

Dr hab. inż. Marek Adamczak, prof. uczelni
Katedra Inżynierii, Aparatury Procesowej
i Biotechnologii Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Jana Heweliusza 1, 10-719 Olsztyn
89-52338-38, marek.adamczak@uwm.edu.pl

23.02.2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Tomasza Szymczaka

**pt. OPRACOWANIE METODY OTRZYMYWANIA LIPAZY DROGĄ BIOTECHNOLOGICZNĄ
O POTENCJALE ZASTOSOWANIA W SKALI PRZEMYSŁOWEJ**

(fragmenty rozprawy doktorskiej objęte klauzulą tajności)

Promotorem ocenianej pracy była Pani dr hab. inż. Justyna Cybulska, prof. IA PAN, opiekunem pomocniczym Pan dr Marcin Podleśny, a praca została wykonana w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego, Polskiej Akademii Nauk w Lublinie.

Recenzję pracy przygotowano na podstawie Uchwały nr 98/P8/2023 Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego w Lublinie, z 11 grudnia 2023 r.

Wprowadzenie

Lipazy są powszechnie syntezowane przez rośliny, zwierzęta i mikroorganizmy. Jednak lipazy pochodzenia mikrobiologicznego są najczęściej preferowane, m.in. ze względu na różnorodność właściwości, możliwe mniejsze koszty produkcji, łatwość manipulacji genetycznej. Na syntezę tych biokatalizatorów przez mikroorganizmy ma wpływ szczep drobnoustroju, skład podłoża hodowlanego oraz parametry fizykochemiczne. Lipazy mikrobiologiczne są głównie enzymami zewnątrzkomórkowymi, wydzielanymi do pożywki hodowlanej w obecności odpowiednich składników podłoża i z reguły także substratów indukujących ich syntezę, choć możliwa jest także regulacja syntezy poprzez represję kataboliczną. Synteza lipaz mikrobiologicznych wymaga różnego czasu hodowli, od kilku godzin do kilku dni i jest zwykle związana z fazą wzrostu wykładniczego lub stacjonarnego. Przyjmuje się, że około 90% enzymów przemysłowych wytwarzanych jest w procesie hodowli wgłębnej, w podłożu płynnym i tego typu warunki hodowli preferowane są w syntezie lipaz. Warunki syntezy lipaz różnią się w zależności od szczepu drobnoustroju, rodzaju substratu i techniki fermentacji. Wymagany jest więc dobór i optymalizacja warunków hodowli drobnoustrojów i syntezy lipaz. Efektywność syntezy enzymów przemysłowych zapewniona jest głównie przez zastosowanie szczepów rekombinowanych, a nowe enzymy pozyskiwane są po zastosowaniu wysokowydajnych metod selekcji i skriningu oraz izolacji i analizy metagenomu. Chociaż

metody te znacznie przyspieszają produkcję enzymów, wykorzystanie organizmów rekombinowanych wymaga dodatkowych prac, które nie są konieczne w przypadku systemów natywnych. Różnorodność wymagań drobnoustrojów i czynników wpływających na syntezę lipaz powoduje, że konieczna jest optymalizacja warunków bioprocesu, zastosowanie metod matematycznych. Szczególne znaczenie w produkcji przemysłowej mają koszty procesu oraz zapewnienie możliwości realizacji procesów zrównoważonych, w tym z użyciem substratów odpadowych, naturalnych i odnawialnych.

Lipazy, w tym enzymy pochodzenia mikrobiologicznego, nieprzerwanie od lat cieszą się dużym zainteresowaniem badaczy oraz przemysłu. Znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym, produkcji detergentów, kosmetyków, leków, a także w bioremediacji środowiska. W warunkach naturalnych enzymy katalizują reakcje chemiczne zwykle w środowisku wody. Lipazy to enzymy, które katalizują hydrolizę estrów długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i glicerolu, działają na granicy faz olej-woda i charakteryzują się unikalnym zjawiskiem aktywacji międzyfazowej. Inną specyficzną cechą lipaz jest ich promiskuityzm. Promiskuityzm enzymów definiuje się jako cechę enzymu umożliwiającą katalizowanie reakcji chemicznej innej niż naturalnej, która wynika z funkcji fizjologicznej. Zmieniony został paradygmat dotyczący specyficzności, selektywności, reakcji katalizowanych przez enzymy właściwe z uwagi na ich promiskuityzm. Enzymy wykazujące tą cechę akceptują więcej niż jeden substrat i katalizują reakcje z innymi niż ich naturalne, fizjologiczne, substraty. Wtórna funkcja enzymu jest określana także jako wielofunkcyjność, niejednoznaczność substratowa lub czasami jako reaktywność krzyżowa enzymów. Możliwe jest, że promiskuityzm enzymów może nie być istotny w warunkach fizjologicznych, np. z powodu małego stężenia substratów lub z powodu bardzo małej aktywności katalitycznej. Promiskuityzm enzymów umożliwia ewolucję nowych ich funkcji w przyrodzie, wykorzystywany jest do modyfikacji właściwości enzymów poprzez zastosowanie ukierunkowanej ewolucji laboratoryjnej i technik inżynierii białek.

Kataliza enzymatyczna jest zieloną alternatywą dla syntezy chemicznej na skalę przemysłową. Najnowszym trendem jest łączenie kilku etapów katalitycznych w reakcjach kaskadowych, prowadzenie reakcji z użyciem biokatalizatorów i katalizatorów chemicznych. Kaskadowa kataliza zapewnia kilka korzyści, m.in. nie ma potrzeby izolowania produktów pośrednich, wyeliminowany jest problem niestabilnych produktów pośrednich.

W 1899 roku Adolf von Baeyer i Victor Villiger po raz pierwszy opisali przemianę ketonów w estry lub laktony w środowisku nadkwasów. Od tego czasu utlenianie Baeyera-Villigera (BV) jest jedną z najczęściej analizowanych reakcji w syntezie organicznej. Szczególnie interesujące jest tworzenie ϵ -kaprolaktonu ze względu na jego znaczenie w syntezie polimerów i wielu innych produktów. W syntezie stosowane są monooksygenazy Baeyera-Villigera (BVMO) oraz alternatywne, chemoenzymatyczne utlenianie BV przy użyciu hydrolaz. Systemy te wykorzystują katalizowaną przez hydrolazę formację perkwasów (zastosowanie promiskuitycznej aktywności "perhydrolazy"), po której następuje spontaniczne utlenianie BV.

Tematyka ocenianej pracy jest spójna z wiodącymi kierunkami prac w zakresie pozyskiwania nowych wydajnych katalizatorów oraz doskonalenia biokatalizy, szczególnie w obszarze inżynierii środowiska reakcji, zielonej chemii oraz gospodarki zrównoważonej.

Analiza dysertacji

Oceniano wydruk, 135 strony, rozprawy dysertacyjnej Pana mgr. inż. Tomasza Szymczaka. Pracę przygotowano zgodnie ze standardowymi zasadami i zawierała 8 rozdziałów pt.: Streszczenie; Spis symboli i skrótów; Wstęp; Przegląd literatury; Cel pracy i hipotezy badawcze; Materiały i metody; Wyniki; Dyskusja; Wnioski; Bibliografia (236 pozycji, 10 i 2 pozycji odpowiednio z roku 2022 i 2023). Na pierwszej, nie numerowanej stronie, znajduje się tytuł pracy, który jest dość ogólny i mógłby zostać skrócony do formy: Opracowanie metody biotechnologicznej otrzymywania lipazy do zastosowań przemysłowych. Szkoda, że nie wskazano w tytule o jakie zastosowania chodzi, do katalizy jakich reakcji ma być użyta lipaza i czy ma to być jeden preparat czy więcej (po analizie całości pracy wydaje się, że tytuł powinien być jeszcze bardziej zmodyfikowany). Zawsze duże zainteresowanie towarzyszy pracom, które wskazują nie tylko na badania podstawowe, ale także na zwykle trudne zadania aplikacyjne, które zostało w analizowanej pracy częściowo objęte klauzulą poufności. Uznanie już na początku budzi także finansowanie pracy ze środków MNiSW. Układ pracy, tytuły podrozdziałów, pracy dysertacyjnej przygotowanej przez Pana mgr. inż. Tomasza Szymczaka są klasyczne i bez dyskusyjne.

W streszczeniu pracy przedstawiono niestety tylko bardzo ogólne informacje, nie ma żadnych danych. Znalazłem zaledwie trzy cyfry, a większość tego rozdziału dotyczy ogólnych informacji dotyczących klasycznego procesu mikrobiologicznej syntezy lipaz. Tylko dwa bardzo ogólne zdania dotyczą reakcji enzymatycznej, brak jest nawet informacji o stosowanych substratach, wydajności procesu. Niepokój budzi także informacja o tym, że skalę procesu syntezy lipazy rozpoczęto stosując 25 cm³ podłoża hodowlanego, a następnie hodowlę przeniesiono do bioreaktora, ale o pojemności zaledwie 1,5 dm³ (robocza objętość znacznie mniejsza). Uważam, że zasadne jest stosowanie uniwersalnych jednostek z układu SI (Międzynarodowy Układ Jednostek Miar), choć wiadomym jest, że nie jest to powszechna preferencja, nawet w wymaganiach czasopism naukowych.

W kolejnym rozdziale doktorant pomaga czytelnikowi przedstawiając wyjaśnienia stosowanych w pracy symboli i skrótów. Jest to zestawienie wyjaśnień skrótów, wzorów związków chemicznych, wyjaśnień skrótów określeń angielskich. Wydaje się, że wyjaśnienia mogłyby być bardziej precyzyjne, prezentując, np. skład podłoża LB czy YPG, a także postać preparatu lipazy B z *Candida antarctica*. Lipaza CAL-B dostępna jest przecież w formie wolnej i immobilizowanej (Novozym 435). Doktorant w kolejnych rozdziałach przedstawia informacje na temat tego enzymu, choć przedstawione informacje wymagają weryfikacji, bo różnie przedstawiane są w literaturze dane na temat preparatów CAL-B. Przy okazji proszę o informację czy nazwa szczepu syntezującego lipazę B, która jest powszechnie stosowana w laboratoriach jest obowiązująca i prawidłowa, a może jednak powinniśmy stosować nazwy: *Pseudozyma antarctica* lub *Moesziomyces antarcticus*. Proszę także o wyjaśnienie różnicy między wprowadzonymi pojęciami: gęstość optyczna (OD) i absorbancja (ABS)? Niefortunne jest także wyjaśnienie symboli „M” i „mM”, np. „M – masa molowa wyrażona w molach”, ponieważ masa molowa to masa 1 mola związku chemicznego, a jednostką tego parametru w układzie SI jest kg/mol. Niefortunna jest również próba przetłumaczenia angielskiego skrótu „MWCO” jako „wartość odcięcia masy cząsteczkowej”, proponuję określenie: graniczna masa cząsteczkowa porów membrany. Tak jak już to wcześniej wyraziłem, jestem zwolennikiem przedstawiania jednostek z układu SI, a także nazewnictwa chemicznego zgodnie z wytycznymi IUPAC lub innymi oficjalnymi. Proszę także o wyjaśnienie czym różnią się „FC” i „NFC”, tj. wyłoki po produkcji odpowiednio soku zagęszczonego i niezagęszczonego z jabłek? Prawidłowa nazwa związku chemicznego stosowanego do spektrofotometrycznego oznaczania aktywności lipaz, *p*-NPP, to *p*-nitrofenylo palmitynian. Wiele skrótów wprowadzono, a potem ich nie stosowano w tekście, a innym razem stosowano inne określenia, np. zamiast diacylglicerole, diglicerydy.

Na jednej stronie przedstawiony jest wstęp, który wskazuje na atrakcyjne katalizatory, lipazy, które preferencyjnie wskazywane są jako katalizatory przegrupowania BV. Często opisuje się enzymy czy biokatalizę z użyciem wielu określeń, np. tani, drogi, stabilny, niestabilny, etc. Wydaje się, że do obiektywnego przedstawienia zalet i wad bioproduktu konieczne są specyficzne parametry, czasami nawet analiza ekonomiczna, która oczywiście może być obca lub trudna do wykonania przez technologa. Do tego dochodzi analiza oddziaływania na środowisko czyli, np. ślad środowiskowy, ślad węglowy, ocena cyklu życia.

Przegląd literatury, jak przedstawił to Pan mgr Szymczak, przygotowano na podstawie publikacji której jest współautorem, m.in. wraz z Panią prof. Cybulską i Panem dr. Podleśnym, opiekunami przygotowanej pracy. Taka informacja wskazuje, że informacje z anglojęzycznej publikacji zostały zacytowane i przedstawione w ocenianej pracy dyplomowej (nie znalazłem za to tej publikacji w zestawieniu cytowanej literatury). Przyznam, że zapis, który został przedstawiony wzbudził moje wątpliwości czy materiał ma być powieleniem informacji zapisanych w publikacji, czy też tylko elementem zaprezentowanego materiału w pracy dyplomowej. Po weryfikacji obu materiałów przyjąłem, że zacytowano publikację Szymczak i wsp. z roku 2021 opublikowaną w czasopiśmie MDPI Agriculture.

W informacjach dotyczących występowania lipaz (str.4), ale także w innych miejscach pracy, doktorant sugeruje lub stwierdza, wymieniając zalety enzymów mikrobiologicznych, że są one bardziej stabilne od innych enzymów, enzymów innego pochodzenia. Nie znam takiej specyficznej zależności, jest ją także trudno ogólnie przedstawić, ponieważ stabilność enzymów zależy od warunków środowiska, a narzędzie którym dysponujemy, tj. inżynieria środowiska reakcji, umożliwia drastyczne zmiany warunków katalizy enzymatycznej i stabilności enzymów. Publikacja, którą na poparcie swoich słów doktorant cytuje dotyczy immobilizacji lipaz i nie znajduje w niej potwierdzenia stwierdzeń z ocenianego materiału. Proszę o komentarz w tej sprawie.

Na rysunku 2 pt. Triada katalityczna lipaz, przedstawiono schemat nieznanej konformacji triady katalitycznej hydrolaz serynowych. Schemat jest dość mało informacyjny. Proszę o wyjaśnienie co oznaczają symbole przestrzennego wiązania chemicznego? Czy mamy rzeczywiście do czynienia z wiązaniami chemicznymi pomiędzy aminokwasami triady?

W kolejnych rozdziałach przedstawiono opracowane w latach 90 informacje o strukturze lipaz i mechanizmie katalizy, powtarzane wielokrotnie w publikacjach, opracowaniach książkowych, które ukazują się do dzisiaj. Czasami więc trudno jest znaleźć rzeczywisty źródłowy materiał. Tak jest, np. z rysunkiem 3, który przedstawiono za Casas-Godoy i in., 2018, a prezentowany jest także w innych publikacjach. Identyczne zestawienie aktywnej i nieaktywnej struktury tych samych lipaz z *Candida rugosa* i *Rhizomucor miehei* przedstawiono w pracy CONTESINI i in.,

2020¹. Oczywiście każdy może przygotować takie schematy z użyciem dostępnych struktur w bazie PDB oraz programów komputerowych. Przy okazji proszę o wyjaśnienie co przedstawiają struktury kuliste na rysunku 3 b?

W kolejnych rozdziałach 2.3-2.5 przedstawiono informacje na temat reakcji katalizowanych przez lipazy, specyficzności lipaz i ich zastosowania. Oczywiście w pracy dyplomowej nie sposób przedstawić wszystkich informacji z zakresu reakcji katalizowanych przez lipazy oraz przedstawić warunki tych reakcji. Ciekaw jednak jestem jakie kryterium prezentacji reakcji chemicznych katalizowanych przez lipazy przyświecało doktorantowi? Większość podstawowych, fundamentalnych informacji na temat lipaz przedstawiono jak już wspomniałem w latach 90, wracam więc do kwestii reprezentatywnych cytowań i z całym szacunkiem dla autorów pracy Kołodziejska i in. 2013 (str.7), to inni autorzy jako pierwsi opisali wcześniej prezentowane informacje determinujące selektywność lipaz względem grupy acylowej i alkoholu.

Na rysunku 10 doktorant przedstawił ogólny schemat triacyloglicerolu. Wcześniej jednak wprowadza właściwą numerację stereochemiczną i szkoda, że nie przedstawił budowy stereochemicznej triacyloglicerolu na tym ogólnym schemacie. Mam również uwagę dotyczącą klasycznych informacji na temat selektywności lipaz. W części doświadczalnej pracy doktorant wykazuje promiskuityzm lipaz, dlaczego nie wspomina o tej wyjątkowo użytecznej i analizowanej właściwości lipaz?

Na kolejnych stronach 12-17 Pan mgr Szymczak próbuje przedstawić zastosowania przemysłowe lipaz, które należy to jednak dodać, są wybranymi przykładami i bazują na literaturze sprzed 10-20 lat. Właściwie autor tylko wylicza możliwe zastosowania lipaz, co zrozumiałe z uwagi na rodzaj przygotowanego materiału, więc może właściwe byłoby skupienie się na opisie tylko wybranych, reprezentatywnych, przykładach i przedstawienie rzeczywistego postępu w tych obszarach stosowania lipaz. Mam wątpliwości czy wszystkie wymienione przykłady dotyczą zastosowań przemysłowych. Proszę o komentarz na temat tej wątpliwości. Jako, że reprezentuję także technologię żywności proszę o informację na temat rzeczywistego zastosowania lipaz w produkcji żywności. Z uwagi na moje zainteresowanie enzymatyczną syntezą biodiesla, mam przeświadczenie o przedstawieniu nie reprezentatywnych i nie aktualnych informacji na temat tego zagadnienia. Bardzo ogólne i chyba jednak kontrowersyjne jest stwierdzenie doktoranta, że „Zastosowanie enzymu do produkcji biodiesla jest opłacalne i przyjazne dla środowiska.”. Jeśli byłaby to prawda zamiast chemicznej syntezy biodiesla powszechna byłaby synteza enzymatyczna, a przecież tak nie jest. Każda synteza biodiesla wymaga

¹ CONTESINI F.J., DAVANÇO M.G., BORIN G.P., VANEGAS K.G., CIRINO J.P.G., MELO R.R.D., MORTENSEN U.H., HILDÉN K., CAMPOS D.R., CARVALHO P.D.O., 2020. Advances in Recombinant Lipases: Production, Engineering, Immobilization and Application in the Pharmaceutical Industry. Catalysts, 10(9): 1032. 10.3390/catal10091032:

dotacji, a postęp w zakresie enzymatycznej syntezy biodiesla dotyczy, m.in. stosowania tanich enzymów, np. płynnego preparatu Callera® Trans L; zastosowania tłuszczu mikrobiologicznego i z glonów oraz stosowania przyjaznych dla środowiska rozpuszczalników.

W kolejnym rozdziale przedstawiono trudno dostępne informacje na temat danych dotyczących rynku i prognoz rynku enzymów. Poddaje jednak pod wątpliwość zasadność prezentacji tabeli 1, w której przedstawiono dane dotyczące preparatów oferowanych przez firmę Merck. Lista dotyczy preparatów stosowanych w celach badawczych, nie przemysłowych. Ceny i oferta enzymów firmy Merck dla przemysłu wymaga indywidualnych zapytań, a z doświadczenia wiem, że ceny, charakterystyka, rodzaj enzymów przemysłowych oferowanych przez potentatów w ich produkcji, np. firmę Novozymes, Amano, są drastycznie inne od tych przedstawionych w tabeli.

W kolejnych rozdziałach przedstawione są techniczne i technologiczne uwarunkowania syntezy lipaz oraz możliwe do zastosowania w syntezie i produkcji substraty odpadowe. Nie jest to bardzo istotna kwestia, jednak jestem za informacyjnym tytułem rozdziałów. Rozdział 2.8 ma tytuł: „Produkcja lipaz mikrobiologicznych na odpadach rolno–przemysłowych”, z mojej perspektywy w rozdziale powinienem znaleźć informacje na temat przemysłowych (bo „produkcja”) metod prowadzenia hodowli drobnoustrojów na podłożu stałym (bo „na odpadach”). W materiale doktorant przedstawił podstawowe, bardzo ogólne informacje o technikach hodowli drobnoustrojów i uważam, że ten rozdział mógłby być pominięty bez zmiany wartości pracy. W kolejnym rozdziale pojawiają się informacje na temat doświadczeń przedstawionych w literaturze, zastosowywania odpadów zawierających substancje tłuszczowe, odpadów lignocelulozowych i ścieków przemysłowych, do syntezy lipaz. Doktorant próbuje wykazać możliwości, przekonać do stosowania tych substratów w syntezie lipaz. Przewrotnie poproszę jednak o informację czy doktorant widzi jakieś zagrożenia, niedogodności stosowania produktów ubocznych, odpadów w syntezie i produkcji mikrobiologicznej lipaz?

Analizę zagadnień w świetle literatury uzupełnia opis podstaw i możliwości zastosowania reakcji BV oraz biotransformacji produktów reakcji do polimerów. Opis jest podstawowy, dla wybranych reakcji i zastanawiam się nad reprezentatywnością przedstawionych informacji. Enzymy przemysłowe otrzymywane są głównie dzięki rekombinowanym mikroorganizmom, a postęp w zakresie reakcji BV dotyczy zastosowania inżynierii enzymatycznej, kierowanej ewolucji molekularnej, inżynierii środowiska reakcji. Tych informacji brakuje mi w opracowaniu, choć doceniam także zauważalną próbę prezentacji osiągnięć polskich naukowców (przy okazji nie znalazłem w zestawieniu literatury publikacji: Szczepaniak, 2022).

Cel pracy opisany jest mało konkretnie, obejmuje także próbę uzasadnienia podjętych prac, jednak uzasadnienie jasno wynika z lektury przedstawionych wcześniej rozdziałów. Jak to zwykle bywa w pracy dysercyjnej doktorant stara się wykazać szeroki zakres prac i dla mnie ten szeroki zakres prac jest jasny i zdefiniowany, od hodowli drobnoustrojów w celu pozyskania lipaz do katalizy reakcji BV, a wszystkie doświadczenia mają być związane z stosowaniem na skalę przemysłową. Moja ciekawość kolejny raz została nie zaspokojona, ponieważ doktorant pisze o „skalowaniu procesu”, co prawdopodobnie oznacza zadanie powiększenia skali procesu biotechnologicznego, ale brak jest danych. Jeśli jest to zadanie weryfikacji wyników aktywności lipaz uzyskanych w hodowli węgłnej wstrząsanej (25 cm³) i hodowli w bioreaktorze (500 cm³), to nie jest to powiększenie skali bioprocessu. To jest porównanie warunków laboratoryjnych hodowli z użyciem dwóch metod.

Opis materiałów i metod przedstawiono na 21 stronach, co świadczy o złożonym i szerokim zakresie przeprowadzonych prac. Do selekcji i skringu szczepów syntezujących lipazy wykorzystano wstępnie wyselekcjonowane na podstawie analizy literatury, 13 szczepów bakterii i 4 szczepy drożdży. Niestety analizę tego ważnego rozdziału muszę rozpocząć od uwagi na temat tytułu rozdziału: Przyspieszenie metabolizmu i wzrost biomasy mikroorganizmów. Tytuł jest bardzo intrygujący i odczytałem go jako próbę zastosowania inżynierii metabolicznej do zwiększenia metabolizmu drobnoustrojów. Niestety treść rozdziału dotyczy przygotowania inokulum, kultury płynnej z próbek biomasy przechowywanej w postaci liofilizatów i zawiesin w glicerolu (klasycznych metod przechowywania drobnoustrojów w kolekcjach szczepów). Doktorant zaproponował i przeprowadził selekcję jakościową szczepów syntezujących lipazy z użyciem metody dyfuzyjnej w podłożach z dodatkiem oleju z oliwek, rhodaminy B oraz Tweenu 80. Doceniam zakres wykonanych analiz, mam kilka pytań i uwag, proszę o komentarz. Nie wiem dlaczego w teście dyfuzyjnym zastosowano 3 substraty do weryfikacji aktywności lipolitycznej szczepów? Metody dyfuzyjne mają swoje zalety, ale także wady, szczególnie jeśli dyfuzja następuje z ośrodków o różnej polarności. Tween i zastosowany barwnik fluorescencyjny dobrze rozpuszczają się w wodzie, ale jak doktorant przygotował podłoże z dodatkiem oleju z oliwek? Fundamentalną właściwością lipaz, jak wykazał to także doktorant, jest ich aktywność na powierzchni międzyfazowej, ważna jest zatem jakość i przygotowanie wysokiej jakości zemulgowanego substratu. Kolejne pytanie dotyczy standaryzacji hodowli do testów dyfuzyjnych, czy były analizowane parametry hodowli, ilość biomasy w hodowli? Wątpliwość dotyczy zasadności dodawania płynu hodowlanego (biomasa wraz ze składnikami pożywki) do studzienki (zdjęcia z publikacji doktoranta i pracy rys. 29, wskazują na problemy).

W kolejnym etapie analizowano ilościowo aktywność zewnątrzkomórkową szczepów względem *p*-NPP, który jest jednym z wielu możliwych substratów i jednym z najtrudniejszych do przygotowania. Skąd wybór kwasowości (pH 8), w której prowadzono oznaczenia, jak można porównywać wyniki testów jakościowych i testu ilościowego? Moim zdaniem jak słusznie przedstawił to doktorant, synteza enzymów lipolitycznych indukowana jest obecnością substratu w podłożu, tak więc dlaczego nie prowadzono hodowli w podłożach z induktorami i czy nie zasadne byłoby sprawdzenie w prosty sposób aktywności wewnątrzkomórkowej lipaz? Wracam do tych zagadnień na etapie analizy wyników.

Interesująca i bardzo przydatna może być zastosowana przez doktoranta procedura weryfikacji aktywności metabolicznej wybranych drobnoustrojów względem wybranych grup substratów. Proszę jednak o wyjaśnienie co określa wartość AWCD i R? Uwagi na temat tego etapu doświadczeń przedstawię także analizując wyniki.

W kolejnym etapie doktorant podjął się przygotowania hodowli wgłębnych wstrząsanych oraz hodowli na podłożu stałym (to informacja od autora) z użyciem różnych substratów, odpadów i produktów ubocznych. Wyselekcjonowane 5 szczepów z rodzaju *Burkholderia*, *Pseudomonas* i *Moesziomyces* namnażano w podłożu płynnym wzbogaconym 2% dodatkiem: glicerolu technicznego, destylatu kwasów tłuszczowych, produktów utleniania cykloheksanu, permeatu serwatki, śruty i makuch rzepakowych lub słonecznikowych oraz wytlóków z jabłek. Już zadałem pytanie wcześniej choć liczyłem na pomyłkę autora, jednak i na tym etapie pojawia się informacja o wytlókach jabłkowych uzyskanych po produkcji soku jabłkowego i zagęszczonego soku jabłkowego. Proszę o informację jaka była różnica między tymi surowcami? Jestem także przekonany, że podłoża które były przygotowane z niektórymi dodatkami były zawiesinami, a nie roztworami, co powoduje wiele problemów podczas realizacji bioprocessu i powinno być zdecydowanie zaznaczone w opisie procedur.

Jeśli dobrze zrozumiałem, hodowle które doktorant określa jako prowadzone na podłożu stałym były prowadzone w podłożu płynnym zawierającym 5% dodatek permeatu serwatki, śruty i makuch rzepakowych lub słonecznikowych oraz wytlóków z jabłek. Kryterium, które przyjmuje się do określenia warunków jako hodowli na podłożu stałym jest brak wolnej wody. Proszę o informację czy rzeczywiście przygotowane podłoża spełniały kryteria podłóż stałych? W konsekwencji proszę o wyjaśnienie procedur pozyskania płynu pohodowlanego do

oznaczenia aktywności lipolitycznej zewnątrzkomórkowej, tj. „Wykonano ekstrakcję 5 mL/g surowca przy użyciu roztworu Triton X-100 10 g/L wykorzystując mieszanie...”.

Kolejny etap doświadczeń to weryfikacja możliwości zastąpienia źródła azotu w hodowli szczepu 18 *Pseudomonas* spp. i wykonanie hodowli w różnych warunkach temperatury i co warto jednak zaznaczyć przy różnej wartości początkowej kwasowości podłoża.

Wszystkie do tej pory opisane hodowle prowadzono w małych objętościach podłóż w kolbach Erlenmeyera. To co doktorant określa jako „skalowanie” nazwałbym weryfikacją warunków syntezy lipazy w hodowli w głębszej w bioreaktorze i porównaniem do hodowli w głębszej wstrząsanej. Nie skorzystano jednak z możliwości, które oferuje bioreaktor i nie prowadzono hodowli w warunkach pH-statycznych. Warunki hodowli w bioreaktorze wskazują na laboratoryjną skalę procesu (500 cm³ podłoża). Hodowle prowadzono w podłożu z dodatkiem makuch słonecznikowych, tym razem dodatek makuch wynosił 3% i proszę o uzasadnienie tego wyboru.

Na etapie przygotowania materiału do wydzielenia i wstępnego oczyszczenia lipazy, zmieniono warunki namnażania szczepów i zastosowano hodowle w kolbach w podłożu z dodatkiem makuch słonecznikowych i oleju z oliwek. Trudno jest zrozumieć racjonalne przesłanki zmian warunków doświadczeń wykonanych przez doktoranta. Trzeba przyznać, że Pan mgr inż. Tomasz Szymczak nie unikał pracy, ale z zainteresowaniem wysłucham wytłumaczenia algorytmu postępowania. Docenić należy próbę wykorzystania różnych odpadów, produktów ubocznych, wszystko to zgodnie z przesłaniem materiału wprowadzającego, które przekonuje i zachęca do stosowania zasad zielonej technologii. Jak jednak wytłumaczyć zastosowanie, w ostatnim etapie, oleju z oliwek, do indukcji syntezy lipaz? Dodatkowo nie rozumiem procedury wydzielenia biomasy z płynu pohodowlanego i efektu wirowania biomasy przedstawionego na rysunku 26. Jeśli miałbym poradzić coś Panu mgr. Szymczakowi, to zaleciłbym w warunkach laboratoryjnych filtrację, co zapewne rozwiązałoby problem rozdziału faz, zwróciłbym także uwagę na warunki wirowania i zaproponowałbym przemycie materiału rozpuszczalnikiem organicznym w celu usunięcia tłuszczu, który będzie stwarzał wiele problemów podczas kolejnych etapów wydzielenia enzymu. Zdecydowanie unikałbym określenia „Warstwa w postaci błony”. Ta frakcja to zapewne biomasa, która w sposób naturalny w warunkach hodowli w podłożu z substratem hydrofobowym gromadzi się na granicy faz woda:olej. Dodatkowo należy przypuszczać, że użyte przez doktoranta szczepy

i warunki hodowli oprócz syntezy lipaz indukowały syntezę także innych metabolitów wtórnych, np. biosurfaktantów, które utrudniają rozdział faz, zmieniają potencjał zeta i współczynnik hydrofobowości-hydrofilowości biomasy. Procedurę, którą przedstawił doktorant z nieznanymi mi przyczyn, tj. zastosowanie ultradźwięków do obróbki biomasy, doprowadziła zapewne do jej dezintegracji i uzyskania w supernatancie wewnątrzkomórkowego preparatu lipaz 18 *Pseudomonas* spp.

W ostatnim etapie doktorant, jeśli dobrze zrozumiałem zapis, zastosował preparat CAL-B, a jeśli to był enzym o numerze katalogowym L3170 (określony jako pochodzący z *Candida* sp.), to jest to preparat płynny, enzym rozpuszczony. W nieprzyjaznych warunkach środowiska reakcji BV, znacznie lepsza wydajność biokatalizy jest zapewniona dzięki stabilizacji lipaz przez immobilizację. Dla porównania, w ramach pracy dysercyjnej, stosowano także preparaty płynne uzyskane z 18 *Pseudomonas* spp. i *Moesziomyces antarcticus* ATCC 28323, w tym także w moim przekonaniu o czym już informowałem preparat wewnątrzkomórkowy z 18 *Pseudomonas* spp. Rysunek 27 umożliwia zrozumienie składu wielu mieszanin reakcyjnych zaproponowanych przez doktoranta. Niestety nie podano informacji o ilości użytego enzymu, reagentów i rozpuszczalnika. Proszę o informację jaki wzorzec zastosowano do analizy chromatograficznej stężenia kaprolaktonu.

Docenić należy zakres realizowanych prac, rozmach, jednak zrozumienie postępowania przedstawionego w pracy wymaga żmudnej analiz. Opis mógłby być znacznie krótszy, bez zmiany wartości pracy, skupiony tylko na opisie procedur, metod i chyba jednak powinien być dokładniejszy. Liczę na wiele wyjaśnień podczas posiedzenia komisji. Reasumując chciałbym jednak zwrócić uwagę, że podczas ważnego i trudnego etapu weryfikacji sposobu otrzymywania lipaz, warunków hodowli kontrolowano tylko aktywność lipolityczną. To zdecydowanie zbyt mało, żeby racjonalnie wnioskować o zależnościach. Konieczne są także informacje o składzie chemicznym stosowanych substratów. Przedstawienie literaturowych informacji na temat możliwego składu chemicznego odpadów i produktów ubocznych ma ograniczoną wartość. Opis prac doświadczalnych kończy przedstawienie stosowanych metod statystycznych. Tutaj również znajdują się rezultaty dość specyficznego układu doświadczeń. W pracy najważniejsze były dwa etapy, tj. synteza lipaz i reakcje enzymatyczne w celu otrzymania kaprolaktonu, a najwięcej uwagi poświęcono statystycznej obróbce wyników aktywności metabolicznej drobnoustrojów.

Doświadczenia związane ze wstępnym oznaczeniem aktywności lipolitycznej przedstawia tabela 17 i właściwie nie znajdują podstaw do rozbudowanej analizy wyników, podobnie opisuje wyniki Pan mgr Szymczak. Jak można się domyśleć na podstawie moich uwag dotyczących metod analitycznych uważam, że stosowanie na tym etapie 3 testów dyfuzyjnych i oznaczenia spektrofotometrycznego nie przyniosło wymiernych korzyści, ponieważ najlepszym sposobem prezentacji aktywności enzymów jest wyrażenie ilościowe aktywności względem *p*-NPP. Wyniki można byłoby udoskonalić prezentując oznaczenia spektrofotometryczne aktywności wewnątrzkomórkowej. Przy okazji rysunek 29 obrazuje problem związany z zastosowaną procedurą, tj. w studzienkach widoczny jest wzrost drobnoustrojów, tak więc zasadne jest pytanie, co mierzono, aktywność lipaz czy aktywność wzrostu drobnoustrojów w przyjętych warunkach i aktywność wytworzonych lipaz? Przypomnę, że dodawano tylko 50µl hodowli do studzienki i inkubację prowadzono w 30 lub 37°C przez 72h, co zapewne prowadziło do szybkiego odparowania wody ze studzienki, problemów z dyfuzją i wzrostem drobnoustrojów. Proszę jednak o krótką informację czy doktorant znalazł korelacje pomiędzy wynikami uzyskanymi z zastosowaniem różnych testów?

Doceniam informacje charakteryzujące aktywność metaboliczną wybranych szczepów drobnoustrojów, ich preferencję substratową i wrażliwość na warunki środowiska. Są one bardzo przydatne, charakteryzują szczepy drobnoustrojów, dają możliwość doboru i kierowania aktywnością metaboliczną drobnoustrojów. Analiza uzyskanych wyników z użyciem testów Biolog® została zapisana na stronach 63-79. Proszę jednak o krótkie podsumowanie w jaki sposób wykorzystano uzyskane dane do realizacji kolejnych etapów doświadczeń, zadań realizowanych w ramach pracy doktorskiej? Proszę także o opis danych przedstawionych na rysunku 32, a mój drobny komentarz do dyskusji jest następujący:

1. Przebieg krzywych jest nie do zaakceptowania, czy można wytłumaczyć w przebiegu krzywych gwałtowne zwiększenia i zmniejszenia wartości absorbancji?
2. Zakres zmian wartości absorbancji jest bardzo mały od 0 do 0,14, zwykle wartość absorbancji hodowli drobnoustrojów obrazująca ich wzrost w płytce osiąga znacznie większe wartości, więc proszę o informację jakie maksymalne wartości można osiągnąć w zastosowanym teście? Nie rozumiem także informacji w tytułach wykresów o poziomie istotności różnic, proszę o wyjaśnienie. Proszę pozwolić mi także podzielić się uwagą, że zrozumienie i analiza testu

Biology® przez oceniającego byłoby lepsze, gdyby na etapie prezentacji wyników, a nie na etapie prezentacji procedury opisywane byłyby zasady testów i ich wyniki.

Jeśli chodzi o analizę aktywności lipolitycznej oznaczonej w płynie po hodowli drobnoustrojów to jest ją trudno analizować w tak przygotowanej tabeli 19 (duża tabela bez informacji o rodzaju danych w kolumnach). Niestety nie udało mi się w metodyce znaleźć informacji w jaki sposób oznaczono aktywność po hodowli metodą SSF wyrażoną w U/g podłoża? Powtórzę w tym miejscu, swoją wcześniejszą uwagę, że analiza licznych wyników jest ograniczona ponieważ nie ma informacji o kinetyce syntezy lipaz, kinetyce zmian hodowli drobnoustrojów. Mam także pytanie na jakiej podstawie przyjęto parametry temperatury prowadzenia hodowli, kwaśności początkowej podłoża i czasu hodowli?

Doktorant nie zastosował metod statystycznych, nie zweryfikował wszystkich zmiennych, więc tytuł rozdziału 5.3.2 Optymalizacja procesu fermentacji, nie odpowiada przeprowadzonym doświadczeniom. Proszę jednocześnie o informację dlaczego przyjęto, że źródło azotu będzie krytycznym parametrem oddziałującym na aktywność lipaz zewnątrzkomórkowych? Poważniejszy problem związany jest z brakiem logicznego powiązania poprzednich etapów doświadczeń. Doktorant przygotował podłoża mineralne z dodatkiem różnych źródeł azotu, bez źródła węgla wybranego w poprzednim etapie (Tabela 14)? W tabelach 20-22 bardzo przydatna byłaby statystyczna analiza różnic aktywności lipolitycznej. Zaproponowane początkowe wartości kwasowości i mały zakres analizowanych temperatury, w których prowadzono hodowle jest bardzo dyskusyjny. Jeśli jednak doktorant zapomniał w składzie podłoża hodowlanego uwzględnić wcześniej wybrane źródło węgla, wyniki zaprezentowane w rozdziale 5.3.2 nie powinny znaleźć się w pracy doktorskiej. Proszę o uzasadnienie planu doświadczeń uwzględniającego ocenę wpływu źródła azotu na syntezę lipaz.

To co pan mgr inż. Tomasz Szymczak niestety wciąż nazywa „skalowaniem” namnażania i syntezy, ogranicza się do wyników 6 pomiarów aktywności lipolitycznej (tabela 23), to naprawdę za mało żeby mówić o doskonaleniu bioprocessu.

Wciąż bardzo trudno zrozumieć jest ideę, filozofię prowadzonych doświadczeń, lektura opracowania jest bardzo trudna. Autor stosuje różne preparaty do wydzielenia i prób oczyszczenia lipaz. Hodowle prowadzone są w małej skali, pojawia się znów jako dodatek do podłoża oliwa z oliwek, wszystko to wbrew tytułowi pracy i jej celowi. Dopełnieniem uwag

dotyczących realizowanych zadań jest tabela 24. Określenia preparatów, których aktywność oceniano są nie do zaakceptowania, tj. „Warstewka olejowa...”, „Osad w formie błony...”. Ważne jest nie tylko nazewnictwo, ale również to że doktorant olej i zawiesinę dodaje do studzienki mikroplastyki w celu wykonania pomiaru absorbancji *p*-nitrofenolu.

W kolejnym rozdziale doktorant próbuje opisać różne etapy wydzielania, oczyszczania preparatu. Operacje jednostkowe monitorowane są jednak tylko poprzez przedstawienie aktywności lipolitycznej. W standardowych procedurach oczyszczanie enzymów monitoruje się prezentując na każdym etapie: stężenie białka, aktywność enzymatyczną całkowitą i specyficzną a także ogólny wskaźnik oczyszczenia, wydajność ogólną i wydajność etapów. Wszystkie te parametry powinny i mogłyby być przedstawione w tej pracy, ale niestety nie mamy możliwości oceny jakości zaproponowanych procedur. Muszę także skomentować złą jakość zdjęć żeli po rozdziale elektroforetycznym, a na rysunku 48 przedstawiono w nieakceptowalny sposób profil wzorca masowego (dorysowana „drabinka” mas). Moje obawy budzi także zdjęcie przedstawione jako rysunek 51. Po wirowaniu uzyskano, jeśli dobrze widzę 3 fazy, proszę o komentarz o ich pochodzeniu, składzie i proszę o informację z której fazy pobierano próbkę do analizy chromatograficznej kaprolaktonu?

Podsumowująca przeprowadzone prace, analiza efektów zastosowania lipaz w reakcji BV, w mieszaninach o różnym składzie zmusza recenzenta do zadania pytań i przedstawienia wątpliwości:

1. Niestety pojawia się kolejny raz w zestawieniu określenie „preparat enzymatyczny w postaci błony...”.
2. Brak jest danych o wartości współczynnika konwersji, bo dopiero ten parametr z połączeniu ze stężeniem produktu w mieszaninie reakcyjnej daje obraz jakości procesu.
3. Zastosowano dodatek różnej masy preparatów enzymatycznych, które różniły się aktywnością enzymatyczną i nie uwzględniono tego parametru w analizie efektywności reakcji enzymatycznej, produktywności enzymu.
4. Nic nie wiemy o kinetyce reakcji enzymatycznej.
5. Po zastosowaniu analizy chromatograficznej, szczególnie w pracy doktorskiej, zalecane jest przedstawienie choć wybranych chromatogramów.

Dyskusja wyników i wnioski są konsekwencją przeprowadzonych doświadczeń. Moim zdaniem dyskusja jest mało atrakcyjna, analizowano wiele parametrów, ale z użyciem właściwie dwóch deskryptorów, tj. aktywności lipolitycznej i stężenia kaprolaktonu. Taka prezentacja osiągnięć ogranicza dyskusję, choć zestawienie uzyskiwanych przez innych naukowców wartości aktywności lipolitycznej zewnątrzkomórkowej i stężenia kaprolaktonu, dałoby szansę na obiektywizację jakości uzyskanych wyników.

Z uwagi na duży zakres prac, rozumiejąc jednocześnie uwarunkowania organizacyjne, chciałbym podzielić się uwagami, komentarzami, które mam nadzieję pomogą w dalszych etapach postępowania, a także będą przydatne doktorantowi.

Praca jest napisana bardzo mało przyjaźnie dla czytelnika, bardzo trudno jest ją analizować, opisy metodyczne mieszały się z analizą wyników, towarzyszy temu często język trywialnych określeń. Zakres skomplikowanych procedur, przemyśleń, kroków, podczas realizacji pracy były bardziej zrozumiałe, gdyby został przygotowany ogólny schemat przeprowadzonych doświadczeń.

Przedstawiam także, moim zdaniem, niefortunne sformułowania użyte w pracy:

Str. 3 „...po system eukariotyczny, taki jak drożdże i grzyby strzępkowe.”; „...otrzymywania enzymu lipazy na drodze biotechnologicznej przy użyciu mikroorganizmów na podłożach fermentacyjnych.”

Str. 4 „Lipazy są szeroko rozpowszechnione w...organach roślin i mikroorganizmów.”

Str. 4 „...lipazy różnią się sekwencją aminokwasową w części białkowej...”

Str. 5 „...Ta aktywna katalityczna cząsteczka lipazy...” (prawdopodobnie chodzi o strukturę przestrzenną centrum aktywnego)

Str. 5 „...które są połączone z główną strukturą enzymu elastyczną strukturą.” (prawdopodobnie przecinek zmieniłby sens zdania.

Str. 5 „„Wieczko” jest elementem ruchomym i może otwierać miejsce aktywne **w obecności reakcji zachodzącej w układzie dwufazowym**. Kiedy „wieczko” odsłania miejsce aktywne enzymu **umożliwia dostęp substratu reakcji**...Nie wszystkie lipazy wykazują zjawisko aktywacji międzyfazowej, **gdzie do wyjątków** można zaliczyć lipazę B z *Candida antarctica*”

Str. 7 „We wszystkich przypadkach reakcja jest przeprowadzana na granicy faz układu dwufazowego, który zawiera fazę organiczną i hydrofobową”

Str. 7 „...aktywność katalityczna lipaz jest odwracalna”

Str. 12 Opisując zastosowania lipaz: „...gdzie enzymy odpowiadają za czyszczenie tkanin...”, „...w produktach farmaceutycznych służą do produkcji związków leczniczych.”, „...przy procesie obrabiania skóry...”

Str. 13 „Przemysł detergentowy”

Str. 17 „...przedstawiono przykładowe preparaty enzymatyczne na bazie lipaz...”

Str. 24 „Odpady oleiste” (informacje o śrucie i makuchach, wytlókach?)

Str. 28 „...na ataku czynnika nukleofilowego związku nadtlennego na węgiel karbonylowy ketonu, gdzie powstaje tetraedryczny produkt ...”

Str. 36 „...prowadzona na podłożach hodowlanych opartych na surowcach...”

Str. 41 „...podłoże wycięto otwory o średnicy 5 mm, w których zaszczerpiono 50 μ L hodowli poszczególnych mikroorganizmów...”

Str. 41 „Przyrost stężenia barwnego produktu mierzono...”

Str. 54 „Płyn pohodowlany po wirowaniu z fermentacji szczepu...”

Str. 54 „...prowadzono na lodzie przez 10 minut...”

Str. 57 „...*Moesziomyces antarcticus* ATCC 28323 w postaci płynu po dializie oraz preparat enzymatyczny w postaci błony 18 *Pseudomonas* spp. w oparciu o modyfikacje użytych rozpuszczalników...”

Str. 58 „...fazę mobilną zastosowano 50 mM kwas siarkowy, gdzie jej przepływ podczas analiz...”

Str. 67 „...charakteryzowały się podobną ilością utylizowanych substratów...”

Str. 68 „...określony przy pomocy wskaźnika R w 48 godzinie inkubacji.”

Str. 80 : „...wykorzystaniem naturalnych źródeł węgla o charakterze odpadowym”

Str. 96 „Preparat enzymatyczny w postaci błony 18 *Pseudomonas spp.*” określenie nie do zaakceptowania

Często stosowane powtórzenia: „enzym lipaza” i błąd związany z użyciem „x” zamiast „x”.
Stosowane zbędne personifikacje: „Mikroorganizmy zdolne do...”

Podsumowanie

Wskazane uwagi, dyskusyjne, może zbyt szczegółowe, a czasami nie wnoszące nowej wartości do przygotowanej pracy skłaniają jednak do wstępnej pozytywnej oceny pracy przygotowanej przez Pana mgr. inż. Tomasza Szymczaka w dziedzinie nauk rolniczych dyscyplina rolnictwo i ogrodnictwo. Zauważony powinien być duży zakres wykonanej pracy, różnorodność wykonanych zadań. Mam także nadzieję, na dyskusję i wyjaśnienia podczas spotkania komisji.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.); Ustawie z dnia 30 kwietnia 2010 r. o Polskiej Akademii Nauk (Dz. U. z 2020 r. poz. 1796 ze zm.). Zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN o dopuszczenie Pana mgr. inż. Tomasza Szymczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

