

Łwów, dnia 05.02.2018 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.: **“Konstruowanie szczepów drożdży *Ogataea (Hansenula) polymorpha* zdolnych do efektywnej konwersji glicerolu do etanolu”** wykonanej przez Mgr inż. Iwonę Katę w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Uniwersytetu Rzeszowskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Sybirnego

Przedstawiona do oceny praca doktorska pod w/w tytułem należy do dziedziny nauk biologicznych i przedstawiona jest na 137 stronach maszynopisu podzielonego na 10 rozdziałów, w tym spis literatury obejmujący 272 najnowszych pozycji z ostatnich kilkunastu lat. Wyniki badań przedstawiono w 10 tabelach, 10 rysunkach i 18 wykresach, służących informacyjnym udokumentowaniem wyników pracy.

1. Ocena aktualności problematyki rozprawy.

Jednym z najważniejszych problemów współczesnej cywilizacji jest otrzymanie nowych źródeł energii, w tym – odnawialnych alternatywnych biopaliw. Bioetanol, jako ważne nowoczesne biopaliwo, wytwarzane z biomasy, może pochodzić zarówno z pełnowartościowych produktów roślinnych (zboże, buraki cukrowe, ziemniaki, trzcina cukrowa), jak i z odpadów. W związku z dużym poziomem produkcji biodiesla (około 25 bilionów litrów rocznie) problem utylizacji glicerolu jak odpadowego produktu ubocznego, sięgającego 10% od produkowanego biodiesla. Ten nadmiar zanieczyszczonej gliceryny powoduje konieczność jej konwersji na cenne produkty o wyższej wartości. Jednym z najbardziej obiecujących produktów, które można otrzymać z ubocznego glicerolu, jest bioetanol, używany w formie płynnego paliwa. Jego roczna produkcja światowa wynosi ponad 97 mld litrów i w ciągu najbliższych lat ta liczba ulegnie znacznemu wzrostowi.

W związku z zaznaczonym, temat rozprawy doktorskiej Mgr inż. Iwony Katy pt. “Konstruowanie szczepów drożdży *Ogataea (Hansenula) polymorpha* zdolnych do efektywnej konwersji glicerolu do etanolu” jest bardzo aktualny z punktu widzenia nauki polskiej i światowej. O aktualności tej problematyki świadczy więcej niż 350 tys. artykułów poświęconych biokonwersji glicerolu do etanolu w internetowych bazach danych.

Wybór drożdży *Ogataea (Hansenula) polymorpha* dla genetycznych manipulacji w celu polepszenia wydajności konwersji glicerolu do etanolu jest bardzo trafny, ponieważ ten organizm jest termoodpornym, stosowanym w praktycznej biotechnologii. Dla pomyślnej realizacji celów pracy doktorskiej,

ważny też dobry poziom wiedzy o tym organizmie w aspekcie metabolicznym i molekularno-biologicznym, dostępność technik inżynierii genetycznej stosownie tych drożdży, i też wspaniałe doświadczenie zespołu, kierowanego przez prof. dr hab. Andrzeja Sybirnego, w konstruowaniu genetycznym *Ogataea polymorpha*.

2. Ocena pracy pod względem metodycznym.

Użyte w pracy metody badawcze oparte są na nowoczesnych metodach molekularno-genetycznych, biochemicznych i mikrobiologicznych, są właściwie dobrane oraz zastosowane, pozwalające na udowodnienie postawionego celu. Głównym podejściem metodycznym w pracy jest inżynieria metaboliczna z zastosowaniem różnych nowoczesnych technik, w tym: konstruowanie kaset nadekspresyjnych, transformacja komórek drożdży, udowodnienie obecności genów celowych po transformacji komórek za pomocą PCR i analizy restrykcyjnej, RT-PCR analiza transkrypcji wprowadzonych genów, analiza aktywności odpowiednich enzymów w ekstraktach bezkomórkowych, oznaczanie glicerolu i etanolu metoda HPLC (oba związki) oraz metodą enzymatyczną (etanol). O dużym zakresie pracy świadczą 7 wektorów plazmidowych i 7 szczepów drożdży i bakterii, skonstruowanych w badaniach, 16 par primerów dla różnych genów, analiza aktywności 6 enzymów. Wszystko wskazuje na to, że badania w recenzowanej pracy wykonane na współczesnym poziomie, który odpowiada nowoczesnym osiągnięciom w tej dziedzinie nauki światowej.

Wszystkie badania Doktorant przeprowadziła wyjątkowo starannie, w licznych powtórzeniach, z opracowaniem statystycznym, co zaowocowało wiarygodnymi wynikami oraz udowodnionymi wnioskami.

3. Ocena pracy pod względem merytorycznym.

Celem ocenianej pracy było skonstruowanie szczepów drożdży *O. polymorpha* zdolnych do efektywnej konwersji glicerolu do etanolu, a także poznanie procesu metabolizmu glicerolu w komórkach niekonwencjonalnych drożdży *O. polymorpha*, wyjaśnienie funkcji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za katabolizm glicerolu oraz analiza wydajności produkcji etanolu z odpadowego glicerolu.

Przegląd literatury jest poświęcony scharakteryzowaniu biopaliw jako alternatywnych nośników energii, konwersji glicerolu przez komórki bakteryjne i drożdżowe, z dużym akcentem na mikroorganizmy, zdolne do konwersji glicerolu do użytecznych związków chemicznych, w tym etanolu. Dalej opisane zostały główne techniki stosowane w inżynierii metabolicznej mikroorganizmów, w tym dla drożdży *Ogataea polymorpha* jako organizmu badawczego.

Szczególną uwagę zwraca się na analizę szlaków metabolicznych konwersji glicerolu do etanolu w komórkach *O. polymorpha* oraz nadekspresji kluczowych genów, odgrywających ważną rolę w metabolizmie glicerolu w tym organizmie.

Cele pracy zostały precyzyjnie określone, a zaplanowane zadania są bardzo logiczne i powiązane z głównym celem badań.

Głównymi osiągnięciami ocenianej pracy jest przeprowadzenie nadekspresji genów *ADH1* i *PDC1*, kodujących odpowiednio dehydrogenazę alkoholową oraz dekarboksylazę pirogronianową odpowiedzialne za produkcję etanolu, a także realizacja nadekspresji genów *GCY1*, *DAK1*, *GUT1* i *GPD1*, kodujących odpowiednio dehydrogenazę glicerolu, kinazę dihydroksyacetonu, kinazę glicerolu oraz dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanu. Skonstruowane szczepy są scharakteryzowane pod względem udowodnienia integracji zaznaczonych genów w genom gospodarza, oceny poziomu ekspresji wyżej wymienionych genów oraz oznaczania aktywności odpowiednich enzymów, związanych z metabolizmem glicerolu. Kluczowym wynikiem pracy jest analiza produktywności konwersji glicerolu do etanolu. W wyniku tych badań skonstruowane zostały szczepy z nadekspresją genów *ADH1* i *PDC1* zdolnych do polepszonej produkcji etanolu w podwyższonej temperaturze – do 5 g/l etanolu. Centralnym aspektem pracy są manipulacje genetyczne, powiązane z enzymami katabolizmu glicerolu – kinazą glicerolu (Gut) i dehydrogenazą glicerolo-3-fosforanu (Gpd), oraz dehydrogenazą glicerolu (Gcy) i kinazą dihydroksyacetonu (Dak). Nadekspresja genów kodujących dehydrogenazę glicerolu (Gcy) i kinazę dihydroksyacetonu (Dak) spowodowała wzrost produkcji etanolu odpowiednio do 10,41 g/l (szlak Gut-Gpd) i 10,71 g/l (szlak Gcy-Dak). Wyciągnięty został ważny wniosek, że geny, biorące udział w pierwotnych etapach katabolizmu glicerolu w komórkach drożdży *O. polymorpha*, mają istotne znaczenie w konwersji glicerolu do etanolu. Nadekspresja genów *GCY1*, *DAK1*, a także *GUT1* i *GPD1*, pozwala zwiększyć wydajność produkcji etanolu przez komórki zmodyfikowanych drożdży *O. polymorpha*. Należy podkreślić, że skonstruowane szczepy z nadekspresją genów początkowych etapów katabolizmu glicerolu oraz genów *PDC1* i *ADH1* są zdolne do produkcji etanolu nie tylko z czystego glicerolu, jak również z preparatów gliceryny odpadowej.

Fakt opublikowania dwóch artykułów naukowych (w tym jednej pracy oryginalnej w renomowanym czasopiśmie *Yeast* (**Kata I., Semkiv M.V., Ruchala J., Dmytruk K.V., Sibirny A.A. Overexpression of the genes *PDC1* and *ADH1* activates glycerol conversion to ethanol in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha* // *Yeast*. - 2016. - V. 33, Nr 8. - P. 471-478 (**Impact factor 1.99**; należy do części A Wykazu czasopism naukowych – **25 punktów**)) dodatkowo świadczy o wartości rozprawy i służy bezpośrednim dowodem międzynarodowego poziomu wykonanych badań.**

Wysoko oceniając wyniki uzyskane w pracy, chcę zwrócić uwagę na niektóre aspekty krytyczne (czy polemiczne). Moim zdaniem, przegląd literatury

byłby bardziej czytelny, jeśliby opis szlaków utylizacji glicerolu i produkcji etanolu został dopełniony schematami metabolicznymi, a w charakterystyce drożdży *O. polymorpha* – schematem metabolizmu metanolu. To samo dotyczy opisu układu CRISP-Cas9. Warto byłoby też podać wykaz skrótów nazw enzymów oraz genów, stosowanych w pracy. W podsumowaniu do przeglądu literatury brakuje tabeli z uogólnieniem w dostępnej literaturze informacji o skutkach genetycznej modyfikacji drożdży *O. polymorpha* dla produktywności etanolowej na glicerolu.

Mam też uwagi charakteru terminologicznego:

- zamiast „synteza etanolu” lepiej pisać „produkcja”, dlatego że transformacja glicerolu do etanolu jest reakcją kataboliczną;

- z punktu widzenia matematycznego, zamiast „mmol/L/h”, „g/l/h”, trzeba pisać „mmol/(L·h)”, „g/(L·h)” albo „mmol·L⁻¹·h⁻¹” i „g·L⁻¹·h⁻¹”, dlatego że powtórne dzielenie oznacza już mnożenie;

- na str. 60, 61, 62, 63 i 64 zamiast „U/mL białka” powinno być „U/mg białka”;

- milimolowy współczynnik absorpcji dla kofaktora nikotynoamidowego (6,22) ma wymiar mM⁻¹·cm⁻¹;

- na Rys. 2 i innych podobnych wykresach podano nieprawidłowe wyjaśnienie: „MW – marker wielkości (1 kb)”; bardzo często na ścieżce elektroforetycznej dla markerów nie pokazano masy molekularnej paska;

- na Wykresie 5 (s. 71) pomijana jest nazwa osi Y (stężenie etanolu);

Z obowiązku recenzenta rozprawy doktorskiej zgłaszam następujące uwagi, zapytania dla wyjaśnienia:

- Często w tekście pracy upomina się, że "generalnie drożdże *O. polymorpha* na glicerolu rosną bardzo słabo, a zrekombinowane szczepy drożdży wykazują nieco lepszy wzrost...", chociaż na wykresach przedstawiono informacje o wzroście komórek i konsumpcji glicerolu tylko przy dużej początkowej biomacie wysiewu (więcej, niż 1,5 g/l). Czy prowadziła Pani Doktorant badania kinetyki wzrostu skonstruowanych (oraz macierzystych) szczepów w klasycznym formacie, to znaczy, przy małym początkowym stężeniu komórek?

- Moim zdaniem, przy analizie wydajności etanolowej oprócz masowego wymiaru (g etanolu/g spożytego glicerolu) należałoby podać ten parametr w jednostkach molowych (mol EtOH/mol konsumowanego glicerolu). W ostatnim przypadku, taka forma podania wydajności pozwoliłaby autorowi zwrócić uwagę na niektóre paradoksalne wyniki. Np., w Tabeli 7 (s. 75), gdzie podane są główne parametry fermentacji glukozy przez zrekombinowane szczepy drożdży *O. polymorpha*, wydajność etanolu (g/g zużytej glukozy) dla niektórych szczepów wynosi 0,689, 0,874, 0,719, 0,767, czyli wartości

wyższe od teoretycznej, możliwych $(2 \times 46)/180 = 0,511$ g/g). Jak można wytłumaczyć takie wyniki?

- Podobna sytuacja ma miejsce przy zestawieniu głównych parametrów fermentacji glicerolu do etanolu przez zrekombinowane szczepy drożdży *O. polymorpha* (Tabela 9, s. 97). Wydajność etanolu (g/g zużytego glicerolu) dla trzech szczepów jest istotnie większa (0,628; 0,636; 0,541) w porównaniu z teoretycznie możliwą wartością tego parametru ($46/92 = 0,50$). Jakie są przyczyny takiego zjawiska? Czy nie może to być powiązane z obecnością w ekstrakcie drożdżowym, stosowanym dla przygotowania podłoża, komponentów zdolnych do fermentacji alkoholowej?
- Ponieważ szlaki metaboliczne glicerolu u drożdży *O. polymorpha* nie są do końca poznane, bardzo ważna jest informacja o aktywnościach enzymów przemiany glicerolu u tego mikroorganizmu. W związku z tym mam pytanie: jeżeli u drożdży *O. polymorpha* funkcjonują oba szlaki katabolizmu glicerolu – przez dehydrogenazę glicerolu/ kinazę dihydroksyacetonu oraz kinazę glicerolu/dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanu, dlaczego **aktywności tych czterech wyżej wymienionych enzymów** są obserwowane w ekstraktach bezkomórkowych rodzicielskiego szczepu i szczepu WT/ADH1/PDC1 (Tabela 9), ale nie odkrywane aktywności Gcy i Dak u szczepów rekombinowanych WT/ADH1/PDC1/GUT1, WT/ADH1/PDC1/GPD1 i WT/ADH1/PDC1/GUT1/GPD1; podobna sytuacja występuje dla enzymów Gpd i Gut – ich aktywność nie jest obserwowana u szczepów WT/ADH1/PDC1/GCY1, WT/ADH1/PDC1/DAK1 i WT/ADH1/PDC1/GCY1/DAK1?
- U drożdży, np., *S. cerevisiae*, glicerol tworzy się przy fermentacji cukru do etanolu w procesie redoks-obojętnym. Przeciwnie, konwersja glicerolu do etanolu powoduje naruszenie równowagi redoks według schematu reakcji: $\text{Glyc} + \text{NAD}^+ + \text{ADP} + \text{P}_i = \text{EtOH} + \text{CO}_2 + \text{NADH}/\text{H}^+ + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$. Pani Doktorant nie analizuje skutki tego procesu dla komórki. Mam wobec tego pytanie, jakie są dalsze perspektywy ulepszenia procesu konwersji glicerolu do etanolu, biorąc pod uwagę powodowaną tym procesem disbalans redoks w komórkach?
- Dalej, ponieważ Pani Doktorant przeprowadziła nadekspresję kluczowych enzymów dwóch szlaków katabolizmu glicerolu: genów *GCY1*, *DAK1*, a także *GUT1* i *GPD1*, kodujących dehydrogenazę glicerolu, kinazę dihydroksyacetonu, kinazę glicerolu oraz cytozolową dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanu, jaki mechanizm zużycia cytozolowego nadmiaru NADH w komórkach? Czy jest dla tego potrzebny jakikolwiek komórkowy akceptor H z zredukowanego

NADH (warunki beztlenowe) czy zachodzi utlenianie NADH w trakcie oddychania (warunki tlenowe)?

- W związku z tym, że Pani doktorant prowadziła nadekspresję genu *GPD1*, kodującego cytozolową dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanu - enzymu, który odpowiada za osmotolerancję komórek drożdży, czy badała Pani tolerancję odpowiednich szczepów na wysokie stężenie glicerolu w podłożu (ponad 150 g/L)?
- Ponieważ dla drożdży *O. polymorpha* glicerol nie represuje syntezy oksydazy alkoholowej, a ostatni enzym powinien spowodować spadek wydajności produkcji etanolu dzięki jego utlenianiu, czy badała Pani doktorant aktywność tego enzymu u skonstruowanych szczepów na podłożu z glicerolem?
- W pracy Ruchala i wsp., 2017 pokazano że delecja genu regulatorowego *CAT8* powoduje wzrost produkcji etanolu na ksylozie. Czy jest informacja (albo założenie), jak to może wpłynąć na konwersję glicerolu do etanolu?
- Bardzo mi imponuje, że Doktorant prowadziła testowanie skonstruowanych szczepów na zdolność do konwersji glicerolu w etanol na technicznych preparatach glicerolu (glicerynie odpadowej oczyszczonej i surowej glicerynie nieoczyszczonej) i przy tym otrzymane zostały obiecujące wyniki. Chociaż w pracy (Tabela 10) podana jest zawartość składników mineralnych, ale wynika pytanie, jakie są składniki organiczne w tym preparacie glicerolu i jakim jest technologiczne pochodzenie surowej gliceryny firmy Koncernu Naftowego? Czy ma ten ostatni preparat związek z produkcją biodiesla?
- Ponieważ nieoczyszczony odpadowy glicerol zawiera toksyczne dla drożdży komponenty, jaką jest opinia Pani Doktorantki odnośnie możliwości fermentacji glicerolu w bioreaktorach, w tym z immobilizowanymi komórkami?

Oczywiście, że moje uwagi nie mają charakteru pryncypialnego i nie wpływają w najmniejszym stopniu na wartość naukową pracy, a są jedynie pytaniami i uwagami w dyskusji i mają służyć lepszemu przygotowaniu fragmentów pracy do druku w czasopiśmie fachowym.

4. Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Praca napisana jest bardzo dokładnie, precyzyjnie i treściwie, dlatego przedstawioną rozprawę Pani Mgr Iwony Katy oceniam bardzo wysoko. Uzyskane w Jej pracy wyniki wzbogacają naszą wiedzę z zakresu mikrobiologii, biochemii i genetyki drobnoustrojów, szczególnie w aspekcie enzymologii i regulacji genetycznej katabolizmu glicerolu i produkcji etanolu. W aspekcie


praktycznym, otrzymane wyniki są ważnym osiągnięciem w dziedzinie biotechnologii drożdży, ponieważ odkrywają możliwości konstruowania nowych zrekombinowanych szczepów, zdolnych do biokonwersji odpadowego glicerolu do etanolu – bardzo potrzebnego dla nowoczesnej cywilizacji źródła energii.

Należy podkreślić, że recenzowana praca wykonana jest poprawnie pod względem formalnym, stylistycznym i językowym. Tekst i ilustracje wykonane zostały w ładnym, estetycznym stylu. Kluczowe rozdziały przeglądu literatury należy opublikować jako podręcznik dla studentów.

5. Wniosek końcowy.

Przechodząc do wniosku końcowego i biorąc pod uwagę powyższą analizę rozprawy pracy pod względem formalnym, metodycznym i merytorycznym, stwierdzam niewątpliwie, że praca doktorska „**Konstruowanie szczepów drożdży *Ogataea (Hansenula) polymorpha* zdolnych do efektywnej konwersji glicerolu do etanolu**” stanowi oryginalne i cenne osiągnięcie naukowe w zakresie mikrobiologii, biotechnologii i genetyki molekularnej. Uważam, że rozprawa doktorska pod w/w tytułem wykonana przez **Mgr inż. Iwonę Katę** w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Uniwersytetu Rzeszowskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Sybirnego **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 inż. Iwony Katy do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.**

Ze względu na bardzo wysoki naukowo-metodyczny poziom pracy, duży wkład pracy własnej w badaniach eksperymentalnych oraz sposób przedstawienia wyników, ich opracowanie i omówienie, stawiam wniosek do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej Pani Mgr inż. Iwony Katy stosowną nagrodą Rektora Uniwersytetu.


Prof. dr hab. Mykhailo GONCHAR
Wydział Biotechnologii Analitycznej
Instytut Biologii Komórki, Narodowa Akademia Nauk Ukrainy
79005 ul. Drahomanowa 14/16, Lwów, Ukraina
tel. (+38-032) 261-21-44

Підпис *Gonchar*
ЗАСВІДЧУЮ
Уч. секретар
ІБК НАН України, к.б.н.
2525575
Барська М.Л.
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИННОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ
м. Львів, Інститут