



Kraków, dnia 15.02 2015 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.: “Badanie zdolności szczepów drożdży
Ogataea (Hansenula) polymorpha z nadprodukcją flawoprotein
– produktów genów *CYB2* i *DLD1* – do detoksykacji
chromianu i D-mleczanu”

wykonanej przez mgr Daniela Brodę
z Zakładu Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie

Nadesłana mi do recenzji praca doktorska pod w/w tytułem przedstawiona jest na 178 stronach maszynopisu podzielonego na jednaście rozdziałów, które podzielone są z kolei na podrozdziały, w tym spis literatury obejmujący aż 366 najnowszych pozycji z ostatnich kilkunastu lat głównie polskich, rosyjskich i anglojęzycznych, które wykorzystano we wstępie pracy, celem wprowadzenia czytelnika w omawiany problem. Wyniki badań przedstawiono w 19 tabelach i 46 kolorowych rysunkach oraz kilku zdjęciach, co stanowi obszerną i bardzo dobrze udokumentowaną część pracy.

Jednym z najważniejszych problemów współczesnej cywilizacji jest zachowanie dobrego zdrowia i samopoczucia dla wszystkich ludzi na całym świecie. Nasze zdrowie zależy od wielu czynników, ale jednym z najważniejszych jest stan środowiska, w którym żyjemy, pracujemy i spędzamy wolny czas. Stąd świadomość naszych związków ze środowiskiem, w którym żyjemy, zaczyna dominować w większości podejmowanych przez człowieka działań prozdrowotnych i proekologicznych. 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. Eksperti 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 technologie wykorzystujące najnowsze

zdobycze wiedzy z zakresu medycyny, ekologii, biologii molekularnej, genetyki, inżynierii genetycznej i mikrobiologii mogą sprostać stojącymi przed ludzkością zadaniom i przyczynić się do zmniejszenia zachorowalności ludzi na liczne choroby cywilizacyjne. Nic, więc dziwnego, że temat pracy doktorskiej p. mgr Daniela Brody związany jest z możliwością wykorzystania szczepów drożdży do detoksykacji chromianu i D-mleczanu, groźnych i toksycznych związków chemicznych, których obecność w środowisku ulega stałemu zwiększeniu.

Należy zaznaczyć, że w Polsce od kilkunastu lat obserwuje się dynamiczny wzrost zainteresowania nowoczesnymi metodami biologicznymi pozwalającymi na neutralizację, rewitalizację i detoksyfikację skażeń środowiska różnymi ksenobiotykami. Zastosowanie drobnoustrojów oraz bioaugmentacja wydają się najlepszymi i najtańszymi metodami pozwalającymi zrealizować ten cel. Dlatego jestem pełen uznania za trud podjęcia badań zmierzających do wyjaśnienia zależności między uzdolnieniami szczepów drożdży *Ogataea polymorpha* i ich zdolności do nadprodukcji flawoprotein, a możliwością detoksykacji chromianu i D-mleczanu.

Podjęcie powyższych badań uważam za słuszne i celowe, a wykonanie ich w warunkach laboratoryjnych, gdzie stworzono wiele kombinacji doświadczalnych i badano różne zależności i interakcje wynikające z ich właściwości, za bardzo cenne osiągnięcie Doktoranta.

1. 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 mikroorganizmów, genetyki, inżynierii genetycznej, toksykologii i biotechnologii, a dotyczą wykorzystania niekonwencjonalnych, termotolerancyjnych, metylotroficznych drożdży *Hansenula (Ogataea) polymorpha*, jako źródło flawoprotein do detoksykacji D-mleczanu i chromianu. Drożdże, wykorzystano jako źródło enzymów, a po modyfikacjach genetycznych uzyskano ich nadprodukcję, co pozwala na ich wykorzystanie w przyszłości do celów komercyjnych.

Do osiągnięcia tych ważnych celów doktorant zastosował nowoczesne metody inżynierii genetycznej pozwalające na syntezę białek enzymatycznych oraz tak zrekombinował komórki drożdży, że uzyskał enzymy o zwiększonej aktywności w stosunku do D-mleczanu oraz otrzymał flawoproteiny o wyższej aktywności bioremediacyjnej względem chromianu. Ważnym osiągnięciem doktoranta jest także fakt wykazania, że drożdże *H. polymorpha* tr1 posiadają zdolność do zewnątrzkomórkowej redukcji toksycznego chromianu i chelatacji chromu(III). Należy zaznaczyć, że otrzymane kompleksy Cr(III) zostały przebadane w doświadczeniach fizjologicznych na szczurach i wykazano, że powodowały obniżenie poziomu glukozy we krwi szczurów, nie wykazując

działania toksycznego. Powyższe badania przeprowadzono za pomocą testów na aktywność aminotransferaz ALAT i AST.

Zastosowane metody badawcze oparte są na nowoczesnych metodach mikrobiologicznych i genetycznych, są właściwie dobrane oraz zastosowane, pozwalające na udowodnienie postawionego celu. Na szczególne podkreślenie zasługują badania nad systemem syntezy białek fuzyjnych, syntezą mitochondrialnej flafoproteiny oraz powstawaniem biokompleksów Cr(III).

Powyższe badania Doktorant przeprowadzi wyjątkowo starannie, w licznych powtórzeniach, co zaowocowało wieloma bardzo interesującymi wynikami, które być może znajdą praktyczne zastosowanie w opracowaniu nowoczesnych metod rewitalizacji skażonego środowiska. Praca wykonana jest poprawnie pod względem metodycznym.

2. Ocena pracy pod względem merytorycznym

Oceniana praca doktorska zawiera bardzo dobrze opracowaną część wstępną-przeładową, w której autor opisuje dotychczasowy dorobek naukowy w tej dziedzinie, dając wyraz swej doskonałej orientacji w najnowszych osiągnięciach badawczych nad rolą flawoprotein produkowanych przez drożdże w detoksykacji D-mleczanu i chromianu. Należy zaznaczyć, że drożdże są najlepiej nadającym się źródłem białek enzymatycznych oraz platformą do heterologicznej produkcji białek. Ponadto w części wstępnej opisano różne gatunki drożdży i ich modyfikacje genetyczne oraz inne mikroorganizmy, które można wykorzystywać do nadprodukcji wielu ważnych z gospodarczego punktu widzenia enzymów. Szczegółowy opis różnych szlaków metabolicznych i możliwości ich praktycznego zastosowania oraz aktywność wybranych enzymów wskazują na ważność podjętych badań. Natomiast zastosowanie najnowszych technik badawczych z zakresu biologii molekularnej i inżynierii genetycznej uwidaczniają nieograniczone możliwości tworzenia nowych rekombinowanych szczepów drobnoustrojów w tym drożdży o potencjalnych możliwościach ich wykorzystania w degradacji wielu toksycznych substancji skażających środowisko oraz będących przyczyną wielu chorób ludzi i zwierząt.

Głównymi celami wykonanej pracy doktorskiej były badania mikrobiologiczne, biochemiczne i genetyczne zmierzające do opracowania nowych technik badawczych do biotechnologicznego wykorzystania drożdży w:

- konstruowaniu metodami inżynierii genetycznej i białkowej nadproducentów flawoprotein – produktów genów *CYB2* i *DLD* – zdolnych do stereospecyficznego utleniania L- i D-mleczanów,
- detoksykacji D-mleczanu przy pomocy drożdży *Hansenula polymorpha* tr6, zdolnych do nadprodukcji oksydoreduktazy D-mleczanu DLDH, produktu genu *DLD1*,
- otrzymanie D-mleczanu z racematu przy wykorzystaniu flawocytochromu *b₂*, specyficznego względem L-mleczanu,

- detoksykacja chromianu przy pomocy drożdży *Hansenula polymorpha* tr1, zdolnych do nadprodukcji flawocytochromu b_2 , produktu genu *CYB2*,
- charakterystyka fizyko-chemiczna wyizolowanych bio-kompleksów Cr(III),
- ocena wpływu bio-kompleksów Cr(III) na wybrane parametry fizjologiczne szczurów.

Zamierzony cel osiągnięto poprzez dokładne badania genetyczne, biochemiczne, enzymatyczne, mikrobiologiczne oraz fizjologiczne na szczurach. Wszystkie badania wykonano w wielu powtórzeniach wykorzystując do tego celu nowoczesne techniki badawcze łącznie z inżynierią genetyczną konstruując nowe rekombinowane szczepy drożdży zdolne do nadprodukcji ważnych białek, posiadających specyficzne właściwości. Należy zaznaczyć, że Doktorant wykonał cały szereg dodatkowych badań związanych z zastosowaniem technik analitycznych jak: izolacja plazmidowego i genowego DNA, klonowanie i namnażanie plazmidowego DNA, transformację komórek drobnoustrojów, izolację ciał inkluzyjnych z *E. coli*, mikroskopia fluorescencyjna, chromatografia, elektroforezę i wiele innych powszechnie stosowanych w nowoczesnych laboratoriach mikrobiologicznych, biochemicznych, genetycznych i biotechnologicznych.

Badania zostały zaplanowane bardzo dobrze, co umożliwiło także przeprowadzenie dogłębnej analizy statystycznej otrzymanych wyników. Przeprowadzone badania są bardzo ważne pod względem naukowym i nie budzą zastrzeżeń natury merytorycznej. Jako oryginalne i bardzo ciekawe wnoszą one nowe elementy naukowe do poznania roli flawoprotein w detoksykacji chromianu i D-mleczanu.

Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że istnieje możliwość konstruowania nowych rekombinowanych szczepów drożdży, które mogą posiadać nowe cenne cechy o dużych możliwościach ich wykorzystania w praktyce.

W oparciu o uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań autor wyciągnął wnioski, które sprecyzowane są bardzo rzeczowo i konkretnie. Do najważniejszych wniosków Doktoranta należy zaliczyć te, w których stwierdza, że drożdże można wykorzystać do celów remediacyjnych i przeprowadzić za ich pomocą detoksykację chromianu i D-mleczanu oraz inne, w których wykazał, że:

1. Zastosowanie prokariotycznego systemu ekspresyjnego opartego na bakterii *Escherichia coli* i wektorze plazmidowym z serii *pET32a* do IPTG-indukowanej ekspresji drożdżowego ORF *HpCYB2*, kodującego flawocytochrom b_2 , daje w efekcie syntezę tego enzymu w postaci ciał inkluzyjnych.
2. Fuzja białek znacznikowych - tioredoksyny (Trx), (His)6-tag, S-tag z flawocytochromem b_2 , zachowuje aktywność (16 J . mg-1) enzymatyczną tego białka, po solubilizacji ciał inkluzyjnych w obecności 0,3% N-lauroilosarkozyny.
3. Eukariotyczny system ekspresyjny oparty na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, dla syntezy białka fuzyjnego, składającego się z połączenia białka yEGFP, dehydrogenazy D-mleczanu z drożdży *Hansenula polymorpha* oraz znacznika (His)6-tag nie daje aktywnej postaci enzymu, jednak powoduje jego fluorescencję w komórkach rekombinowanych.

4. Eukariotycznego układ sekrecyjny z użyciem drożdży *Kluyveromyces lactis* dla ekspresji pochodzącej z drożdży *Hansenula polymorpha* dehydrogenazy D-mleczanu powoduje sekrecję nieaktywnej postaci enzymu.
5. Zastosowanie komórek szczepu rekombinowanego tr6 drożdży *H. polymorpha*, wykazujących nadekspresję dehydrogenazy D-mleczanu, prowadzi do detoksykacji D-mleczanu z wydajnością 9 mM · h-I.
6. Wykazano możliwość otrzymania D-mleczanu z racematu na drodze enzymatycznego utleniania L-mleczanu za pomocą oczyszczonego flawocytochromu *b2* z drożdży *H. polymorpha*.
7. Flawocytochrom *b2*, dzięki niespecyficzności do akceptora elektronów *in vitro*, posiada zdolność bezpośredniej redukcji chromianu do Cr(III) w obecności L-mleczanu.
8. Zbadano aktywność mediatorową różnych barwników o aktywności redoks w redukcji chromianu flawocytochromem *b2*; wyselekcjonowany dichlorfenolindofenol zastosowano do bioremediacji chromianu w reakcji, katalizowanej przez flawocytochrom *b2* oraz komórki drożdży *H. polymorpha* (żywe bądź permabilizowane).
9. Drożdże *H. polymorpha* tr1 znadekspresją flawocytochromu *b2* zdolne do wydajnej (100%) bioremediacji redukcyjnej 1 mM chromianu.
10. Drożdże *H. polymorpha* tr1 znadsynteza flawocytochromu *h2* posiadają zdolność do zewnątrzkomórkowej redukcji toksycznego chromianu i chelatacji chromu z wytworzeniem biokompleksów Cr(III) w podłożu hodowlanym.
11. Wyizolowane biokompleksy HpCr(III) składają się przynajmniej z dwóch komponentów (w tym białkowego). Pochłaniają światło z pikami przy: 275, 325, 580 i 975 nm. Są zdolne do zielonej fluorescencji. Posiadają aktywność antyoksydacyjną (9,9 + 21,9 J · g-l Cr) w testach z ABTS i jonami żelaza(III).
12. Otrzymane biokompleksy Cr(III) wykazują pozytywną biologiczną aktywność w badaniach fizjologicznych z użyciem szczurów jako modelu badawczego: nie powodują działania toksycznego (w teście z aminotransferazami ALT i ASP), obniżają poziom glukozy we krwi.

Z obowiązku recenzenta powyższej rozprawy doktorskiej, zgłaszam następujące uwagi, zapytania i proszę o wyjaśnienie:

- proszę przedstawić najnowszą systematykę drożdży,
- na czym polega toksyczne działanie Cr(III) i Cr(VI),
- omów otrzymywanie metanolu przy wykorzystaniu drobnoustrojów,
- na czym polega prozdrowotne działanie bakterii kwasu mlekowego u ludzi i zwierząt,
- co to są probiotyki, prebiotyki i synbiotyki,
- co to jest siara i jaka jest jej rola u ludzi i zwierząt (str.48),
- omów łańcuch oddechowy drożdży w warunkach tlenowych i bez-tlenowych,
- dlaczego jedna reakcja jest pisana (str. 15) po angielsku, a podobna na str.26 po Polsku,
- scharakteryzuj plazmidy i omów jakie cechy one kodują,
- omów metody izolacji plazmidowego i genomowego DNA u organizmów prokaryotycznych i eukariotycznych,
- na czym polega działanie chromatografii cieczowej (HPLC) str. 71.

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.

3. Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Praca napisana jest zwięźle i treściwie, stąd przedstawioną rozprawę p. mgr Daniela Brody oceniam bardzo wysoko. Uzyskane w Jego pracy wyniki

wzbogacają naszą wiedzę z zakresu mikrobiologii, genetyki drobnoustrojów, biotechnologii i możliwości konstruowania nowych rekombinowanych szczepów drożdży o cennych właściwościach biochemicznych w zakresie degradacji szkodliwych związków toksycznych skażających nasze środowisko. Gromadzenie tego rodzaju faktów jest szczególnie cenne w obecnym czasie, kiedy środowisko przyrodnicze poddawane jest różnej presji i widać negatywną ingerencję człowieka. Zanieczyszczenia i skażenia różnymi związkami chemicznymi, preparatami i materiałami budowlanymi czynią, że coraz trudniej będzie uzyskać informacje o układach i zależnościach biologicznych panujących w środowisku, co jest konieczne dla określenia w nich stopnia wywoływanych zmian. 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 Doktoranta.

4. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższe dane dotyczące oceny formalnej, metodycznej i merytorycznej pracy doktorskiej pana mgr Daniela Brody pt.:

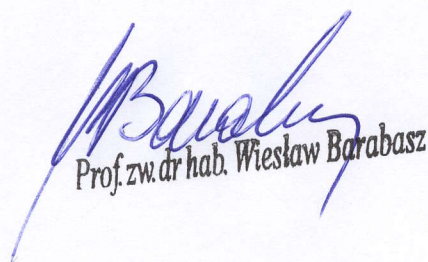
„Badanie zdolności szczepów drożdży *Ogataea (Hansenula) polymorpha* z nadprodukcją flawoprotein – produktów genów *CYB2* i *DLA1* – do detoksykacji chromianu i D-mleczanu”

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

W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska pod w/w tytułem wykonana przez p. mgr Daniela Brody z Zakładu Biotechnologii Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Mykhaila Gonchara **w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. W związku z powyższym stawiam wniosek do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie o dopuszczenie mgr Daniela Brody do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na znaczenie naukowe tematu, duży wkład pracy własnej w badaniach laboratoryjnych, analitycznych i mikrobiologicznych oraz sposób przedstawienia wyników, ich opracowanie i omówienie stawiam wniosek do **Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego** o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej p. mgr Daniela Brody – stosowną nagrodą Ministra lub Rektora Uniwersytetu.

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



Prof. zw. dr hab. Wiesław Barabasz