



Prof. dr hab. Stanisław Ułaszewski  
Instytut Genetyki i Mikrobiologii  
Uniwersytet Wrocławski  
ul. Przybyszewskiego 63 / 77  
51-148 Wrocław

## OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr Justyny Ruchała pt.: „Konstruowanie szczepów drożdży *Hansenula polymorpha* z ulepszonymi charakterystykami alkoholowej fermentacji ksylozy”, wykonanej pod kierunkiem Pana Profesora Andrzeja Sybirnego.**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy badań mających na celu konstrukcję i selekcję wydajnych, rekombinowanych i termotolerancyjnych szczepów drożdży charakteryzujących się wysoką produkcją bioetanolu, z odnawialnych surowców lignocelulozowych. Autorka dokonała trafego wyboru komórek drożdży, jako dobrego modelu badawczego i ważnego elementu systemu ekspresyjnego przydatnego do heterologicznej ekspresji genów. W mojej ocenie temat i problematyka ocenianej pracy doktorskiej jest uzasadniona zarówno z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia, ze względu na ważny aspekt biotechnologiczny oraz ekonomiczny, który dotyczy poszukiwania taniego źródła ekologicznej energii. Świadczy o tym rosnące zainteresowanie na świecie i liczba publikacji na ten temat. Chciałbym mocno podkreślić, że jest to tematyka badawcza, którą prof. Andrzej Sybirny wraz ze swoim Zespołem tradycyjnie już od dawna realizuje z dużym powodzeniem, w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Praca doktorska mgr Justyny Ruchała ma układ typowy dla polskich rozpraw doktorskich. Obejmuje 156 stron, w tym *Streszczenia* w j. polskim i angielskim oraz 50 stron obszernego *Wstępu* napisanego, w oparciu o aktualną literaturę naukową, łącznie 196 pozycji. Autorka opisuje w nim aktualny stan wiedzy na temat procesów fermentacyjnych i technologicznych otrzymywania różnych biopaliw pierwszej, drugiej i trzeciej generacji, ich szczegółową charakterystykę oraz udział bakterii i drożdży w metabolizmie heksoz i pentoz również w aspekcie heterologicznej ekspresji genów. Cel pracy został precyzyjnie określony, a następnie konsekwentnie realizowany w oparciu o klasyczny i nowoczesny warsztat badawczy, przy wykorzystaniu właściwie dobranych wektorów bakteryjnych i szczepów drożdży *Hansenula polymorpha*. Doktorantka z góry wiedziała co ją czeka, jakie powinna zastosować metody i jakie uzyskać wyniki. Należy podkreślić Jej dobrą znajomość genetyki i biochemii oraz opanowanie warsztatu badawczego, o czym świadczy wybór i zastosowanie wielu różnorodnych i nowoczesnych metod: w zakresie genetyki, inżynierii genetycznej, biochemii i

bioinformatyki, które są dokładnie opisane w rozdziale *Materiały i metody*. W kolejnym rozdziale pracy przedstawiono wyniki badań, które są dobrze udokumentowane i opisane oraz potwierdzone analizą statystyczną. W zbyt krótkiej moim zdaniem *Dyskusji* Autorka dokonała krytycznej analizy wyników badań własnych w kontekście wcześniejszych oraz aktualnych osiągnięć i publikacji na ten temat. Ponadto, zaproponowała wykaz genów i kombinację różnych metod genetycznych i fizjologicznych, których wykorzystanie może w przyszłości zaowocować konstrukcją nowych szczepów drożdży *H. polymorpha* zdolnych do intensywnego wzrostu i wydajnej produkcji bioetanolu, jako efekt jednoczesnej fermentacji ksylozy i glukozy. Ostatni rozdział obejmuje cenne uwagi i cztery główne wnioski, które obrazują najważniejsze Jej osiągnięcia oraz perspektywy badawcze na przyszłość. Na początku swojej pracy laboratoryjnej Doktorantka podjęła próbę nadekspresji genów *H. polymorpha* kodujących zmodyfikowaną reduktazę ksylozy, kinazę ksylulozy, dehydrogenazę ksylitolu i dekarboksylazę pirogronianową, a następnie określenie intensywności alkoholowej fermentacji ksylozy w komórkach transformantów. Kolejnym etapem badań była selekcja komórek tych szczepów pod względem ich oporności na kwas 3-bromopirogronowy, który jest potencjalnym, obiecującym lekiem przeciwnowotworowym i przeciwgrzybicznym. Aby zwiększyć wydajność fermentacji ksylozy i produkcji etanolu wykonano delecję genu *CAT8* w genomie komórek poprzednio uzyskanych rekombinowanych szczepów. Produkt tego genu jest ważnym czynnikiem transkrypcyjnym i ma duży wpływ na regulację ekspresji licznych genów, determinujących między innymi również proces glukoneogenezy. Tak uzyskane mutanty delecyjne charakteryzowały się zwiększoną produkcją etanolu z ksylozy. Autorka ma rację, że tylko analiza transkryptomu uzyskanych mutantów delecyjnych pod względem genu *CAT8*, może wyjaśnić molekularny charakter zmian metabolicznych, które zachodzą w komórkach drożdży *H. polymorpha*. Taka kompleksowa analiza jest możliwa tylko przy zastosowaniu kosztochłonnej metody mikromacierzy (microarrays).

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć:

- 1) Konstrukcja rekombinowanych szczepów drożdży *Hansenula polymorpha* charakteryzujących się nadekspresją genów *XYL1*, *XYL2*, *XYL3* i *PDC1*, których produkty związane są z metabolizmem ksylozy i zwiększoną produkcją etanolu, w porównaniu ze szczepem dzikim.
- 2) Izolacja i charakterystyka fizjologiczna mutantów drożdży *Hansenula polymorpha* produkujących efektywnie etanol i opornych na przeciwnowotworowy, przeciwgrzybiczy lek 3-bromopirogronian .
- 3) Konstrukcja mutantu delecyjnego drożdży *Hansenula polymorpha* pod względem genu *CAT8* oraz charakterystyka fenotypowa komórek tego mutantu, ze szczególnym uwzględnieniem oddychania komórkowego i produkcji etanolu.

4) Reasumując powyższe trzy osiągnięcia, konstrukcja i selekcja szczepów drożdży *Hansenula polymorpha*, które charakteryzują się zwiększoną do 40% produkcją etanolu z ksylozy w temp. 45°C, w porównaniu ze szczepami wyjściowymi.

W ocenianej rozprawie doktorskiej nie zauważyłem poważniejszych błędów metodycznych lub merytorycznych. W *Materiałach i metodach* w opisie reakcji PCR w czasie rzeczywistym zastosowano gen kontrolny *ACT1* (brak w wykazie skrótów). Moje szczegółowe uwagi krytyczne o charakterze edytorskim, które w odrębnym załączeniu do recenzji przekazałem Doktorantce, dotyczą przede wszystkim licznych błędów literowych, żargonu laboratoryjnego i pewnych niezręczności stylistycznych oraz końcowego spisu literatury. Do najważniejszych należy zaliczyć: brak lub błędnie podane 3 pozycje literatury: Waman 1996; Dmytruk et al. 2007; Goshina et al. 2013; (zacytowane na str. 20, 37 i 128). W przypadku opisanego wpływu 3-bromopirogronianu i etanolu na komórki drożdży nie można mylić odporności z fenotypem oporności i należy używać terminu oporność ( np. str. 47, 9 wiersz od dołu; str. 58, 5 i 11 wiersz od góry str. 130, 6 wiersz od dołu; str. 135 i 136, 2 i 5 wiersz od dołu). Zastosowanie skrótu myślowego na str. 12, 1 wiersz od dołu, w rozwinięciu poprawnie to nie geny ale ich produkty są zaangażowane w szlaki centralnego metabolizmu komórki drożdżowej. Ponadto, nie mogę zgodzić się z twierdzeniem Autorki zawartym w dyskusji (str. 130; 110 wiersz od dołu), że wpływ 3-bromopirogronianu na drożdże nie był wcześniej sprawdzany. Tak się składa, że ja osobiście i moi współpracownicy mieliśmy przyjemność brać udział w takich badaniach, których wyniki zostały opublikowane w następujących publikacjach: 1). Lis i wsp. (2012). Transport and cytotoxicity of the anticancer drug 3-bromopyruvate in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 44: 155 – 161. 2). Dyląg i wsp. (2013). 3-bromopyruvate: a novel antifungal agent against the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 434: (2): 322-327. Z obowiązku recenzenta muszę wytknąć złe cytowanie literatury na temat 3-bromopirogronianu ponieważ w rozprawie doktorskiej i w artykule Autorki opublikowanym w *Microbial Cell Factories* w 2014r całkowicie pominięto cytowanie wspomnianych wyżej publikacji oraz priorytetowych prac opublikowanych przez dr Young Ko i prof. P. Pedersena z Johns Hopkins Medical University w Baltimore. Szkoda, że Autorka nie zdecydowała się na identyfikację genu (genów) warunkującego fenotyp oporności komórek *H. polymorpha* na 3-BrPA. Dlatego z ciekawości recenzenta i osoby bezpośrednio zainteresowanej tym tematem zapytam jaka może być prawdopodobna funkcja genu i jego produktu, który determinuje taki fenotyp oporności opisany w tej rozprawie doktorskiej.

W podsumowaniu chciałbym podkreślić, że recenzowana praca została dobrze zaplanowana i starannie wykonana przy pomocy odpowiednio dobranych szczepów i plazmidów oraz stosownych metod. Praca jest wybitnie nowatorska ponieważ dostarcza nowych, teoretycznych i praktycznych

wiadomości na temat szczepów drożdży i procesu produkcji taniego biotechnologicznego paliwa wytwarzanego z biomasy roślinnej. Doktorantka dzięki swojej pracowitości uzyskała wartościowe wyniki, których znaczenie poznawcze w biotechnologii i być może praktyczne na szerszą skalę w aspekcie technologicznym jest ewidentne. Fakt opublikowania (współautorstwo) jednej pracy oryginalnej w renomowanym czasopiśmie naukowym (Microbial Cell Factories) i czterech prac przeglądowych w j. angielskim, dodatkowo świadczy o wartości rozprawy i jest również bezpośrednim dowodem wspierającym moją pozytywną recenzję. Należy tylko żałować, że zabrakło wykazu tych publikacji w rozprawie doktorskiej. Pewien niedosyt budzi również brak opublikowania pozostałych wyników w renomowanym czasopiśmie naukowym ale jestem przekonany, że taka publikacja ukaze się w najbliższej przyszłości.

**Przechodząc do wniosku końcowego uważam, że oceniona rozprawa doktorska spełnia wszystkie kryteria Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym z dnia 14 marca 2003r., ze wszystkimi późniejszymi modyfikacjami, dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno – Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr Justyny Ruchała do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Wrocław, 15.11. 2015 r.

  
Stanisław Ułaszewski