

Kraków, 23 grudnia 2022 r.

**Wpłynęło dnia:**

**02. 01. 2023**

**Dziekanat Wydziału  
Biotechnologii i Ogrodnictwa URK**

Dr hab. Piotr Mleczko, prof. UJ  
Instytut Botaniki  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie  
e-mail: piotr.mleczko@uj.edu.pl

Rada dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo, Wydział  
Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego  
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

**Recenzja pracy doktorskiej mgr. inż. Piotra Zięby**

p.t. „Zawartość substancji biologicznie aktywnych w mycelium i owocnikach grzybów  
*Pleurotus* spp. uzyskanych z podłoża suplementowanych”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy problematyki wykorzystania grzybów jadalnych, a w szczególności gatunków rodzaju bocznik (*Pleurotus*), jako źródła pierwiastków biogenych oraz związków biologicznie czynnych. Podstawowymi zagadnieniami poruszonymi w pracy doktorskiej są zależność pomiędzy ilością (stężeniem) wyżej wspomnianych pierwiastków i związków a rodzajem podłoża (płynna pożywka hodowlana/podłoże do uprawy) i typem materiału grzybowego (grzybnia/owocniki) a także efekt, jaki wywiera suplementacja podłoża o sole trzech pierwiastków: selenu, cynku i magnezu, istotnych dla zdrowia człowieka, na zmianę poziomu akumulacji tych i szeregu innych pierwiastków oraz produkcję związków prozdrowotnych. Tematykę pracy uważam za ważną z naukowego i praktycznego punktu widzenia. Wpisuje się ona w nurt badań nad wykorzystaniem grzybów jako ważnego źródła substancji wpływających korzystnie na zdrowie człowieka, w tym stymulujących i wspierających naturalne procesy obronne organizmu.

Na rozprawę doktorską składają się cztery anglojęzyczne artykuły: jeden o charakterze przeglądowym oraz trzy o charakterze badawczym. Wszystkie prace są wieloautorskie, w trzech z nich (w tym dwóch badawczych) Pan Piotr Zięba jest autorem pierwszym a w jednej z prac badawczych także autorem korespondencyjnym. Według załączonych oświadczeń, Doktorant był zaangażowany w powstawanie prac na wszystkich etapach: od tworzenia koncepcji (za wyjątkiem pracy nr 2: Food Chemistry 327, 2020), poprzez opracowywanie metodyki, przeprowadzenie części uprawowej doświadczeń, analizy laboratoryjne, opracowywanie i analizowanie oraz interpretację danych aż po tworzenie artykułów (od mansuskryptu po odpowiedzi na uwagi recenzentów). W pracy przeglądowej (Acta Mycologica 55[2], 2020) był jedną z dwóch osób dokonujących przeglądu literatury oraz zbierających i opracowujących dane do artykułu. Wszystkie prace badawcze zostały opublikowane w czasopiśmie posiadającym wysoki współczynnik wpływu (IF)



i wysoko punktowanych przez Ministerstwo Edukacji i Nauki. O ile czasopismo *Molecules* (o charakterze otwartego dostępu, wydawane przez wydawnictwo MDPI), w którym opublikowano dwie ostatnie, kluczowe dla pracy doktorskiej artykuły badawcze, trudno uznać za selektywne (co oznacza, że jego wskaźniki parametryczne nie są dobrymi predyktorami potencjalnego znaczenia publikacji), o tyle czasopismo *Food Chemistry*, (wydawane przez wydawnictwo Elsevier), w którym opublikowana została pierwsza z prac badawczych, jest czasopismem selektywnym o bardzo dużej renomie.

Integralną częścią pracy jest obszerne podsumowanie w języku polskim, zawierające najważniejsze informacje, w tym dotyczące tła problematyki badawczej, celów pracy, stosowanej metodyki oraz najważniejszych wyników i wniosków. W części tej, liczącej ponad 25 stron (w tym tych z rycinami i tabelami), zawarte są też podstawowe cele pracy doktorskiej. Cele pracy, chociaż wymienione w komplecie, w moim przekonaniu zostały sformułowane nieprawidłowo. Cele powinny w zwięzły sposób wskazywać na pytania badawcze, nie powinny jednak zawierać wyników (patrz akapit 1, wersy 6 i 7) ani streszczać pracy. W pierwszym akapicie pada stwierdzenie, że „Celem pracy było otrzymanie kultur *in vitro* sześciu gatunków boczników... oraz opracowanie optymalnej metody uprawy tych gatunków...”. Mógł to być jeden z celów, ale na pewno nie był to cel główny (na co nie wskazuje również tytuł rozprawy doktorskiej). Dalsza część rozdziału „Cele pracy” ma charakter streszczenia/podsumowania („Następnie otrzymaną biomasę mycelium...porównano...”), po czym Autor zauważa, że „Ważnym celem... badań było też określenie czy możliwe jest fortyfikowanie kultur *in vitro* oraz substratu uprawowego w biopierwiastki...” - oczywiście, że jest to możliwe, nie to jest jednak najważniejsze; najważniejsze jest pytanie jak taka fortyfikacja wpływa na akumulację pierwiastków i produkcję substancji biologicznie czynnych. Użycie słowa „też” powoduje, że ma się wrażenie, że jest to cel dodatkowy doktoratu, podczas gdy tak naprawdę jest to cel główny i podstawowy. Cele pracy mogą być główne oraz dodatkowe, powinny też być wymienione w logicznej kolejności. Tak więc celami pracy było: (1) otrzymanie płynnych kultur myceliarnych sześciu gatunków boczników oraz modyfikacja i optymalizacja (to m.in. nowatorski skład podłoża, opracowany przez Doktoranta) metody ich uprawy w celu uzyskania surowca o najwyższej jakości (publikacja 2), (2) porównanie owocników uzyskanych w uprawie oraz grzybni uzyskanej w hodowli płynnej pod kątem jakościowego i ilościowego składu pierwiastków i substancji biologicznie czynnych (publikacja 2), (3) sprawdzenie, czy i w jaki sposób fortyfikacja podłoży hodowlanych oraz substratu uprawowego wybranymi pierwiastkami wpływa na polepszenie właściwości prozdrowotnych surowca grzybowego (owocników i grzybni) dwóch gatunków boczników: *P. djamor* i *P. eryngii* (publikacja 3).

W rozdziale poświęconym metodom, powtórzono opisy metod z artykułów wchodzących w skład pracy doktorskiej, uzupełniono je jednak o kilka szczegółów i aspektów, które ze zrozumiałych względów nie mogły znaleźć się w publikacjach. Tu między innymi znalazł się pełen skład pożywki Oddoux, co jest o tyle istotne, że w żadnej z publikacji ten skład nie został podany a dostęp do oryginalnej publikacji z jego składem jest bardzo mocno utrudniony. O ile metody analiz chemicznych podano skrótowo, ale wymieniając je wszystkie, o tyle metody statystyczne w zasadzie nie zostały w ogóle wymienione (choć są dostępne w publikacjach). W rozdziale tym (podrozdział „Metoda pozyskania owocników *Pleurotus*”), pada informacja o autorsko opracowanym składzie podłoży hodowlanych oraz optymalizacji warunków uprawy, tymczasem ani w tym miejscu ani w żadnym z artykułów badawczych (co jest zrozumiałe, ponieważ nie dotyczyły one tego aspektu) i w artykule przeglądowym (z definicji nie ma w nim własnych danych) nie został przedstawiony sposób opracowywania uprawy (od momentu wyjściowego, poprzez doświadczenia prowadzące do uzyskania pożądanego, najlepszego wyniku uprawy, korzystanie z konkretnych



inspiracji i źródeł itd.), a jedynie końcowy efekt, a szkoda, ponieważ byłaby to cenna informacja, tym bardziej, że Autor własną pracą doszedł do spektakularnych wyników. Polskojęzyczne podsumowanie byłoby odpowiednim miejscem do zaprezentowania doświadczenia Doktoranta jako specjalisty uprawy grzybów. Dodatkowo, opracowanie autorskich metod uprawy jest wymieniane jako jeden ze (wstępnych) celów pracy.

Wydaje się, że zupełnie niepotrzebne było wprowadzanie rozdziału „Streszczenia załączonych publikacji”, skoro we wcześniejszych rozdziałach podano metodykę wszystkich prac a w kolejnym ich wyniki. W rozdziale „Wyniki” znalazły się też metody, co nie było konieczne, ponieważ wymienione zostały we wcześniejszych rozdziałach (a w każdym razie wszystkie konieczne informacje na ten temat powinny były się tam znaleźć).

W rozdziale podsumowującym wyniki nie jest dla mnie zrozumiałe zestawianie ze sobą danych o najwyższej i najniższej zanotowanej zawartości pierwiastka/substancji, kiedy obydwie te wartości wystąpiły u różnych gatunków *Pleurotus* i dotyczyły zupełnie innych pierwiastków/substancji (np. Rozdział 8.1, wersy 10-12). Moje zastrzeżenia budzi również podstawa, na której oparto wybór dwóch gatunków *Pleurotus* do doświadczeń, których wyniki zaprezentowano w publikacjach nr 3 i nr 4, a więc kluczowych dla pracy doktorskiej. W rozdziale 8.2 Autor bardzo ogólnie zaznacza, że podstawą były dane oraz wyniki analiz zaprezentowane w pracy nr 2, ale nie wskazuje na konkretne powody. Z pewnością powodem wyboru *P. eryngii* do doświadczeń z suplementacją związkami selenu nie była najwyższa zanotowana wartość stężenia tego pierwiastka, ponieważ zarówno w przypadku grzybni jak i owocników najwyższe wartości zanotowano dla *P. florida*. Podobna sytuacja jest w przypadku wyboru gatunku do doświadczeń z suplementacją związkami magnezu - wśród gatunków o najwyższych stężeniach tego pierwiastka nie znalazł się wybrany do badań *P. djamor* - były nimi *P. citrinopileatus*, *P. eryngii* i *P. pulmonarius*. W przypadku suplementacji związkami cynku rzeczywistą podstawą mogła być duża akumulacja tego pierwiastka w grzybni *P. eryngii*, chociaż najwyższe wartości dla owocników stwierdzono już dla *P. djamor* i *P. ostreatus* a nie *P. eryngii*.

Pomimo, że dyskusja wyników jest zawarta w każdym z trzech badawczych artykułów wchodzącym w skład pracy doktorskiej, w polskojęzycznym podsumowaniu najbardziej zwraca uwagę właściwie całkowity brak dyskusji spajającej całość opublikowanych w oddzielnych pracach wyników.

Polskie podsumowanie zawiera też w szeregu miejscach błędy językowe i stylistyczne, wyrażenia kolokwialne i żargonowe (zostały zaznaczone na manuskrypcie pracy, dostępnym dla Doktoranta), co powoduje wrażenie, że zostało ono napisane w pewnym pośpiechu. W tej części znalazło się również kilka nieznaczących błędów merytorycznych, m.in. błędnie przetłumaczono angielską nazwę „malt extract” jako „ekstrakt maltozowy” - chodzi, oczywiście, o ekstrakt słodowy (Tabela 1, skład pożywki hodowlanej).

W pierwszej publikacji badawczej (nr 2) analizowany był poziom zawartości szeregu pierwiastków oraz związków biologicznie czynnych w grzybni hodowanej na płynnej pożywce Odoux oraz w pochodzących z uprawy owocnikach boczników. Dużą wartość poznawczą ma analiza pod tym kątem większości (o ile nie wszystkich) uprawianych gatunków boczników (sześć gatunków). Przy okazji nasuwa się pytanie: jak dużo szczepów poszczególnych gatunków boczników jest uprawianych w Polsce? Czy są to pojedyncze szczepy czy też jest ich wiele? Jeśli wiele, to jaki jest to rząd wielkości? Najważniejszymi wynikami tej pracy było stwierdzenie, że skład biochemiczny zależy od gatunku grzyba, a ponadto, że poziom produkowanych i akumulowanych związków i pierwiastków jest w większości odmienny u grzybni i owocników w przypadku tego samego gatunku, co dotyczy m.in. związków fenolowych, istotnych antyoksydantów. W pracy wskazano również na owocniki bocznika mikołajkowego, jako cenne



źródło związków indolowych. W przeciwieństwie do owocników to grzybnia boczniaków (głównie b. mikołajkowego i b. różowego) jest cenniejszym źródłem ergoteiny i lowastatyny a także witamin z grupy B. Bardzo cenną informacją jest stwierdzenie, że to owocniki są lepszym źródłem makroelementów, natomiast grzybnia rosnąca w podłożu hodowlanym akumuluje większe ilości mikroelementów. Odmienne właściwości biochemiczne owocników i grzybni zostały potwierdzone również chemometrycznymi analizami statystycznymi w tym przede wszystkim grupującymi. Moją uwagę zwróciło kilka aspektów szczegółowych: (1) brak analizy stężenia pierwiastków w pożywce (co uniemożliwia zbadanie zdolności grzybni do bioakumulacji tych pierwiastków), (2) brak podanej liczby powtórzeń w metodyce (jedynie w uwadze do tabeli znajduje się lakoniczna uwaga o N=6, nie wiemy jednak, czy chodzi o replikacje czy autoreplikacje - ta kwestia powinna być zostac jednoznacznie wyjaśniona w opisie metod), (3) sposób pobierania prób do badań owocników (czy zastosowano próbę zbiorczą ze wszystkich zmielonych owocników z danego worka, czy pobierano jedynie niewielki wycinek jednego z owocników - co byłoby mniej prawidłowe), (4) błąd w nazwie „maltose extract” - chodzi oczywiście o „malt extract” (ekstrakt słodowy) oraz (5) brak szeregu informacji dotyczących analiz statystycznych - pojawiają się one dopiero w rozdziale poświęconym wynikom i dyskusji, co nie powinno mieć miejsca. Szkoda, że w artykule brak jest też odniesienia uzyskanych wyników do potrzeb człowieka w zakresie suplementacji badanymi pierwiastkami oraz substancjami bioaktywnymi (nie wiemy, czy uzyskane wartości to dużo czy mało w kontekście zapotrzebowania organizmu człowieka).

W dwóch kolejnych artykułach badawczych (nr 3 i 4), kluczowych z punktu widzenia tematu pracy doktorskiej, zbadano wpływ suplementacji związkami cynku i selenu (publikacja 3) oraz magnezu (publikacja 4) na produkcję związków biologicznie aktywnych oraz akumulację szeregu makro- i mikroelementów w grzybni z hodowli płynnej (tu użyto pożywki identycznej jak w artykule nr 2) oraz w owocnikach pochodzących z uprawy (w tym przypadku zastosowano podłoża i warunki zmodyfikowane i zoptymalizowane indywidualnie dla każdego z badanych gatunków pod kątem maksymalnej biomasy produkowanych owocników). Do najciekawszych wyników tych prac z pewnością należy stwierdzenie, że suplementacja tym samym związkiem daje bardzo różne efekty w przypadku grzybni hodowanej na pożywce płynnej oraz w przypadku owocników (i prawdopodobnie również grzybni) uzyskanych na podłożach uprawowych, przy czym na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że większe perspektywy ma pozyskiwanie substancji biologicznie czynnych w formie grzybni niż owocników. Jak piszą autorzy, nie dotyczy to jednak lowastatyny, której poziom negatywnie reaguje na suplementację zastosowanymi dawkami związków cynku i selenu. Uzyskany efekt różni się również w zależności od zastosowanej formy związku (dane dla cynku i magnezu) oraz dawki (dane dla magnezu). Suplementacja solami magnezu spowodowała wyraźne polepszenie jakości surowca, w tym owocników pod kątem zawartości nie tylko magnezu ale również związków o działaniu antyoksydacyjnym. W przypadku tego pierwiastka, jedynie najwyższa dawka soli powodowała wyraźne obniżenie plonowania.

Dobór zarówno obiektu badań jak i metodyki a przed wszystkim układu doświadczalnego jest czymś subiektywnym i należy do decyzji autorów, chociaż powinna ona być poparta konkretnymi motywami. Jednym ze słabszych punktów pierwszej pracy (nr 3) dotyczącej suplementacji solami cynku i selenu jest brak w niej elementu doświadczalnego, który wskazywałby na kierunkowe zmiany w produkcji konkretnych biologicznie czynnych związków chemicznych czy akumulację konkretnych pierwiastków w zależności od dawki suplementowanej soli. Stąd Autor na podstawie otrzymanych danych mógł jedynie stwierdzić, jakie efekty niesie zastosowanie jedynej zastosowanej dawki związku, ale nie mógł dać już żadnych rekomendacji co do kierunku sterowania dawką dla uzyskania optymalnych wyników czy to dla grzybni czy dla owocników. Jest to o tyle istotne, że wśród wyników znajduje się również obniżenie plonowania



owocników, co raczej z punktu widzenia ich produkcji byłoby nieopłacalne, nawet jeśli zawierają one podwyższoną zawartość niektórych substancji. Zastosowane dawki spowodowały również obniżenie zawartości niektórych z analizowanych związków i pierwiastków. Wydaje się, że najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla suplementowanej grzybni, ale tu nasuwa się pytanie, czy w takim razie możliwe jest zastosowanie pożywki Oddoux do produkcji grzybni na skalę zapewniającą opłacalność? Zastosowanie pożywek o innym składzie może dać zupełnie inne efekty. Rozumiem, że analiza chemiczna (identyfikacja i zbadanie poziomu) badanych związków i pierwiastków jest bardzo czaso- i kosztochłonna. Czy zatem nie należało raczej ograniczyć analiz do wybranych, najbardziej cennych czy reprezentatywnych związków/pierwiastków na rzecz wprowadzenia do doświadczeń różnych dawek soli selenu i cynku? Zastosowany układ badawczy odpowiedziałby na pytanie o kierunkowość zmian w zawartości substancji, ale też zawierał konkretne wskazówki do dalszych badań a być może również miał wartość praktyczną poprzez wskazanie optymalnych dawek (jeśli istnieją). Szczególnie, że w punkcie 11 Wniosków Autor pisze, że „możliwe jest sterowanie metabolizmem grzybów i składem biochemicznym surowca poprzez dodanie do pożywki lub substratu soli i związków pierwiastków”, jednak na podstawie uzyskanych wyników nie można stwierdzić, w jaki sposób jest to możliwe. W ostatniej pracy (nr 4), dotyczącej suplementacji solami magnezu, układ eksperymentalny jest bardziej interesujący i problemowy - zastosowano w nim nie tylko dwie różne sole magnezu ale również różne dawki, co dało już możliwość bardziej ukierunkowanych wskazówek i przewidywania zmian w składzie owocników i grzybni.

Przy okazji trzeba zauważyć, że w żadnym miejscu (ani w podsumowaniu ani w poszczególnych pracach) nie został podany powód zastosowania takich a nie innych dawek soli wybranych metali. Zatem: czym spowodowany był wybór takich dawek? W podsumowaniu pada jedynie lakoniczne stwierdzenie, że zostały one dobrane na podstawie doświadczeń (jakich? Jakie były ich wyniki?).

Bardzo interesującą częścią analiz wyników obydwu prac były analizy statystyczne. Stwierdzono w nich między innymi, że pewne grupy związków chemicznych oraz pierwiastków cechuje podobna reakcja na zastosowane w suplementacji dawki pierwiastków. Byłaby to interesująca wskazówka co do dalszych badań, pozwalająca na przewidzenie kierunkowych zmian nie tylko dla pojedynczych pierwiastków/związków, ale dla grup substancji. W tym miejscu należy zauważyć, że w polskojęzycznym streszczeniu niemal nieobecne są wyniki analiz statystycznych.

Przedstawione do recenzji prace otwierają szereg pytań badawczych i nowych perspektyw dalszych badań. Bardzo jestem ciekaw, jak widziałby Doktorant rozwinięcie swoich dotychczasowych badań, w jakim kierunku powinny pójść według niego dalsze doświadczenia?

Podsumowując, mimo pewnych krytycznych uwag, z których część na pewno ma charakter polemiczny, uważam przedstawione do recenzji publikacje za znaczący i oryginalny wkład do poznania zagadnienia wykorzystania grzybów z rodzaju *Pleurotus* jako źródła substancji prozdrowotnych oraz wskazania kierunku dalszych badań o charakterze aplikacyjnym. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres badanych związków biologicznie czynnych i pierwiastków, stwierdzenie, że suplementacja solami wybranych metali o charakterze prozdrowotnym może wpływać w odmienny sposób na produkcję pożądaných związków chemicznych i akumulację pierwiastków a ponadto zmiany te mogą zależeć od typu zastosowanej soli danego metalu oraz mieć inny charakter w zależności od typu surowca i podłoża (grzybni z hodowli płynnych i owocniki z upraw). Za ważny, chociaż poboczny aspekt pracy, niestety słabo w niej rozwinięty, uważam zmodyfikowanie i zoptymalizowanie uprawy dwóch badanych gatunków boczników.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami). Wnoszę zatem do Rady dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr. inż. Piotra Zięby do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized symbol followed by the name 'Mleczo'.

Piotr Mleczo