

## **RECENZJA ROZRAWY DOKTORSKIEJ**

Mgr inż. Katarzyny Wiśniewskiej

pt. „MOLEKULARNA, FIZJOLOGICZNA I BIOCHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA ZIMNOLUBNYCH GRZYBÓW  
MIKROSKOPOWYCH Z KOLEKCJI INSTYTUTU BIOTECHNOLOGII MOLEKULARNEJ I PRZEMYSŁOWEJ”

wykonanej

w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności

Politechniki Łódzkiej

pod kierunkiem Prof. Uczelni dr hab. inż. Anety Białkowskiej

Recenzja została przygotowana w nawiązaniu do Uchwały Rady do Spraw Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia z dnia 6 lipca 2021 roku, w odpowiedzi na pismo Pani Dziekan Prof. Uczelni dr hab. inż. Anny Diowkszej z dnia 11 października 2022 roku.

### **1. Charakterystyka formalna rozprawy**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Wiśniewskiej pt. „MOLEKULARNA, FIZJOLOGICZNA I BIOCHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA ZIMNOLUBNYCH GRZYBÓW MIKROSKOPOWYCH Z KOLEKCJI INSTYTUTU BIOTECHNOLOGII MOLEKULARNEJ I PRZEMYSŁOWEJ” stanowi rozprawę w postaci jedno-autorskiego dzieła, jednakże, jak można wywnioskować na podstawie lektury dzieła, jest w znacznej części oparta na zestawie trzech artykułów naukowych opublikowanych w latach 2017 i 2021 w czasopismach Polar Biology, Biomolecules oraz International Journal of Molecular Sciences. Doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch, kluczowych artykułach wchodzących w skład dzieła, a drugim autorem

w trzeciej pracy. Sama rozprawa jednakże zawiera także dodatkowe elementy, które nie stanowią przedmiotu w/w artykułów naukowych (jak badanie aktywności ksylanolitycznej, metryczki szczepów). Stąd całość dzieła z jednej strony jest oparta na nowym modelu przygotowywania rozpraw doktorskich (na podstawie publikacji), a jednocześnie stanowi oryginalny, niepublikowany wcześniej zestaw wyników wraz z kompleksowym omówieniem całości.

Manuskrypt jest skonstruowany w sposób klasyczny dla rozpraw naukowych, a wspomniane powyżej publikacje i ich omówienie stanowią jej zasadniczą część. W dokumencie zawarto typowe rozdziały, takie jak streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie do przedmiotu rozprawy, cel i zakres pracy, opis zastosowanych materiałów i metod, wyniki bogato opatrzone elementami graficznymi, dyskusję i wnioski, spis cytowanej literatury, oraz materiały uzupełniające. Załączono także wykaz dorobku naukowego Doktorantki, w którego skład wchodzi 6 oryginalnych artykułów naukowych, 43 rekordy sekwencji nukleotydowych zarejestrowanych w bazie danych GenBank, 8 doniesień konferencyjnych, oraz kierowanie 1 projektem naukowym finansowanym ze środków macierzystej Uczelni. Reasumując strukturę rozprawy, można stwierdzić, że konstrukcja pracy jest klarowna i logiczna. Manuskrypt jest przygotowany niezwykle starannie, z dużą dbałością o estetykę pracy i poprawny język. Dorobek naukowy Doktorantki wykracza poza zestaw wyników prezentowanych w rozprawie. Przedstawienie wyników prac eksperymentalnych w postaci jednolitej, spójnej rozprawy, oraz rola pierwszego / drugiego Autora w kluczowych dla dzieła artykułach, pozwala stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi **autorskie dzieło mgr inż. Katarzyny Wiśniewskiej**, realizowane pod opieką Pani Promotor.

## 2. Przedmiot rozprawy oraz zastosowane podejście metodyczne

W ogólnym ujęciu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy biologii zimnolubnych drożdży i grzybów drożdżopodobnych. Główny materiał badany stanowił oryginalny zestaw 29 izolatów grzybów pochodzących z ekstremalnego środowiska, dla których przeprowadzono gruntowną charakterystykę właściwości fizjologicznych, biochemicznych i molekularnych. Drugi, wyraźnie zaznaczony obszar badawczy stanowią szczegółowe studia nad lakazą z *Aureobasidium bupleuri* G3 o unikatowych właściwościach biochemicznych. Na podstawie przeglądu literatury przedmiotu można stwierdzić, że podjęta tematyka badawcza zarówno w odniesieniu do kolekcji zimnolubnych grzybów, jak i nowej lakazy stanowi **oryginalny aspekt badań uzupełniający światową wiedzę o nowe i ciekawe wyniki**.

Cele szczegółowe rozprawy, a tym samym główne etapy badań i zastosowane podejścia metodyczne, można skrótowo ująć w następujących punktach:

1. Kompleksowa charakterystyka zestawu zimnolubnych grzybów z kolekcji Instytutu BMiP
  - Metodycznie etap ten zrealizowano poprzez dokonanie identyfikacji szczepów na drodze sekwencjonowania dwóch regionów klastra rDNA, przygotowanie drzew filogenetycznych, określenie wielkości genomów i struktury kariotypu poprzez

cytometrię przepływową i elektroforezę pulsacyjną.

- Ponadto dokonano oceny uzdolnień enzymatycznych dla w/w zestawu izolatów oraz 15 szczepów kolekcyjnych poprzez zastosowanie szeregu mediów różnicujących (inaczej – indykatorowych) i, w kilku przypadkach, komplementarnych roztworów barwiących. W tym etapie badano uzdolnienia amylolytyczne, proteolityczne, esterolityczne, pektynolityczne, celulozylityczne, ksylanolityczne, aktywność beta-galaktozydazy, fizaty i (kluczowej dla dalszych etapów pracy) lakazy.

2. Zsekwencjonowanie genomu szczepu *Aureobasidium bupleuri* G3 z kolekcji Instytutu i przeszukanie sekwencji genomu celem identyfikacji genów kodujących lakazy, dla których wykonano pogłębioną analizę bioinformatyczną.

- Metodycznie etap polegał na: i) przygotowaniu biblioteki sekwencji i sekwencjonowaniu nowej generacji, ii) ocenie jakości sekwencjonowania, iii) złożeniu kompletnej sekwencji genomu, iv) identyfikacji sekwencji kodujących białka i ich adnotacji funkcjonalnej.
- Dalsze szczegółowe analizy bioinformatyczne dotyczyły 9 wyselekcjonowanych genów o przypisanej funkcji oksydazy miedziowej. W tym zakresie wykorzystano bazy CDD i Pfam i zastosowano przyrównanie wielu sekwencji (MSA), aby wskazać kluczowe dla katalizy domeny, motywy, a w końcu - reszty aminokwasowe.
- Dla wybranych 4 sekwencji o przypuszczalnej funkcji lakaz, analizy bioinformatyczne poszerzono o charakterystykę właściwości kodowanych białek – obecność peptydu sygnałowego, liczbę i lokalizację intronów, zawartość typowych dla lakaz domen, przewidywaną masę cząsteczkową, punkt izoelektryczny, oraz bardzo ciekawą analizę sekwencji promotorowych pod kątem występowania motywów wiązania czynników transkrypcyjnych. W tym celu zastosowano szereg narzędzi bioinformatycznych.

3. Dobór warunków syntezy natywnych lakaz przez szczep G3, częściowe oczyszczanie i charakterystyka uzyskanego preparatu enzymatycznego.

- Metodycznie realizacja tego celu obejmowała prace z zakresu mikrobiologii i biochemii - przetestowaniu szeregu składników medium hodowlanego (bazy medium, dodatku jonów Cu, witaminy C i induktorów syntezy lakaz) oraz badaniu ich wpływu na poziom aktywności lakaz w medium hodowlanym. Bardzo ciekawym, i zakończonym dużym sukcesem, aspektem było testowanie szeregu surowców naturalnych (odpadów przemysłu rolno-spożywczego) jako bazy podłoża produkcyjnego.
- Dalsze prace w ramach tego etapu obejmowały dobór warunków częściowego oczyszczania lakaz syntetyzowanych przez szczep G3, oraz typowe prace z zakresu enzymologii – badania aktywności i stabilności w zakresie temperatur, pH,

specyficzności pH-substrat.

4. Klonowanie i nadekspresja genu *KbLcc1* kodującego jedną z czterech lakaz ze szczepu G3 w *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), oraz charakterystyka rekombinowanego białka.
  - Realizacja tego zadania wymagała biegłości w zakresie stosowania szeregu technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Gen *KbLcc1* klonowano najpierw w wektorze do sub-klonowań specyficznym dla *E. coli*, przeprowadzono splicing *in vitro*, a gotowy fragment opatrzony stosownymi flankami wprowadzono do wektora typu shuttle umożliwiającego indukowaną ekspresję genów w komórkach *P. pastoris*. Spośród transformowanych sub-klonów do dalszych badań wybrano jeden, na podstawie poziomu aktywności zewnątrzkomórkowej lakazy i obrazu rozdziału elektroforetycznego białek.
  - W dalszym etapie rekombinowany enzym oczyszczono do homogenności obserwowanej w rozdziale elektroforetycznym i poddano charakterystyce biochemicznej w zakresie znacznie poszerzonym w stosunku do natywnego preparatu ze szczepu G3. W tym przypadku badano aktywność i stabilność enzymu w zakresie temperatur, pH, specyficzności pH-substrat, ale też wpływ szeregu kationów oraz rozpuszczalników organicznych (tu bardzo ciekawe wyniki uzyskano dla testów z jonami żelaza i heksanem).
5. Finalnym etapem było zbadanie potencjału aplikacyjnego natywnej i rekombinowanej lakazy w zakresie dekoloryzacji syntetycznych barwników, oraz biotransformacji kwasu ferulowego do waniliny (tylko enzym rekombinowany). W obu przypadkach prowadzono reakcje enzymatyczne *in vitro*, i z sukcesem wykazano potencjał aplikacyjny przedmiotowego enzymu.

Aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zastosowała szereg zróżnicowanych technik, które w sposób adekwatny odnosiły się do problemów badawczych. Podejścia eksperymentalne zostały szczegółowo przedstawione w sekcji 3 i 4 rozprawy. Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera wyniki dobrze zaplanowanych, wielokierunkowych badań, o bardzo szerokim zakresie metodycznym, obejmującym podejścia z zakresu mikrobiologii, biochemii, enzymologii, inżynierii genetycznej, biologii molekularnej, jak również zaawansowane analizy bioinformatyczne. Tak szeroki zakres przeprowadzonych prac obrazuje szerokie spektrum kompetencji, jakie Doktorantka nabyła w trakcie wykonywania pracy doktorskiej i zasługuje na duże uznanie.

### **3. Kluczowe wyniki i wnioski uzyskane w toku realizacji pracy oraz znaczenie osiągnięć dla środowiska naukowego**

Do kluczowych osiągnięć naukowych przedstawionych w rozprawie należą:

- dostarczenie do międzynarodowej bazy danych 43 rekordów sekwencji nukleotydowych kodujących fragmenty klastra rDNA, co stanowi wartościowy wkład dla środowiska naukowego, ponieważ umożliwi bardziej precyzyjne oznaczenia innym badaczom;
- eksperymentalne wykazanie wielkości i struktury genomów zestawu drożdży, dla których dane te nie były dostępne lub bazowały na szacowaniach na podstawie analiz bioinformatycznych; takie dane mogą zainicjować pogłębione prace z zakresu biologii molekularnej tych gatunków, a w konsekwencji - umożliwić prowadzenie modyfikacji genetycznych;
- kompleksowa analiza uzdolnień enzymatycznych zestawu zimnolubnych grzybów; dane te stanowią bazę do dalszych pogłębionych prac nad rozwijaniem tych uzdolnień w ukierunkowanych procesach biotechnologicznych i mogą skutkować ciekawymi rozwiązaniami z zakresu biotechnologii przemysłowej;
- zsekwencjonowanie genomu szczepu *A. bupleuri* G3 o unikatowych uzdolnieniach enzymatycznych, jego charakterystyka, adnotacja i skuteczne wyszukanie interesujących sekwencji nukleotydowych, wraz z dogłębną analizą bioinformatyczną samych genów i sekwencji promotorowych;
- zwiększenie parametru produktywności objętościowej dla procesu syntezy lakazy KbLcc1 z 0.22 (U/(L\*h)) do 0.597 i dalej do 0.77 (U/(L\*h)) dzięki modyfikacjom medium produkcyjnego, zastosowaniu alternatywnego surowca, a finalnie – ekspresji heterologicznej; tutaj szczególnie wysoko oceniam wyniki uzyskane w hodowlach na młócie browarniczym;
- dokonanie charakterystyki biochemicznej unikatowego enzymu i wykazanie jego potencjału aplikacyjnego; ciekawym aspektem było także eksperymentalne wykazanie różnic pomiędzy aktywnością natywnej i rekombinowanej lakazy w dekoloryzacji syntetycznych barwników.

Wyniki uzyskane w toku prac eksperymentalnych, po trafnej interpretacji biologicznej i szczegółowym przedyskutowaniu z danymi literaturowymi, pozwoliły na sformułowanie aż 17 finalnych obserwacji i wniosków, zaprezentowanych na str. 199 dokumentu. Postawione wnioski są uzasadnione i poparte przedstawionymi danymi eksperymentalnymi.

#### **4. Komentarze**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska w znacznej części już przeszła proces recenzencki, jako że stanowi zbiór wyników przedstawionych w oryginalnych artykułach opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. W ocenie recenzenta, praca jest ciekawa, przygotowana starannie, prezentuje bardzo szeroki zakres dobrze zaplanowanych prac eksperymentalnych, a interpretacje i wyjaśnienia uzyskanych rezultatów są szczegółowe i wyczerpujące. Z tego względu pozwolę sobie jedynie na drobne komentarze oraz zapytania kierowane do Doktorantki z prośbą o ustosunkowanie się do nich w trakcie publicznej obrony:

1. Jako osobę pracującą z niekonwencjonalnym drożdżami dimorficznymi, bardzo zainteresowało mnie stosowane przez Doktorantkę określenie „grzybów drożdżopodobnych”. Chciałam uprzejmie poprosić o przybliżenie jaka grupa grzybów mieści się w tej grupie? Czy są jakieś konkretne wyznaczniki pozwalające na zaklasyfikowanie danego gatunku do tej grupy?
2. Analiza wyników przedstawionych na Rysunku 5.16 obrazującego wyniki testowania uzdolnień amyloolitycznych trzech szczepów W10, W15 i G3 budzi wątpliwość w odniesieniu do stwierdzonej aktywności amyloolitycznej szczepów z serii W. Do wątpliwości przyczynia się kontrast pomiędzy charakterystyką stref przejaśnienia dla G3 i W10/W15. Obserwowane dla tych drugich strefy przejaśnienia mają inny charakter niż dla szczepu G3 – są mniejsze, brzegi strefy są mniej ostre i mniej wyraźne niż w przypadku szczepu G3. Biorąc pod uwagę, iż kompleksowanie jodu przez helisę skrobi jest reakcją wrażliwą na warunki środowiska, jak np. pH (choć pH medium wskaźnikowego w tym wypadku było regulowane), obserwowane przejaśnienie może być wynikiem syntezy metabolitów, a nie reakcją enzymatyczną. Ponieważ w rozprawie po raz pierwszy stwierdzono aktywność amyloolityczną dla *F. oerense* W10, warto byłoby na jednej płytce z medium buforowanym posiać wszystkie te szczepy badane oraz szczepy kontrolne, dla których już stwierdzono obecność / brak tych uzdolnień. Takie wyniki jednoznacznie wykażą zasadność wniosków. Przy okazji tego pytania, chciałam też dopytać, dlaczego regulowano pH tylko niektórych z podłoży wskaźnikowych?
3. Zgodnie z najlepszą wiedzą recenzenta media selekcyjne to takie, które pozwalają wyeliminować część wysianej populacji mikroorganizmów a umożliwić wzrost grupie preferowanej. Z kolei, media różnicujące = wskaźnikowe = indykatorowe to takie, które umożliwiają wzrost całej wysianej populacji, ale pozwalają na ich różnicowanie ze względu na daną cechę. Możliwe są media jednocześnie selekcyjne i różnicujące. Uprzejmie proszę o ustosunkowanie się do tych znanych recenzentowi definicji w kontekście mediów stosowanych w pracy do badania uzdolnień enzymatycznych kolekcji szczepów.
4. Zainteresował mnie fakt, że przy klonowaniu genu *KbLcc1* w komercyjnym wektorze ekspresyjnym, klonowana sekwencja była opatrzona dwoma sekwencjami peptydu sygnałowego – jednym natywnym dla rzeczony lakazy, i drugim peptydem sygnałowym czynnika alfa; jako że sekwencja kodująca ten peptyd stanowi integralny element stosowanego wektora. Bardzo mnie ciekawi, czy oba były peptydy prawidłowo procesowane w szlaku sekrecyjnym gospodarza. Można to zbadać przy zastosowaniu degradacji Edmana prążka wyciętego z żelu. Czy może Doktorantka dysponuje takimi danymi?
5. Chciałam też dopytać Doktorantkę, czy ma jakieś przypuszczenia dlaczego rekombinowana lakaza wykazywała lepszą efektywność w dekoloryzacji syntetycznych barwników?
6. Drobne potknięcia edytorskie: s. 153 – Overall-Extension PCR; literówki na str 84, 85; błąd we wniosku 13 – masa cząsteczkowa nie jest 69 kDa (przewidywana na podstawie sekwencji) tylko 76 kDa, jak wynika z przeprowadzonych eksperymentów; nieprecyzyjny opis kolejnych kolumn w Tab. 5.18 (kolumny „motyw” i „domniemana funkcja” czasami wskazuje na czynnik transkrypcyjny, a czasami rzeczywiście na motyw sekwencji DNA). Chciałam poprosić o uzupełnienie informacji na temat warunków kwasowości środowiska reakcji biotransformacji kwasu ferulowego do waniliny

zaprezentowanych na Rysunku 5.61. W omówieniu wskazano, że reakcję prowadzono w pH 3.5 i 7, ale nie wskazano dalej, w jakich warunkach prowadzono reakcję której dotyczą zaprezentowane wyniki.

## **5. Posumowanie**

W recenzowanej rozprawie doktorskiej mgr inż. Katarzyny Wiśniewskiej na uwagę zasługuje szeroki zakres przeprowadzonych badań. Wysoko oceniam wielokierunkowość podejść i mnogość zastosowanych technik, co skutkuje kompleksowym i rzetelnym podejściem do badanego problemu. Uważam, iż przedstawiona rozprawa doktorska wraz z towarzyszącymi jej publikacjami stanowi merytorycznie wartościowy i nowatorski wkład do światowej wiedzy naukowej z zakresu biologii zimnolubnych grzybów mikroskopowych oraz unikatowej lakazy, stanowiąc zarazem rzetelną podstawę do kontynuowania badań w tej tematyce i w obszarach pokrewnych.

## **6. Wniosek końcowy**

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Wiśniewskiej spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017, poz. 1789). Zwracam się zatem do Rady do spraw Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

## **7. Wniosek o wyróżnienie**

Jednocześnie, mając na uwadze walory merytoryczne recenzowanej rozprawy oraz jakość opublikowanych artykułów naukowych towarzyszących rozprawie, wnoszę do Rady do spraw Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia o jej wyróżnienie.

Poznań, 24-10-2022

.....