

Prof. dr hab. Zdzisław Targoński  
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i  
Żywienia Człowieka  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
20144 Lublin, ul Skromna 8

Lublin, 27.11.19

### Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Jędrzejewskiego pt.  
„Biotransformacja  $\beta$ -pinenu przy użyciu psychrotroficznych grzybów  
nitkowatych w warunkach wybranych stresów abiotycznych ” wykonanej w  
Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej UMCS w Lublinie pod  
kierunkiem prof. dr hab. Jana Fiedurka,

Biotransformacja określana jest jako enzymatyczne przekształcenie związków chemicznych, często ksenobiotyków, do strukturalnie podobnych produktów, które na ogół nie wykazują żadnej funkcji metabolicznej. Do tego celu wykorzystuje się enzymy, drobnoustroje czy katalizę biomimetyczną. W ocenianej rozprawie doktorskiej substratem poddawanym transformacji był  $\beta$ -pinen, zmostkowany bicykliczny monoterpen, otrzymywany z terpentyny, którą z kolei otrzymuje się z żywicy drzew iglastych, głównie sosny, przez destylację z parą wodną lub ekstrakcją benzyną karpiny sosnowej. Głównymi składnikami terpentyny są dwupierścieniowe monoterpeny:  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen i  $\Delta^3$ -karen o wzorze  $C_{10}H_{16}$ .  $\beta$ -pinen wykazuje właściwości antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne, zaś znajduje zastosowanie w przemyśle piekarniczym, cukierniczym, mleczarskim jako aromat. Jednocześnie, jest stosunkowo tanim substratem do syntezy substancji zapachowych identycznych z naturalnymi monoterpenoidami. W wyniku biotransformacji  $\beta$ -pinenu przez drobnoustroje otrzymuje się różne związki chemiczne będące jego pochodnymi. Jednym z nich jest (-)-trans-pinokarweol, będący składnikiem olejku eterycznego pozyskiwanego z dębu jedwabnego, a także innych roślin, w tym eukaliptusa, który jest stosowany w aromaterapii, a także jako atraktant niektórych owadów.

Celem ocenianej rozprawy doktorskiej było uzyskanie jak najwyższej wydajności biotransformacji  $\beta$ -pinenu poprzez selekcję szczepów grzybów psychrotroficznych, a następnie zwiększenie wydajności procesu biotransformacji  $\beta$ -pinenu przy użyciu wyselekcjonowanego szczepu grzyba nitkowatego *Chrysosporium pannorum* A-1. W tym celu optymalizowano warunki hodowli i biotransformacji, określano wpływ czynników stresowych (pH, osmotyczny, oksydacyjny), dokonano indukcji oraz selekcji mutantów grzyba *C. pannorum* A-1, a także oceniono użyteczność niekonwencjonalnej metody natleniania hodowli. Stwierdzam, że podstawowe cele pracy zostały w pełni zrealizowane, a wyniki wydajności procesu biotransformacji  $\beta$ -pinenu są porównywalne do wyników otrzymanych przez innych badaczy, prezentujących prace z tego zakresu w czasopismach międzynarodowych.

Rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami. W pierwszej części prac Autor przedstawił przegląd piśmiennictwa. Na wstępie dokonał charakterystyki terpenów omawiając ich biosyntezę, budowę i klasyfikację, właściwości oraz rolę biologiczną monoterenów jak i ich wykorzystanie w praktyce. W kolejnym rozdziale zdefiniował proces biotransformacji i stosowane w nim biokatalizatory oraz wskazał główne zastosowania tego procesu w przemyśle, a także scharakteryzował  $\beta$ -pinen jako substrat do biotransformacji. W dwóch kolejnych podrozdziałach krótko scharakteryzował metody doskonalenia szczepów mikroorganizmów przemysłowych, a następnie omówił oddziaływanie warunków środowiskowych na mikroorganizmy, w tym wpływ stresów abiotycznych na mikroorganizmy. Przegląd piśmiennictwa został oparty o aktualne i ważne publikacje dotyczące tematyki zawartej w eksperymentalnej części pracy. Zakres przeglądu jak i dobór treści poszczególnych podrozdziałów jest merytorycznie uzasadniony i dobrze wprowadza czytelnika w problematykę badawczą rozprawy. Ta część pracy jak i pozostałe części napisane są w sposób przejrzysty i poprawny pod względem stylistycznym i językowym.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorant scharakteryzował użyte w pracy materiały oraz w sposób poglądowy przedstawił metodykę wykonania poszczególnych eksperymentów. Dobór metod badawczych był prawidłowy,. Zwraca uwagę pracowitość pracy biorąc na przykład pod uwagę selekcję mutantów na podstawie ich ogólnej aktywności metabolicznej, czy badania

wpływu warunków stresowych na proces biotransformacji. Dobór metod analitycznych był na ogół prawidłowy, a opisy poszczególnych eksperymentów pozwalają na ich odtworzenie w innych laboratoriach.

W rozdziale zatytułowanym „Omówienie wyników i dyskusja” Autor w siedmiu podrozdziałach w sposób szczegółowy zaprezentował wyniki badań, omówił je, a następnie poddał dyskusji na tle wyników badań prezentowanych przez innych badaczy. Układ i sekwencja następujących po sobie eksperymentów jest logiczna i dobrze przemyślana. W pierwszym podrozdziale Autor opisał selekcję szczepów na podstawie ich zdolności do wzrostu na podłożu minimalnym z  $\alpha$ -pinenem i biotransformacji tego związku, a także kilku innych terpenów. Z badań przesiewowych do dalszych prac wybrano szczep grzyba *Chrysosporium pannorum* A-1, który na tle innych szczepów z najwyższą wydajnością transformował dwa w/w terpeny. Ponadto był zdolny do transformacji innych badanych terpenów, chociaż nie wszystkich. Wykazano, że głównymi produktami biotransformacji  $\beta$ -pinenu były: *trans*-pinokarweol oraz nieznaną związek o czasie retencji ok. 20,1 min, które stanowiły ok. 80% wszystkich produktów terpenoidowych. Świadczy to o dużej specyficzności biotransformacji  $\beta$ -pinenu przy użyciu *C. pannorum* A-1.

W kolejnym podrozdziale opisano prace nad optymalizacją warunków hodowli wyizolowanego szczepu i procesem biotransformacji. Najlepsze wydajności biotransformacji  $\beta$ -pinenu uzyskano przy użyciu grzybni pochodzącej z 48 godzinnej hodowli gdy jego stężenie wynosiło 1%. Ponadto, wykazano celowość sekwencyjnego dodawania  $\beta$ -pinenu oraz etanolu jako kosolwenta i dodatkowego źródła węgla.

W dalszej części pracy badano wpływ pulsacyjnego pola elektrycznego na ogólną aktywność metaboliczną grzybni *Chrysosporium pannorum* A-1 oraz biotransformację  $\beta$ -pinenu po stymulacji grzybni PPE. Wykazano niewielki wpływ działania PPE na grzybnię *C. pannorum* A-1 na przebieg procesu biotransformacji badanego substratu. Natomiast dużo więcej pracy poświęcono ocenie wybranych stresów abiotycznych i ich wpływie na proces biotransformacji. Wykazano, że w warunkach stresu osmotycznego (0,8 M NaCl) grzybnia *C. pannorum* A-1 charakteryzowała się zwiększoną (1,75-krotnie) wydajnością procesu biotransformacji  $\beta$ -pinenu w stosunku do kontroli. Również stwarzanie innych warunków stresowych opartych o takie czynniki jak: pH, stres oksydacyjny [*t*BOOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i menadion] czy zmiany składu pożywki w hodowli i biotransformacji mogą zwiększyć wydajność

tego procesu od 1,34- do 1,5-krotnie. Warto zwrócić uwagę na pozytywny wpływ jonów cynku i magnezu na wydajność transformacji  $\beta$ -pinenu, które nie należą do antyoksydantów jak sugeruje Autor, a także dodatkowo pozytywny wpływ obecności wodoronad tlenku tert-butyłu (tBOOH) wywołującego stres oksydacyjny. W tym układzie uzyskano najwyższą wydajność biotransformacji wynoszącą odpowiednio 173 i 164 mg/g s.m.

Niewątpliwie interesującym rozwiązaniem było wykorzystanie nadtlenu wodoru do natleniania podłoża hodowlanego w procesie biotransformacji  $\beta$ -pinenu przez *Chrysosporium pannorum* A-1. Wykazano, że badana grzybnia ma większą (2,6-krotnie w buforze i 1,25-krotnie w pożywce podstawowej) wydajność biotransformacji w porównaniu z układem kontrolnym natlenianym metodą klasyczną. Zwraca jednak uwagę stosunkowo niski poziom produktów biotransformacji do których porównywano wyniki niekonwencjonalnego natleniania.

W ocenie Recenzenta najbardziej wartościowym efektem pracy doktorskiej było otrzymanie mutantu *Chrysosporium pannorum* A-1, 2-6 w wyniku mutagenyzy i adaptacji szczepu wyjściowego. Mutant ten pozwolił na blisko 4-krotny wzrost wydajności procesu biotransformacji  $\beta$ -pinenu w kierunku otrzymywania *trans*-pinokarweolu w stosunku do kontroli. Szkoda, że na podstawie wcześniejszych pozytywnych wyników optymalizacji biotransformacji  $\beta$ -pinenu nie podjęto prób dalszego zwiększenia wydajności biotransformacji, tym razem wykorzystując mutant *Chrysosporium pannorum* A-1, 2-6. Prace te w mojej ocenie byłyby lepszym zwieńczeniem pracy doktorskiej, niż badanie wpływu inkubacji grzybni ze szczepem rodzimym i jego dwoma mutantami z nadtlaniem wodoru i oznaczaniem aktywności katalazy wewnątrz i zewnątrzkomórkowej.

W końcowej części pracy Doktorant dokonał krótkiego podsumowania prac eksperymentalnych w formie opisowej, a następnie najważniejsze osiągnięcia pracy zawarł w 10 wnioskach. Wskazują one iż w wyniku realizacji badań została pogłębiona wiedza w zakresie biotransformacji  $\beta$ -pinenu do *trans*-pinokarweolu, ponadto otrzymano wartościowy mutant *Chrysosporium pannorum* A-1, 2-6 do biotransformacji  $\beta$ -pinenu, a część wyników badań ma znamiona oryginalności w skali międzynarodowej i może mieć istotne znaczenie przy próbach wdrażania technologii pozyskiwania produktów biotransformacji  $\beta$ -pinenu do praktyki przemysłowej.

Obowiązkiem recenzenta jest zwrócenie uwagi na pewne uchybienia w ocenianej rozprawie, chociaż w tym przypadku ograniczają się one do kilku uwag.

I tak;

str. 2 - w spisie treści brak podrozdziałów 1.3.1.1, 1.3.1.2., 1.3.1.3, 1.3.1.4.

str. 33 - skrót myślowy; szczepy *Klebsiella*, winno być szczepy z rodzaju *Klebsiella*

str. 58 - jak otrzymano gradient stężenia  $\beta$ -pinenu, gdy  $\beta$ -pinen jest bardzo słabo rozpuszczany w wodzie, a jego wyjściowe stężenie wynosić miało 1% - wydaje się że musiała być emulsja

str 72 - podane wzoru dotyczą nie ilości tlenu, a jego procentowego obniżenia stężenia w podłożu w stosunku do jego nasycenia początkowego

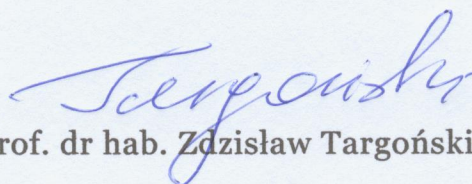
str. 77 - dlaczego do badań przesiewowych użyto  $\alpha$ -pinenu, a nie  $\beta$ -pinenu i dlaczego podłoże agarowe zawierało tylko  $\beta$ -pinen, przy braku innych niezbędnych składników do wzrostu grzybni

str. różne - dlaczego w pracy nie pokazano kilku chromatografów pochodzących z rozdziałów związków powstałych po najbardziej charakterystycznych biotransformacjach. Ponadto bardziej celowe wydaje się wykorzystanie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas do identyfikacji związków po biotransformacji, niż zastosowanie GC-FID. Zwraca uwagę brak danych dotyczących stopnia transformacji  $\beta$ -pinenu na różnych etapach biotransformacji.

W podsumowaniu w opinii Recenzenta przedstawiona do oceny praca jest interesującym, wartościowym studium dotyczącym biotransformacji  $\beta$ -pinenu przez *Chrysosporium pannorum* A-1 i jego mutanty, zawierającym zarówno aspekty poznawcze jak i aplikacyjne. Na podkreślenie zasługuje dojrzałość badawcza Doktoranta, a w szczególności Jego dobre i wszechstronne przygotowanie warsztatowe, poparte bardzo dobrym rozpoznaniem literaturowym. W pracy zamieszczono dobrze udokumentowany i opisany materiał faktograficzny. Przegląd piśmiennictwa i dyskusja wyników badań zostały oparte na 299 publikacjach, które ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych. Zwraca uwagę poprawność formułowania myśli, bardzo dobra stylistyka językowa oraz poprawna grafika pracy.

Biorąc pod uwagę wartość aplikacyjną pracy, zawarte w niej elementy nowości naukowej, bardzo dobre przygotowanie warsztatowe Doktoranta stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Jędrzejewskiego spełnia kryteria zgodnie z Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o

stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami ( Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) w związku z art.179 ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę-Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. pop. 1669), stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne i wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony.



Prof. dr hab. Zdzisław Targoński