



**POLITECHNIKA POZNAŃSKA**  
**INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ**  
Berdychowo 4, 60-965 Poznań  
tel. 61 665-37-16, fax 61 665 36 49  
e-mail: lukasz.chrzanowski@put.poznan.pl  
*prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski*  
*Zakład Chemii Organicznej*



Poznań, 01.12.2022

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Wiśniewskiej**

**pt. „Fizjologiczna, molekularna i biochemiczna charakterystyka zimnolubnych grzybów mikroskopowych z kolekcji Instytutu Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej”**

Oceniana praca doktorska została wykonana w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Anety Białkowskiej, prof. PŁ.

### **Podstawa wykonania recenzji**

Recenzję wykonałem w oparciu o pismo Pani Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej dr hab. inż. Anny Diowks prof. PŁ. z dnia 11 października 2022 roku oraz dostarczonego egzemplarza pracy doktorskiej.

### **Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej**

Współczesny przemysł w coraz większym stopniu bazuje na wykorzystaniu związków pochodzenia naturalnego. Nawet jeśli końcowy produkt jest uzyskiwany w wyniku klasycznej syntezy chemicznej, bardzo często jednym z etapów pośrednich jest przekształcanie związków naturalnych w odpowiednie pochodne. Co więcej, od dłuższego czasu w reakcjach wykorzystuje się enzymy, które okazały się idealnym rozwiązaniem. Nie tylko umożliwiają łatwe przeprowadzenie transformacji, często bardzo trudnych, czy wręcz niemożliwych do odtworzenia za pomocą klasycznych metod syntezy, a dodatkowo pozwalają wyeliminować potrzebę rozdzielania izomerów, zwiększają selektywność, wydajność produkcji pożądanych produktów itp. W chwili obecnej niemożliwe jest funkcjonowanie przemysłu chemicznego bez wykorzystania odpowiednich enzymów. O ile same enzymy wykorzystywaliśmy nieświadomie przez tysiąclecia, o tyle ich celowa izolacja i wykorzystanie w przemyśle nastąpiło po raz pierwszy w roku 1894, kiedy amylazę wyizolowaną z grzyba wprowadzono na rynek jako preparat zwalczający problemy trawienne. W roku 1915 opatentowano w Stanach Zjednoczonych preparat do prania zawierający enzymy. Zawierucha wojenna skierowała uwagę na

inne tematy, jednak przemysł w połączeniu z ośrodkami naukowymi nadal kontynuował badania na izolację, charakterystyką i potencjalnym wykorzystaniem enzymów. W konsekwencji prowadzonych badań, wprowadzano do produkcji kolejne enzymy. Dodatkowo kryzys paliwowy w Stanach Zjednoczonych w roku 1973 spowodował zmiany w sposobie postrzegania klasycznej syntezy opartej na ropie naftowej, jako jedyne źródła substratów dla przemysłu chemicznego. W tym okresie powrócono do koncepcji wykorzystania substratów odnawialnych, co pierwotnie rozwijano podczas II Wojny Światowej, zwłaszcza w dotkniętymi licznymi ograniczeniami importowymi Niemczech. W latach 70-tych odświeżono dużo pomysłów jak przykładowo koncepcja produkcji biopaliw, czy polimerów z substratów naturalnych. Od tego momentu wszystkie badania uległy znacznemu przyspieszeniu. Ponadto dodatkowym czynnikiem sprzyjającym takiemu rozwojowi była zwiększająca się świadomość, że zasoby kopalniane są ograniczone, a zanieczyszczenie powietrza, gleb i wód to globalny problem dotykający wszystkich. Przez ostatnie 40 lat enzymy stały się powszechnym składnikiem proszków do prania, kosmetyków, preparatów czyszczących naczyń itp. Są one produkowane przez firmy, które są powszechnie rozpoznawalne na świecie jak przykładowo duński Novozyme, z dochodem około 2 mld PLN za rok 2021. W swojej ofercie posiada enzymy dla przemysłu spożywczego, odzieżowego, papierniczego, farmaceutycznego, rolnictwa, szeroko pojętego oczyszczania środowiska, środków piorących i czyszczących i wielu innych gałęzi przemysłu i nauki. Jest to jedna z kilku podobnych firm nastawionych na wykorzystywanie enzymów. Wszystkie te firmy ustawicznie poszukują nowych enzymów oraz wydajnych źródeł ich produkcji.

Analizując światowe trendy można stwierdzić, że tematyka badawcza podjęta przez Panią mgr inż. Katarzynę Wiśniewską doskonale wpisuje się w działania wielu ośrodków naukowych i komercyjnych firm.

Grzyby są dobrze znane z szerokiego wachlarza enzymatycznego pozwalającego na przeprowadzanie wielu reakcji chemicznych, przez co mogą kolonizować liczne nisze środowiskowe. Są więc doskonałym źródłem nowych enzymów. Pani Katarzyna Wiśniewska od samego początku uzupełnia luki w obecnym stanie wiedzy. W pierwszym etapie dokonuje charakterystyki fizjologicznej i molekularnej zimnolubnych grzybów mikroskopowych z kolekcji macierzystego Instytutu. Następnie przechodzi do określenia potencjału enzymatycznego szczepów, co pozwala na wytypowanie aktywnego szczepu wraz z poszukiwaniem odpowiedniej sekwencji genowej. W kolejnych etapach Doktorantka zajmuje się optymalizacją syntezy lakaz wraz z ich charakterystyką biochemiczną i kinetyczną. Pracę kończą badania dekoloryzacji barwników syntetycznych oraz biotransformacji kwasu ferulowego do waniliny z użyciem wyodrębnionych enzymów.

Nie ma wątpliwości, że Doktorantka wykonała ogrom badań, a uzyskane wyniki wnoszą elementy nowości naukowej do obecnego stanu wiedzy.

### **Formalna ocena pracy doktorskiej**

Praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Wiśniewskiej została zrealizowana jako klasyczna monografia. Układ pracy jest typowy dla tego typu doktoratów. Całość pracy zawarto na 272 stronach. Po stronie tytułowej znajdują się podziękowania a następnie trzy strony spisu treści. Dwie kolejne strony zawierają streszczenie

pracy w języku polskim, po czym zamieszczono analogiczne streszczenie w języku angielskim. Wprowadzenie do tematyki badawczej zajmuje 40 kolejnych stron i jest napisane poprawnym stylistycznie językiem. Doktorantka nie wprowadza do treści nadmiernej ilości zapożyczonych terminów obcojęzycznych, wykorzystując przede wszystkim uniwersalne, powszechnie rozpoznawalne słownictwo. Przeglądając bardzo uważnie pracę znalazłem nieistotne uchybienia, które podano poniżej:

- str. 2 „przyjaciołom” – z dużej litery
- str. 12 „... w okolicach antarktycznego jeziora Vostok” – raczej Wostok
- str. 14 Singh i inni – raczej Singh i wsp.
- str. 16 „kompatybilnych solutów” – zbyt dosłowna kalka językowa
- str. 34 „I tak np. ...” – styl
- str. 36 „w latach 50s” – niedokończone tłumaczenie
- str. 43 „katod biopaliwowych” - ?
- str. 46 „stopień biodegradacji” – raczej efektywność, stopień nasuwa konieczność zdefiniowania jednostki, a efektywność może być podawana w procentach
- str. 54 „dodawano do roztworu enzymu przed roztworem substratu” – styl
- str. 54 „współczynnik kierunkowy ... (ml/ $\mu$ mol) – współczynnik nie ma jednostki gdyż jest to tg kąta nachylenia prostej
- str. 64 „Sole żelaza” – brakuje konkretnej nazwy soli
- str. 68 „Stężenia induktorów dobrano na podstawie literatury” – brakuje odnośnika literaturowego
- str. 76 „w warunkach wstrząsanych” – wstrząsano
- str. 85 „analogicznie do punktu” – brakuje numeru
- str. 145 „I tak ...” – styl
- str. 148 „trójjądrowe centrum miedziowe” – jądra nie stanowią centrów, tylko odpowiednie kationy

Warto również bardziej zwrócić uwagę na jednolity sposób zapisu symboli takich jak „°C” czy „%”. Zgodnie z wytycznymi Rady Języka Polskiego powołanej przez Prezydium Polskiej Akademii Nauk uchwałą nr 17/96 z dnia 9 września 1996 r. zalecana jest następująca reguła „zapisu oznaczeń wartości fizycznych i matematycznych: **między wartością liczbową a literowym oznaczeniem miary, czyli skrótem lub skrótowcem, stawiamy spację, natomiast między wartością liczbową a oznaczeniem miary za pomocą symbolu albo połączenia skrótu/skrótowca i symbolu spacji nie stawiamy.** Poprawny zapis to zatem: np. 5 proc., 5 m, 5 s, 20 V, 13  $\Omega$ , 7,5 rd, 10,5 rad, 98 Hz oraz 5% (nie: 5 %, choć: 5 proc.), 3‰ (nie: 3 ‰), 10°C (nie: 10 °C ani 10 ° C), 212°F (nie: 212 °F ani 212 ° F), 3' (nie: 3 '), 35" (nie: 35 "), 25g (nie: 25 g) itd.”

Na kolejnej stronie wyraźnie określono cele i zakres pracy, w ramach których trafnie wyodrębniono następujące zadania badawcze:

- charakterystykę fizjologiczną i molekularną zimnolubnych grzybów mikroskopowych z kolekcji Instytutu Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
- określenie potencjału enzymatycznego badanych szczepów
- wybór jednego szczepu, jako potencjalnego źródła interesującej aktywności enzymatycznej
- analizę bioinformatyczną zsekwencjonowanego genomu psychrotrofowych grzybów drożdżopodobnych z gatunku *Aureobasidium bupleurii* i poszukiwanie genu kodującego docelową aktywność
- optymalizację warunków wydajnej biosyntezy lakaz produkowanych przez szczep *Aureobasidium bupleuri* G3 IBMiP
- ekspresję genu kodującego lakazę KbLcc1 w heterologicznym mezofilnym gospodarzu *Pichia pastoris*
- charakterystykę biochemiczną i kinetyczną zimnolubnej natywnej i rekombinowanej lakazy
- wskazanie potencjału katalitycznego badanego białka enzymatycznego w procesach dekoloryzacji barwników syntetycznych oraz biotransformacji kwasu ferulowego do waniliny.

W dalszej kolejności zamieszczono 42 stronicowy opis materiałów i metod wykorzystanych podczas prowadzenia badań. Opis wyników zajmuje 82 strony tekstu wraz z tabelami, wykresami i zrzutami ekranu. Następnie Doktorantka przedstawia 22 strony dyskusji naukowej oraz 3 strony wniosków. Na następnych 7 stronach przedstawiono dorobek naukowy Doktorantki, na który składają się 2 prace w monografiach naukowych, 4 artykuły naukowe w czasopismach z listy filadelfijskiej, 43 sekwencje genów zgłoszone do GenBank a także 8 referatów i komunikatów na konferencjach naukowych. Ponadto Doktorantka kierowała projektem finansowanym z Funduszu Młodych Liderów Nauki na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Spis rysunków, schematów i tabel zamieszczonych w rozprawie to kolejne 7 stron, po których umieszczono 33 strony spisu wykorzystanej literatury, co odpowiada 474 pozycjom. Całość zamyka 27 stron materiałów dodatkowych.

#### Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Przystępując do oceny pracy doktorskiej warto zwrócić uwagę na bardzo ciekawe wprowadzenie do tematyki badawczej. Poza standardowymi informacjami Doktorantka przedstawia interesujące przykłady technologicznego zastosowania enzymów z grupy lakaz, a wszystkie informacje opierają się na aktualnym stanie wiedzy. Wprowadzenie w jasny sposób informuje czytelnika co wiemy i co jeszcze należy przebadać. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka doskonale przestudiowała dostępną literaturę, jednak warto było ograniczyć liczbę odnośników literaturowych, których jest aż 474. To średnio trzy razy więcej niż w typowej rozprawie. Nawet bez tej ogromnej liczby odnośników, można dostrzec że realizowane badania wpisują się w tematykę badawczą prowadzoną przez rozpoznawalne międzynarodowe ośrodki badawcze. Wśród autorów zacytowanych prac bez trudu można odnaleźć nazwiska liderów tego typu badań na świecie.

Badania przedstawione w pracy zostały zaplanowane z wykorzystaniem typowych technik wykorzystywanych w omawianej dziedzinie i są one wystarczające do dobrego opisu analizowanych szczepów. Bezpośrednim potwierdzeniem są 4 publikacje Doktorantki w dobrze rozpoznawalnych czasopismach z listy filadelfijskiej. Opublikowane prace wnoszą elementy nowości naukowej, pozwalają na lepsze i pełniejsze zrozumienie analizowanych zagadnień naukowych oraz pokazują uniwersalne informacje ważne dla międzynarodowego środowiska naukowego. Wyniki pokazane na łamach niniejszego doktoratu z pewnością są równie interesujące i szkoda, że nie zostały w całości opublikowane.

Podany w doktoracie cel badań jest czytelny i bardzo dobrze koresponduje z obecnym stanem wiedzy. Całościowo badania charakteryzują się wieloma elementami nowości naukowej. Szczegółowa analiza załączonych wyników, dyskusji i wniosków, nasunęła Recenzentowi pewne komentarze, sugestie i pytania:

- Dużym atutem jest fakt, że większość z wybranych do badań szczepów drożdży została wyizolowana z prób gleby pobranej z okolic Polskiej Stacji Antarktycznej zlokalizowanej na Wyspie Króla Jerzego ulokowanej w archipelagu Szetlandów Południowych. Jest to o tyle interesujące, że wiele ciekawych enzymów o znaczeniu przemysłowym zostało wyizolowanych właśnie z mikroorganizmów bytujących w niskich temperaturach. Taka strategia podnosi wartość poznawczą niniejszych badań.
- Doktorantka stosuje wyrażenia: „stopień degradacji” czy „stopień dekoloryzacji”. Chyba zdecydowanie trafniejszym jest użycie zwrotu: efektywność degradacji czy dekoloryzacji, tym bardziej, że wartość wyrażona jest w procentach i nie posiada żadnej charakterystycznej jednostki.
- Doktorantka chcąc zamieścić wszystkie informacje w swojej pracy nadała jej formę zeszytu laboratoryjnego z bardzo szczegółowym opisem wszystkich metod i wyników. Do tego dochodzi dyskusja wyników, wnioski i wszystkie inne typowe sekcje, co przekłada się na 272 strony pracy. Oczywiście z punktu widzenia pracowników Instytutu, ta praca jest idealna bo stanowi kompendium wiedzy na temat szczepów znajdujących się w kolekcji i będzie nieocenioną pomocą dla wszystkich planujących wykorzystanie szczepów kolekcyjnych. Z punktu widzenia recenzenta, zdecydowanie korzystniej byłoby maksymalnie skrócić pracę aby zawierała tylko niezbędne fakty. Byłoby to o tyle łatwiejszym, że przedstawione wyniki można z pewnością opublikować w dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej, przez co praca przybrałaby formę tzw. zsywki bazującej na opublikowanych pracach. Ponadto Doktorantka powinna potrafić w krótki i zwarty sposób przedstawić swoje osiągnięcie naukowe, a obecna forma, choć napisana bardzo poprawnym językiem, jest trochę za długa.
- Należy docenić metodyczne badania w pierwszej części doktoratu, których celem była analiza kariotypów oraz skrining ponad 40 szczepów. Nie ma wątpliwości, że te badania są potrzebne i choć nie przekładają się na spektakularne wyniki, pozwoliły na wyselekcjonowanie jednego szczepu do

dalszych analiz. Dzięki temu powstała baza danych, którą będą mogli wykorzystać pracownicy Instytutu, a poprzez sekwencje genów zgłoszone do GenBank, także inni naukowcy. Badania te są bardzo rzetelne i widać jak wiele czasu i pracy Doktorantka poświęciła na realizację tego zadania.

- Doktorantka podczas prób uproszczenia i zminimalizowania kosztów medium hodowlanego dla wydajnej syntezy laktazy wymienia stosowane induktory, a wśród nich jony miedzi  $\text{Cu}^{2+}$  oraz Tween 80. Ten drugi to typowy związek powierzchniowo-czynny dlatego prosiłbym o kilka słów wyjaśnienia dlaczego i na jakiej zasadzie ten związek ma działać jako induktor.
- Bardzo interesujące są badania wskazujące na możliwość wykorzystania natywnego preparatu enzymatycznego i rekombinowanej laktazy do dekoloryzacji barwników syntetycznych z grupy trifenylometanowych i tiazynowych. Biorąc pod uwagę światowe trendy badawcze wskazujące na wagę problemu skażenia wód barwnikami, zaprezentowane wyniki mają duży potencjał publikacyjny. Warto byłoby sprawdzić selektywność dekoloryzacji w odniesieniu do mieszanin barwników znajdujących się w ściekach oraz do metali ciężkich, które znajdują się często w takich ściekach i mogą negatywnie oddziaływać na enzymy. Czy takie substancje obecne w ściekach nie będą przeszkadzać w procesie? Jakie badania zaproponowałaby Doktorantka aby uzupełnić obecne wyniki i zapewnić możliwość opublikowania w wiodących czasopismach? Czy zdaniem Doktorantki na chwilę obecną istnieją przesłanki pozwalające na kolejne etapy zmierzające do komercjalizacji takiego rozwiązania?
- Rozwijając wątek dekoloryzacji, warto byłoby sprawdzić za pomocą odpowiedniej techniki, np. HPLC-MS, jakie produkty rozkładu barwników powstają. Należy wyeliminować potencjalną możliwość generowania metabolitów, które będą bardziej toksyczne niż wyjściowa substancja. Do tego niezbędne jest przeprowadzenie wstępnego bilansu masowego, co można zgrubnie przeprowadzić wykorzystując metody chromatograficzne. Ponadto idealnym rozwiązaniem byłoby sprawdzenie możliwości immobilizacji enzymu na prostym nośniku wraz z badaniami w układzie przepływowym, który znacznie lepiej odpowiada zastosowaniu przemysłowemu do usuwania barwników obecnych w ściekach.
- Niezmiernie ciekawe są badania nad biotransformacją kwasu ferulowego do waniliny. Doskonale rozumiem, że są to badania wstępne, ale chciałbym zapytać Doktorantkę jaka wydajność waniliny byłaby niezbędna aby przemysł podjął się wykorzystania zaproponowanej metody do komercyjnego wytwarzania tego związku? Trochę szkoda, że w pracy nie ma bezpośredniego odniesienia do tego zagadnienia.
- Dyskusja wyników przeprowadzona przez Doktorantkę jest optymalna i pozwala na dobre ich umiejscowienie pośród wyników opisanych przez innych badaczy. Warto podkreślić, że Doktorantka

w żadnym momencie nie spekuluje i nie wykazuje tendencji do nadinterpretowania uzyskanych danych. Liczą się tylko fakty potwierdzone naukowo. Chciałbym w szczególny sposób zasygnalizować ten fakt, gdyż czasami nawet brakuje wskazania potencjalnego wykorzystania wyników. Bardzo cennym jest również wskazanie jakie wyniki zostały już opublikowane a także podanie odpowiednich czasopism.

- Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską należy wyróżnić bardzo duży wkład własnej pracy Doktorantki.

### **Wniosek końcowy**

Analizując niniejszą pracę doktorską pod kątem aktualności i oryginalności podjętych badań można z całą pewnością stwierdzić, że Autorka z sukcesem odnalazła swoją niszę badawczą, a zrealizowane przez Nią badania będą interesujące dla szeregu naukowców zainteresowanych wykorzystaniem grzybów jako źródła pozyskiwania enzymów.

Reasumując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr inż. Katarzyny Wiśniewskiej pt. **„Fizjologiczna, molekularna i biochemiczna charakterystyka zimnolubnych grzybów mikroskopowych z kolekcji Instytutu Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej”** oceniam bardzo pozytywnie oraz stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim procedowanym na podstawie Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Ponadto, praca wykazuje niezbędną ogólną wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych wraz z interpretacją uzyskanych wyników dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Wiśniewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem,



prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski