



Dr hab. Anna Krasowska prof. UWr
Zakład Biotransformacji
Wydział Biotechnologii
ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław, 27.11.2023

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Igi Jodłowskiej

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

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Anety Białkowskiej prof. uczelni
na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej

Rozprawa doktorska pani mgr Igi Jodłowskiej dotyczy badań nad optymalizacją biosyntezy enzymu oksydazy monoaminowej przez grzyb pochodzenia arktycznego *Pseudogymnoascus sp.* a także charakterystyki właściwości tego enzymu.

Autorka pracy skupiła się na badaniach nad oksydazą monoaminową MAO, należąca do grupy enzymów, które są wykorzystywane do otrzymywania związków mających szerokie zastosowanie w syntezie farmaceutyków, agrochemikaliów oraz substancji smakowo-zapachowych. Do tej pory zidentyfikowano oksydazy MAO w wielu organizmach i mikroorganizmach: od ssaczych po bakterie. Najlepiej poznaną oksydazą monoaminową jest MAO-N wyizolowaną z grzyba *Aspergillus niger*, natomiast, do tej pory nie opisano enzymów MAO adaptowanych do aktywności w niskich temperaturach. Enzymy aktywne w niskich temperaturach mają nieprzecenioną wartość i zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Prowadzenie bioprocessów nie wymagających podnoszenia temperatury jest opłacalne ekonomicznie i wpisuje się w strategię budowania innowacyjnej gospodarki. Z powyższych powodów uważam, że temat badawczy podjęty przez panią Igę Jodłowską w swojej pracy doktorskiej jest bardzo ważny.

Ocena poprawności struktury pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 165 stron i ma układ klasyczny. W jej skład wchodziły rozdziały takie jak *Streszczenie, Stan Wiedzy w Obszarze Badań, Cel i Zakres*

badań, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Literatura. Na końcu pracy Autorka zamieściła materiały dodatkowe, w skład których wchodzi widma GC/MS biotransformacji substratów aminowych z wykorzystaniem uzyskanej przez Autorkę oksydazy MAO P3.

Ocena merytoryczna rozprawy

Cele pracy obejmują siedem zagadnień naukowych, takich jak scharakteryzowanie pod względem makroskopowym i molekularnym arktycznych grzybów strzępkowych z kolekcji Uczelni, wytypowanie spośród tej kolekcji producenta oksydazy monoaminowej, optymalizacja hodowli pod względem syntezy MAO, a także charakterystykę biochemiczną i kinetyczną natywnej MAO, wykorzystanie jej w biotransformacjach amin, zaprojektowanie i przeprowadzenie kaskadowych reakcji przekształcenia amin do alkoholi z udziałem MAO P3 i aldo-keto reduktaz. Należy też podkreślić, że w celu identyfikacji genu kodującego MAO P3 Autorka pracy przeanalizowała genom *Pseudogymnoascus* sp. P3, a tym samym ostatecznie udowodniła odkrycie nowej oksydazy monoaminowej.

W rozdziale **Stan Wiedzy w Obszarze Badań** opisane zostały zagadnienia niezbędne do zrozumienia założeń rozprawy doktorskiej i uzasadniające logiczność wykonywanych eksperymentów. W przystępny sposób opisano dotychczasową wiedzę na temat podziału i występowania organizmów ekstremofilnych, a zwłaszcza psychrofilnych na Ziemi i ich mechanizmów przystosowawczych do życia w niskich temperaturach. Istotną wiedzę dla celu badań w recenzowanej pracy doktorskiej zawiera obszerny rozdział na temat przystosowań strukturalnych psychrozymów, które umożliwiają ich aktywność w niskich temperaturach. Drugą część Wstępu stanowią rozdziały traktujące o potencjale biotechnologicznym zimnolubnych mikroorganizmów oraz psychrozymów, w tym oksydaz monoaminowych.

W rozdziale **Materiały** są wymienione: kolekcja grzybów antarktycznych, szczepy *Escherichia coli* i stosowane odczynniki, natomiast **Metody** zostały podzielone na cztery obszerne podrozdziały, w tym oddzielnie metody hodowlane, analityczne i badawcze.

Wyniki doświadczeń rozpoczynają się oznaczeniem przynależności taksonomicznej 14 szczepów grzybów antarktycznych z kolekcji uczelnianej. Oznaczono je jako przynależące do rodzaju *Pseudogymnoascus*. Określono też w tych wstępnych badaniach temperatury, w których testowane grzyby rosną, a także dla większości grzybów wybrano jako optymalną temperaturę 20 st. C. Następnie, w poszukiwaniu najbardziej wydajnego producenta oksydazy monoaminowej wykonano szereg testów biochemicznych z udziałem komórek grzybów, jak i ekstraktów bezkomórkowych. Testy te wskazały na szczep oznaczony symbolem P3 jako potencjalnie biosyntezujący najbardziej wydajną MAO. Na tym etapie badań zdecydowano się na zsekwencjonowanie genomu szczepu P3 i w analizie bioinformatycznej wyłoniono

najbardziej liczne sekwencje genów kodujących białka o potencjalnych aktywnościach hydrolaz i transferaz. Zsekwencjonowany genom został wykorzystany ponownie w momencie kiedy została wyizolowana i oczyszczona oksydaza monoaminowa. W tym etapie badań wytypowano charakterystyczne dla MAO domeny z bazy CDD, InerPro i Pfam, i znaleziono trzy białka z domenami Rossmanna, charakterystycznymi dla MAO, a po oznaczeniu mas cząsteczkowych wytypowano białko g3222 jako najbardziej odpowiadające wyizolowanej z *Pseudogymnoascus* sp. P3 oksydazie monoaminowej.

Po ustaleniu optymalnych warunków hodowli dla biosyntezy oksydazy monoaminowej, Doktorantka przeprowadziła oczyszczanie tego enzymu i uzyskała czysty jego preparat, aczkolwiek pomiar i różnice w aktywności enzymatycznej w ekstrakcie bezkomórkowym i w materiale uzyskanym po procesie oczyszczenia wskazują na duże straty. Stąd nasunęło mi się pytanie natury także ekonomicznej: czy w trakcie produkcji różnych substratów dla przemysłu bardziej ekonomiczne nie okazałoby się zastosowanie ekstraktu bezkomórkowego niż czystego enzymu? Za zastosowaniem ekstraktu przemawiałaby też niższa temperatura (20 st. C) jego aktywności niż oczyszczonego enzymu (30 st. C).

Po oznaczeniu optymalnych warunków (temperatury, pH, stężenia substratu) dla aktywności wyizolowanej oksydazy monoaminowej, Doktorantka dokonała określenia specyficzności substratowej MAO P3 i wykazała, że enzym ten jest zdolny do katalizowania reakcji deaminacji pierwszo- i drugorzędowych amin, lecz nie aminy trzeciorzędowej, jaką jest 1,1-difenylometyloamina. Jestem ciekawa czy Doktorantka przetestowała również inne aminy trzeciorzędowe?

W końcowym etapie pracy doktorskiej zaplanowano i przeprowadzono innowacyjne doświadczenia reakcji kaskadowych z udziałem MAO P3 oraz aldo-keto reduktaz, w wyniku których z substratu jakim była cyklopentyloamina uzyskano cyklopentanol, a z amin aromatycznych fenyletanole. Wszystkie uzyskane produkty znajdują szerokie zastosowanie, a zapotrzebowanie na nie stale rośnie, tak więc zaproponowane i przetestowane reakcje kaskadowe są jak najbardziej uzasadnione, zwłaszcza, że są metodami przyjaznymi środowisku.

W podsumowaniu chciałabym jeszcze uzyskać odpowiedź na pytanie jakie są obecnie stosowane w produkcji na skalę przemysłową oksydazy monoaminowe (wytwarzane zarówno przez grzyby, jak i bakterie) i jaka jest ich wydajność w przekształcaniu substratów?

W **Dyskusji** Autorka umiejętnie zestawia uzyskane wyniki z rezultatami przedstawionymi w literaturze naukowej. Rozdział ten jest podsumowaniem całości prac

doświadczalnych i Autorka odwołuje się do doświadczeń opisanych w rozdziale Wyniki, uzupełnia je o analizę i komentarze.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Rozprawa została napisana poprawnym językiem polskim i czyta się ją z dużą przyjemnością.

Podsumowanie recenzji

Rozprawa doktorska pani mgr Igi Jodłowskiej pt. „*Psychrofilna oksydaza monoaminowa z Pseudogymnoascus sp. P3 jako użyteczne narzędzie w biotransformacjach amin*” stanowi oryginalne rozwiązanie problemów naukowych. Doświadczenia zostały zaplanowane bardzo metodycznie, Doktorantka w rozprawie wykazała się umiejętnością interpretacji i wyciągania wniosków z uzyskanych rezultatów. Wyniki opisane w pracy doktorskiej stanowią całość potrzebną do rozwiązania naukowego zagadnienia w danym temacie, zostały przeprowadzone od badań ściśle mikrobiologicznych poprzez bioinformatyczne aż po enzymologiczne. Rezultaty otrzymane przez Doktorantkę otwierają jak najbardziej dalsze perspektywy badawcze i aplikacyjne, a przedłożona praca doktorska potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedstawione przeze mnie uwagi i wątpliwości mają charakter polemiczny, wynikają również z mojego zaciekawienia i nie umniejszają wartości naukowej rozprawy. Moja recenzja jest jak najbardziej pozytywna.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim (Dz.U. z dnia 30 stycznia 2018 r. Poz. 261) stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę także do Rady do spraw Stopni Naukowych w dyscyplinach Nauki Chemiczne, Inżynieria Chemiczna, Technologia Żywności i Żywnienia Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie pani mgr Igi Jodłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na zaprezentowany wysoki poziom, kompletność doświadczeń, szerokie ujęcie tematu, zwięzłe, jasne przedstawienie wyników, nie budzące wątpliwości podsumowanie i wnioski pracy wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr Igi Jodłowskiej.



Signed by /
Podpisano przez:

Anna Janina
Krasowska
Uniwersytet
Wrocławski

Date / Data:
2023-11-07 08:38

dr hab. Anna Krasowska prof. UWr



Dr hab. Anna Krasowska prof. UWr
Zakład Biotransformacji
Wydział Biotechnologii
ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław, 27.11.2023

**Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani Igi Jodłowskiej
zatytułowanej**

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

Wnioskuje o wyróżnienie pracy doktorskiej pani Igi Jodłowskiej ze względu na szerokie ujęcie tematu, jasne przedstawienie wyników, nie budzące wątpliwości podsumowanie i wnioski oraz dobry dorobek publikacyjny w czasopismach międzynarodowych z wysokim współczynnikiem oddziaływania (IF). Autorka pracy wykonała szeroki wachlarz doświadczeń od charakterystyki kolekcji grzybów psychrofilnych i wyłonienia najlepszego producenta oksydazy monoaminowej przez izolację i oczyszczenie tego enzymu, aż po przebadanie jego specyficzności substratowej i przeprowadzenie reakcji kaskadowych z innymi enzymami. Praca pani Jodłowskiej niewątpliwie wnosi rozwiązania problemów naukowych oraz nową wiedzę.



Signed by /
Podpisano przez:

Anna Janina
Krasowska
Uniwersytet
Wrocławski

Date / Data:
2023-11-06 18:34

dr hab. Anna Krasowska prof. UWr