

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

22.08.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Jakuba Szeląga

**pt. Enzymatyczna alkoholiza katalizowana przez lipazy – modyfikacja niewodnego
środowiska reakcji**

Promotorem ocenianej pracy był Pan prof. dr hab. inż. Tadeusz Antczak, a praca została wykonana w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej.

Recenzję pracy przygotowano na podstawie pisma Pani Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, dr hab. inż. Anny Diowks, prof. uczelni, z dnia 2.06.2023 roku. W piśmie przedstawiono prośbę o przygotowanie oceny pracy doktorskiej Pana mgr. inż. Jakuba Szeląga w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, na podstawie Uchwały nr 49/2023 Rady do Spraw Stopni Naukowych.

Wprowadzenie

W warunkach naturalnych enzymy katalizują reakcje chemiczne zwykle w środowisku wody. Z tego powodu bufony, roztwory wodne, są preferencyjnie wybierane jako media reakcyjne. Jednakże, aby sprostać wymaganiom zastosowań przemysłowych, ze względu na małą rozpuszczalność w wodzie wielu związków chemicznych o znaczeniu przemysłowym, stosowane są media określane jako niekonwencjonalne, które w wielu zastosowaniach stały się już rozwiązaniami standardowymi. Media reakcyjne niekonwencjonalne to między innymi rozpuszczalniki organiczne, rozpuszczalniki neoteryczne (płyny nadkrytyczne, ciecze jonowe, ciecze głęboko eutektyczne), a także mieszaniny substratów stosowanych jako rozpuszczalniki. Zastosowanie niewodnego układu rozpuszczalników umożliwia rozwiązanie wiele problemów, w tym pomaga zapewnić odpowiednio duże stężenia w mieszaninie reakcyjnej substratów

hydrofobowych. Jest to technologia powszechnie stosowane w katalizie z użyciem lipaz, ale wciąż wydaje się być wyzwaniem dla innych biokatalizatorów. Medium reakcji inne niż woda nie jest obojętne dla wrażliwego na warunki środowiska białka enzymatycznego. Stosuje się rozwiązania określane jako inżynieria środowiska reakcyjnego, inżynieria reaktorów, ale może być konieczne zastosowanie inżynierii białka lub inżynierii genetycznej modyfikujące właściwości katalityczne enzymów. Stosunkowo łatwe i szybkie są metody z zastosowaniem dodatku do mieszaniny reakcyjnej substancji „pomocniczych”, które często w sposób trudny do wytłumaczenia stabilizują, aktywują, a często hiperaktywują białko enzymatyczne. Do tych substancji zalicza się sacharydy, szczególnie cukry nieredukujące, polimery, np. glikol polietylenowy lub sole. Spektakularne zwiększenie aktywności, np. amidazy penicylinowej w środowisku *n*-heksanu o 35000-razy dzięki zastosowaniu dodatku KCl jest godne uwagi. Oczywiście możliwe i atrakcyjne jest także poszukiwanie nowych stabilnych enzymów ze środowiska, w tym z użyciem technik metagenomiki. Reakcje enzymatyczne muszą zapewniać odpowiednio dużą wydajność, dużą liczbę obrotów enzymu i wysokie stężenia produktów. Dzięki zastosowaniu rozpuszczalników innych niż woda możliwe jest zwiększenia stężenia substratów oraz produktu/produktów, a w konsekwencji zmniejszenie stężenia odpadów, produktów ubocznych. Dodatkowo, w tych niewodnych warunkach, enzymy mogą tworzyć reaktory kaskadowe z innymi, wrażliwymi na wodę, np. katalizatorami chemicznymi.

Tematyka ocenianej pracy jest spójna z wiodącym kierunkiem prac w zakresie biokatalizy, szczególnie w obszarze inżynierii środowiska reakcji, zielonej chemii oraz gospodarki zrównoważonej.

Ocena pracy

Oceniano wydruk, 130 stronny, rozprawy dysercycyjnej Pana mgr. inż. Jakuba Szeląga. Pracę przygotowano zgodnie ze standardowymi zasadami i zawierała 9 rozdziałów pt.: Wykaz skrótów; Wprowadzenie do tematu; Motywy powstania pracy; Cel i zakres pracy; Materiały i metody; Wyniki i dyskusja; Podsumowanie całości pracy oraz Wnioski; Streszczenie; Abstract; Cytowane prace. Na pierwszej, nie numerowanej stronie, znajduje się tytuł pracy, który jest dość ogólny i mógłby zostać skrócony do formy: Alkoholiza katalizowana przez lipazy – modyfikacja niewodnego środowiska reakcji. Układ pracy, tytuły podrozdziałów przygotowane przez Pana mgr. inż. Jakuba Szeląga są oryginalne, intrygujące, a czasami dyskusyjne. Oprócz zamieszczenia streszczenia pracy na końcu materiału opisowego zastosowano oryginalne

skrótów, choć literatura przedmiotu, tak polskojęzyczna jak i angielska stosuje powszechnie akceptowane i zrozumiałe skrótów, np. CAL-B. Novozym 435 lub Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM. Trochę cierpliwości wymaga także zrozumienie i zaakceptowanie skrótów opisujących otrzymane preparaty enzymatyczne z *Mucor circinelloides*. Proszę jednocześnie o informację czy nazwa szczepu *Mucor circinelloides* jest obowiązująca i czy jest to szczep bezpieczny w stosowaniu?

Opis zaproponowanych skrótów powinien być precyzyjny, a brak jednolitego schematu opisu definiującego choćby postać preparatu enzymatycznego, w tym informacje czy jest to enzym immobilizowany (unieruchomiony) czy niezwiązany (rozpuszczalny) oraz jego pochodzenie, zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowy, nie pozwalana na precyzyjne śledzenie przedstawianych wyników. Doktorant w innych miejscach pracy jeszcze raz wprowadzone te skrótów, przedstawia je bardziej precyzyjnie jak np. na stronie 48, definiując postać stosowanych handlowych preparatów lipaz. Trudno często o jednoznaczne prawidłowe polskojęzyczne określenia dotyczące biokatalizy, ale określenie skrótu MCL jako „Preparat enzymatyczny *Mucor circinelloides* otrzymany w trakcie izolacji białek” jest niefortunne, prawdopodobnie chodzi o preparat wewnątrzkomórkowy z *M. circinelloides*. Moje wątpliwości budzi także określenie „Preparat całokomórkowy lipazy...” czy rzeczywiście opisuje on preparat immobilizowany komórek *M. circinelloides*, a może preparat immobilizowany enzymów związanych z komórkami, biomasą? Wyjaśnienie skrótu „MCG – Preparat lipazy *Mucor circinelloides* otrzymany poprzez sproszkowanie grzybni” również nie jest precyzyjne, prawdopodobnie chodzi o proszek preparatu wewnątrzkomórkowego czyli wysuszony (jak?) preparat wewnątrzkomórkowy? Przedstawione uwagi dotyczące wprowadzonych skrótów tracą wagę, ponieważ doktorant później ich nie stosuje, a także, jak już wspomniałem, doprecyzowuje niejasności w opisie doświadczeń i analizie wyników.

Na 20 stronach przedstawiono wprowadzenie do analizowanych zagadnień przygotowane na podstawie literatury (uwagi dotyczące literatury przedstawię w kolejnej części recenzji). Nie jest to materiał wyczerpujący tematykę, ale przedstawiono kilka interesujących zagadnień często pomijanych w literaturze. Autor rozpoczął analizę od rysu historycznego i zaznaczenia wagi osiągnięć polskiego naukowca prof. Ernesta Syma (1893-1950), którego osiągnięcia zostały zauważone przez wybitnych naukowców zajmujących się tematyką biokatalizy w mediach innych niż woda w latach 90 ubiegłego wieku. Warto byłoby także zwrócić uwagę

na współczesne osiągnięcia w tym zakresie, w tym osiągnięcia zespołu Pana prof. Antczaka, wskazujące na aktywowanie w specyficzny sposób lipazy z *Mucor circinelloides* w rozpuszczalnikach organicznych, np. dietanoloamine, trietanoloamine, pirydynie, co było spowodowane wiązaniami wodorowymi między grupą indolową reszty Trp zlokalizowanej na powierzchni pokrywy i cząsteczkami aktywatora (doktorant przedstawił te wyniki na etapie dyskusji wyników). Zjawisko to jest podobne do unikalnej i dość powszechnej właściwości lipaz, tzw. aktywacji międzyfazowej.

Na stronie 5 pojawia się pierwsza, choć dość ogólna, informacja o celu prowadzonych prac, które mają obejmować co najmniej dwa kierunki, tj. prowadzenie i doskonalenie reakcji alkoholizy z użyciem 1-rzędowych alkoholi oraz opracowanie matematycznego modelu procesu. Zadanie które podjął doktorant ma dotyczyć „...badania wpływu dodatku wody oraz dietyloaminy...”. Zagadnienie to jest ważne dla właściwego przebiegu procesu enzymatycznego jednak były i są stosowane różne metody opisu wpływu wody na reakcję enzymatyczną. Ciekaw jestem jakie jest zdanie doktoranta na temat posługiwania się pojęciem stężenia wody w układzie reakcyjnym, a nie, np. wartością współczynnika aktywności wody? Na podstawie literatury doktorant przedstawił opinię na stronie 23, ale proszę o wyrażenie swojego zdania w tej kwestii.

Pan mgr inż. Jakub Szelaąg przedstawia zalety biokatalizy w mediach innych niż woda, charakteryzuje ogólnie lipazy ich budowę chemiczną, mechanizm katalizy oraz przedstawia możliwości pozyskiwania lipaz.

Ważne jest przedstawienie przez doktoranta zmian strukturalnych lipazy z *Thermomyces lanuginosus* (rys.3) oraz zmodyfikowanego za Paiva i wsp. schematu reakcji enzymatycznych (rys. 4), choć są one mało czytelne, a sposobów przedstawienia mechanizmu reakcji katalizowanych przez lipazy jest wiele, np. rys. 7 oraz schemat na str. 11 i powtórzony na str. 22. Nie sposób we wprowadzeniu do pracy doktorskiej przedstawić pełną charakterystykę lipaz, dlatego doktorant skupił się na wybranych przykładach próbując także wskazać jako atrakcyjną możliwość stosowania otrzymanych w prosty sposób niehomogennych preparatów enzymatycznych. Moje zdziwienie budzi jednak brak zacytowania w rozdziale dotyczącym enzymatycznej syntezy biodiesla doskonałej i bardzo często cytowanej pracy z 2009 roku Pani dr hab. Szcześniey-Antczak i wsp.

W podrozdziale 1.4 doktorant skupia się na przedstawieniu i przygotowaniu podstaw do dyskusji naukowej dotyczącej enzymatycznej alkoholizy, głównego zagadnienia zaprezentowanego w tej pracy doktorskiej. Niestety chaotycznie przedstawione jest zagadnienie dotyczące wpływu proporcji molowej substratów na przebieg alkoholizy, tj. fragment od: „Opisano także inne przypadki. Przykładem tego są doświadczenia...” do końca tego zdania. Autor chciał chyba przedstawić rezultaty, wyniki reakcji, a opisuje skład mieszaniny reakcyjnej.

Kolejnym ważnym zagadnieniem przedstawionym przez doktoranta jest opis wpływu rozpuszczalników organicznych i wody na przebieg reakcji enzymatycznej (str. 20-23). Niestety nie zrozumiał jest dla mnie opis przedstawiony na stronie 20, akapit rozpoczynający się od słów: „Rozpuszczalniki polarne oddziałują...”. Przedstawienie symulacji dystrybucji wody na powierzchni kutynazy jest wartościowe jednak wymaga doprecyzowanie dlaczego przedstawiono dwie struktury enzymu dla każdego rozpuszczalnika? Prawdopodobnie dla zapewnienia obiektywnego obrazu lokalizacji wody na powierzchni białka przedstawiono enzym z dwóch stron. Proszę o informację jakie wnioski dotyczące właściwości enzymów, przebiegu reakcji, można sformułować po analizie różnej dystrybucji wody na powierzchni białka enzymatycznego?

Ekstremalnie interesujące są analizy dotyczące substancji wpływających na katalizę enzymatyczną (rozdział 1.4.4.), ale reprezentatywna analiza możliwa jest tylko po przedstawieniu dogłębnej analizy i choćby zestawienia uzyskiwanych wyników. Tylko taka kompleksowa analiza, przygotowana na podstawie reprezentatywnej literatury i doświadczeń własnych, uprawnia do używania określeń stosowanych przez doktoranta typu: „najczęściej”, „w niemal wszystkich przypadkach”, *etc.* Chciałbym także zwrócić uwagę na to, że z uwagi na bardzo specyficzne właściwości lipaz/lipazy syntezowanej przez *M. circinelloides* może nie być łatwo prowadzić dyskusję naukową i porównywać uzyskane wyniki z wynikami uzyskanymi w reakcjach z innymi lipazami.

W kolejnych rozdziałach Pan mgr Szeląg definiuje cel pracy. Opis, próba uzasadnienia celu w dwóch rozdziałach wprowadza zamieszanie, a jednocześnie pokazuje bardzo szeroki zakres prowadzonych prac, dotyczących zaawansowanych i racjonalnych modyfikacji środowiska reakcji (inżynieria środowiska reakcji, *a propos* chyba ani razu doktorant nie użył tego określenia?) po modelowanie matematyczne. Zgadzam się z autorem, że połączenie

prezentacji wyników i ich dyskusji z uwagi na duży zakres prowadzonych prac było zasadne. Przy okazji do tej pory doktorant ani razu nie próbował uzasadnić dlaczego zamierza zastosować jako substraty wybrane alkohole (propylowy, butylowy, 2-metylo-1-butylowy, heptylowy, oktylowy i decylowy) oraz olej rzepakowy (tylko oznaczanie aktywności lipaz) i słonecznikowy (reakcje), a także trioleinian (modelowanie matematyczne)?

Zakres wykonanych prac znajduje potwierdzenie w opisie doświadczeń i stosowanych metod analitycznych (20 stron). Część opisu doświadczeń przedstawia informacje podstawowe, bardzo szczegółowe, które można pominąć, czasami stosowany jest język roboczy stosowany w laboratoriach. Bardzo proszę, aby mój komentarz dotyczący tego obszernego fragmentu pracy potraktować jako materiał do dyskusji, weryfikacji podczas dalszych etapów pracy naukowej. Chciałbym zwrócić uwagę na przygotowanie inokulum i jego standaryzację. Biotechnolodzy często już na początku doświadczeń mają problem z powtarzalnością uzyskiwanych wyników, a otrzymanie standardowego inokulum z biomasy grzybów strzępkowych, wykazujących dimorfizm wzrostu, w małych objętościach pożywki jest dużym wyzwaniem. Zapewne doktorant miał na tym etapie problemy stąd też konieczność stosowania substancji aktywnej powierzchniowo do próby zdyspergowania materiału.

Dyskusyjne jest określenie, że grzybnie hodowano na piankach poliuretanowych. Fizycznie i na podstawie zamieszczonych zdjęć widać, że biomasa ulokowana była w strukturze pianki, a nie na jej powierzchni. Trudne jest także przewidzenie czy w obszarze gdzie znajdowała się biomasa w piance były warunki, które umożliwiały rozwój grzybów, czy grzyby były aktywne (utrudniony transport substancji odżywczych i tlenu). Częstki pianki przemywano wodą i zastanawiam się dlaczego mierzono absorbancję przy 280 nm, monitorowano tylko obecność białka? Hodowle prowadzono w podłożu z dodatkiem oleju rzepakowego i w kolejnych etapach usuwano właśnie lipidy zewnątrzkomórkowe z pożywki. Początkowo po informacji przedstawionej w pracy, że usuwano lipidy z grzybni sądziłem, że chodzi o lipidy wewnątrzkomórkowe co jednak byłoby trudne do uzyskania z użyciem zaproponowanej procedury. Jestem także przekonany, że zastosowanie szczególnie acetonu nie skutkowało tylko usunięciem oleju (lipidów?), a także nie zapewniało całkowitego usunięcia hydrofobowych składników podłoża hodowlanego. Otrzymane trzy form preparatu lipolitycznego z *M. circinelloides* powinny charakteryzować się różną aktywnością w przeliczeniu na suchą substancję, dodatkowo procedury ich otrzymywania nie kończył się na etapie standardowego

suszenia, a wydawałoby się, że najlepszym rozwiązaniem jest liofilizacja. Wydaje się, że różna postać preparatu lipolitycznego, w tym nie rozpuszczalność ekstraktu wewnątrzkomórkowego w „tłuszczach” i „alkoholach” powodowała dodatkowe trudności w interpretacji wyników. To wyzwanie zdecydowanie spełniające wymóg wartości naukowej i oryginalności pracy dyplomowej.

Prezentacja zasad oznaczania aktywności lipolitycznej oczywiście jest zasadna, ale najważniejsze byłoby zdefiniowanie przyjętej definicji jednostki aktywności lipazy. Czy nie właściwe byłoby zastosowanie do oceny pomiaru aktywności hydrolitycznej preparatów lipaz oleju słonecznikowego, tego który wybrano do prowadzenia reakcji alkoholizacji? Doceniona powinna być krytyczna ocena przez doktoranta i weryfikacja, walidacja, metody chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Doktorant stosował zweryfikowaną technikę chromatografii cienkowarstwowej i cieczowej (HPLC) do analizy składu mieszaniny reakcyjnej. Czy stosowane wzorce odpowiadały wymogom stosowanych technik chromatograficznych? Szkoda, że w pracy nie znalazły się przykładowe zdjęcia, chromatogramy. Nie jest też dla mnie jasne w których etapach doświadczeń stosowano metodę TLC a w których HPLC?

Do opisu doświadczeń reakcji jak i zastosowanych metod statystycznych (metoda optymalizacji doświadczeń (RSM) oraz równanie Gompertza) nie mam uwag, jednak stosowanie cząstek pianki z biomasą w probówkach firmy Eppendorf (objętość 1-2 cm³) wydaje się bardzo problematyczny, szczególnie z uwagi na jakość transportu masy, zróżnicowanie warunków reakcji w porównaniu do innych stosowanych katalizatorów w formie drobnych cząstek.

W opisie obliczeń kinetycznych, przebiegu reakcji brakuje chyba sposobu przeliczania, stosowanych jednostek, sposobu monitorowania przebiegu reakcji uwzględniającego aktywność stosowanego katalizatora (stosowano bowiem 50 mg katalizatora/0,59 cm³ oleju) (str. 43) oraz tego jak obliczono masę molową oleju słonecznikowego, ponieważ posługiwano się masą molową, a proporcja molowa substratów wynosiła 5:1 (alkohol:olej) (str. 43).

Jaka już wspominałem wcześniej doktorant posługiwał się oryginalnie dobranymi metodami, także sformułowaniami, np. zastosował opisany w 2-3 publikacjach parametr który został określony jako intensywność katalizy (IOT). Bardzo proszę o przybliżenie tego parametru i wyjaśnienie decyzji o jego wyborze. Parametr ten zgodnie z informacją przedstawioną na str.

43 jest wynikiem pomnożenia „ilości lipazy” przez „czas” i podzieleniem uzyskanej wartości przez „ilość oleju”.

W rozdziale 5 przedstawiono wyniki i dyskusję wyników trzech zaplanowanych etapów realizacji pracy dyplomowej, a każdy zakończony podsumowaniem. Pomimo tytułu rozdziału przedstawiono w nim także wiele informacji metodycznych, doprecyzowujących i odpowiadających częściowo na przedstawione wcześniej pytania, komentarze (np. masę molową olejów przeliczano na trioleinian). Nie jestem przekonany czy takie rozwiązanie ułatwia lekturę pracy, choć z uwagi na liczbę zmiennych parametrów, co autor próbuje wielokrotnie uzasadnić, może pozwolić zrozumieć intencje i tok rozumowania. Chciałbym więc, zrozumieć wybór preparatów lipaz, które porównywano do otrzymanych we własnym zakresie preparatów z *M. circinelloides*?

W pierwszym etapie prowadzono reakcje okresowe z użyciem oleju słonecznikowego oraz butanolu lub oktanolu. Przedstawione wyniki są wartościowe, ale też wymagają uwagi a pojawia się wiele pytań. Proszę o informację na jakiej podstawie poprowadzono krzywe łączące wyznaczone punkty na rys. 13 (podobnie rys. 28) oraz jakie było odchylenie standardowe, w ilu powtórzeniach przeprowadzono reakcje? Jak doktorant wytłumaczy obecność dużej ilości estrów już na początku reakcji, dla większości preparatów enzymatycznych, w czasie „0”? Kolejne pytanie dotyczy rys. 14, jak należy interpretować małe stężenie WKT przy braku wody (0), a jednocześnie duże stężenie w tych samych warunkach MAG i DAG? Podobne pytanie dotyczy stężenia TAG przy stężeniu wody określonym jako „0” (rys. 15). Doktorant informuje o wydajności syntezy estrów (str. 52), ale jak wydajność obliczano, nie ma informacji o tym parametrze na wykresach i w tabelach?

Pierwszy etap doświadczeń zakończono weryfikując hipotezę o konieczności otrzymania wartości parametru opisującego zmiany stężenie wody w mieszaninie reakcyjnej (ΔC_w) na nie zmienionym poziomie i przy zachowaniu wymaganego początkowego stężenia wody w mieszaninie.

W kolejnych rozdziałach doktorant przedstawia szczegółowo kolejne etapy prowadzenia doświadczeń, co wprowadza trochę zamieszania bo dotyczy informacji z którymi zapoznano się na etapie lektury wcześniejszych rozdziałów. Z uwagi na transport, rozpuszczalność, oddziaływanie fizyko-chemiczne trudno jest mówić o takim samym wpływie wody

w środowisku reakcji, jej transporcie, gdy stosowano preparat otrzymany z użyciem pianki poliuretanowej lub krzemionki (Lipozyme TL IM). Dodatkowo warunki mieszania dla reakcji z użytymi preparatami enzymatycznymi w małych probówkach zapewniają prawdopodobnie mieszanie tylko fazy płynnej? Pomimo wątpliwości tezę dotyczącą konieczności stabilizacji stężenia wody w mieszaninie reakcyjnej potwierdzono w długoterminowych doświadczeniach z użyciem reaktora kolumnowego. Wykazano możliwość prowadzenia katalizy przez 100 dni bez zmiany „wydajności” procesu (prawdopodobnie chodzi jednak o stężenie estrów, choć na str. 81 pojawia się informacja o produktywności (to nie jest wydajność) wynoszącej około 350 mg estrów/g biokatalizatora przez 1 godzinę). Podobnie doktorant w podsumowaniu posługuje się pojęciem stabilności operacyjnej, ale tego parametru także nie oznaczono? Uznanie i zaskoczenie budzi bardzo duża efektywność preparatu lipolitycznego otrzymanego przez doktoranta, która była porównywana do preparatów handlowych. Nie znalazłem w pracy informacji o zmierzonej aktywności lipolitycznej stosowanych preparatów enzymatycznych.

W drugim etapie doświadczeń analizowano wpływ substancji pomocniczych, amin oraz ektoiny na efektywność reakcji alkoholizy pomiędzy 2-metylobutanołem i olejem słonecznikowym, katalizowaną przez preparat komórkowy z *M. circinelloides*. Na tym etapie wybrano dietyloaminę (DEA) jako stymulatora reakcji alkoholizy, choć dodatek DEA do stężenia 30 mM umożliwiał uzyskanie tylko o 5% większego stężenia estrów po 48h. Zaproponowano także, prawdopodobne oddziaływanie DEA na składniki mieszaniny reakcyjnej, z czego wydaje się iż oddziaływanie na lipazę/monomolekularną wodę oraz hydratacja hydrofobowa wydają się prawdopodobne.

W konsekwencji w ostatnim etapie doświadczeń analizowano i optymalizowano wpływ stężenia wody (0-3%) i DEA (0-60 mM) na efektywność syntezy estrów katalizowaną przez preparat komórkowy z *M. circinelloides* oraz zaproponowano model matematyczny opisujący analizowane zależności. Potwierdzono oddziaływanie wody w mieszaninie reakcyjnej i DEA w odpowiednich stężeniach, w tym współoddziaływanie tych parametrów, na możliwość zwiększenia stężenia estrów w mieszaninie reakcyjnej z 65% do około 80%.

W podsumowaniu doktorant raz jeszcze przedstawił konkluzje, które odpowiadały wcześniej podsumowanym etapom przeprowadzonych doświadczeń.

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.

Zapewne zasadne byłoby wprowadzenie w pracy obowiązującego nazewnictwa chemicznego i stosowanie standardowych jednostek miary (SI). Obraz skomplikowanych procedur, przemysłów, kroków, podczas realizacji pracy były bardziej zrozumiałe, gdyby został przygotowany ogólny schemat przeprowadzonych doświadczeń.

Przedstawiam także, moim zdaniem, niefortunne sformułowania użyte w pracy: str. 4: „...usunięcie wody...niweczy strukturę 3-rzędową...”; str. 4 „...dzięki tym fenomenom białka są w stanie zachować swoją funkcjonalność...”; str. 4 także str. 20: „Klibanowa” powinno być Klibanova; str. 8: „Na rys. 2 zamieszczono ogólny schemat...”; „Z przemysłowego punktu widzenia...”(str. 14); „...metanoliza enzymem...” (str. 19); „Rys. 6. Wyniki symulacji modelowania...”; „...różnych wariantów preparatu...” (str. 27); „Przygotowanie inokulum do szczepienia” (str. 27); „tryton X-10” (str. 28); „...usuwano fazę ciekłą na lejku Buchnera...” (str. 28); „Pianki poliuretanowe przerośnięte grzybnią...” (str. 29); „Odlipidowanie grzybni zachodziło...” (str. 29); „Odczynnikami rozwijającym była mieszanina...” (str. 35); „...podczas procesowania preparatu MCG.” (str. 51) i inne. Uważam, że zasadne jest zwrócenie uwagi na poprawność stosowania słów lipidy i tłuszcz/olej. Należy unikać także pewnego rodzaju personifikacji enzymów, przypisywania im niemal ludzkich cech, bo przecież enzymy katalizują reakcje chemiczne, obniżają energię aktywacji, a nie: „...potrafią dokonywać aktu katalizycznego...” (str.7) lub „...lipazy są również zdolne do katalizowania reakcji odwrotnej...” (str. 10), „...uzdolnienia katalizyczne enzymów...” (str. 56), a „Grzyby pleśniowe zdolne do wytwarzania...” (str. 12). Doktorant operuje określeniami „spadła”, „urosla”, „niższa”, „wyższa”, etc., zamiast prawdopodobnie zalecanymi do analiz liczbowych: „większa”, „mniejsza”, etc.

Wskazane uwagi, dyskusyjne, może zbyt szczegółowe, a czasami nie wnoszące nowej wartości do przygotowanej pracy nie podważają bardzo pozytywnej oceny pracy przygotowanej przez Pana mgr. inż. Jakuba Szeląga. Zauważony powinien być ogromny zakres wykonanej pracy, różnorodność wykonanych zadań, z użyciem unikalnego katalizatora z którego odkrycia słynie zespół Pana prof. Antczaka.

Literatura z której korzystał doktorant obejmuje 123 pozycje. Moja uwaga na temat literatury dotyczy jej aktualności. Oczywiście fundamentalne prace z zakresu biokatalizy w mediach innych niż woda powstały w latach 80 i 90, ale wciąż prezentowane są nowe zagadnienia, często z użyciem nowych technik. We wprowadzeniu na stronie 6 autor przedstawił zwiększającą się na przestrzeni lat liczbę publikacji dotyczących biokatalizy z użyciem lipaz, a w zestawieniu są tylko dwie pozycje z roku 2022, 6 z roku 2021, jedna z 2020. Zestawienie literatury to także miejsce w którym łatwo o błędy: literowe (skrót p. i pp., np. pozycja 10, 109, pozycja 25: autorem tej bardzo dobrej publikacji są: S. Hari Krishna, N. G. Karanth), nie zachowanie jednolitej formy zapisu, stosowanie małych i dużych liter (np. pozycja 1 a pozycja 3), znaków interpunkcyjnych (np. pozycja 14 a 16), stosowanie kursywy (np. pozycja 29, 30, 38, 39, 56, 57, 100, 101, 102), brak danych edytorów monografii (np. pozycja 44, 85), a także użycie obowiązujących skrótów nazw czasopism (np. pozycja 8, 26, 27, 66, 68, 107, 116).

W zestawieniu cytowanej w pracy literatury znajduje się jedna pozycja, której współautorem jest Pan mgr. Szelaąg (pozycja 12, IF₂₀₁₆ 0,836). W dostępnych bazach literatury znalazłem jeszcze 3 inne publikacje, których współautorem jest doktorant, w tym 2 w czasopismach z bazy JCR.

Podsumowanie

Po analizie przedstawionej pracy dysercyjnej Pana mgr. inż. Jakuba Szelaąga stwierdzam, że stanowi ona oryginalną analizę postawionego problemu naukowego. Autor wykazał się wiedzą teoretyczną, uzasadnił celowość przeprowadzenia pracy naukowej, wykazał się umiejętnościami planowania i wykonania oryginalnych doświadczeń, w tym analiz matematycznych. Wyniki które zostały uzyskane są wartościowym uzupełnieniem wiedzy z zakresu dyscypliny technologia żywności i żywienia.

Wniosek końcowy

Uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z póź. zm.), Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora oraz Ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 poz.

261) oraz Przepisami wprowadzającymi ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z póź. zm.). Zwracam się z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. inż. Jakuba Szeląga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Maciek Adamiak