



Kraków, dnia 31.01.2018 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej p. mgr inż. Iwony Kata pt.
„Konstruowanie szczepów drożdży *Ogataea (Hansenula) polymorpha*
zdolnych do efektywnej konwersji glicerolu do etanolu”
wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii
Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie
pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Sybirnego

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pod w/w tytułem jest stosunkowo zwięzłym maszynopisem, bo liczącym 137 stron tekstu, jest napisana w tradycyjnym układzie, obejmującym bardzo obszerny 45-stronicowy wstęp i przegląd literatury. Przegląd literatury Autorka podzieliła na cztery podrozdziały, co ułatwiło charakterystykę ważnego problemu związanego z omówieniem tak skomplikowanego zagadnienia jakim jest wykorzystanie glicerolu do różnych celów. Cel pracy to kolejny jednostronicowy rozdział w którym Autorka przedstawiła swoje zamierzenia związane z realizacją założonej hipotezy badawczej oraz zakres badań dotyczących zrozumienia i poznania przemian glicerolu u niekonwencjonalnych drożdży *Ogataea polymorpha*, a także funkcji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za katabolizm glicerolu. „Idea fix” badań to konstruowanie szczepów drożdży zdolnych do bardziej efektywnej i wydajnej konwersji glicerolu do etanolu. Omówieniu materiału biologicznego i metod użytych w badaniach jest poświęcony 14 stronicowy rozdział – materiał i metody, w którym zamieszczono 4 tabele z wykazem szczepów bakterii i drożdży wykorzystanych w badaniach oraz listą plazmidów, primerów i sekwencji starterów zastosowanych w przeprowadzonych badaniach. Kolejną bardzo obszerną część tekstu, bo liczącą 36 stron to interesujące wyniki badań, które zilustrowano 10 rysunkami, 18 wykresami i 6 tabelami, co stanowi bardzo obszerną i wyjątkowo dobrze przedstawioną dokumentację pracy. Należy zaznaczyć, że kolorowe rysunki i wykresy, wykonano bardzo przejrzystie i opisano w prosty sposób, co czyni pracę wyjątkowo przyjemną w czytaniu. Po wynikach następuje bardzo treściwa 7-stronicowa dyskusja najważniejszych wyników, podsumowująca całość badań na podstawie której sformułowano 6 głównych wniosków. Końcowy rozdział to piśmiennictwo, liczące 272 pozycje oraz 6 stron internetowych. W większości są to oryginalne prace z ostatniego dziesięciolecia łącznie z kilkunastoma najnowszymi artykułami, opublikowanymi

w 2017 roku, które wykorzystano we wstępie i dyskusji pracy, celem wprowadzenia czytelnika w omawiany problem oraz porównania otrzymanych wyników z danymi uzyskanymi przez innych autorów. Na początku maszynopisu znajduje się spis treści, a na jego końcu streszczenie w języku polskim i angielskim.

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 logiczna a jakość dokumentacji wysoka.

Jednymi z najważniejszych problemów współczesnej cywilizacji są zagadnienia dotyczące zachowanie naturalnego środowiska w stanie nie gorszym niż go zastaliśmy oraz zapewnienie dostatecznej ilości energii dla stale rosnącego jej zapotrzebowania. Surowce kopalniane są głównym źródłem energii na świecie. Jednakże malejące zasoby tych paliw, a co za tym idzie drastyczny wzrost cen oraz globalne ocieplenie i zanieczyszczenie środowiska powodują duże zainteresowanie odnawialnymi i niekonwencjonalnymi źródłami energii. Jednym z nich jest biopaliwo do silników wysokoprężnych, tzw. biodiesel, produkowany z olejów roślinnych i tłuszczów zwierzęcych na drodze transestryfikacji. W procesie tym otrzymuje się znaczne ilości odpadowej fazy glicerynowej zawierającej w swym składzie glicerol (propano-1,2,3-triol) (50–60%), metanol, mono- i diacyloglicerole, wolne kwasy tłuszczowe oraz mydła. W Unii Europejskiej w ostatnim czasie kładzie się bardzo dużą uwagę na rozwój technologii produkcji paliw alternatywnych. Do biopaliw zaliczamy paliwa płynne (np. biodiesel, bioetanol) i gazowe (np. syngaz, a także metan syntetyzowany przez bakterie metanogenne). Ich największą zaletą w odróżnieniu od kopalnych źródeł energii, jest to, że mają charakter odnawialny, a ich zastosowanie może znacznie zmniejszyć negatywny wpływ pozyskiwania energii na środowisko, włączając w to spadek emisji gazów cieplarnianych. Biopaliwa uzyskiwane są głównie przez poddanie biomasy szeregowi reakcji biochemicznych, termochemicznych, jak również biologicznych.

Obecnie produkcja biopaliw na świecie sięga ponad 9,5 tys. litrów na dzień. Produkcja biopaliw na świecie wzrosła o 2,6% w 2016 r. Stany Zjednoczone były zdecydowanie jednym z największych producentów biopaliw na świecie w 2015 r., co stanowiło 41,4 procent światowej produkcji biopaliw. Kraj ten wyprodukował 31 mln ton ekwiwalentu ropy naftowej w tym roku, podczas gdy Brazylia produkowała 17,6 miliona ton ekwiwalentu ropy. Biopaliwa mogą być również wytwarzane poprzez konsumpcję lub konwersję biomasy.

W Polsce biopaliwa są produkowane w niewielkiej ilości w porównaniu do USA, czy Brazylii, a wielkość produkcji w roku 2016 wynosi 898 tysięcy ton ekwiwalentu ropy naftowej. W krajach europejskich jest to średnia wielkość produkcji, przewyższają nas pod tym względem Niemcy (3 198 tys. ton), Francja (2 226 tys. ton), Holandia (1 680 tys. ton) i Hiszpania (1 148 tys. ton).

W związku z rosnącą produkcją biodiesla wzrasta ryzyko zanieczyszczenia środowiska produktami ubocznymi tego procesu, zwłaszcza glicerolem, którego w najbliższej przyszłości może powstawać w Europie ok. 1,5-2 mln ton rocznie. Zagospodarowanie tak dużej ilości taniego surowca może stanowić problem i wymaga poszukiwania nowych metod jego przemianę w cenniejsze produkty. Jednym z interesujących rozwiązań jest wykorzystywanie glicerolu jako źródła węgla i energii w procesach mikrobiologicznych. Glicerol był z powodzeniem wykorzystywany w biotechnologii do produkcji np.: kwasu cytrynowego, kwasu bursztynowego, wodoru i alkoholu etylowego, dihydroksy-acetonu, erytrolu oraz biomasy drożdży paszowych. Jednym z racjonalnych kierunków utylizacji tego związku jest biosynteza białka mikrobiologicznego (SCP), przy udziale drożdży i wykorzystaniu w tej postaci jako dodatku paszowego. Taka sytuacja spowodowana jest głównie przez wyeliminowanie mączki kostnej z produkcji pasz, w związku ryzykiem wystąpienia choroby BSE oraz zaostrzeniem regulacji w zakresie wykorzystania i upraw roślin GMO w Unii Europejskiej, a w szczególności soi genetycznie modyfikowanej. Biomasa komórkowa drożdży posiada również dodatkową zaletę, a mianowicie bogata jest w białko o dobrze zbilansowanym składzie aminokwasowym.

Należy zaznaczyć, że gliceryna ma wiele praktycznych zastosowań. Jest substancją całkowicie nietoksyczną. Stosuje się ją do wyrobu kosmetyków, mydeł toaletowych oraz maści niezawierających tłuszczów. Gliceryna jest substancją o dużej higroskopijności czyli zdolności do pochłaniania wilgoci, co wykorzystuje się na przykład w garbarstwie do zabezpieczania skór przed wysychaniem. Glicerol używany jest również jako substancja słodząca w syropach przeciwkaszlowych. Służy również do produkcji materiałów wybuchowych (nitrogliceryna). Glicerol ma bardzo szerokie zastosowanie w medycynie. Łatwo wchłania się do przewodu pokarmowego, gdzie następnie zostaje utleniony do dwutlenku węgla i glikogenu. Doustne preparaty glicerolu działają łagodnie przeczyszczająco. Poza tym obniża również ciśnienie wewnątrzgałkowe i wewnątrzczaszkowe.

Glicerol może być wykorzystywany w żywieniu zwierząt gospodarskich takich jak krowy, owce, świnie, kurczęta, jednak w ilości nieprzekraczającej 10% dawki paszy. Jego pozytywne działanie polega głównie na zwiększeniu spożycia paszy, najprawdopodobniej dzięki słodkiemu smakowi i lepszej strukturze paszy. Nawet przy wysokiej dawce, która wynosiła 30%, nie stwierdzono jego szkodliwego działania na zwierzęta.

Oprócz tych różnorodnych możliwości wykorzystania glicerolu, na nową i specjalną uwagę zasługuje możliwość wykorzystania go jako surowiec do produkcji etanolu. Wydaje się, że właśnie nowoczesne procesy biotechnologiczne wykorzystujące najnowsze zdobycze wiedzy z zakresu biologii molekularnej, genetyki, inżynierii genetycznej i mikrobiologii mogą sprostać stojącym przed ludzkością zadaniom i przyczynić się do zmniejszenia zanieczysz-

czenia środowiska oraz zapewnić dostateczna ilość energii. Nic, więc dziwnego, że temat pracy doktorskiej p. mgr inż. Iwony Kata związany jest z biologią, aktywnością i właściwościami biochemicznymi drożdży, które odpowiednio skonstruowane metodami inżynierii genetycznej zamierza wykorzystać do produkcji alkoholi, głównie etanolu z glicerolu, 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 glicerolu do etanolu. Cała uwaga badawcza Doktorantki skupia się na takiej modyfikacji wybranego szczepu drożdży *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, w taki sposób, aby można go było wykorzystać w procesie fermentacji prowadzącej do otrzymywania zwiększonych ilości etanolu, których produkowane ilości mogłyby być już opłacalne ekonomicznie.

Należy zaznaczyć, że na całym świecie poszukuje się skutecznych i szybkich metod pozwalających na konwersję produktów odpadowych z produkcji biopaliw i 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 transformacji glicerolu przez drobnoustroje jest wieloetapowy i uwarunkowane wieloma czynnikami, których jeszcze dokładnie nie znamy. Te skomplikowane warunki przebiegu biokonwersji wskazują jak trudnym jest to proces i ile jeszcze trzeba szczegółowych badań, aby otrzymywać w tani i bezodpadowy sposób alkohole-biopaliwa tzw. drugiej generacji.

Dlatego jestem pełen uznania za trud podjęcia badań zmierzających do wyjaśnienia biochemicznych zależności między wybranym szczepem drożdży, a stworzonymi w laboratorium warunkami pozwalającymi maksymalizować proces transformacji glicerolu do alkoholu. 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 genetycznej, wyjaśniające wiele problemów związanych z modyfikacjami genetycznymi drożdży. Zastosowane metody badawcze oparte są na powszechnie stosowanych metodach inżynierii genetycznej i mikrobiologicznych, są właściwie dobrane oraz zastosowane, pozwalające na udowodnienie posta-

wionego celu. Praca wykonana jest poprawnie pod względem metodycznym. Na szczególne podkreślenie zasługują badania nad konstruowaniem szczepów z nadekspresją genów czynnych w rozkładzie glicerolu oraz badania nad uzdolnieniami uzyskanych mutantów do przeprowadzania procesu transformacji 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 glicerolu do 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 technologie 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 transformacji glicerolu do etanolu. Zamierzony cel osiągnięto poprzez konstruowanie nowych szczepów *Ogataea (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 tym aktywność enzymów warunkujących biosyntezę alkoholu etylowego.

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

1. Konstrukcji plazmidu pGLG61 z nadekspresją genu ADH1,
2. Oznaczenia aktywności enzymatycznej dehydrogenazy alkoholowej i dekarboksylazy pirogronianowej,

3. RT-PCR genów *ADH1* i *PDC1*,
4. Analizy produkcji etanolu oraz konsumpcji glicerolu w trakcie fermentacji,
5. Optymalizacja warunków fermentacji glicerolowej drożdży *Ogataea (Hansenula) polymorpha*,
6. Nadekspresji genów odpowiedzialnych za pierwotne reakcje katabolizmu glicerolu u *O. polymorpha*,
7. Konstrukcji plazmidów pUC19 z nadekspresją genów *GPD1*, *GUT1*, *GCY1*, *DAK1* oraz pUC57 z nadekspresją genu *GPD1*,
8. Ekspresji genów *DAK1*, *GUT1*, *GPD1*, *GCY1* z wykorzystaniem reakcji PCR z odwrotną transkrypcją (RT-PCR),
9. Aktywności właściwa enzymów katalizujących reakcje katabolizmu glicerolu,
10. Analizy transformantów drożdży w trakcie fermentacji glicerolu,
11. Fermentacji glicerolu odpadowego przez zrekombinowane drożdże.

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 glicerolu. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że czynniki genetyczne mają istotny wpływ na proces biokonwersji glicerolu przez drożdże *Ogataea (Hansenula) polymorpha*.

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 glicerolu są geny *GCY1*, *PDC1*, *ADH1*, *DAK1*, *GUT1* i *GPD1* oraz czynniki środowiskowe, które pozwoliły na zwiększenie konwersji glicerolu do etanolu 15 razy oraz te w których wykazała, że:

1. Nadekspresja genów *ADH1* i *PDC1*, kodujących enzymy odpowiednio dehydrogenazę alkoholową oraz dekarboksylazę pirogronianową, zwiększała produkcję etanolu z glicerolu przy podwyższonej temperaturze o 7 razy, nawet do 5 g/l.
2. Nadekspresja genów *ADH1* i *PDC1* w niewielkim stopniu poprawiała także fermentację alkoholową ksylozy oraz glukozy.
3. Geny biorące udział w początkowych etapach katabolizmu glicerolu w komórkach drożdży *O. polymorpha* mają istotne znaczenie w konwersji glicerolu do etanolu. Przeprowadzenie nadekspresji genów *GCY1*, *DAK1*, a także *GUT1* i *GPD1*, kodujących dehydrogenazę glicerolu, kinazę dihydroksyacetonu, kinazę glicerolu oraz dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanu, odpowiednio, przyczyniało się do wzrostu produkcji etanolu, a także znacznego wzrostu tempa metabolizmu glicerolu. Maksymalny poziom gromadzonego etanolu podczas konwersji glicerolu wynosił 10,71 g/l, czyli o 15 razy więcej w porównaniu do szczepu dzikiego.
4. Nadekspresja *PDC1*, *ADH1*, *GCY1*, *DAK1* lub *PDC1*, *ADH1*, *GUT1*, *GPD1* także zwiększała wzrost oraz produkcję etanolu z dwóch przeanalizowanych wzorców gliceryny odpadowej. Maksymalna ilość gromadzonego etanolu w tym przypadku wynosiła 2,5 g/l.

5. Nadekspresje 6 wyżej wspomnianych genów biorących udział w konwersji glicerolu do etanolu zwiększały konsumpcję glicerolu przez komórki zmodyfikowanych drożdży *O. polymorpha*.
6. Nadekspresja genów *GPD1/GUT1* oraz *GCY1/DAK1* jednocześnie ze zwiększeniem produkcji etanolu prowadziła do poprawy wzrostu odpowiednich szczepów na podłożu z glicerolem czystym, jak również odpadowym

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

1. Co Pani rozumie pod pojęciem – „Biopaliwa i ich generacje”?
2. Proszę omówić działanie systemu CRISPR w inżynierii genetycznej.
3. Jak wygląda produkcja etanolu na świecie?
4. Zalety i wady BIODIESELA, jako przeszłościowego paliwa.
5. Jakie geny odpowiedzialne są za produkcję etanolu u bakterii a jakie u drożdży? Czy szlaki metabolizmu są podobne?
6. Proszę omówić główne etapy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i w jaki celu jej się używa?
7. Proszę omówić szlak metaboliczny glicerolu do etanolu u drożdży.
8. Jak temperatura wpływała na wydajność fermentacji u drożdży?
9. Skąd się wzięły enzymy restrykcyjne, jaki jest początek ich powszechnego stosowania?
10. Czy widzi Pani możliwość opatentowania i zastosowania wyników badań otrzymanych podczas realizacji pracy doktorskiej?

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 krótko i treściwie, ale bardzo dokładnie, i precyzyjnie, stąd przedstawioną rozprawę p. mgr inż. Iwony Kata oceniam bardzo wysoko. Uzyskane w Jej pracy wyniki wzbogacają naszą wiedzę z zakresu mikrobiologii i procesów fermentacyjnych przeprowadzane przez drożdże *Ogataea (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 inż. Iwony Kata, pt.:

„Konstruowanie szczepów drożdży *Ogataea (Hansenula) polymorpha* zdolnych do efektywnej konwersji glicerolu do etanolu”

stwierdzam, że powyższa rozprawa stanowi niewątpliwie oryginalne i bardzo 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 publikowana.

W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska pod w/w tytułem wykonana przez p. mgr inż. Iwonę Kata 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 inż. Iwony Kata 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 inż. Iwony KATA - stosowną nagrodą (Nagroda Dziekana, Nagrodą Rektora lub Nagrodą 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



Prof. zw. dr hab. Wiesław Barabasz