem sugestii dotyczących pracy. Dlatego w tym miejscu chciałabym się podzielić moimi przemyśleniami które nasunęły mi się w trakcie zapoznawania się z pracą. Są to uwagi , czy sugestie, które w moim odczuciu pozwalają jedynie na silniejsze dopracowanie i przemyślenie niektórych kwestii nie umniejszając wartości pracy.

#### **Uwagi do pracy:**

- Strona 9 – proszę o dopracowanie zdania...*Co więcej, większość przypadków wymaga zawartości wody mniejszej niż 1 %... (syntezy czego??);*
- Strona 8 – zdanie: *Estryfikacja katalizowana przez lipazę może być alternatywą dla produkcji estrów organicznych, ponieważ woda jest jedynym produktem ubocznym reakcji.* – proszę o rozszerzenie tej wypowiedzi;
- Strona 14 – proszę o wyjaśnienie stwierdzenie, że lipazy są odporne na temperaturę?
- Strona 14 – proszę o rozszerzenie tego akapitu: *W celu redukcji ilości stosowanych chemikaliów opracowano zrównoważone podejście oparte na enzymach mikrobiologicznych. Lipazy usuwają tłuszcz na etapach odtłuszczania bez generowania toksycznych produktów ubocznych...* -- jaka rolę odgrywają tu lipazy? Czy wykorzystywane są do ścieków garbarskich działu mokrego? Czy wykorzystywane są w kąpielach garbarskich do poszczególnych procesów garbowania np. odwłaszania???

- Strona 15 - *do przetwarzania wysokiej jakości skóry...*- w mojej opinii powinno być do wytarzania wysokiej jakości skóry bo tutaj chodzi już o produkt gotowy jakim jest skóra wykończona, a nie skóra surowa (surowiec garbarski).
- Strona 15 – Co Autor rozumie jako wysoka jakość produktów kosmetycznych jeśli do produkcji zostają wykorzystane enzymy, lipazy??? Jaką rolę pełnią lipazy w dermokosmetykach?
- Strona 16 – proszę o wersyfikację substratów i produktów podanych w tym stwierdzeniu: *transestryfikacji przekształcają kwasy tłuszczowe i krótkołańcuchowe alkohole w metanol..*
- Strona 16 – zdanie: *Reakcje transestryfikacji, które są katalizowane przez lipazę, mogą obniżyć koszty dalszego przetwarzania w produkcji biodiesla...*- proszę o uzasadnienie tej wypowiedzi jak można obniżyć koszty?
- Strona 34 – rysunek 20. Proszę o odniesienie się do roku 2023, czy Autor ma może już informacje czy prognoza na 2023 okazała się prawdziwa na dzień dzisiejszy?
- Z czego wynikał wybór, selekcja szczepów mikroorganizmów wziętych do pracy?
- Strona 48 – Tabela 12. Czy bromian sodu został prawidłowo określony? Czy to sól organiczna?
- Strona 54 – zdanie: *Zawieszono osady białkowe posłużyły do wykonania dializy...* zastanawiam się czy zdanie zostało prawidłowo skonstruowane? Czy osady były narzędziem pozwalającym dokonać dializy?
- Strona 81 - Tabela 19 – skróty SmF i SSF nie mają objaśnienia. Powinny być przytoczone jako legenda tabeli.
- Strona 84 - Tabela 21 w mojej opinii objaśnienie podłoży albo powinno być jako legenda tabeli albo w tekście wskazane, że są to podłoże A, B, C D.
- Strona 84 - Jakim składnikiem regulowano pH podłoży?
- Dane tabeli nie korelują z opisem ze strony 84 który odnosi się do opisu danych z tabel – proszę o wyjaśnienie.
- Dla jakiej temperatury prowadzona była optymalizacja w zakresie różnych podłoży i pH? Czy zastosowanie uzyskanej T optymalnej mogłoby mieć wpływ na te parametry? Jak wytłumaczyć otrzymaną temperaturę? Czy zatem nie wydaje się również zasadne sprawdzenie pośrednich temperatur czyli 29°C czy 31°C skoro wskazano wyraźne różnice w aktywnościach?
- Strona 85 – zdanie *Każde z oznaczeń wykonano 3-krotnie w celu otrzymania odchylenia standardowego* – chyba tak nie do końca jest. Odchylenie pozwala nam określić stan przeprowadzonego eksperymentu i ocenić jakość oznaczeń a nie odwrotnie, że badania robimy alby określić odchylenie standardowe.
- Strona 86 – Co by było gdyby prowadzić dalej proces powyżej 48 godzin?
- Tabela 29 – 2- adamantanon z octanem etylu występuje dwa razy i są dwa różne wyniki...
- Tabela 31 - potwierdza, że praca dowiodła oryginalności rozwiązania w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych. Czy Autor zamierza prowadzić dalsze badania w kierunku immobilizacji uzyskanego enzymu jako preparatu immobilizowanego i jeśli tak to na czym?

### **Wniosek końcowy**

Praca Pana mgr inż. Tomasza Szymczaka została wykonana zgodnie z założonymi dla tej pracy celami. Oceniając ze strony edytorskiej została przygotowana starannie, czytelnie i właściwie bez błędów edytorskich. Szeroki zakres badań, doświadczeń, czynności które zostały wykonane w pracy, pozwala stwierdzić, że Pan mgr inż. Tomasz Szymczak wniósł nowe elementy do dziedziny nauk rolniczych i dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Mam nadzieję, że zaznaczona w pracy jego dojrzałość naukowa pozwoli spojrzeć na wskazane uwagi jako materiał który pomoże w następnych miesiącach w pracy nad publikacjami do renomowanych czasopism.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny dysertacja Pana mgr inż. Tomasza Szymczaka pt. *"Opracowanie metody otrzymywania lipazy drogą biotechnologiczną o potencjale zastosowania w skali przemysłowej"* spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (dz. U. z 2023 r. poz.742 z późn. zm). Mając to na uwadze wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN o **dopuszczenie Pana mgr inż. T. Szymczaka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**

*Prof. dr hab. inż. D. Nowak*

