



AKADEMIA ROLNICZA IM. HUGONA KOŁŁĄTAJA W KRAKOWIE  
WYDZIAŁ ROLNICZO - EKONOMICZNY  
KATEDRA MIKROBIOLOGII  
al. Mickiewicza 24/28  
30-059 Kraków  
tel./fax: 012/633-13-56; tel. 012/662-40-65 oraz 012/662-40-96  
E-mail: rkm@ar.krakow.pl

---

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej p. mgr Macieja KLUZA pt.  
„Optymalizacja procesów produkcji ryboflawiny (witaminy B<sub>2</sub>) przez  
zrekombinowane szczepy drożdży *Candida famata*”  
wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii  
Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie  
pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Sybirnego

---

### 1. Ocena problematyki rozprawy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pod w/w tytułem jest związłym maszynopisem, bo liczącym tylko 174 stron tekstu, jest napisana w tradycyjnym układzie, obejmującym bardzo obszerny 32-stronicowy przegląd literatury, nazwany wstępem, poprzedzony spisem skrótów używanych w tekście oraz 5 stronicowym streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim. We wstępie Autor zamieścił 4 rysunki, dotyczące struktur chemicznych i szlaków metabolicznych syntezy ryboflawin i jej pochodnych, a na jego końcu przedstawił cele swych badań. Omówieniu materiału biologicznego i metod użytych w badaniach jest poświęcony 14 stronicowy rozdział – materiał i metody, a kolejną bardzo obszerną część tekstu, bo liczącą 79 stron to interesujące wyniki badań, które zilustrowano 77 rysunkami i 20 tabelami, co stanowi bardzo obszerną i wyjątkowo dobrze przedstawioną dokumentację pracy. Po wynikach następuje bardzo treściwa, 6-stronicowa dyskusja najważniejszych osiągnięć doktoranta i 5 wniosków podsumowujących całość badań. Końcowy rozdział to piśmiennictwo, liczący 218 pozycji, w tym 6 stron internetowych, należy zaznaczyć, że w większości są to oryginalne prace z ostatniego dziesięciolecia łącznie z kilkunastoma najnowszymi artykułami, publikowanymi w 2015 roku, które wykorzystano we wstępie pracy, celem wprowadzenia czytelnika w omawiany problem. Na początku maszynopisu znajduje się spis treści.

Tekst rozprawy jest napisany dobrą polszczyzną błędy literowe i stylistyczne w kontekście rozmiaru pracy są nieliczne i na tyle nieistotne, że nie będą ich cytować. Układ tekstu jest przejrzysty, kolejność rozdziałów logiczną, a jakość dokumentacji wysoką.

Do najważniejszych problemów współczesnej cywilizacji XXI wieku zaliczyć należy zagadnienia dotyczące wyżywienia wzrastającej liczby ludności, zdrowotności ludzi i zwierząt, dostępu do źródeł wody i energii oraz zachowanie naturalnego środowiska w stanie nie gorszym niż go zastaliśmy. Eksperci już dziś ostrzegają, szczególnie w krajach rozwijających się, a także i w Polsce, że wzrastająca liczba ludności pociągnie za sobą wzrost problemów związanych z dostępem do żywności, jakością żywności jej dystrybucją, a także przyczynić się może do fali migracji ludności w poszukiwaniu lepszej, tańszej i zdrowszej żywności. Stąd świadomość naszych działań zmierzających do eliminacji wszystkich zagrożeń, które mogłyby w jakikolwiek sposób wpływać negatywnie na naszą egzystencję. Do ludzi dociera świadomość, że podejmując niekiedy proste działania, można nie niszczyć podstawowych elementów środowiska wyeliminować szkodliwe czynniki z naszego otoczenia, a prowadząc odpowiedni styl życia zachować zdrowie na długie lata.

Wydaje się, że nowoczesne procesy biotechnologiczne wykorzystujące najnowsze zdobycze wiedzy z zakresu biochemii, biologii molekularnej, genetyki, inżynierii genetycznej i mikrobiologii mogą sprostać stojącym przed ludzkością zadaniom i przyczynić się do zapewnienia dostatecznej ilości dobrej jakościowo żywności dla całej ludzkości. Nic, więc dziwnego, że temat pracy doktorskiej p. mgr Macieja Kluza związany jest z biologią, aktywnością i właściwościami biochemicznymi drożdży (*Candida famata*), które odpowiednio zrekombinowane metodami inżynierii genetycznej zamierza wykorzystać do produkcji ryboflawiny (witaminy B<sub>2</sub>).

Ryboflawina jest niezbędnym składnikiem diety ludzi i zwierząt, służy jako prekursor koenzymów flawinowych: mononukleotydy flawinowego (FMN) i dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD), które zaangażowane są w metabolizm i inne procesy zachodzące w komórkach. Produkowana komercyjnie witamina B<sub>2</sub> stosowana jest w żywieniu ludzi i zwierząt, jako suplement diety oraz składnik pasz i jako dodatek do żywności w przemyśle spożywczym. Wykorzystuje się ją także w leczeniu oraz profilaktyce szeregu chorób np. oczu, układu nerwowego czy skóry.

Należy zaznaczyć, że światowy rynek produkcji ryboflawiny kształtuje się na poziomie 9 000 t rocznie przy obrocie równym 150 – 500 mln dolarów. Do końca XX w ryboflawinę pozyskiwano głównie na drodze syntezy chemicznej, jednakże w ostatnich latach obserwuje się silny rozwój mikrobiologicznej syntezy, a do jej produkcji stosuje się genetycznie zmodyfikowane bakterie, grzyby i drożdże. Jak na razie wykorzystanie mikroorganizmów do bioprodukcji ryboflawiny na skalę przemysłową napotyka liczne trudności, spowodowane głównie niestabilnością szczepów. Ponadto efektywność pozyskiwania ryboflawiny w procesach biotechnologicznych zależy od wielu czynników jak chociażby: odpowiednie źródło węgla, dobór mikroelementów, odczynu, parcjalnego ciśnienia tlenu, szybkości rozcieńczania, szybkości mieszania oraz wielu innych mniej poznanych parametrów. Te skomplikowane warunki przebiegu syntezy

wskazują jak trudny jest to proces i ile jeszcze trzeba szczegółowych badań, aby otrzymać na drodze mikrobiologicznej ten cenny składnik diety.

Dlatego jestem pełen uznania za trud podjęcia badań zmierzających do opracowanie takiego sposobu syntezy ryboflawiny, aby w optymalnych warunkach hodowlanych pozyskiwać jak największe jej ilości. Stąd głównym celem pracy było wybranie najlepszego producenta ryboflawiny i optymalizację jej produkcji. Podjęcie powyższych badań uważam za słuszne i celowe, a wykonanie ich na konkretnych zrekombinowanych szczepach drożdży i przeprowadzenie doświadczeń w warunkach laboratoryjnych gdzie stworzono i kontrolowano wiele zależności i interakcji za bardzo cenne osiągnięcie Doktoranta.

## 2. Ocena pracy pod względem metodycznym

Przystępując do oceny recenzowanej pracy, jako rozprawy doktorskiej pragnę zaznaczyć, że zebrane wyniki dotyczą ogromnego zakresu badań wykonanych w warunkach laboratoryjnych. Powyższe badania stanowią cenne osiągnięcie naukowe z zakresu biologii molekularnej, mikrobiologii i inżynierii metabolicznej, wyjaśniające wiele problemów związanych z modyfikacjami genetycznymi drożdży. Zastosowane metody badawcze oparte są na powszechnie stosowanych metodach genetycznych, mikrobiologicznych i chemicznych, są właściwie dobrane oraz zastosowane, pozwalające na udowodnienie postawionego celu. Praca wykonana jest poprawnie pod względem metodycznym. Na szczególne podkreślenie zasługują badania nad konstruowaniem szczepów drożdży zdolnych do produkcji w stwarzanych warunkach laboratoryjnych znacznych ilości ryboflawiny. Powyższe badania Doktorant przeprowadził wyjątkowo starannie, w licznych powtórzeniach, co zaowocowało wieloma bardzo interesującymi wynikami, które być może znajdą praktyczne zastosowanie w procesach biotechnologicznych związanych z wykorzystaniem skonstruowanych szczepów drożdży do przemysłowej produkcji ryboflawiny.

## 3. Ocena pracy pod względem merytorycznym

Z obowiązku recenzenta powinienem wskazać jakieś nieścisłości, niekompletne tezy, czy też inne niejasności w ocenianej rozprawie doktorskiej, jednak nie znajduję fragmentów, które wymagałyby dodatkowych wyjaśnień.

Oceniana praca doktorska zawiera bardzo dobrze opracowaną część wstępną-przeładową, w której autor opisuje dotychczasowy dorobek naukowy w tej dziedzinie, dając wyraz swej doskonałej orientacji w najnowszych osiągnięciach badawczych nad rolą i znaczeniem drobnoustrojów w tym niektórych gatunków bakterii i drożdży w produkcji ryboflawiny i jej znaczeniu w żywieniu ludzi i zwierząt. Szczegółowo analizuje technologie stosowane podczas jej syntezy i analizuje różne czynniki wpływające na jej produkcję, jak chociażby: dobór szczepów mikroorganizmów, rodzaj procesów biotechnologicznych

związanych z jej pozyskiwaniem, rodzajem hodowli oraz analizuje wpływ takich czynników na jej syntezę jak tlen, odczyn, temperatura, składniki podłoża, czy sposób wydzielenia produktów.

Głównym celem wykonanej pracy doktorskiej były badania genetyczne nad modyfikacją drożdży, zmierzające do otrzymania nowych efektywnych szczepów, które konstruowane nowoczesnymi metodami inżynierii genetycznej byłyby zdolne do syntezy cennej ryboflawiny. Zamierzony cel osiągnięto poprzez konstruowanie nowych szczepów *Candida famata* wykorzystując do tego celu wiele szczepów o różnych genotypach oznaczonych jako: AF-4, AF-4/RIB1/RIB7, AF-4/RIB1/RIB7/SEF1 i plazmidów oraz nowoczesne metody transformacji i ekspresji genów, a także wiele metod biochemicznych pozwalających analizować aktywność skonstruowanych nowych szczepów drożdży zawierających w plazmidzie ważne geny kodujące cechy, które umożliwiają im syntezę zwiększonej ilości cennej ryboflawiny.

W wyniku przeprowadzonych badań genetycznych, biochemicznych, i mikrobiologicznych Doktorant uzyskał wyniki, które wiążą się z badaniami syntezy ryboflawiny przez drożdże *Candida famata*, które uzyskano na drodze inżynierii genetycznej, metabolicznej i klasycznej selekcji, zdolnych do zwiększonej produkcji ryboflawiny. Szczególnie interesujące są wyniki dotyczące m.in.:

1. Transformacji komórek drożdży *Candida famata* na drodze elektroporacji.
2. Metod konstruowania nowych szczepów drożdży z ekspresją genu *SEF1*.
3. Izolacji genomowego RNA i DNA z komórek drożdży.
4. Oznaczania aktywności enzymów czynnych w syntezie ryboflawiny.
5. Seria doświadczeń nad doborem optymalnego podłoża hodowlanego oraz metod i warunków prowadzenia hodowli i sposobów jej optymalizacji.
6. Zastosowania metod chemicznych i analitycznych do oznaczania ryboflawiny i produktów użytych do optymalizacji hodowli drożdży.

Przeprowadzone badania są bardzo ważne pod względem naukowym i nie budzą żadnych zastrzeżeń natury merytorycznej. Jako oryginalne i bardzo ciekawe wnoszą one nowe elementy poznawcze do genetyki i fizjologii drożdży oraz ich aktywności w procesie syntezy ryboflawiny. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że czynniki genetyczne oraz warunki hodowli mają istotny wpływ na proces powstawania ryboflawiny, warunkowany przez wiele czynników, które odpowiednio modyfikowane mogą przyczynić się do zwiększenia jej uzysku.

W oparciu o uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań Doktorant wyciągnął wnioski, które sprecyzowane są bardzo rzeczowo i konkretnie. Do najważniejszych wniosków Doktoranta należy zaliczyć te, w których stwierdza, że najważniejszymi czynnikami decydującymi o produkcji ryboflawiny są czynniki genetyczne i środowiskowe, w tym skład nowego optymalnego podłoża i warunki hodowli, w których wykazał, że:

1. Szczep #91 drożdży *Candida famata* okazał się najlepszym producentem ryboflawiny ze wszystkich badanych szczepów drożdży.
2. Stężenie syntetyzowanej przez drożdże *C. famata* ryboflawiny zależy od specyficznej aktywności enzymów zaangażowanych w syntezę RF – GTP cyklohydrolazy II oraz ryboflawinowej syntazy.
3. Najwyższe ilości ryboflawiny oraz wydajność syntezy ryboflawiny uzyskano w hodowlach, gdzie wykorzystano optymalizowane podłoże Op5m.
4. Napowietrzanie miało znaczący wpływ na wydajność procesu biosyntezy ryboflawiny przez wyselekcjonowane szczep #91 drożdży *C. famata*. Optymalny stopień nasycenia podłoża tlenem %pO<sub>2</sub> wynosił 40.
5. W warunkach hodowli optymalnej w bioreaktorze o poj. 7,0 L szczep #91 drożdży *C. famata* syntetyzował aż 16,82 g/L ryboflawiny z wydajnością 185,32 mg Rf/g biomasy.

Z obowiązku recenzenta powyższej rozprawy doktorskiej, zgłaszam następujące uwagi oraz proszę o dokładniejszą informację w sprawie:

1. Witaminy to grupa substancji biologicznie czynnych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów człowieka i zwierząt. Proszę przedstawić historię badań nad tą ważną grupą związków i ogólny ich podział.
2. Jak wygląda produkcja ryboflawiny na świecie, przy wykorzystaniu metod mikrobiologicznych, z zastosowaniem drobnoustrojów?
3. Jakie geny odpowiedzialne są za produkcję ryboflawiny u bakterii a jakie u drożdży? Czy szlaki metabolizmu są podobne?
4. Proszę omówić główne zalety: inżynierii genetycznej, inżynierii metabolicznej i metody selekcji oraz jak je należy stosować?
5. Proszę omówić główne etapy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i w jakim celu jej się używa?
6. Proszę omówić najważniejsze metody hodowli drobnoustrojów stosowane w warunkach laboratoryjnych i przemysłowych.
7. Co to są protisty, o których Pan wspomina we wstępie?
8. Proszę omówić metody wydzielania produktów końcowych z hodowli drobnoustrojów.
9. Który ze składników podłoża hodowlanego makro- i mikroelementów miał największy wpływ na syntezę ryboflawiny i czy łatwo można go modyfikować?
10. Skąd pochodziły szczepy bakterii i drożdży, plazmidy oraz startery wykorzystywane do badań?
11. Czy były problemy z produkcją biomasy drożdży w czasie hodowli w bioreaktorach?

Moje uwagi - nie mają charakteru krytycznego i oczywiście nie wpływają w najmniejszym stopniu na wartość naukową pracy, a są jedynie pytaniami i uwagami w dyskusji oraz powinny służyć lepszemu przygotowaniu pracy do druku.

#### 4. Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Praca napisana jest bardzo treściwie, dokładnie, precyzyjnie i konkretnie, stąd przedstawioną rozprawę p. mgr Macieja Kluza oceniam bardzo wysoko. Uzyskane w Jego pracy wyniki wzbogacają naszą wiedzę z zakresu mikrobiologii i procesów biotechnologicznych przeprowadzanych przez drożdże *Candida fumata* wykorzystywanych do produkcji ryboflawiny. Gromadzenie tego rodzaju faktów jest szczególnie cenne w obecnym czasie, kiedy obserwujemy gwałtowne zapotrzebowanie na nowe aminokwasy, witaminy, antybiotyki czy inne substancje biologicznie czynne. Należy podkreślić, że praca wykonana jest poprawnie pod względem formalnym, stylistycznym i językowym oraz nie budzi żadnych zastrzeżeń natury naukowej. Na uwagę zasługuje poprawny styl i język polski. Na specjalną pochwałę zasługuje sama redakcja pracy, którą wykonano bardzo estetycznie i wyjątkowo starannie, co dodatkowo świadczy o wszechstronnych uzdolnieniach Doktoranta.

#### 5. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższe dane dotyczące oceny formalnej, metodycznej i merytorycznej pracy doktorskiej pana mgr Macieja Kluza, pt.:

„Optymalizacja procesów produkcji ryboflawiny (witaminy B<sub>2</sub>) przez zrekombinowane szczepy drożdży *Candida famata*”

stwierdzam, że powyższa rozprawa stanowi niewątpliwie oryginalne i cenne osiągnięcie naukowe doktoranta w zakresie mikrobiologii i biotechnologii. Wykazał w prezentowanej pracy umiejętność organizacji i samodzielnej realizacji badań. Duża znajomość literatury przedmiotu, opanowanie techniki badawczej z zakresu mikrobiologii i analityki - wskazują na dobre przygotowanie doktoranta do pracy naukowej. Powyższa praca powinna być opublikowana.

W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska pod w/w tytułem wykonana przez p. mgr Macieja Kluza z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Uniwersytetu Rzeszowskiego, pod kierunkiem **p. prof. dr hab. Andrzeja Sybirnego w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. W związku z powyższym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kollątaja w Krakowie o dopuszczenie p. mgr Macieja KLUZA do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na znaczenie naukowe tematu, duży wkład pracy własnej w badaniach oraz sposób przedstawienia wyników, ich opracowanie i omówienie stawiam wniosek do **Wysokiej Rady Wydziału Technologii Żywności UR w Krakowie o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej p. mgr Macieja KLIUZA - stosowną nagrodą (Nagroda Dziekana, Nagrodą Rektora lub Nagroda Ministra).**

Prof. zw. dr hab. Wiesław BARABASZ  
Katedra Mikrobiologii Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 24/28  
tel. (012) 6331356, +48 602295120

Kraków, dnia 25 lutego 2016 r.



Prof. zw. dr hab. Wiesław Barabasz