



Prof. dr hab. inż. Ewa Żymańczyk-Duda,
Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Chemiczny
Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 29
50-370 Wrocław
email: ewa.zymanczyk-duda@pwr.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Igi Jodłowskiej
zatytułowanej**

*Psychrofilna oksydaza monoaminowa Pseudogymnoascus sp. P3 jako
użyteczne narzędzie w biotransformacjach amin”*

Biotransformacje z wykorzystaniem różnych typów biokatalizatorów stanowią ważny obszar biotechnologii i jak można się przekonać, śledząc doniesienia literaturowe (ponad 60 tys. dokumentów, które można znaleźć w bazie SCOPUS) biokataliza zastępuje coraz więcej i coraz bardziej zaawansowanych syntez chemicznych, a konsekwencją tej tendencji jest rosnący udział procesów minimalizujących ingerencję człowieka w środowisko. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa Pani mgr Igi Jodłowskiej wpisuje się w badania nad poszukiwaniem i wykorzystaniem układów biologicznych jako katalizatorów zarówno pojedynczych jak i bardziej złożonych wieloetapowych sekwencji reakcji chemicznych. Trzon pracy stanowi charakterystyka zimnolubnego enzymu pochodzenia eukariotycznego – oksydazy monoaminowej z grzybów z rodzaju *Pseudogymnoascus* sp. oraz zbadanie możliwości wykorzystania tego biokatalizatora w reakcjach biokonwersji amin. Realizację celów dysertacji zapewniało doświadczenie i osiągnięcia naukowców Politechniki Łódzkiej w pracy z organizmami psychrofilnymi oraz dostęp do kolekcji 14 szczepów zimnolubnych grzybów strzępkowych wyizolowanych z prób gleby pochodzącej z okolic Polskiej Stacji Antarktycznej im. Henryka Arctowskiego, zlokalizowanej na Wyspie Króla Jerzego w archipelagu Szetlandy Południowe.



Podjęte przez Panią mgr inż. Jodłowską badania wnoszą duży wkład w rozwój nauk chemicznych, a szczególnie w rozwój wiedzy nad wykorzystywaniem narzędzi biologicznych do poszukiwania nowych, czy też alternatywnych do już istniejących, procedur syntez chemicznych. Oryginalność rozprawy wiąże się z faktem, że Doktorantka podjęła badania w obszarze, w którym nasza wiedza jest ciągle bardzo ograniczona. Zaproponowała i udokumentowała możliwość wykorzystania oksydazy monoaminowej pochodzącej z zimnolubnego organizmu eukariotycznego w reakcjach biokonwersji amin, scharakteryzowała aktywność tego enzymu, określiła jego profil substratowy i wykonała badania z zakresu biologii molekularnej by zdefiniować sekwencje genetyczne kodujące to białko i ostatecznie zdefiniować sekwencję aminokwasową – czyli budowę badanego biokatalizatora. Interesujące i oryginalne wyniki uzyskała także projektując układ enzymatyczny złożony z wymienionej oksydazy oraz dwóch dodatkowych enzymów pochodzących z bardzo odmiennych, pod względem wymagań wzrostowych organizmów, celem przeprowadzenia reakcji kaskadowej, której substratem jest amina, a produktem użyteczny alkohol. Do bardzo interesującej części badań zaliczam też charakterystykę badanych grzybów psychrofilnych, a mianowicie podejście, które nie ogranicza się tylko do wykorzystania ich jako źródła kluczowego dla dysertacji enzymu, ale również ma na celu pełniejszą ocenę ich użyteczności w biotechnologii.

Ogólna ocena dysertacji

Przedstawiony mi do oceny dokument został podzielony na typowe dla prac doktorskich paragrafy: streszczenie, stan wiedzy w obszarze badań, cel i zakres pracy, materiały, wyniki, dyskusja i wnioski. Jest to bardzo spójny opis badań, który pozwala czytającemu prześledzić poszczególne etapy badań, składające się na uzyskane, końcowe wyniki. W tym miejscu podkreślę, że tekst jest napisany w sposób, który bardzo ułatwia odbiór i czyta się całość z dużą przyjemnością, a zarazem wysoki poziom merytoryczny jest również zachowany. Bardzo obszerne wprowadzenie zawiera niezbędne dla zrozumienia całości informacje, które nie ograniczają się tylko do zwięzłej charakterystyki organizmów psychrofilnych, ale przybliżają czytającemu całą złożoność problemu, opisując na podstawie bardzo aktualnej literatury naukowej, zagadnienia np. dotyczące mechanizmów adaptacyjnych do niskich temperatur, mechanizmów reakcji biokatalizatorów w niskich temperaturach i inne. Istotny jest też opis i zestawienie tabelaryczne zastosowań różnych struktur biologicznych (w tym



enzymów) pochodzenia psychrofilnego przedstawiony przez Panią mgr inż. Jodłowską. Wnikliwa analiza stanu aktualnego wiedzy, pozwoliła Autorce precyzyjnie zdefiniować cel i zakres badań, jak i zaplanować sekwencje badań, które pozwoliły ten cel osiągnąć. I tak Doktorantka wykonała badania taksonomiczne i wykazała przynależność 14 antarktycznych grzybów strzępkowych do rodzaju *Pseudogymnoascus* oraz scharakteryzowała ich wymagania wzrostowe, klasyfikując je jako psychrotrofy. W następnym kroku wytypowała producenta oksydazy monoaminowej (grzyb oznaczony w dalszej części pracy jako P3) i wykorzystując podłuża selekcyjne wykazała, że użyteczność tego organizmu może być znacząca, ponieważ jest on zdolny do biosyntezy enzymów o aktywności amylolitycznej, celulolitycznej, ksylanolitycznej, pektynolitycznej, esterolitycznej, lipolitycznej, proteolitycznej i keratynolitycznej, a także, że może rosnąć na podłożach wzbogacanych składnikami odpadowymi. Dalszym etapem były badania mające na celu sekwencjonowanie genomowego DNA badanego organizmu P3, co pozwoliło na zidentyfikowanie 11 662 genów kodujących białka, w tym 5575 genów kodujących białka enzymatyczne, a obszar kodujący oksydoreduktazy obejmował 1272 sekwencje. Pozwoliło to na znalezienie sekwencji dla badanej oksydazy, oznaczonej jako MAO P3. Doktorantka następnie zoptymalizowała warunki hodowli szczepu P3 w kierunku podniesienia efektywności produkcji enzymu, dowodząc, że istotne jest suplementowanie podłoża butyloaminą oraz ryboflawiną. Zaowocowało to podniesieniem aktywności enzymatycznej przy krótszym czasie hodowli producenta. Oczyszczony produkt - psychrofilna oksydaza monoaminowa wykazywała aktywność właściwą rzędu 1,87 U/mg. Charakterystyka profilu aktywności tego białka wobec n-butyloaminy (modelowego substratu) w zależności od temperatury układu, wykazała że jest ona maksymalna temperaturze 30°C i w pH 7,0 oraz, że enzym zachowuje ok. 37% aktywności maksymalnej w 10°C i 25% w temperaturze 0°C. Doktorantka poszukując dalszych dowodów na to, że badane białko to oxygenaza monoaminowa, udowodniła, że aktywność oksydazy MAO P3 jest hamowana przez selektywny inhibitor innej oksydazy monoaminowej (MAO-A0 – klogilinę, a wartość współczynnika IC50 wynosi $1,8 \times 10^{-8}$ M. Dalsza charakterystyka obejmowała określenie masy badanego enzymu, która została ustalona na poziomie na ok. 56 kDa. Autorka wykorzystwała oksydazę MAO P3 jako biokatalizator w reakcjach biokonwersji amin o różnej strukturze i rzędowości, udowadniając jej wysoką specyficzność wobec 6,6-dimetylo-3-azabicyklo[3.1.0]heksanu (KM 2,4 mM) oraz heksametylenoiminy (KM 2,56 mM). Dodatkowo wykazała, że możliwe jest wykorzystanie MAO P3 do syntezy imin czy ketonów, jak np. w reakcji przekształcenia



α -metylobenzyloaminy do 1-fenyletanolu, zachodzącej z wydajnością 51,2%. Powyższe wyniki były podstawą do sprawdzenia dalszych możliwości wykorzystania MAO P3, tym razem w reakcji kaskadowej, której pierwszy etap zależał właśnie od aktywności tego białka. I tak sekwencja reakcji, której substratem jest określona amina, a końcowym produktem odpowiedni alkohol (np. cyklopentanol, 1-fenyletanol czy 2-fenyletanol) została przeprowadzona przez Panią mgr inż. Jodłowską z udziałem enzymów o różnym profilu temperaturowym: oksydazy MAO P3 i aldo-keto reduktaz AKR R3 lub AKR R4. Najefektywniej (wydajność powyżej 50%) była konwertowana α -metylobenzyloamina do 1-fenyletanolu. Podsumowując tę część, z powyższego wynika, że Doktorantka zrealizowała cele badawcze, a osiągnięte wyniki mają dużą wartość nie tylko poznawczą, ale też aplikacyjną.

Ogólne uwagi do dysertacji:

Poszczególne paragrafy dysertacji napisane są, jak już było wspomniane powyżej, w sposób bardzo przejrzysty, a zarazem ich poziom merytoryczny jest wysoki. Ważnym elementem jest część poświęcona dyskusji, napisana jako odrębna składowa pracy, co pozwala na przeanalizowanie otrzymanych wyników, zdefiniowanie korelacji między nimi i przedstawienie ich znaczenia na tle aktualnej wiedzy. Jedyne elementy, których brakuje to indeks skrótów, który zawsze ułatwia poruszanie się w pracy. Inna uwaga ogólna dotyczy problemu chiralności związków chemicznych, o których mowa w rozprawie. Na schematach brakuje oznaczeń chiralnych atomów węgla np. rysunki 41, 42, 45 i inne, ponadto nie są zdefiniowane konfiguracje absolutne otrzymywanych chiralnych produktów, np. Tabela 22, 1-fenyletanol, czy chromatogram – rys 47, str. 115. Więcej na ten temat w dalszej części recenzji.

Uwagi szczegółowe do rozdziałów dysertacji:

Stan wiedzy w obszarze badań:

1. na str. 44 jest wymieniona technika cyt. „przyspieszonej dynamiki molekularnej” – bardzo proszę o informację na czym polega ta metoda badań

Metody:

1. str 56 i 60 – proszę o więcej informacji o tym jak wygląda hodowla **wglębna** na podłożu płynnym – czy jest to specjalny rodzaj hodowli czy też rutynowa hodowla płynna

2. str. 60 – proszę o rozwinięcie skrótu IPTG



Politechnika
Wroclawska

3. str. 60 – par 4.2.1 – czy była wykonywana krzywa standardowa do badań stężenia biomasy?
4. str. 61 – par. 4.2.4.1 – i też dalsze, str. 62, – jakie było stężenie buforu potasowo-fosforanowego?
5. str. 61 – par 4.2.4.1 – jaki jest mechanizm leżący u podstaw testu paskowego?
6. str. 63 – par. 4.2.9 – pytanie jak wyżej – do testu Folina?
7. str. 67 – par 4.3.5 – dodanie rysunku ze strukturą klogiliny wyjaśniloby lepiej mechanizm jej oddziaływania z enzymem
8. str. 71 – par. 4.3.12 – jakie były przesłanki wybrania cyklopentyloaminy jako związku modelowego?

Pytania i uwagi z obszaru badań opisanych w dysertacji:

1. Bardzo proszę o głos w dyskusji na temat tego jaka była enancjoselektywność reakcji zarówno tych katalizowanych jedno-enzymatycznie jak i reakcji kaskadowej (na wybranych przykładach). Jest to bardzo istotne zagadnienie w kontekście badań zaprezentowanych przez Panią mgr inż. Igę Jodłowską.
2. Bardzo proszę o komentarz dotyczący maksymalnych wydajności reakcji, których substraty są chiralne – np. α -metylobenzyloamina, gdzie przy wykorzystaniu tego substratu, efektywność wynosiła powyżej 50%, a jest to proces zachodzący pod kontrolą kinetyczną.

Konkludzja końcowa:

Uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki określone Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z póź. zm), Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora oraz Ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 poz. 261) oraz Przepisami wprowadzającymi ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z póź. zm.) i niniejszym występuję z wnioskiem do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia o dopuszczenie Pani mgr inż. Igi Jodłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ewa
Eymonta
Dobie



Politechnika
Wroclawska

12.09.2023

Prof. dr hab. inż. Ewa Żymańczyk-Duda,
Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Chemiczny
Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 29
50-370 Wrocław
email: ewa.zymanczyk-duda@pwr.edu.pl

**Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Igi Jodłowskiej
zatytułowanej**

*Psychrofilna oksydaza monoaminowa Pseudogymnoascus sp. P3 jako
użyteczne narzędzie w biotransformacjach amin”*

Praca Pani mgr inż. Igi Jodłowskiej zasługuje na wyróżnienie z kilku powodów. Doktorantka poprzez swoje badania znacznie poszerzyła wiedzę naukową o białkach pochodzenia psychrofilnego, w tym wiedzę w obszarze możliwości wykorzystania enzymów pochodzących od psychrofilnych organizmów eukariotycznych. Ponadto, bardzo dobrze opisana w dysertacji metodyka badań wskazuje na przemyślaną strategię, co w konsekwencji owocuje powtarzalnymi, dobrze udokumentowanymi wynikami, które mogą być wykorzystane jako podstawa do dalszych badań. Kolejna przesłanka, która wyróżnia rozprawę, to rozszerzenie badań o dodatkowe, powiązane z sobą i uzasadnione elementy – np. o wielowątkową charakterystykę użyteczności identyfikowanych grzybów psychrofilnych. Jest to obszar poboczny w ocenianym dokumencie, ale wnoszący dużo informacji o stosowanych grzybach i powiązany eksperymentalnie z kluczowymi dla rozprawy doświadczeniami. Na podkreślenie zasługuje też fakt znaczącego dorobku naukowego doktorantki (str. 136 dysertacji), obejmującego prace oryginalne, patenty oraz referaty konferencyjne.

Ewa Żymańczyk-Duda