



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biochemii



dr hab. Anna Szakiel, prof. ucz.
Zakład Biochemii Roślin

Warszawa, 2023-11-22

Do Rady Dyscypliny Biotechnologia
Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr Adama Kawińskiego

pt. „Lipazy kielkujących roślin oleistych, ze szczególnym uwzględnieniem nasion jojoba –
jedynej rośliny akumulującej woski”

wykonanej w Zakładzie Biochemii Roślin Instytutu Biotechnologii
Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

pod kierunkiem prof. dr hab. Antoniego Banasia

Ocena formalna. Przedstawiona do recenzji dysertacja ma typowy układ rozprawy doktorskiej złożonej z kolejnych rozdziałów wymaganych w pracy eksperymentalnej: streszczenia, wstępu, wprowadzenia i celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji i wniosków. Rozprawa liczy 157 stron, zamieszczono w niej 21 tabel i 28 rycin; ponadto zawiera także suplement z dodatkowymi materiałami nie zamieszczonymi w głównym tekście (10 tabel i 2 ryciny), spis stosowanych skrótów oraz spis literatury, obejmujący 83 pozycje literaturowe – są to głównie anglojęzycznie publikacje oryginalne, a dodatkowo prace przeglądowe i rozdziały z podręczników akademickich. Rozprawa jest kompletna, prawidłowo zredagowana, sposób cytowania odnośników literaturowych poprawny.

Ocena merytoryczna. Zgodnie z tytułem rozprawy, głównym celem podjętych badań była charakterystyka lipaz występujących w kielkujących nasionach trzech roślin oleistych: jojoba (*Simmondsia chinensis*) katranu abisyńskiego (*Crabe abyssinica*) i

Inicznika siewnego (*Camelina sativa*). Badania te były częścią międzynarodowego projektu ICON (*Industrial Crops producing added value Oils for Novel chemicals*), którego założeniem było pozyskanie nowych źródeł olei zawierających woski. Jojoba jest jedyną aktualnie użytkowaną rośliną akumulującą znaczące ilości wosków w nasionach, natomiast wydaje się, że po odpowiednich manipulacjach genetycznych podobne cechy mogłyby wykazywać inne rośliny oleiste, np. katran czy Inicznik. Badania przeprowadzone w recenzowanej rozprawie dotyczyły właściwości lipaz występujących w kiełkujących nasionach roślin badanych gatunków, w kontekście możliwości mobilizacji wosków podczas kiełkowania nasion potencjalnych roślin transgenicznych.

Podjęty temat uważam za bardzo interesujący i istotny z punktu widzenia nie tylko potencjalnie aplikacyjnego, ale także czysto poznawczego, gdyż przeprowadzone badania przyczyniły się do poszerzenia wiedzy o procesie mobilizacji zapasowych lipidów w kiełkujących nasionach roślin oleistych.

W rozpoczynającym rozprawę wstępie Doktorant przedstawił wiele wątków związanych z głównym założeniem pracy, m.in. rozważania o alternatywnych (w stosunku do ropy naftowej) źródłach surowców do produkcji energii i chemikaliów; charakterystykę roślin oleistych ze szczególnym uwzględnieniem gatunków badanych w części eksperymentalnej; a następnie szczegółowe omówienie powstawania, budowy, gromadzonych materiałów zapasowych oraz procesów metabolicznych występujących podczas kiełkowania nasion. Wstęp teoretyczny został dobrze przygotowany, kolejność omawianych zagadnień jest logiczna, Doktorant wykazał się dogłębną znajomością tematyki związanej z podjętymi badaniami.

Część metodyczna została podzielona na kilka podrozdziałów, w których Doktorant sukcesywnie przedstawił stosowane odczynniki i materiały, a następnie procedury eksperymentalne. Użyte w pracy metody są nowoczesne, a ich dobór właściwy, w pełni adekwatny do wyznaczonych celów i umożliwiający ich realizację. Zastosowane metody są opisane klarownie i przejrzysto. Doktorant przeprowadził ilościowe i jakościowe oznaczanie zawartości lipidów zapasowych badanych nasion posługując się odpowiednimi metodami ekstrakcji oraz chromatografii adsorpcyjnej i gazowej; określił specyficzność substratową lipaz wyizolowanych z frakcji mikrosomalnych kiełkujących nasion; oznaczył zawartość białek rozpuszczalnych i węglowodanów. Na uwagę zasługują zwłaszcza metody poświęcone głównemu celowi pracy, czyli charakterystyce lipaz – wymagały one m.in.

pracochlónnych procedur izolowania i zagęszczania frakcji mikrosomalnych oraz syntezy znakowanych radioaktywnie (izotopem węgla [^{14}C]) substratów do reakcji *in vitro*.

Uzyskane wyniki, przedstawione w postaci przejrzystych tabel i wykresów, zostały szczegółowo omówione i zinterpretowane. Za najważniejsze osiągnięcia recenzowanej rozprawy można uznać:

- stwierdzenie korelacji aktywności lipaz występujących we frakcjach mikrosomalnych izolowanych z kiełkujących nasion z intensywnością mobilizacji lipidów zapasowych, co pozwala uznać frakcje mikrosomalne za odpowiedni model badawczy do charakterystyki lipaz;
- stwierdzenie wzrastającej zawartości oleozyn we frakcjach mikrosomalnych, co może sugerować, że błony degradowanych ciałek olejowych w kiełkujących nasionach ulegają integracji z błonami mikrosomów, stąd też obecność lipaz;
- wykazanie, że lipazy kiełkujących nasion katrań abisyńskiego i lnicznika siewnego wykazują zdolność hydrolizy wosków, a więc lipazy nasion jojoba nie są pod tym względem unikatowe, co więcej - lipazy wszystkich badanych gatunków roślin (także jojoba) wykazują wyższe powinowactwo do triacylogliceroli niż wosków;
- lipazy kiełkujących nasion wszystkich badanych roślin wykazują zdolność nie tylko degradacji, ale także syntezy wosków;
- charakterystyka biochemiczna i substratowa badanych lipaz wykazała wiele podobieństw, ale także specyficznych różnic, na przykład w zakresie optymalnych temperatur czy wyjątkowej stymulacji lipazy nasion jojoba przez jony Mg^{2+} ;
- testowane siewki linii transgenicznych roślin lnicznika, podobnie jak badane w innych ośrodkach transgeniczne siewki katrań, wykazują wolniejszą mobilizację wosków i słabszy rozwój w pierwszych dniach kiełkowania niż analogiczne siewki typu dzikiego, ale problemy te wydają się nie być związane z właściwościami lipaz.

Rozprawę zamyka obszerna i wnikliwa dyskusja, która jest wartościową częścią recenzowanej rozprawy i dowodzi nie tylko umiejętności właściwego doboru cytowanej literatury jako tła do interpretacji uzyskanych wyników, ale także krytycznego podejścia Doktoranta do badań (zarówno cudzych jak i własnych) w przypadku ich rozbieżności.

Obowiązkiem recenzenta jest także zauważenie niedociągnięć rozprawy.

Opracowując wyniki analiz Doktorant podawał w przedstawionych tabelach i wykresach średnie wartości z kilku (na ogół 4) powtórzeń biologicznych i odchylenia

standardowe. W przypadku wielu oznaczeń nie przeprowadził analizy istotności statystycznej otrzymanych wyników, podając jako powód fakt, że dane oznaczenie nie było głównym celem pracy (choćby w przypadku analiz składu frakcji lipidowej nasion). Natomiast tam, gdzie analiza istotności statystycznej została przeprowadzona, informacja o zastosowanej metodzie (czyli dwustronnym teście różnic średnich) jest umieszczona jedynie w objaśnieniach do tabeli. Zdaniem recenzenta opracowanie statystyczne wyników jest ważnym elementem pracy eksperymentalnej i zasługuje na oddzielny, nawet jeśli bardzo krótki, podrozdział w części metodycznej.

Podobnie, nawet jeśli oznaczenie składu frakcji lipidowej, w tym zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych, nie było głównym celem pracy, wartościowe i cenne byłoby umieszczenie przykładowego chromatogramu gazowego GC-FID (np. w suplemencie) ilustrującego uzyskany chromatograficzny rozdział estrów metylowych kwasów tłuszczowych oraz zderywatyzowanych alkoholi tłuszczowych. Taka ilustracja świadczyłaby o poprawności zastosowanej metody i wiarygodności przeprowadzonych analiz.

Przedstawione powyżej uwagi krytyczne mają charakter redakcyjny i nie wpływają na jednoznacznie pozytywną ocenę merytoryczną rozprawy. Trochę szkoda, że Doktorant nie wspomniał w rozprawie o opublikowaniu części wyników w artykule w BMC Plant Biology z 2021 r. (w którym jest nota bene pierwszym autorem).

Kierując się czystą ciekawością naukową, chciałabym, aby podczas publicznej obrony rozprawy Doktorant ustosunkował się do głównego założenia podjętych badań w kontekście uzyskanych przez siebie wyników, czyli ocenił potencjał badanych roślin (katranu abisyńskiego i lnicznika siewnego – i ich linii transgenicznych) jako ewentualnych nowych źródeł olei zawierających woski do produkcji przemysłowej. Czy od momentu zakończenia prac eksperymentalnych opisanych w recenzowanej rozprawie nastąpił jakiś postęp w badaniach?

Podsumowując - uważam, że temat podjęty w recenzowanej rozprawie doktorskiej jest istotny i wartościowy, zastosowane metody zostały adekwatnie dobrane, doświadczenia prawidłowo zaplanowane i starannie przeprowadzone, a uzyskane wyniki są oryginalne i interesujące. Doktorant wykazał się samodzielnością, rozległą wiedzą, umiejętnością planowania eksperymentów oraz interpretacji ich wyników, a także doboru i korzystania z literatury naukowej do przeprowadzenia dyskusji.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Adama Kawińskiego p.t. „Lipazy kiełkujących roślin oleistych, ze szczególnym uwzględnieniem nasion jojoba – jedynej rośliny akumulującej woski” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, świadczy o nabyciu dogłębnej wiedzy teoretycznej, znajomości technik laboratoryjnych i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy badawczej przez Kandydata. Spełnia ona zatem wszystkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595; z późn. zm.) i jednocześnie ujętym w przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 179. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.).

W związku z powyższym, przedstawiam Radzie Dyscypliny Biotechnologia Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego **wniosek o dopuszczenie Pana mgr Adama Kawińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia doktora w reprezentowanej dyscyplinie.**

