

dr hab. inż. Magdalena Klimek-Ochab, prof. uczelni

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny

Politechnika Wrocławska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27

50-370 Wrocław

tel. +48 71 320 28 16

e-mail: magdalena.klimek-ochab@pwr.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Kani,

zatytułowanej

„Aminopeptydazy z rzepaku – charakterystyka i wpływ wybranych czynników na ich aktywność”

wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej pod opieką naukową Pani dr hab. inż. Danuty Gillner, prof. Pol.Śl.

Tematyka opiniowanej rozprawy dotyczy charakterystyki aminopeptydaz pochodzących z rzepaku ozimego (*Brassica napus* L. var. *napus*). Z licznych doniesień literaturowych wynika, że enzymy te odgrywają bardzo istotną rolę w fizjologii roślin na różnych etapach ich rozwoju, a co istotne są syntezowane także w odpowiedzi na pojawienie się czynników stresowych w środowisku rośliny. Biorąc pod uwagę znaczenie rzepaku dla polskiego rolnictwa i skalę jego upraw, podjęte przez Doktorantkę badania są bardzo interesujące, a uzyskane wyniki oprócz wymiaru poznawczego mają także aspekt praktyczny.

Recenzowana rozprawa jest opracowaniem naukowym, które liczy 182 strony i zawiera 28 tabel i 73 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 nazw zwyczajowych oraz opis aktywności naukowej Doktorantki, przypadający na lata realizowania pracy badawczej.

Pracę rozpoczyna krótkie *Wprowadzenie*, w którym Doktorantka syntetycznie nakreśliła przesłanki do podjęcia badań, aby na kolejnych stronach (*Cel pracy*) przedstawić zaplanowane cele badawcze. Należy podkreślić, że były to cele ambitne i z góry zakładały duży nakład pracy eksperymentalnej. W mojej opinii, ten fragment pracy powinien być jednak pozbawiony szczegółów proceduralnych, co wpłynęłoby pozytywnie na przejrzystość tekstu i jego przesłanie.

Kolejna część pracy (*Część teoretyczna*) liczy 35 stron i przygotowana została na podstawie przeszło 150 aktualnych pozycji literaturowych, a podzielona na 3 rozdziały. Zadaniem tej części jest przede wszystkim przedstawienie czytelnikowi aktualnego stanu wiedzy w zakresie tematyki doktoratu i zadanie to zostało zrealizowane, a zawarte informacje świadczą, że Pani mgr inż. Joanna Kania bez wątplenia świetnie orientuje się w temacie. Czytając jednak tę część, miałam wrażenie lekkiego przesytu, w kontekście zawarcia w niej także bardzo podstawowych, nawet podręcznikowych informacji (szczególnie dotyczy to rozdziału pierwszego) i w mojej opinii jest zupełnie niepotrzebne, podobnie jak powtarzanie niektórych danych z części literaturowej w ramach wprowadzenia do podrozdziałów z opisem wyników badań (część *Wyniki*).

Analizowany fragment rozprawy podzielony jest na dwie części tematyczne. W pierwszej Autorka bardzo szczegółowo przedstawiła charakterystykę aminopeptydaz roślinnych, w tym przybliżyła ich rolę w reakcjach obronnych rośliny w obliczu stresu, a w drugiej opisała wykorzystywaną w badaniach roślinę wraz z pewnymi aspektami jej uprawy. W przytoczonych w *Części teoretycznej* przykładach Autorka posługuje się nazwami botanicznymi, czasem są to wyłącznie nazwy polskie (np. str. 18) albo łacińskie (np. str. 19), a w przypadku niektórych roślin podawane są obydwie nazwy (str.20) – brakuje tutaj konsekwencji i porządku. Uważam, że w przypadku każdej rośliny należało wprowadzić obydwie nazwy (jeśli polska istnieje) przy pierwszym przykładzie, a później korzystać już z wybranej formy w sposób jednorodny. Dodatkowo w podrozdziale 2.3.7 (i np. na str. 11, 166) pojawiły się błędy w zapisie nazw gatunkowych mikroorganizmów (np. *Aspergillus Niger* zamiast *niger*), ale zakładam, że jest to przeoczenie związane z funkcją autokorekty edytora tekstu. Ponadto zdanie (str.37) „Zmiany takie zostały zaobserwowane po infekcji grzybami z gatunku *Fusarium*.....” powinno brzmieć „Zmiany takie zostały zaobserwowane po infekcji grzybami z **rodzaju** *Fusarium*....”. Podobne pomyłki związane z nazwami jednostek taksonomicznych zdarzają się także w części z

wynikami np. str.148. Z kolei na str.46 (podrozdział 3.3) nieprawidłowo podane są informacje związane z herbicydem glifozatem (*N*-fosfonometyloglicyną) – fosfonian wpływa hamująco na syntezę aminokwasów aromatycznych w komórkach m.in. roślin, będąc inhibitorem enzymu syntazy 5-enolopirogroniano-szikimowo-3-fosforanu (syntazy EPSP).

Kolejny fragment pracy: *Część eksperymentalna* zawiera opis zastosowanych materiałów, a także wszystkich procedur badawczych, które pozwoliły Autorce wykonać zaplanowaną pracę eksperymentalną. Trzeba tutaj podkreślić, że zastosowane techniki i procedury są różnorodne (zarówno z zakresu biochemii, mikrobiologii jak i chemii organicznej) i ich znajomość bardzo dobrze świadczy o przygotowaniu warsztatowym Doktorantki do pracy laboratoryjnej i jej wiedzy związanej z podjętą tematyką. Do tej części nie mam większych zastrzeżeń merytorycznych, ale uważam, że opisy niektórych eksperymentów i procedur wymagają uzupełnienia lub modyfikacji. W Tab.8 (str.47) dane dotyczące poszczególnych odczynników nie są kompletne – nawet w przypadku tych chemikaliów, które zostały udostępnione przez określone osoby, ale komercyjne dostępnych powinny w tabeli znaleźć się informacje o producencie. Opis metodyki podzielony jest ogólnie na dwie części – pierwsza z nich dotyczy eksperymentów na suchych nasionach rzepaku, natomiast druga dotyczy badań na siewkach. Podrozdział 4.3 zatytułowany „Ogólna metodyka oznaczania aktywności aminopeptydaz” powinien zostać zmodyfikowany. W mojej opinii, część dotycząca badań nad nasionami mogłaby zaczynać się od metody przygotowywania roślinnego ekstraktu bezkomórkowego, sposobu monitorowania stężenia białka w takim ekstrakcie (i innych próbach), metody określenia aktywności aminopeptydazowej ekstraktu i zawierać następnie opis wszystkich eksperymentów związanych z procedurą oczyszczania białka/białek z nasion wraz z ich charakterystyką. Taki układ ułatwiłby analizę stosowanych procedur. W rozdziale 4.4 Doktorantka zawarła informacje dotyczące izolacji i charakterystyki badanych enzymów, ale była dość oszczędna w słowach, opisując niełatwą przecież i wieloetapową procedurę izolacji białka. W mojej opinii opis tego typu można umieścić w publikacji, ale w przypadku pracy doktorskiej powinien być bardziej precyzyjny. Ponadto w badaniach aktywności enzymatycznej, w różnych próbach wykorzystywane są różne substraty i nie bardzo wiadomo dlaczego – takie informacje oczywiście można znaleźć w kolejnych rozdziałach, w których analizowane są uzyskane wyniki, niemniej jednak utrudnia to analizę samych procedur. W kolejnych rozdziałach (4.5 - 4.9) Pani mgr inż. Joanna Kania zawarła opis procedur badawczych

stosowanych w eksperymentach na siewkach. W tej części największe uwagi dotyczą rozdziału 4.8, w którym opisane zostały procedury z wykorzystaniem grzybów strzępkowych. Przede wszystkim brakuje informacji o pochodzeniu wykorzystywanych patogenów (czy są to izolanty, identyfikowane w kolekcji kultur, czy też szczepy zakupione w takiej kolekcji – w obydwu przypadkach należało podać ich konkretne numery). Nie wiadomo w jaki sposób hodowano używane mikroorganizmy – jaki typ podłoża, czas hodowli, warunki itp. i czym było wspomiane inokulum (jak było standaryzowane?) - czy były to spory, czy mieszanina strzępek. W jaki sposób sprawdzano efektywność infekcji? Czy badano aktywność aminopeptydazową samych ekstraktów grzybowych?

W kolejnym rozdziale znajduje się opis doświadczeń, w tym również polowych, mających na celu zbadanie wpływu 3 fungicydów na aktywność aminopeptydaz na założonym etapie rozwoju rośliny. Część metodyczną kończą dwa rozdziały – jeden, w którym Doktorantka opisała metody statystyczne zastosowane do analizy wyników, a w drugim zawarła dokładne opisy procedur syntezy chemicznej substratów wykorzystywanych w badaniach oraz wyniki ich analizy NMR.

Po przeczytaniu i analizie informacji zawartych w *Części eksperymentalnej* odniosłam wrażenie, że Pani Joanna świetnie czuje się w laboratorium (o czym świadczy bardzo duża liczba wykonanych różnorodnych eksperymentów), ale trochę brakło jej cierpliwości, aby te swoje wysiłki skrupulatnie opisać.

Na kolejnych stronach pracy Pani Joanna przedstawiła i zanalizowała wyniki badań (w rozdziale 5.), który podzielony został na określone części tematyczne. Przedstawiając otrzymane wyniki Doktorantka porównała je z danymi literaturowymi, zanalizowała, aby później wyciągnąć odpowiednie wnioski. Rozdział ten zaczyna się półstronicowym fragmentem, który kolejny raz przypomina informacje przedstawione już w *Części teoretycznej* – w mojej opinii zupełnie niepotrzebnym. Układ rozdziału 5. odpowiada układowi części eksperymentalnej, a więc zaczyna się od przedstawienia wyników eksperymentów z wykorzystaniem suchych nasion i po jej przeanalizowaniu, wzrasta moje przekonanie, że przedstawienie kolejności opisu poszczególnych eksperymentów w części metodycznej i konsekwentnie także w części z wynikami, bardzo ułatwiłoby czytanie i analizę bardzo ciekawej pracy doktorskiej. W rozdziale 5.1 zatytułowanym *Aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego – izolacja i charakterystyka* znalazłam wiele informacji, których brakowało mi w rozdziale 4.4

i ponieważ są to szczegóły techniczne, powinny być zostać zawarte w *Części eksperymentalnej*. Natomiast niedosyt budzi brak informacji związanych z samym opracowaniem szczegółów procedury oczyszczania – w pracy zawarto tylko lakoniczne zdanie „W procesie izolacji zastosowano procedury i złoża często stosowane w oczyszczaniu aminopeptydaz pochodzenia roślinnego” wraz z czterema odnośnikami literaturowymi. Czytając ten rozdział, mogłoby się wydawać, że procedura jest dosyć prosta i tylko ten, kto ma doświadczenie w oczyszczaniu białek, wie jak żmudne i pracochłonne jest dojście do momentu, w którym krok po kroku realizujemy założony cel – a w tym przypadku sytuację komplikuje obecność najprawdopodobniej więcej niż jednego enzymu/jednej formy w preparacie. W podrozdziale 5.1.3 Doktorantka zamieściła obszerną biochemiczną charakterystykę otrzymanego z nasion rzepaku białka. Badania na ekstrakcie bezkomórkowym wskazywały, że najwyższy poziom aktywności enzymatycznej obserwuje się dla substratu z *N*-końcową fenyloalaniną (co zresztą, potwierdzone zostało także w podrozdziale 5.1.3.3), a w badaniach mających na celu najpierw izolację, a potem charakterystykę enzymu z nasion rzepaku używany był substrat z leucyną (Leu-pNA). Czym był podyktowany taki wybór substratu?

Na kolejnych stronach dysertacji (w rozdziale 5.2) Doktorantka pokazała jak zmienia się aktywność aminopeptydaz w pierwszych godzinach rozwoju siewek rzepaku i na podstawie uzyskanych wyników, scharakteryzowała wpływ różnych czynników fizycznych i chemicznych na aktywność badanych enzymów, w ekstraktach bezkomórkowych ze 120 h siewek wobec 4 różnych substratów. Udowodniła, że różnice w poziomie aktywności aminopeptydaz dotyczą nie tylko samego przebiegu procesu kiełkowania nasion rzepaku, ale także poszczególnych części rośliny. Ostatnią i dość obszerną część wyników badań Pani Joanna zawarła w podrozdziałach od 5.4 do 5.7, które dotyczą wpływu różnych czynników stresowych, na które narażone były kiełkujące rośliny, na aktywność badanych enzymów. Doktorantka w tej części udowodniła zaangażowanie aminopeptydaz w mechanizmy fizjologiczne, związane z odpowiedzią na stres. Ponieważ wybór poszczególnych czynników podyktowany był próbą odtworzenia warunków naturalnych uprawy rzepaku ozimego, to uzyskane wyniki stanowią cenne informacje w kontekście stosowanych technik uprawy, w tym stosowanych zabiegów ochronnych.

W kolejnym fragmencie dysertacji, który jest zatytułowany *Podsumowanie i wnioski* Doktorantka zestawiała najważniejsze wyniki wykonanych badań i przedstawiła wnioski z nich płynące. Bardzo dobrym pomysłem jest umieszczenie w tym fragmencie Tab.28 przedstawiającej w sposób porównawczy wpływ abiotycznych czynników stresowych na aminopeptydazy z siewek rzepaku.

Na kolejnych stronach rozprawy znajduje się opis aktywności naukowej Pani mgr inż. Joanny Kani, a dysertację kończy część literaturowa obejmująca 259 pozycji. W tej części można znaleźć błędy edytorskie, związane ze sposobem prezentacji poszczególnych pozycji literaturowych, który powinien być jednolity - np. czasami Autorka używa skrótów nazw czasopism, a czasami całych nazw.

Wartości dysertacji nie obniżają błędy stylistyczne czy gramatyczne, które pojawiają się w pracy, a których nie będę wymieniała. Sygnalizowane w recenzji niedociągnięcia, sugestie i pomyłki nie wpływają istotnie na merytoryczną wartość pracy. Przedstawioną mi do oceny pracę oceniam wysoko, tym bardziej, że zawarte w niej wyniki zostały opublikowane w 2 pracach oryginalnych w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Ponadto Pani Joanna jest współautorką 3 publikacji tematycznie związanych z doktoratem, opublikowanych w wydawnictwach o zasięgu krajowym. Aktywność naukową oraz jakość uzyskanych wyników, potwierdzają także informacje o czynnym uczestnictwie Doktorantki w konferencjach naukowych o krajowym i zagranicznym zasięgu.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Kani stwierdzam, że założone cele badawcze zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki eksperymentalne są wartościowe i mają oprócz wartości poznawczej także wymiar praktyczny. Stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi formalne i merytoryczne określone obowiązującym prawem i wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Naukową Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

