

Dziekanat MWB UG i GUMed  
Wpłynęło dnia ..... 10.11.2015 .....  
L.dz. nr ..... 42/2015 pue .....

Prof. dr hab. Zbigniew Tukaj  
Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin  
Uniwersytet Gdański  
Gdańsk, Wita Stwosza 59

Gdańsk 9 listopada 2015.

**Ocena rozprawy doktorskiej Pani Magdaleny Miklaszewskiej pt. „Specyficzność substratowa wybranych reduktaz kwasów tłuszczowych i syntez wosków”.**

Z globalnej produkcji olejów roślinnych, szacowanej w 2010 roku na 137 milionów ton, na potrzeby żywieniowe człowieka wykorzystywane jest 74%, jako pasza dla zwierząt 6%, a 20% znajduje zastosowania przemysłowe. W przemyśle niespożywczym oleje używane są przede wszystkim do produkcji biopaliw (Metzger 2009), w znacznie mniejszym stopniu do produkcji wosków. Woski znajdują coraz szersze zastosowania w przemyśle chemicznym, kosmetycznym i farmaceutycznym, ale ich przemysłowa produkcja jest nadal kosztowna i uciążliwa dla środowiska. W związku z tym istnieje zapotrzebowanie na opracowanie taniej i wydajnej metody wytwarzania wosków w oparciu o surowce odnawialne. Istotnym elementem projektowania procesu biotechnologicznego produkcji wosków powinno być odpowiednie wzajemne dopasowanie specyficzności substratowej wyselekcjonowanych reduktaz kwasów tłuszczowych i syntez wosków – dwóch kluczowych enzymów uczestniczących w ich biosyntezie. Jedną z trudności w badaniach tych enzymów jest ich lokalizacja w obrębie błon retikulum endoplazmatycznego. W celu obejścia tej trudności stosuje się różnego rodzaju systemy ekspresyjne, które umożliwiają badanie aktywności w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* z wykorzystaniem tylko częściowo oczyszczonego białka lub frakcji mikrosomalnej zawierającej badany enzym, i takie właśnie podejście zastosowano w badaniach, których wyniki składają się na niniejszą rozprawę.

Oceniana rozprawa powstała w Zespole kierowanym przez Pana Profesora Antoniego Banasia w trakcie realizacji międzynarodowego projektu ICON finansowanego ze środków 7. Programu Ramowego Unii Europejskiej. Była ponadto realizowana w ramach projektu „Kształcimy najlepszych –kompleksowy program rozwoju doktorantów, młodych doktorów i akademickiej kadry dydaktycznej UG” oraz w ramach IV edycji projektu systemowego „InnoDoktorant –stypendia dla doktorantów”, oba projekty współfinansowane przez UE z Funduszu Społecznego, w Ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzi. Widać tu nie tylko aktywność, ale przede wszystkim skuteczność Doktorantki w uzyskiwaniu środków finansowych na badania.

Do badań specyficzności substratowej reduktaz kwasów tłuszczowych i syntez wosków Doktorantka wykorzystwała drożdże piekarnicze, szczep dziki BY 4742 oraz szczep H1246 z wyłączonymi 4 genami estrów steroli oraz triacylogliceroli, co umożliwiło porównanie specyficzności substratowej reduktaz kwasów tłuszczowych w war. *in vivo* w zależności od dostępności poszczególnych acylo-CoA, izolowanych z *Mus musculus*, *Simmondsia chinensis* i *Arabidopsis thaliana*. Doktorantka dokonała rozbudowanej charakterystyki specyficzności substratowej badanych przez siebie enzymów stwierdzając, że w odróżnieniu od reduktaz kwasów tłuszczowych, aktywność syntez wosków we frakcji mikrosomalnej była zdecydowanie wyższa.

Rozprawa liczy 175 ponumerowanych stron i ma zasadniczo typową strukturę dla tego typu opracowań. Na początku dzieła zamieszczono 2 stronicowe streszczenie, następne 4

strony zajmuje wykaz stosowanych skrótów i terminów, w tym bardzo przydatne w czytaniu rozprawy zestawienie skrótowego, zwyczajowego i rekomendowanego przez IUPAC nazewnictwa kwasów tłuszczowych i alkoholi oraz sposobu tworzenia nazw wosków, tę sekwencję trzech krótkich rozdziałów kończy 1-stronicowe wprowadzenie, odnoszące się między innymi do kontrowersji związanych ze stosowaniem w polskiej literaturze naukowej terminu „woski”.

Rozdział 4 to obszerny, liczący 36 stron przegląd literatury, który w bardzo przejrzysty i wystarczający sposób wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy. W kolejnych podrozdziałach tej części przedstawiono bowiem aktualny stan badań na temat budowy, występowania i funkcji wosków (4.1), biosyntezy wosków oraz ich składowych (4.2) oraz występowania reduktaz kwasów tłuszczowych i syntez wosków u bakterii i jednokomórkowych eucaryontów, roślin, bezkręgowców oraz ptaków i ssaków (4.3). W rozdziale „Przegląd Literatury” przedstawiono także informacje o zastosowaniu wosków i alkoholi tłuszczowych w przemyśle (4.4) oraz omówiono metody ich otrzymywania w mikroorganizmach oraz roślinach (4.5).

W rozdziale 5 doktorantka uzasadnia cel podjęcia badań wyprowadzając go między innymi z udziału w projekcie ICON. Celem pracy było określenie specyficzności substratowej reduktaz kwasów tłuszczowych z *Mus musculus*, *Simmondsia chinensis* i *Arabidopsis thaliana* oraz syntez wosków pochodzących z *M. musculus*, *S. chinensis* oraz *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* w drożdżowym systemie ekspresyjnym. Cel ten został podzielony na trzy etapy, z których trzeci – wskazany jako główny cel niniejszej pracy jest sformułowany w sposób niefortunny z uwagi na użycie słowa „determinacja”, które w żadnym wypadku nie jest synonimem słowa „oznaczanie”, o które to oznaczanie w tym przypadku chodzi.

Rozdział materiał i metody (rozdział 6) obejmuje 18 stron maszynopisu. Obok standardowego w tego typu pracach zestawienia stosowanych odczynników, buforów, roztworów, podłoży hodowlanych jest tutaj charakterystyka użytych szczepów drożdży i bakterii *E. coli*, plazmidów używanych przez doktorantkę ze szczegółowym opisem konstrukcji plazmidu pYES2 zawierający gen syntazy wosków z *S. chinensis* dokonany przez doktorantkę, a także opis transformacji i hodowli *Saccharomyces cerevisiae*. Metody analityczne ekstrakcji lipidów i ich chromatograficzna analiza, izolacja frakcji mikrosomalnej z drożdży oraz synteza acylo-CoA, DAG i MAG z zastosowaniem izotopu węgla C-14 opisane są w wyczerpujący sposób. Rozdział kończy opis reakcji syntezy *in vitro* reduktaz kwasów tłuszczowych i syntazy wosków. Szeroka paleta zastosowanych metod oraz ich różnorodność daje wyobrażenie o zakresie wykonanej pracy jednocześnie wskazuje na możliwości badawcze Doktorantki.

Imponującą ilość wyników zamieszczoną w rozdziale o tym samym tytule (rozdział 7) przedstawiono na 69 stronach rozprawy i udokumentowano w postaci 10 tabel oraz 55 rycin. Prezentacja wyników badań w tej części rozprawy jest klarowna, opisy rycin i tabel wyczerpujące, a zastosowana do ich oceny analiza statystyczna wystarczająca. Nie omawiam tu szczegółowo uzyskanych wyników, bo z pewnością będą przedstawione w trakcie publicznej obrony rozprawy. Chcę natomiast podkreślić szeroki zakres badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, czego ilustracją niech będzie przykładowo fakt przetestowania 238 kombinacji różnych acylo-CoA i alkoholi tłuszczowych w trakcie badania w warunkach *in vitro* aktywności syntez wosków z myszy, jajoby oraz komórek *Marinobacter* i jednocześnie wskazać na najwartościowsze osiągnięcia p. Miklaszewskiej, za które uważam:

1. Uzyskanie ekspresji genu kodującego syntezę wosków z jojoby w drożdżowym systemie ekspresyjnym, w konsekwencji czego możliwe było zbadanie specyficzności substratowej tego enzymu,
2. Optymalizację warunków badania syntazy wosków w warunkach *in vitro* poprzez zastosowanie benzenu jako nośnika alkoholu dodawanego do liofilizowanych frakcji mikrosomalnych, dzięki czemu enzym wykorzystywał jako substrat nie tylko średniołańcuchowe, ale także do tej pory niedostępne w badaniach nasycone i nienasycone długo- i bardzo długołańcuchowe alkohole tłuszczowe.

Czytając tę część rozprawy mam pewną niejasność związana ze wskazaniem różnych czasów reakcji enzymatycznej w serii doświadczeń dotyczących ustalania optymalnych warunków ich działania. Na przykład przebiegi zależności powstawania ilości produktu od czasu reakcji na ryc. 7.25 i 7.44 są podobne, ale w pierwszym przypadku czas wyboru to 30 min, w drugim 5 min – (argument liniowość). Z kolei na rys 7.14 wskazana jest liniowość do 45 min, na rys 7.19 do 30 min, jednocześnie wszystkie przywołane tu krzywe mają charakter krzywych wysycenia, nie zależności prostoliniowych. Proszę o komentarz dotyczący kryterium wyboru tych czasów.

Dyskusja (rozdział 8) została napisana w stylu klasycznej dla doktoratów (i nie tylko) konfrontacji wyników własnych z danymi literaturowymi. Swoboda wypowiedzi, jej zwartość i klarowność w powiązaniu z właściwym i krytycznym doбором odnośników, na tle których łatwo dostrzec osiągnięcie rozprawy wskazuje, iż Pani Miklaszewska jest osobą znakomicie zorientowaną w problematyce nie tylko syntezy wosków, ale także biochemii tłuszczowców. Korzystając z kompetencji Doktorantki proszę o wypowiedź w następującej kwestii. Oba enzymy uczestniczące w syntezie wosków zostały wyizolowane i oczyszczone z nasion jojoby i na podstawie sekwencji aminokwasowej sklonowano odpowiednie geny. Transformacja *Arabidopsis* tymi genami spowodowała wysoką akumulację wosków w nasionach transgenicznych roślin (Lardizabal i wsp. 2000). Jednocześnie czytam w pewnej pracy przeglądowej (Kosmos 61 (3) 2012), iż pomimo ogromnych potencjalnych korzyści wynikających z uzyskania roślin o zwiększonej zawartości wosków badania te nie były kontynuowane. To daje mi asumpt do zadania pytania o perspektywy aplikacyjne związane z tematyką badawczą doktoratu, zwłaszcza w świetle uregulowań prawnych dotyczących hodowli i obrotu roślinami modyfikowanymi genetycznie.

Rozdział 9 rozprawy to podsumowanie i wnioski. Jest ich osiem, a każdy rozpoczyna się wskazaniem najbardziej istotnego osiągnięcia naukowego Doktorantki i kończy sugestią dotyczącą możliwości biotechnologicznego jego zastosowania. Wnioski są faktycznym odzwierciedleniem osiągnięcia naukowego Doktorantki, która założony cel pracy zrealizowała z nawiązką. Wniosek drugi skłania mnie do poruszenia następującej kwestii. Podkreślono tu atrakcyjność transformantów drożdżowych w produkcji wosków wynikającą z faktu wydzielania aż 70% produkowanych alkoholi tłuszczowych do pożywki przez drożdże. Jednak „przestawienie” metabolizmu organizmu w kierunku produkcji lipidów gromadzonych jako materiał zapasowy dokonuje się zazwyczaj kosztem syntezy białka, co przy tak wysokim odsetku (70%) ubytku węgla organicznego rodziłoby pytanie o bilans energetyczny i funkcjonowanie organizmu w ogóle. Proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do tej kwestii.

Rozprawę kończy alfabetyczny spis ponumerowanych 148 odnośników (rozdział 10) i 4-stronicowy Aneks zawierający szczegółowe wyniki pomiarów uzyskane w reakcjach *in vitro* z wykorzystaniem frakcji mikrosomalnych drożdży transformowanych genami kodującymi badana enzymy.

Rozprawa napisana jest prostym i komunikatywnym językiem, a tzw. literówki (np. pierwsze zdanie podrozdziału 4.5.1, str. 39), określenia żargonowe (np. całość worteksowano, str. 58, l. 18), niezręczności językowe czy stylistyczne, (np. enzymy zaangażowane, wielokrotnie) lub zaśmiecające współczesną polszczyznę anglicyzmy (np. algi, str.20) są wyjątkowo nieliczne i w żadnym przypadku nie obniżają merytorycznej wartości dzieła.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że założone cele pracy Doktorantka w pełni uzyskała. Wykonała ogromną pracę analityczną, przedstawiając bardzo obszerną dokumentację wyników badań przeprowadzonych w serii różnorodnych doświadczeń. Zakres i warianty tych doświadczeń zostały dobrze zaplanowane, a powtarzalność uzyskanych wyników wskazuje na dobre opanowanie warsztatu badawczego i rzetelność w prowadzeniu analiz. Uważam, że przedłożona mi do oceny praca spełnia wymagania Ustawy z dn. 18 marca 2011 r. o stopniach i tytułach naukowych z nawiązką. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Miklaszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość naukową otrzymanych wyników, które w postaci kolejnych oryginalnych prac powinny bez większych problemów dać się ulokować w wysoko notowanych czasopismach naukowych, wnoszę do Wysokiej Rady o stosowne wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej. Osiągnięcie naukowe p. Miklaszewskiej w połączeniu z metodą wyciszania lub wzmacniania ekspresji genów uczestniczących w metabolizmie lipidów powinno zaowocować opracowaniem wydajnego procesu produkcji wosków o pożądanej strukturze u wybranych do tego celu organizmach.

