



Lublin, 25 listopada 2019 r.

## OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Jędrzejewskiego**  
**pt. „Biotransformacja  $\beta$ -pinenu przy użyciu psychrotroficznych grzybów nitkowatych w**  
**warunkach wybranych stresów abiotycznych”**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska **mgr Krzysztofa Jędrzejewskiego** została wykonana w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS, pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Jana Fiedurka. Zespół naukowy Profesora J. Fiedurka od wielu lat z sukcesami realizuje prace badawcze z zakresu biotransformacji hydrofobowych terpenów, z wykorzystaniem w tym celu szczepów grzybowych hodowanych w odpowiednio dobranych warunkach stresowych. Obecnie wymieniona tematyka badawcza wzbudza duże zainteresowanie ze strony przemysłu farmaceutycznego w obszarze wykorzystania produktów roślinnych działających nie tylko biostatycznie i biobójczo, ale również obniżających wirulencję i mających zdolność do modulowania oporności bakterii. Ponadto poszukuje się olejków eterycznych wykazujących działanie synergistyczne z wykorzystywanymi w farmakoterapii antybiotykami. Takie zainteresowanie spowodowane jest szybko rosnącą ilością drobnoustrojów wykazujących oporność wobec obecnie stosowanych leków. Terpenoidy zwykle pozyskuje się na wiele różnych sposobów, poczynając od zbioru roślin, rozdrabniania i suszenia, poprzez ich destylację z wykorzystaniem pary wodnej, po ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi z rozdrobnionych elementów roślin. Jednak uzyskiwanie najbardziej wartościowych terpenów tymi metodami jest mało opłacalne, gdyż ich stężenie w roślinach jest zazwyczaj niewielkie. Dlatego też mikrobiologiczna biotransformacja związków terpenowych może stanowić alternatywę wobec drogiej technologii pozyskiwania wymienionych związków z materiału



roślinnego. Z zainteresowaniem zapoznałam się więc z obecną dysertacją, w szczególności pod kątem potencjału medycznego produktów mikrobiologicznej biotransformacji związków terpenowych.

Przesłana do oceny dysertacja doktorska zawiera część wstępną wprowadzającą w temat i opierającą się na aktualnym piśmiennictwie z wymienionego powyżej obszaru badawczego. Dalej zamieszczone zostały opisy wykorzystanych Materiałów i Metod badawczych i analitycznych oraz omówienie osiągniętych wyników i ich dyskusja. Całość dysertacji kończy się wnioskami i podsumowaniem w języku polskim i angielskim oraz spisem rysunków i tabel (49 rycin i 15 tabel). Podana Bibliografia obejmuje 299 pozycji oraz 4 źródła internetowe.

Celem pracy doktorskiej było zwiększenie wydajności procesu biotransformacji  $\beta$ -pinenu przy użyciu wyselekcjonowanego szczepu psychrotroficznego grzyba nitkowatego *Chrysosporium pannorum* A-1. Aby to osiągnąć Doktorant dokonał selekcji szczepów grzybów psychrotroficznych aktywnych w zakresie biotransformacji monoterpenu i w efekcie tego został wybrany szczep *C. pannorum* A-1, dla którego wykonana została optymalizacja warunków hodowli i procesu biotransformacji  $\beta$ -pinenu przy pomocy wymienionego szczepu. Kolejny etap dotyczył indukcji i selekcji mutantów *C. pannorum* A-1 aktywnych w biotransformacji  $\beta$ -pinenu oraz określenia wpływu wybranych stresów abiotycznych (fizycznych) na proces biotransformacji wymienionego terpeny. Doktorant, na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazał, że czynniki stresowe: stres osmotyczny (0,8 M NaCl), oksydacyjny, pH, skład pożywki mogą zwiększać wydajność procesu biotransformacji  $\beta$ -pinenu od 1,34- do 1,75-krotnie. Zastosowane metody indukcji poprzez stres abiotyczny oraz wykorzystanie niekonwencjonalnego sposobu natleniania podłoża w najbardziej optymalnych warunkach, pozwoliły Doktorantowi uzyskać znaczący przyrost wydajności biotransformacji testowanego terpeny (od 1,35 do 2,6-krotny) w stosunku do kontroli. Stosując klasyczne metody mutagenyzy (działanie na konidia promieniami UV w różnym czasie oraz 0,01% N-metylo-N'-nitro-N-nitroguanidyną w różnym przedziałach czasowych) Doktorant otrzymał 10 mutantów, które zostały poddane kolejnej selekcji na podstawie ich ogólnej aktywności metabolicznej, poprzez pomiar szybkości zużycia tlenu przez grzybnię, a potem dokonał adaptacji mutantów na pożywkach hodowlanych zawierających  $\beta$ -pinen. Najaktywniejsze mutanty wykorzystał do prowadzenia



procesu biotransformacji. Największą wydajność biotransformacji  $\beta$ -pinenu uzyskał przy użyciu adaptowanego mutantu oznaczonego *C. pannorum* 2-6, który wykazał blisko 4-krotne zwiększenie wydajności w porównaniu z kontrolą (szczepem rodzicielskim).

Doktorant na podstawie przeprowadzonych badań wykazał, że grzyb *C. pannorum* A-1 jest wydajnym biokatalizatorem konwersji  $\beta$ -pinenu do wartościowego produktu – *trans*-pinokarweolu, bowiem najwyższe stężenie tego głównego produktu biotransformacji wynosiło ok. 600 mg/litr pożywki. Rezultaty pracy badawczej Doktoranta wskazują, że klasyczne metody mutagenyzy i adaptacji drobnoustrojów do warunków stresu abiotycznego oraz opracowana metodyka hodowli mutantu *C. pannorum* mogą z powodzeniem być stosowane do zwiększenia aktywności biotransformacji  $\beta$ -pinenu przez wymieniony szczep.

**W ocenie ogólnej pracy** niewątpliwie można podkreślić, że praca jest koncepcyjnie interesująca i wykonawczo dobra. Przedstawiony do oceny zestaw badań prezentuje dobry poziom naukowy, a uzyskane rezultaty są interesujące aplikacyjnie. Jest to klasyczna praca biotechnologiczna łącząca badania z zakresu biochemii mikroorganizmów, bioinżynierii procesowej i genetyki z eksperymentalną oceną hodowli bioreaktorowych grzybów nitkowatych. Warto zaznaczyć, że Doktorant w czasie realizowania pracy doktorskiej z pewnością natrafił na wiele trudności, gdyż biotransformacja hydrofobowych terpenów jest zwykle ograniczona ich toksycznością, lotnością, słabą rozpuszczalnością w wodzie i niską biodostępnością dla komórek biokatalizatora. Ponadto aktywność metaboliczna mikroorganizmów jest silnie zależna od parametrów środowiskowych i wpływu warunków stresujących. Dlatego też, wymienione opracowanie, stanowi ważny element współczesnej inżynierii bioprocessowej. Elementem nowości ocenianej pracy jest wykorzystanie p o raz pierwszy psychrotroficznego szczepu *Chrysosporium pannorum* A-1 w procesie w transformacji  $\beta$ -pinenu. Ponadto, ważnym osiągnięciem badawczym Doktoranta jest przedstawienie możliwości skomponowania optymalnego pod względem biologicznym mutantu o dużych zdolnościach do biotransformacji  $\beta$ -pinenu w kierunku *trans*-pinokarweolu. Jest to tym bardziej istotne, gdyż drobnoustroje wyizolowane z natury wytwarzają pożądane metabolity zwykle w niewielkich ilościach, więc stosowanie ich na skalę przemysłową jest nieopłacalne.



Warto również podkreślić zaadoptowanie przez Doktoranta systemu niekonwencjonalnego natleniania pożywki w hodowli bioreaktorowej szczepu, co umożliwiło zwiększenie wydajności biotransformacji  $\beta$ -pinenu (2,6-krotnie w buforze i 1,25-krotnie w pożywce podstawowej) w porównaniu z układem kontrolnym natlenianym metodą klasyczną. Niekonwencjonalna metoda natleniania zastosowana w pracy pozwoliła na pokonanie problemu lotności zarówno substratu jak i produktu powstałego w procesie biotransformacji, co jest istotne w skali hodowli bioreaktorowej. Korzyści wpływające z zastosowanego sposobu dotyczą między innymi z zabezpieczenia sterylności wskutek obecności nadtlenu wodoru, umożliwienia wykonania ścisłego bilansu tlenowego, unikania pienienia podłoża hodowlanego i podniesienie produktywności układu w stosunku do metod klasycznych.

Do obowiązku recenzenta należy również podanie pewnych **uwag** dotyczących dysertacji i w kontekście powyższego w trakcie czytania dysertacji nasunęły mi się drobne uwagi. Pytanie moje związane jest z przypuszczalnymi trudnościami w badaniach dotyczących hodowli wgłębnych, które jak mniemam, mogły wynikać z natury wzrostu grzybnii *Chrysosporium pannorum* A-1 w postaci pelletów i jak rozwiązywano ten problem.

Mam pewien niedosyt po zapoznaniu się z częścią pracy pt. „Wnioski”. Ta końcowa część dysertacji obejmująca aż 10 punktów, jest wg. mnie raczej szerokim podsumowaniem wyników, a właściwe wnioski nie zostały jednak przez Doktoranta sformułowane. Trochę rozumiem problemy Doktoranta z utworzeniem takich wniosków. Wynikają one z pewnością z podjęcia się przetestowania dużej liczby szczepów i kilku rodzajów czynników stresowych, czynników mutagennych, związków ochronnych itp.. Jednak, wg mnie, Autor dysertacji powinien na po analizie rezultatów pokusić się raczej o sformułowanie wniosków ogólnych, a nie umieszczać szczegółowego streszczenia wyników, które i tak się znalazło w kolejnej części pracy pt. „Streszczenie w języku polskim i j. angielskim”.

Ponadto, używałabym w tytule rozdziału 6 zamiast słowa „Literatura” (pozostawmy ten termin dla literatury pięknej) słowo „Piśmiennictwo”, które jest bardziej adekwatne dla prac eksperymentalnych.

Wymienione przeze mnie uwagi nie zmieniają mojej dobrej opinii o pracy doktorskiej mgr Krzysztofa Jędrzejewskiego.



**Podsumowując:** stwierdzam, że Pan mgr Krzysztof Jędrzejewski zrealizował postawione cele badawcze, a praca doktorska ma wartości poznawcze i praktyczne. Poddane ocenie rezultaty zawierają istotne elementy nowości naukowej i wpisują się w aktualny nurt badań dotyczących wykorzystania mikrobiologicznej biotransformacji terpenoidów w kierunku uzyskiwania produktów o potencjale aplikacyjnym.

Z przekonaniem więc stwierdzam, że **Rozprawa doktorska Pana mgr Krzysztofa Jędrzejewskiego spełnia, według mojej opinii, wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 r (dz. U. Nr. 65, poz. 595 z 16 kwietnia 2003 r z późniejszymi zmianami) „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i w związku z tym wnioskuję o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

