

Poznań, 15.03.2021

Prof. dr hab. Katarzyna Czaczyk
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-637 Poznań

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Huberta Szczerby
pt. „Charakterystyka fizjologiczna i molekularna nowych szczepów bakterii
z rodziny *Enterobacteriaceae*
jako wydajnych producentów kwasu bursztynowego”

wykonanej w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka
na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
pod kierunkiem Promotora

prof. dr hab. dr h.c. mult. Zdzisława Targońskiego
i Promotora pomocniczego dr hab. inż. Adama Kuzdrałińskiego

Opracowanie niniejszej recenzji jest uzasadnione uchwałą Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 19 grudnia 2018 roku o powołaniu mnie na Recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Huberta Szczerby pt. „Charakterystyka fizjologiczna i molekularna nowych szczepów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* jako wydajnych producentów kwasu bursztynowego”.

Dobór i znaczenie tematu

Wykorzystanie surowców odpadowych i odnawialnych do produkcji użytecznych przemysłowo metabolitów z wykorzystaniem drobnoustrojów, jest tematem bardzo często podejmowanym przez biotechnologów z całego świata. W ostatnich latach podjęto wiele prób opracowania takich procesów, które byłyby ekonomicznie opłacalne. Jednym z takich produktów jest kwas bursztynowy, uznawany za jeden z dziesięciu najbardziej perspektywicznych związków chemicznych, o największym potencjale przemysłowym. Związek ten znajduje zastosowanie m.in. w przemyśle spożywczym (jako przeciwutleniacz, regulator kwasowości, wzmacniacz smaku itp.), w przemyśle chemicznym (do produkcji poliestrów, detergentów, związków powierzchniowo czynnych, farb, lakierów, środków

antykorozyjnych) oraz w przemyśle farmaceutycznym (do produkcji leków, np. antynowotworowych, uspokajających i innych). Szczególnie cenne jest wykorzystanie w procesach biotechnologicznych mikroorganizmów izolowanych ze środowisk naturalnych, które mogą posiadać unikalne cechy i zdolności do metabolizowania różnych źródeł węgla. Do bardzo ważnych zadań naukowców w tym zakresie, należy dokładna charakterystyka izolowanych drobnoustrojów, zarówno pod względem fizjologicznym, metabolicznym jak i molekularnym. W tym kontekście podjęta przez Doktoranta tematyka badań jest bardzo aktualna i ciekawa, w szczególności pod względem aplikacyjnym.

Ocena formalnej strony pracy

Rozprawa doktorska mgr inż. Huberta Szczerby jest zbiorem trzech publikacji oryginalnych, stanowiących spójny pod względem tematycznym cykl prac, poświęconych charakterystyce fizjologicznej i molekularnej bakterii z rodziny *Enerobacteriacee*, jako potencjalnych producentów kwasu bursztynowego. Do pracy dołączono 40-stronicowe omówienie osiągnięć badawczych uzyskanych w ramach realizacji tej dysertacji, w którym sformułowano genezę i cel pracy. Również tytuł pracy dobrze odzwierciedla zakres przeprowadzonych badań. Przedstawiony do oceny zbiór publikacji, który stanowi podstawę do ubiegania się o tytuł doktora w obszarze wiedzy nauk rolniczych, leśnych i weterynaryjnych, w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, to prace opublikowane w 2020 roku, o łącznym współczynniku IF = 13,369 (zgodnie z rokiem opublikowania) i łącznej punktacji MNiSW 480 pkt. Prace te zostały opublikowane w czasopismach takich jak *Biotechnology for Biofuels*, *Scientific Reports* i *Molecular Sciences*. Skład autorski tych publikacji obejmuje od czterech do ośmiu Autorów, we wszystkich pracach mgr inż. Hubert Szczerba jest pierwszym Autorem oraz Autorem korespondencyjnym, a Jego wkład w powstanie tych publikacji oszacowany został na 75-90% (na podstawie oświadczeń Współautorów o procentowym udziale w tych publikacjach). Potencjalnie świadczy to o bardzo znaczącym wkładzie Doktoranta w ich powstanie. Zdając sobie sprawę z tego, że kompleksowe badania naukowe wymagają uczestnictwa w nich wielu Autorów i pomimo oświadczeń Współautorów, zauważam tutaj „sztuczne zawyżanie” procentowego udziału Kandydata w tym osiągnięciu naukowym. Zdaniem Recenzenta udział Współautorów na poziomie 2-3% powinien się kończyć raczej podziękowaniami w Acknowledgements, niż współautorstwem. Uważam, że temu osiągnięciu nic by nie ubyło, gdyby udział Współautorów kształtował się na poziomie 5-10%.

Ocena merytoryczna pracy

Pierwsza z prac cyklu przedstawionego do oceny to publikacja pt. „A novel biocatalyst, *Enterobacter aerogenes* LU2, for efficient production of succinic acid using whey permeate as a cost-effective carbon source” która została opublikowana w *Biotechnology for Biofuels* (13(1), 96, 2020). W pierwszym etapie badań zaprezentowanych w tej publikacji, przeprowadzono skrining izolatów bakteryjnych (izolowanych z żołądka przeżuwaczy) pod kątem efektywnej biosyntezy kwasu bursztynowego na podłożu zawierającym laktozę jako główne źródło węgla. Szczep wytypowany jako najlepszy producent kwasu bursztynowego z laktozy został poddany identyfikacji taksonomicznej z wykorzystaniem analizy proteomicznej MALDI-TOF/MS oraz identyfikacji genetycznej opartej na sekwencjonowaniu DNA genu kodującego podjednostkę rybosomalną 16S r RNA. Dodatkowo, uzyskana sekwencja 16S rDNA badanego izolatu została wykorzystana do przeprowadzenia analizy filogenetycznej, która potwierdziła wyniki identyfikacji proteomicznej i genetycznej. Uzyskane wyniki pozwoliły na zakwalifikowanie izolatu jako *Enterobacter aerogenes* (aktualnie obowiązująca nazwa to *Klebsiella aerogenes*). Szczep został zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2071p. Chciałabym tutaj wyrazić swoje uznanie do tak kompleksowego podejścia do identyfikacji wyizolowanego szczepu. Wszyscy wiemy, że pomimo dostępności coraz bardziej nowoczesnych metod identyfikacji, zadanie to jest trudne i nie zawsze daje satysfakcjonujące wyniki. Wynika to między innymi z faktu ciągłych mutacji szczepów, w szczególności w środowisku naturalnym. Za bardzo cenne uważam także badania dotyczące wpływu warunków hodowlanych na przebieg procesu biosyntezy kwasu bursztynowego. W ramach badań naukowych przedstawionych w tej pracy określono wpływ dostępu tlenu, temperatury, pH, stężenia ekstraktu drożdżowego (jako źródła azotu), wielkości inokulum oraz wpływ stężenia laktozy na syntezę kwasu bursztynowego przez wyizolowany szczep *Enterobacter aerogenes* LU2. Końcowy etap tych badań wykazał możliwości wykorzystania permeatu serwatkowego, jako ekonomicznie atrakcyjnego substytutu czystej laktozy do produkcji kwasu bursztynowego przez szczep *Enterobacter aerogenes* LU2 w warunkach beztlenowych. Najwyższe stężenie kwasu bursztynowego (57,7 g/L) uzyskano w hodowlach bioreaktorowych prowadzonych w temperaturze 34°C, przy pH 7.0, stężeniu laktozy na poziomie 100 g/L, stężeniu ekstraktu drożdżowego 10 g/L i wielkości inokulum 20%.

Druuga praca cyklu przedstawionego do oceny to publikacja pt. „Genome analysis of a wild rumen bacterium *Enterobacter aerogenes* LU2 - a novel bio-based succinic acid

producer”, Scientific Reports (10: 1986, 2020). Celem tego etapu badań była charakterystyka genetyczna szczepu *Enterobacter aerogenes* LU2. Analizy te obejmowały oznaczenie struktury i właściwości genomu badanego szczepu. Wykazano, że badany izolat bakteryjny posiada pojedynczy kolisty chromosom, określono zawartość nukleotydów GC (guanina-cytosyna) oraz stwierdzono brak plazmidów. W genomie szczepu zidentyfikowano 4986 genów, z których większość stanowiła geny kodujące białka. Ponadto zidentyfikowano także geny kodujące rRNA, tRNA, ncRNA oraz pseudogeny. Uzyskane wyniki pozwoliły na porównanie genomu *Enterobacter aerogenes* LU2 z 22 genomami innych szczepów *Enterobacter aerogenes*, zdeponowanymi w bazie danych NCBI GenBank oraz innymi wybranymi szczepami (10) należącymi do rodziny *Enterobacteriaceae*. Dane te pozwoliły na stwierdzenie, że genom badanego izolatu jest najmniejszy, jednakże charakteryzuje się największą gęstością genów w stosunku do porównywanych szczepów. Analiza funkcjonalna zidentyfikowanych genów wykazała, że największą grupę sekwencji kodujących stanowiły geny zaangażowane w metabolizm (aż 45,5%), geny biorące udział w procesach komórkowych oraz w przechowywaniu i przetwarzaniu informacji. Określono także liczbę genów słabo scharakteryzowanych. Analiza rozlokowania genów w kategoriach funkcjonalnych COG, pozwoliła na stwierdzenie że największy klaster tworzą geny zaangażowane w transport i metabolizm aminokwasów i węglowodanów oraz metabolizm podstawowy i funkcje fizjologiczne. Wskazuje to że badany szczep *Enterobacter aerogenes* LU2, charakteryzuje się dobrze rozwiniętym i aktywnym systemem metabolizmu źródeł węgla i azot, co jest bardzo ważną cechą drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych. Dalsza analiza uzyskanych danych potwierdziła, że badany szczep posiada uwarunkowania genetyczne do wzrostu na wielu źródłach węgla (w tym na laktozie), do wydajnej syntezy kwasu bursztynowego i jego ekskrecji do podłoża hodowlanego. W genomie *Enterobacter aerogenes* LU2 znaleziono również geny zaangażowane w odpowiedź na stres osmotyczny i oksydacyjny, co może warunkować zdolności szczepu do wzrostu na pożywkach o dużych stężeniach substratów, jak również w warunkach tlenowych i beztlenowych. Analiza genomu za pomocą platformy ResFinder, nie wykazała obecności genów związanych z potencjalną antybiotykoopornością badanego izolatu, jednakże manualna weryfikacja obecności tych genów pozwoliła na identyfikację 5 genów związanych z opornością na antybiotyki. Posiadanie lub brak takiej oporności jest bardzo istotne z punktu widzenia możliwości wykorzystania szczepów izolowanych ze środowiska naturalnego w procesach przemysłowych.

W ostatniej publikacji cyklu (A genomic perspective on the potential of wild-type rumen bacterium *Enterobacter* sp. LU1 as an industrial platform for bio-based succinate production, International Journal of Molecular Sciences, 21, 4835, 2020) dokonano charakterystyki genetycznej szczepu *Enterobacter* sp. LU1, analogicznie jak dla szczepu *Enterobacter aerogenes* LU2. Wykazano, że genom tego szczepu zbudowany jest z pojedynczego, kolistego chromosomu, w którym zidentyfikowano 4425 genów, z czego 4283 geny kodowały białka. Potwierdzono obecność 114 genów kodujących RNA, w tym 25 genów kodujących rRNA, 84 geny kodujące tRNA (odpowiadające wszystkim 20 standardowym aminokwasom), 5 genów kodujących ncRNA oraz 49 pseudogenów. Rozmiar genomu szczepu LU1, całkowita liczba genów oraz liczba genów kodujących białka była mniejsza w porównaniu do szczepu LU2. Dokonano także analizy funkcjonalnej zidentyfikowanych genów, która wykazała, że podobnie jak w przypadku *Enterobacter aerogenes* LU2, największą grupę sekwencji kodujących stanowiły geny zaangażowane w metabolizm, geny biorące udział w procesach komórkowych oraz w przechowywaniu i przetwarzaniu informacji. Analiza rozlokowania genów pozwoliła na stwierdzenie, że największy klaster tworzą geny zaangażowane w transport i metabolizm aminokwasów i węglowodanów, metabolizm podstawowy i funkcje fizjologiczne oraz geny biorące udział w procesie transkrypcji. Ta ostatnia grupa genów, zaangażowana w proces transkrypcji może przyczyniać się do wysokiej aktywności metabolicznej tego szczepu. W odróżnieniu od izolatu LU2, za pomocą platformy ResFinder w genomie LU1 rozpoznano jeden gen oporności kodujący białko o charakterze β -lakтамazy, a weryfikacja manualna wykazała obecność 6 genów związanych z antybiotykoopornością tego szczepu. W genomie szczepu *Enterobacter* sp. LU1 zidentyfikowano 3 sekwencje profagowe (u LU2 tylko jedną), co może mieć duże znaczenie biotechnologiczne (z jednej stwarza to możliwość wykorzystania inżynierii genetycznej opartej na fagach, z drugiej strony wskazuje na to, że szczep może być podatny na lizę fagów przy prowadzeniu procesów przemysłowych). Ponadto w genomie *Enterobacter* sp. LU1 zidentyfikowano dwa potencjalne odcinki stanowiące elementy systemu CRISPR, co u bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* jest nieregularne i występuje raczej rzadko.

Podsumowując wyniki uzyskane w ramach dwóch ostatnich publikacji, należy wyrazić duże uznanie dla tak szczegółowej i całościowej charakterystyki genetycznej badanych izolatów środowiskowych. Sekwencjonowanie hybrydowe, oparte na połączeniu technologii krótkich oraz długich odczytów umożliwiło otrzymanie kompletnych sekwencji genomów *Enterobacter aerogenes* LU2 i *Enterobacter* sp. LU1, ale dopiero ich wnikliwa analiza

pozwoili na przesledzenie potencjalnych szlakow metabolicznych odpowiedzialnych za utylizacje zrodel węgla i produkcje okreslonych metabolitow. Pozwoliło to na wykazanie, ze oba charakteryzowane szczepy posiadaja uwarunkowania genetyczne umożliwiające biosyntezę kwasu bursztynowego poprzez redukcyjną gałąź cyklu Krebsa i cykl glioksylanowy. Ta calosciowa charakterystyka uwzględnila takze obecność genow związanych ze stresem osmotycznym (odporność na wysokie stężenie substratu) i oksydacyjnym (aktywność metaboliczna w warunkach tlenowych i beztlenowych), obecność sekwencji profagowych, elementow systemu CRISPR/Cas oraz genow związanych z opornością na antybiotyki.

Wszystkie wymienione elementy zadecydowaly o tym, ze przedlozoną mi do recenzji prace przeczytalam z duzym zainteresowaniem i oceniam ja bardzo wysoko. Jednakze w trakcie czytania pracy pojawily sie pewne pytania o charakterze dyskusyjnym.

- Jakie podejście metodyczne zalecalby Pan w celu prawidlowej identyfikacji izolatow srodowiskowych? Jakie sa wady i zalety poszczegolnych technik wykorzystywanych do identyfikacji bakterii?
- Na ile obecność genow związanych z antybiotykoopornością przeklada sie na rzeczywiste występowanie tej cechy u bakterii i czy planowal Pan badania empiryczne z tym związane?
- Czy planuje Pan kontynuacje badan nad szczepami z rodzaju *Enterobacter*? Jezeli tak to w jakim kierunku, zdaniem Pana, te badania powinny byc kontynuowane?

Wnioski koncowe

Rozprawe doktorska mgr inż. Huberta Szczerby oceniam bardzo wysoko. Stwierdzam, ze przedstawiony do oceny cykl trzech publikacji naukowych jest oryginalnym i znaczącym wkladem naukowym do dzialu wiedzy, dotyczacej charakterystyki genetycznej izolatow srodowiskowych i mozliwosci ich wykorzystania w procesach biotechnologicznych. Jest to bardzo dobre studium naukowe, swiadczone o duzej dojrzalosci Autora i Jego dobrym przygotowaniu zarowno warsztatowym jak i merytorycznym. Na podkreślenie zasluguje takze bogaty dorobek publikacyjny Autora (lacznie 13 prac, 9 patentow, 5 zgloszen patentowych – o lacznej punktacji 1750 i IF=34,7), kierownictwo i udzial w projektach badawczych (w tym kierownictwo 2 projektow finansowanych przez NCN), odbyte staze naukowe i otrzymane stypendia i nagrody. Biorac pod uwage duza wartosc pracy, zakres problematyki badawczej i fakt, ze badania te zostaly opublikowane w postaci trzech prac o lacznym wspolczynniku IF =

13,369 i łącznej punktacji MNiSW = 480 pkt., stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa Pana Huberta Szczerby w pełni odpowiada wymaganiom ustawowym (ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki - Dz.U. z 2016 r. poz. 882 ze zm.). W związku z tym wnoszę o jej przyjęcie przez Radę Dyscypliny technologia żywności i żywienia, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora. **Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Huberta Szczerby.**

K. Czaczyk

Katarzyna Czaczyk