



Wroclaw 26 maja 2023 r.

**Dr hab. inż. Magdalena Klimek-Ochab, prof. uczelni**

Politechnika Wroclawska

Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii

[magdalena.klimek-ochab@pwr.edu.pl](mailto:magdalena.klimek-ochab@pwr.edu.pl)

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Winiarskiej  
zatytułowanej

**„Tungsten aldehyde oxidoreductase from *Aromatoleum aromaticum*  
– biocatalyst for alcohol production”**

Praca doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Winiarskiej została wykonana pod opieką naukową dwojga promotorów – Pana prof. Macieja Szaleńca z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk oraz Pani dr hab. Anny Bodzoń-Kuřakowskiej, prof. AGH z Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie.

Obecnie biotechnologia oferuje wiele praktycznych i użytecznych strategii, które znalazły lub mogą znaleźć zastosowanie praktyczne w syntezie cennych, użytecznych związków chemicznych z zachowaniem zasad *Zielonej Chemii*. Wiele grup badawczych na świecie koncentruje swoje badania na poszukiwaniu nowych biokatalizatorów o unikalnych cechach, stara się optymalizować reakcje, które katalizują, bądź stosować je w zupełnie nowych aplikacjach, tak aby jak najbardziej poszerzyć paletę metod biokatalitycznych o znaczeniu praktycznym.

Tematyka opiniowanej rozprawy wpisuje się w powyższe zagadnienie i dotyczy charakterystyki takiego unikalnego biokatalizatora: zależnej od wolframu oksydoreduktazy aldehydów (AOR) wraz propozycją sposobu jej praktycznego zastosowania. **Podjęte przez Doktorantkę badania są niezwykle interesujące, mają niewątpliwie nowatorski charakter, a ich wyniki mają nie tylko aspekt czysto poznawczy, ale także znaczenie praktyczne i potencjał aplikacyjny.**



Recenzowana rozprawa jest **zwartym pisemnym opracowaniem naukowym** przygotowanym w języku angielskim, które liczy 209 stron i zawiera 28 tabel i 72 rysunki. Układ tekstu jest klasyczny (tzn. podzielony na rozdziały i podrozdziały) i zgodny z przyjętymi schematami dla dysertacji doktorskich. W strukturę rozprawy włączono także wykaz skrótów i spis źródeł finansowania badań oraz **opatrzone ją streszczeniami w języku polskim i angielskim.**

Pracę rozpoczyna rozdział pt. *Literature review*, w którym Pani mgr inż. Agnieszka Winiarska wprowadza czytelnika w podstawy teoretyczne swoich badań, przedstawiając aktualny stan wiedzy w zakresie tematyki doktoratu. Ten rozdział został przygotowany w oparciu o 118 aktualnych pozycji literaturowych, które zostały dobrane właściwie i co najważniejsze poddane trafnej analizie krytycznej, aby uzasadnić podjęcie zaproponowanej w pracy problematyki. W siedmiu kolejnych podrozdziałach Doktorantka porusza zarówno kwestie ściśle związane z aspektami biokatalitycznymi swoich badań, przedstawia znaczenie aldehydów jako związków o dużym znaczeniu praktycznym jak i stara się przybliżyć czytelnikowi nowoczesną technikę kriomikroskopii elektronowej i jej zastosowanie do obrazowania makromolekuł. Poszczególne podrozdziały wydają się stosunkowo krótkie, ale po ich przeczytaniu staje się jasne, że nie stanowi to absolutnie ich wady, ponieważ są jednocześnie bardzo informatywne. **Świadczy to, że Pani mgr Winiarska bez wątpienia świetnie orientuje się w temacie, a sam wstęp teoretyczny został szczegółowo przemyślany i przystępnie napisany.**

Po wprowadzeniu teoretycznym następuje rozdział pt. *Aims of the work*, w którym Doktorantka jasno precyzuje postawione cele badawcze, których punktem stycznym jest enzym: wolframowa oksydoreduktaza aldehydów. Należy podkreślić, że były to **cele ambitne** i z góry zakładały duży nakład pracy eksperymentalnej. Źródłem badanego enzymu wolframowego są mikroorganizmy z gatunku *Aromatoleum aromaticum*, stosunkowo mało poznane, a które ostatnimi czasy budzą zainteresowanie badaczy ze względu na naturalne zdolności do biodegradacji różnorodnych ksenobiotyków zarówno w warunkach tlenowych jak bez dostępu do tlenu, prezentując przy tym bardzo elastyczny i dobrze regulowany metabolizm. Dobrze więc, że Doktorantka wybrała ten właśnie niezwykły mikroorganizm i podjęła się charakterystyki enzymu z niego pozyskanego. Nie wybrała jednak łatwego modelu badawczego, postanawiając skupić się na enzymie z grupy enzymów wolframowych, wskazywanego jako enzym metabolizmu beztlenowego badanego mikroorganizmu.

Na kolejnych stronach dysertacji Autorka opisała metodykę prowadzonych badań w rozdziale zatytułowanym *Materials and Methods*, który to rozdział zaczyna się jednostronicowym syntetycznym wprowadzeniem, w którym zestawiała przeprowadzone podejścia badawcze, a co pozwoliło już na tym etapie wyrobić sobie pewien ogólny obraz na materiał zrealizowany w ramach pracy doktorskiej. Następnie Doktorantka przedstawiła już konkretne



procedury eksperymentalne, zastosowane, aby zrealizować założone cele badawcze. **Spektrum metod, które wykorzystana jest bardzo szerokie, co niewątpliwie wymagało odpowiednich podstaw zarówno w kontekście wiedzy teoretycznej jak i doświadczenia praktycznego zarówno z zakresu biologii molekularnej, biotechnologii czy biochemii jak również metod analizy związków chemicznych oraz umiejętności prowadzenia badań teoretycznych.** Natomiast analizując tylko sposób opisu metod badawczych czuję pewien niedosyt i uważam, że w niektórych aspektach jest on nieco zbyt chaotyczny i mało usystematyzowany. Dotyczy to przede wszystkim rozdziału 1, w którym pewnych danych trzeba szukać w kilku miejscach. W mojej (subiektywnej) opinii bardziej czytelnie byłoby zblokować informacje o prokariotycznych źródłach enzymu, mediach hodowlanych wraz ze sposobem ich przygotowania, następnie opisać etapy hodowlane dla poszczególnych mikroorganizmów i wreszcie opisać protokoły oczyszczania białka. Mam wrażenie, że ten rozdział został przygotowany i napisany w sposób, którego używa się do opisu metodyki w publikacjach naukowych, a w pracy doktorskiej można i trzeba opisywać metodykę nieco szerzej.

Na kolejnych stronach pracy Doktorantka przedstawia i analizuje wyniki badań w rozdziale zatytułowanym *Results and Discussion*, który podzielony jest na części tematyczne, w pełni spójne z tematem rozprawy. Niektóre uzyskane rezultaty są zilustrowane rysunkami, schematami i tabelami, które stanowiąc dodatkowe podsumowanie, bardzo ułatwiają analizę wyników dysertacji. Należy podkreślić, że rozdział ten jest szczegółowy i dobrze odzwierciedla duży wkład pracy niezbędny do realizacji zaplanowanych badań, których wykonanie z pewnością wymagało współpracy z innymi naukowcami. Prosiłabym o doprecyzowanie, które badania zostały zrealizowane samodzielnie, a które wymagały współpracy naukowej i jaki był udział innych osób w poszczególnych etapach badań.

W pierwszej części badań Doktoranta przetestowała dwie ścieżki otrzymywania preparatu AOR, wykorzystując dwa alternatywne źródła enzymu, dwie metody hodowlane oraz dwa różne protokoły oczyszczania białka. Nie jest dla mnie jasne, czy etap hodowlany oraz metody oczyszczania białka opracowywała Doktorantka samodzielnie, czy wykorzystwała zoptymalizowane w ramach wcześniejszych badań procedury. Niezależnie od powyższego udało się Jej wykazać, że wprawdzie w obydwu przypadkach można otrzymać stabilne i aktywne preparaty AOR, ale różnią się one poziomem aktywności enzymatycznej oraz mają różną czystość. Biorąc pod uwagę m.in. ewentualny przyszły aspekt aplikacyjny, fermentacyjna produkcja enzymu w oparciu o wykorzystanie systemu ekspresji *A. evansi* wg Doktoratki ma większy potencjał i wydaje się bardziej uzasadniona ekonomicznie. Bardzo podoba mi się takie rozumowanie – rzadko kiedy już na wstępnym etapie badań bierze się pod uwagę możliwość praktycznego zastosowania preparatu enzymatycznego i względy ekonomiczne z tym związane.



W rozdziale drugim zatytułowanym *Catalytic characterisation* Doktorantka charakteryzuje wolframową oksydoreduktazę zaczynając dość standardowo od określenia specyficzności substratowej enzymu AOR w reakcji utleniania aldehydów do odpowiednich kwasów karboksylowych wraz z wyznaczeniem parametrów kinetycznych reakcji utleniania wybranych modelowych substratów.

Przełomowe wydają się badania Doktorantki nad aktywnością AOR w reakcji redukcji  $\text{NAD}^+$  do NADH ponieważ udowadnia Ona aktywność wolframowego enzymu w obecności wodoru cząsteczkowego, co daje początek nowemu kierunkowi badań nad enzymem i w efekcie **prowadzi do jednego z najważniejszych i oryginalnych odkryć recenzowanej pracy doktorskiej, a mianowicie aktywności hydrogenazowej badanego enzymu.** Tak nieoczekiwane odkrycie postawiło przed Doktorantką nowe wyzwania i zdefiniowało dodatkowy cel badawczy, który zrealizowała z powodzeniem. Dodatkowa, hydrogenazowa aktywność AOR jest również bardzo ciekawa w kontekście znaczenia dla metabolizmu beztlenowego *Aromatoleum aromaticum* – prosiłabym o krótki komentarz dotyczący możliwej roli AOR w metabolizmie bakterii, ale biorąc już pod uwagę wiedzę o jej aktywności hydrogenazowej.

W następnym etapie badań Doktorantka scharakteryzowała aktywność AOR w reakcji redukcji kwasów karboksylowych, koncentrując się przede wszystkim na wskazaniu/identyfikacji donora elektronów do redukcji substratów, określeniu specyficzności substratowej AOR względem kwasów karboksylowych oraz charakterystyce kinetyki badanych reakcji redukcji. Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka potwierdziła, że podobnie jak inne dotychczas scharakteryzowane AOR, enzym z *A. aromaticum* regioselektywnie redukuje różne strukturalnie kwasy karboksylowe w obecności silnych reduktorów, ale wykazała także interesujące *novum* - badane enzymy wykazuje tę aktywność także w obecności  $\text{H}_2$  jako donora elektronów. Należy podkreślić, że taką **aktywność AOR wykazano i udowodniono po raz pierwszy**, a ze względu na duże różnice potencjałów pomiędzy redukcją kwasu a utlenieniem  $\text{H}_2$  na pewno nie było to łatwe od strony praktycznej i wymagało dużego nakładu pracy eksperymentalnej. Naturalnym więc było, że w kolejnym etapie Doktorantka skoncentrowała się na dokładnym zbadaniu reakcji redukcji R-COOH w obecności wodoru jako jedyne donora elektronów i wyznaczeniu jej parametrów kinetycznych, a uzyskane dane stały się punktem wyjścia do **opracowania oryginalnego i nowego sposobu biosyntezy alkoholi z kwasów karboksylowych.**

Zaproponowana przez Doktorantkę strategia obejmuje kaskadę enzymatyczną, której funkcjonowanie opiera się o dwa enzymy – AOR oraz dehydrogenazę alkoholu benzyłowego (BADH) oraz wodór, który pełni funkcję jedyne donora elektronów. W zaproponowanym rozwiązaniu syntetycznym AOR jest odpowiedzialna za pierwszy etap kaskady czyli redukcję kwasów karboksylowych do aldehydów, które następnie zostają zredukowane do alkoholi z



wykorzystaniem dehydrogenazy BADH. Dodatkowym atutem przedstawionego rozwiązania jest wykorzystanie AOR do regeneracji koenzymu i odtworzenie koenzymu niezbędnego dehydrogenazie BADH. **I właśnie to zastosowanie (oparcie systemu regeneracji koenzymu o aktywność AOR i wodór cząsteczkowy) jest kolejnym bardzo cennym i oryginalnym rozwiązaniem zaproponowanym w doktoracie, ponieważ stwarza możliwość zastosowania go w innych ważnych/cennych reakcjach, w których udział biorą dehydrogenazy.** Dodatkowo Doktorantka wykazała, że system pracuje efektywnie także wtedy, kiedy preparat AOR ma postać ekstraktu bezkomórkowego, co w kontekście aplikacyjności tego rozwiązania jest bardzo ważne.

W części trzeciej zatytułowanej *Structural studies* Doktorantka podjęła się z sukcesem charakterystyki strukturalnej badanego enzymu głównie w oparciu o kriomikroskopię elektronową i fotometrię masową oraz stosując metody teoretyczne. Wyniki uzyskane na tym polu także mają dużą wartość poznawczą i znacznie wzbogaciły wiedzę o enzymach wolframowych, tym bardziej, że udało się częściowo ustalić zależność pomiędzy strukturą a funkcją enzymu.

Pracę kończy rozdział pt. *Summary of the result*, w którym Doktorantka w punktach podsumowuje zrealizowane przez siebie badania i wypukla najistotniejsze wyniki.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska:

- prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, co potwierdza zarówno sposób uzasadnienia realizowanej w doktoracie tematyki badawczej oraz bogata dyskusja uzyskanych wyników;
- udawadnia, że Doktorantka posiadała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i potrafi płynnie nadawać im kierunek w zależności od uzyskiwanych rezultatów, aby wzbogacić poziom merytoryczny pracy;
- jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego, związanego z charakterystyką AOR i nowego sposobu jej zastosowania w procesach biokatalitycznych.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Kandydatki do stopnia zatytułowana *Tungsten aldehyde oxidoreductase from *Aromatoleum aromaticum* – biocatalyst for alcohol production* odpowiada w pełni warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. z 2023 r., poz. 742) dlatego wnoszę do Rady Naukowej o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.



Ponadto ze względu bardzo wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy, jej oryginalność jak również możliwość praktycznego zastosowania opisanych wyników zwracam się do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.

*Uzasadnienie:*

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Agnieszki Winiarskiej oceniam bardzo wysoko. Niewątpliwie recenzowana dysertacja jest wynikiem wyjątkowo zaawansowanych, trudnych i żmudnych eksperymentów łączących wiedzę z kilku dziedzin naukowych. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są oryginalne i nowatorskie. Z perspektywy biotechnologa wykazanie aktywności hydrogenazowej badanej oksydoreduktazy i umiejętność wykorzystania tego enzymu w zastosowaniu praktycznym ma istotną wartość naukową i praktyczną. Doktorat jest napisany w przystępny sposób, pomimo bardzo zaawansowanych problemów naukowych, które były badane i zostały opisane. Doktorantka poradziła sobie także doskonale z wyciąganiem wniosków z uzyskanych danych pomiarowych. Przełożyło się to na doskonałe publikacje oraz patenty.