



RECENZJA

rozprawy doktorskiej p. mgr Justyny Ruchały pt.
„Konstruowanie szczepów drożdży *Hansenula polymorpha* z ulepszonymi
charakterystykami alkoholowej fermentacji ksylozy”
wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii
Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie
pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Sybirnego

1. Ocena problematyki rozprawy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pod w/w tytułem jest stosunkowo zwięzłym maszynopisem, bo liczącym tylko 156 stron tekstu (do jego skompaktowania przyczynił się też zapewne mniejszy niż w innych dysertacjach rozmiar czcionki), jest napisana w tradycyjnym układzie, obejmującym bardzo obszerny 50-stronicowy przegląd literatury, nazwany wstępem, poprzedzony spisem skrótów używanych w tekście oraz 7 stronicowym streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim. We wstępie Autorka zamieściła 3 kolorowe rysunki, a na jego końcu przedstawiła cele swych badań. Omówieniu materiału biologicznego i metod użytych w badaniach jest poświęcony 19 stronicowy rozdział – materiał i metody, a kolejną bardzo obszerną część tekstu, bo liczącą 41 stron to interesujące wyniki badań, które zilustrowano 18 rysunkami i 10 tabelami, co stanowi bardzo obszerną i wyjątkowo dobrze przedstawioną dokumentację pracy. Po wynikach następuje bardzo treściwa, 11-stronicowa dyskusja najważniejszych wyników, podsumowująca całość badań. Końcowy rozdział to piśmiennictwo, liczące 196 cytowania, w tym 5 stron internetowych, w większości oryginalnych prac z ostatniego dziesięciolecia łącznie z kilkunastoma najnowszymi artykułami, opublikowanymi w 2015 roku, które wykorzystano we wstępie pracy, celem wprowadzenia czytelnika w omawiany problem. Na początku maszynopisu znajduje się spis treści.

Tekst rozprawy jest napisany dobrą polszczyzną błędy literowe i stylistyczne w kontekście rozmiaru pracy są nieliczne i na tyle nieistotne, że nie będę ich cytować. Układ tekstu jest przejrzysty, kolejność rozdziałów logiczną, a jakość dokumentacji wysoką, choć nie zawsze dobór barw na rysunkach jest dostatecznie skonstrastowany. Domyślałam się, że barwy wybrane przez Doktorantkę były nieco inne niż w wydruku jednak w kilku przypadkach utrudniło to

percepcję dokumentacji. Ponadto, rozmiar niektórych rysunków jest w mojej opinii zbyt mały, zwłaszcza, jeśli chodzi o opisy słowne na schematach – dotyczy to w szczególności Rys. 1, 3 i 8.

Jednymi z najważniejszych problemów współczesnej cywilizacji są zagadnienia dotyczące wyżywienia wzrastającej liczby ludności, dostępu do źródeł wody i energii oraz zachowanie naturalnego środowiska w stanie nie gorszym niż go zastaliśmy. Stąd świadomość naszych związków ze środowiskiem, w którym żyjemy, zaczyna dominować w większości podejmowanych przez człowieka działań związanych z eksploatacją zasobów przyrody i wymusza działalność pro-ekologiczną. Do ludzi dociera świadomość, że podejmując niekiedy proste działania, można nie niszczyć podstawowych elementów środowiska wyeliminować szkodliwe czynniki z naszego otoczenia, a prowadząc odpowiedni styl życia zachować zdrowie na długie lata.

Nasze bogactwa naturalne i zasoby środowiska mocno nadwerżone w przeszłości, bez wątpienia nie wytrzymają dalszych obciążeń. Eksperci już dziś ostrzegają, szczególnie w krajach rozwijających się, a także i w Polsce, że wzrastająca liczba ludności pociągnie za sobą wzrost zanieczyszczenia środowiska. Wydaje się, że nowoczesne procesy biotechnologiczne wykorzystujące najnowsze zdobycze wiedzy z zakresu ekologii, biologii molekularnej, genetyki, inżynierii genetycznej i mikrobiologii mogą sprostać stojącym przed ludzkością zadaniom i przyczynić się do zmniejszenia zanieczyszczenia środowiska oraz zapewnić dostateczną ilość żywności i energii. Nic, więc dziwnego, że temat pracy doktorskiej p. mgr Justyny Ruchały związany jest z biologią, aktywnością i właściwościami biochemicznymi drożdży, które odpowiednio skonstruowane metodami inżynierii materiałowej i genetycznej zamierza wykorzystać do produkcji alkoholi, głównie etanolu z pentoz zawartych, w ligninocelulozie, co może znaleźć zastosowanie w produkcji biopaliw. Należy zaznaczyć, że w chwili obecnej nie ma na świecie ani jednej efektywnej oraz opłacalnej technologii, która pozwalałaby na konwersję surowej biomasy roślinnej do etanolu. Cała uwaga Doktorantki skupia się na takiej „idea fix”, jakim byłaby modyfikacja termotolerancyjnego szczepu drożdży *Hansenula polymorpha*, w taki sposób, aby można go było wykorzystać w procesie SSF – (Simultaneous Saccharification and Fermentation) tj. jednoczesnego scukrzania i fermentacji.

Należy zaznaczyć, że na całym świecie poszukuje się skutecznych i szybkich metod pozwalających na konwersję materiału ligninocelulozowego do cukrów prostych, a następnie wykorzystać je do produkcji alkoholi. Jak na razie wydaje się, że wykorzystanie metod biotechnologicznych z zastosowaniem mikroorganizmów w tym drożdży są jednymi z najefektywniejszych sposobów, które mogą już w niedalekiej przyszłości rozwiązać ten ważny problem. Oczywiście proces biodegradacji ligninocelulozy przez drobnoustroje jest wieloetapowy i uwarunkowane wieloma czynnikami, których jeszcze dokładnie nie znamy. Te skomplikowane warunki przebiegu biokonwersji wskazują jak trud-

nym jest to proces i ile jeszcze trzeba szczegółowych badań, aby otrzymywać w tani sposób alkohole-biopaliwa tzw. drugiej generacji

Dlatego jestem pełen uznania za trud podjęcia badań zmierzających do wyjaśnienia biochemicznych zależności między dzikimi szczepami drożdży, a stworzonymi w warunkach laboratoryjnych. Głównym celem pracy było uzyskania nowych wydajniejszych szczepów zdolnych do zwiększonej produkcji etanolu. Podjęcie powyższych badań uważam za słuszne i celowe, a wykonanie ich na konkretnych szczepach i przeprowadzenie doświadczeń w warunkach laboratoryjnych gdzie stworzono i kontrolowano wiele naturalnych zależności i interakcji za bardzo cenne osiągnięcie Doktorantki.

2. Ocena pracy pod względem metodycznym

Przystępując do oceny recenzowanej pracy, jako rozprawy doktorskiej pragnę zaznaczyć, że zebrane wyniki dotyczą ogromnego zakresu badań wykonanych w warunkach laboratoryjnych. Powyższe badania stanowią cenne osiągnięcie naukowe z zakresu biologii molekularnej, mikrobiologii i inżynierii metabolicznej, wyjaśniające wiele problemów związanych z modyfikacjami genetycznymi drożdży. Zastosowane metody badawcze oparte są na powszechnie stosowanych metodach genetycznych, mikrobiologicznych, fizycznych i chemicznych, są właściwie dobrane oraz zastosowane, pozwalające na udowodnienie postawionego celu. Praca wykonana jest poprawnie pod względem metodycznym. Na szczególne podkreślenie zasługują badania nad konstruowaniem szczepów z nadekspresją genów czynnych w rozkładzie ksylozy oraz badania nad uzdolnieniami uzyskanych mutantów do przeprowadzania procesu fermentacji celem uzyskania etanolu. Powyższe badania Doktorantka przeprowadziła wyjątkowo starannie, w licznych powtórzeniach, co zaowocowało wieloma bardzo interesującymi wynikami, które być może znajdą praktyczne zastosowanie w procesach biotechnologicznych związanych z wykorzystaniem biomasy roślinnej celem otrzymywania cennego alkoholu etylowego.

3. Ocena pracy pod względem merytorycznym

Z obowiązku recenzenta powinienem wskazać jakieś nieścisłości, niekompletne tezy, czy też inne niejasności w ocenianej rozprawie doktorskiej, jednak nie znajduję fragmentów, które wymagałyby dodatkowych wyjaśnień.

Oceniana praca doktorska zawiera bardzo dobrze opracowaną część wstępną-przeglądową, w której autorka opisuje dotychczasowy dorobek naukowy w tej dziedzinie, dając wyraz swej doskonałej orientacji w najnowszych osiągnięciach badawczych nad rolą i znaczeniem drobnoustrojów w tym niektórych gatunków bakterii i drożdży w produkcji różnych alkoholi, które można by wykorzystać, jako biopaliwa. Szczegółowo analizuje różne techno-

logie stosowane na świecie i ocenia każdą z nich w kontekście wykorzystania ich w Polskich warunkach.

Głównym celem wykonanej pracy doktorskiej były badania genetyczne nad modyfikacją drożdży, zmierzające do otrzymania nowych efektywnych szczepów drożdży, które konstruowane nowoczesnymi metodami inżynierii genetycznej byłyby zdolne do biokonwersji biomasy ligninocelulozowej zawierającej duże ilości ksylozy do etanolu. Zamierzony cel osiągnięto poprzez konstruowanie nowych szczepów *Hansenula polymorpha* wykorzystując do tego celu wiele szczepów dzikich i oznaczonych, plazmidów, nowoczesne metody transformacji i ekspresji genów, a także wiele metod biochemicznych pozwalających analizować aktywność skonstruowanych nowych szczepów drożdży z nadekspresją genów kodujących ważne cechy metaboliczne.

W wyniku przeprowadzonych badań genetycznych, biochemicznych, i mikrobiologicznych Doktorantka uzyskała wyniki, które wiążą się z badaniami regulacji metabolizmu i fermentacji ksylozy u termotolerancyjnych drożdży *Hansenula polymorpha*, które uzyskano na drodze inżynierii metabolicznej i klasycznej selekcji, zdolnych do jednoczesnego scukrzania i fermentacji hydrolizatów lignocelulozy. Szczególnie interesujące są wyniki dotyczące m.in.:

1. Konstruowanie szczepów z nadekspresją genu kodującego zmodyfikowaną reduktazę ksylozy XR) oraz genu kodującego natywną dehydrogenazę ksylozy,
2. Selekcja szczepów z jednoczesną ekspresją genów kodujących enzymy XR oraz XDH wraz z XK oraz PDC,
3. Otrzymywanie oraz charakterystyka szczepów nadprodukcujących etanol opornych na preparat przeciwnowotworowy 3-bromopirogronian,
4. Izolacja genu *CAT8*,
5. Konstruowanie plazmidu delecyjnego dla szczepu dzikiego NCYC 495 *H. polymorpha* z kodującym oporność na norzeotrycynę,
6. Izolacja mutantów *cat8Δ*,
7. Selekcja delecyjnych szczepów *cat8Δ* z wykorzystaniem najlepszego dotychczas uzyskanego producenta etanolu z ksylozy,
8. Badania wzrostu mutantów na fermentowalnych oraz nie fermentowalnych podłożach,
9. Oznaczanie stężenia etanolu oraz innych metabolitów fermentacji alkoholowej,
10. Analiza oddychania komórek za pomocą elektrody tlenowej,
11. Analiza qRT-PCR mutantów w porównaniu ze szczepami rodzicielskimi,
12. Analiza aktywności enzymatycznej mutantów i szczepów rodzicielskich.

Przeprowadzone badania są bardzo ważne pod względem naukowym i nie budzą żadnych zastrzeżeń natury merytorycznej. Jako oryginalne i bardzo ciekawe wnoszą one nowe elementy poznawcze do fizjologii drożdży i ich

aktywności w procesie fermentacji materiału lignocelulozowego. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że czynniki genetyczne mają istotny wpływ na proces biokonwersji ksylozy przez drożdże *Hansenula polymorpha*, przebiegający w warunkach podwyższonej temperatury..

W oparciu o uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań autorka wyciągnęła wnioski, które sprecyzowane są bardzo rzeczowo i konkretnie. Do najważniejszych wniosków Doktorantki należy zaliczyć te, w których stwierdza, że najważniejszymi czynnikami decydującymi o produkcji etanolu z hydrolizatów lignocelulozy są geny *XYL1*, *XYL2* i *XYL3* oraz czynniki środowiskowe, w tym temperatura, w których wykazała, że:

1. Nadekspresja genu *XYL1* kodującego zmodyfikowaną reduktazę ksylozy oraz natywnych genów *XYL2* (kodującego dehydrogenazę ksylitolu) oraz *XYL3* (kodującego kinazę ksylulozy) na tle szczepu 2EtOH- zwiększyła wydajność produkcji etanolu z ksylozy.
2. Mutanty odporne na przeciwnowotworowy środek, 3-bromopirogronian izolowane ze szczepu z nadekspresją genów *XYL1m*, *XYL2* oraz *XYL3* wykazywały dalszy wzrost produkcji etanolu z ksylozy.
3. Delecja genu *H. polymorpha*, ortologa genu drożdży *S. cerevisiae* *CAT8*, kodującego aktywator transkrypcji genów glukoneogenezy, spowodowała uszkodzenie wzrostu deletanów na etanolu, glicerynie i ksylozie. Dodatkowo była ona przyczyną zmniejszenia aktywności oddychania komórkowego, a także zwiększenia względnego poziomu ekspresji genów oraz aktywności pewnych enzymów uczestniczących w metabolizmie ksylozy.
4. Deletanty *cat8Δ* izolowane z najlepszego dotychczasowego producenta etanolu z ksylozy wykazywały dalsze ulepszenie parametrów syntezy etanolu z tej pentozy. Wydajność syntezy etanolu wynosiła 0,34 g etanolu/g ksylozy, a produktywność syntezy etanolu - 0,205 g/L/h w temperaturze 45°C co sprawia, że uzyskane szczepy są jednymi z najbardziej wydajnych producentów etanolu z ksylozy w podwyższonych temperaturach. Dodatkowo, co ważne, deletanty te nie gromadziły w podłożu z ksylozą ksylitolu.

Z obowiązku recenzenta powyższej rozprawy doktorskiej, zgłaszam następujące uwagi oraz proszę o dokładniejszą informację w sprawie:

1. Co Pani rozumie pod pojęciem – „Alternatywne źródła energii”?
2. W wielu miejscach używa Pani określenia pięciocukrów, sześciocukrów, a w innych heksozy i pentozy, powinno to być ujednolicone. Przyjęło się używać w nomenklaturze naukowej określeń – pentozy i heksozy.
3. Proszę omówić proces SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation).

4. Proszę wyjaśnić, co to są paliwa pierwszej, drugiej i trzeciej generacji?
5. Jak wygląda produkcja etanolu na świecie?
6. Zalety i wady wodoru, jako przeszłościowego uniwersalnego paliwa.
7. Jak to z tym etanolem było? Kto odkrył metodę jego otrzymywania?
8. Jakie geny odpowiedzialne są za produkcję etanolu u bakterii a jakie u drożdży? Czy szlaki metabolizmu są podobne?
9. Proszę omówić główne zalety: inżynierii genetycznej, inżynierii metabolicznej i inżynierii ewolucyjnej oraz jak je należy stosować?
10. Proszę omówić główne etapy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i w jaki celu jej się używa?
11. Niepotrzebnie w tekście szczegółowo opisywała Pani metody oznaczania aktywności poszczególnych enzymów (rozdziały 7.8.2. – 7.8.8), są to metody dokładnie opisane w różnych publikacjach i przewodnikach, można to było pominąć, powołując się tylko na źródło.

Moje uwagi - nie mają charakteru krytycznego i oczywiście nie wpływają w najmniejszym stopniu na wartość naukową pracy, a są jedynie pytaniami i uwagami w dyskusji oraz powinny służyć lepszemu przygotowaniu pracy do druku.

4. Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Praca napisana jest bardzo obszernie, ale dokładnie, precyzyjnie i treściwie, stąd przedstawioną rozprawę p. mgr Justyny Ruchały oceniam bardzo wysoko. Uzyskane w Jej pracy wyniki wzbogacają naszą wiedzę z zakresu mikrobiologii i procesów fermentacyjnych przeprowadzane przez drożdże *Hansenula polymorpha* wykorzystywanych do produkcji etanolu. Gromadzenie tego rodzaju faktów jest szczególnie cenne w obecnym czasie, kiedy obserwujemy gwałtowne zapotrzebowanie na nowe źródła energii. Należy podkreślić, że praca wykonana jest poprawnie pod względem formalnym, stylistycznym i językowym oraz nie budzi zastrzeżeń natury naukowej. Na uwagę zasługuje poprawny styl i język polski. Na specjalną pochwałę zasługuje sama redakcja pracy, którą wykonano bardzo estetycznie i wyjątkowo starannie, co dodatkowo świadczy o wszechstronnych uzdolnieniach Doktorantki.

5. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższe dane dotyczące oceny formalnej, metodycznej i merytorycznej pracy doktorskiej pani mgr Justyny Ruchały, pt.:

„Konstruowanie szczepów drożdży *Hansenula polymorpha* z ulepszonymi charakterystykami alkoholowej fermentacji ksylozy”

stwierdzam, że powyższa rozprawa stanowi niewątpliwie oryginalne i cenne osiągnięcie naukowe doktorantki w zakresie mikrobiologii i biotechnologii. Wykazała w prezentowanej pracy umiejętność organizacji i samodzielnej realizacji badań. Duża znajomość literatury przedmiotu, opanowanie techniki badawczej z zakresu mikrobiologii i analityki - wskazują na dobre przygotowanie doktorantki do pracy naukowej. Powyższa praca powinna być opublikowana.

W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska pod w/w tytułem wykonana przez p. mgr Justynę Ruchałą z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Uniwersytetu Rzeszowskiego, pod kierunkiem **p. prof. dr hab. Andrzeja Sybirnego w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. W związku z powyższym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego UR w Rzeszowie o dopuszczenie mgr Justyny Ruchały do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na znaczenie naukowe tematu, duży wkład pracy własnej w badaniach oraz sposób przedstawienia wyników, ich opracowanie i omówienie stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego UR w Rzeszowie o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej p. mgr Justyny Ruchały - stosowną nagrodą (Nagroda Dziekana, Nagrodą Rektora lub Nagroda Ministra).

Prof. zw. dr hab. Wiesław BARABASZ
Katedra Mikrobiologii Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 24/28
tel. (012) 633-13-56, +48 602295120