

Prof. dr hab. Kazimierz Kochman
Członek Rady Naukowej IFiZZ PAN
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN
05-110 Jabłonna k. Warszawy

OCENA

rozprawy doktorskiej Mgr inż. Katarzyny Elżbiety Stan-Głasek pt.: „Zdolność wykorzystania sacharozy i polimerów fruktozy przez bakterie żwaczowe szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis*”

Po powstaniu pierwszych form życia na naszej planecie, zmiany ewolucyjne następowały powoli. Jednakże, po pojawieniu się zwierząt te zmiany nabrały dużej szybkości, oczywiście w stosunku do całego czasu istnienia ziemi.

Cała kaskada zdarzeń ewolucyjnych w świecie zwierząt zachodziła w czasie stosunkowo krótkim, od trylobitów, ryb, dużych gadów, płazów, dużych ssaków aby w końcowym wyniku uformować zwierzęta sawanny, zwierzęta drapieżne oraz naczelne.

Wydaje się, że dużą siłą sprawczą ewolucyjnego postępu jest dostępność w środowisku odpowiednich składników pokarmowych. Biologiczna odpowiedź organizmu na warunki obecne w otaczającym go środowisku i na zmiany oferujące w rezultacie dostępność właściwych składników odżywczych, które mogły służyć do ukształtowania struktur i reakcji molekularnych ważnych dla życia i formowania większej złożoności organizmu była dość szybka.

Proferor F. Jacob sformułował słynne i bardzo trafne zdanie: „*Ewolucja jest molekularnym majsterkowaniem*” (Evolution is molecular tinkering).

Tak można rozpatrywać pojawienie się żwacza u zwierząt przeżuwających, roślinożernych. Ten twór można scharakteryzować w prosty sposób używając w przenośni terminu „skomplikowanej fabryki”, w której odbywa się degradacja i przemiana cukrów o tak zmienionej strukturze, że stają się one niedostępne przy normalnym sposobie trawienia przez enzymy zwierzęcia. Cukry te zostają w żwaczu degradowane aby w rezultacie dostarczyć zarówno energii jak i składników strukturalnych dla zwierzęcia, takich jak tłuszcze i niektóre aminokwasy. Jest to więc fabryka, w której odbywają się procesy przy zastosowaniu „wyrafinowanej biotechnologii”. W ten sposób następuje przeniesienie energii w łańcuchu pokarmowym, w którym energia promieni słonecznych jest gromadzona w roślinach za pośrednictwem fotosyntezy a następnie przenoszona na herbivora (posiadających żwacz) i z kolei na carnivora, aby w ostatnim ogniwie tego łańcucha służyć człowiekowi.

Z tych powodów, procesy zachodzące w żwaczu są bardzo istotne zarówno z punktu widzenia teoretycznego jako pasja śledzenia interesujących mechanizmów biologicznych, oraz ze względów praktycznych, aby wykorzystać wyniki tych badań do poprawienia produktywności zwierząt użytkowych.

W Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonie, badania nad mikrobiologią żwacza oraz nad biologią zasiedlających go poszczególnych mikroorganizmów były

prowadzone w wielkich sukcesach od początku istnienia Instytutu przez dr Aleksandra Zioleckiego i jego zespół. Obecnie, jego dzieło naukowe kontynuuje prof. dr hab. Tadeusz Michałowski wraz z zespołem młodych, utalentowanych i ambitnych badaczy.

Obecna Rozprawa Doktorska jest dalszym ciągiem i kontynuacją badań tego zespołu. W ocenianych badaniach, przedmiotem szeregu eksperymentów były bakterie żwacza owiec szczepu k3, wyizolowane ze żwacza na podłożu uzupełnionym fruktanem z tymotki a wcześniej zidentyfikowane jako *Butyrivibrio fibrisolvens*.

Na samym początku swych badań, Autorka wykonała analizę genetyczną tej bakterii i jednoznacznie stwierdziła, że należy ona do gatunku *Pseudobutyrvibrio ruminis*. Jest to jej pierwsze osiągnięcie badawcze w serii dalszych badań, prowadzących do sformułowania Rozprawy doktorskiej.

Autorka obrała jako przedmiot badań następujące, nierozwiązane dotąd zagadnienia i problemy naukowe:

1. Wspomniana wcześniej weryfikacja przynależności gatunkowej szczepu bakterii, będącego obiektem badań w ramach tej rozprawy.
2. Określenie zdolności szczepu k3 bakterii *Pseudobutyrvibrio ruminis* do wzrostu na podłożu uzupełnionym sacharozą lub polimerami fruktozy jako jedynym źródłem węgla.
3. Określenie zdolności trawienia sacharozy oraz oligomerów i polimerów fruktozy przez ten szczep bakterii i określenie enzymów katalizujących ten proces oraz identyfikacja i charakterystyka tych enzymów.
4. Zbadanie zdolności bakterii szczepu k3 do fermentacji sacharozy, oligomerów i polimerów fruktozy i glukozy oraz charakterystyka głównych produktów końcowych metabolizmu węglowodanów.

Rozprawa doktorska jest dziełem obszernym, napisanym pięknym językiem, ze zwróceniem uwagi na dobór właściwych słów w określaniu systematyki bakterii, zjawisk biologicznych, biologii molekularnej czy procesów enzymatycznych. Pragnę pochwalić ten sposób pisania rozpraw naukowych, które czytelnikowi wydają się tekstem, w który Autor wkłada nie tylko osobisty styl pisanie ale także część swego ducha.

Rozprawa liczy 172 strony i składa się z 10 rozdziałów:

1. Wstęp, 2. Materiał i metody, 3. Wyniki, 4. Dyskusja, 5. Wnioski, 6. Spis literatury, 7. Spis tabel, 8. Spis rysunków, 9. Streszczenie, 10. Abstract

We wstępie Autorka dała wykład o teoretycznych przesłankach i aktualnej i szerokiej wiedzy na tematy będące przedmiotem badań. Tymi tematami są ssaki roślinożerne, węglowodany strukturalne, węglowodany zapasowe, enzymy uczestniczące w rozkładzie fruktanu i sacharozy, właściwości żwacza i jego znaczenie dla zwierząt przeżuwających, drobnoustroje żwacza i ich właściwości rozkładu węglowodanów strukturalnych oraz przedstawiła także hipotezę roboczą Rozprawy i sposób jej weryfikacji.

W tym rozdziale Autorka umieściła 3 rysunki.

Rozdział 2. Materiał i metody - zawiera opis stosowanych metod eksperymentalnych w rozwiązywaniu problemów naukowych Rozprawy.

Autorka wykonała oznaczenia masy cząsteczkowej enzymów dwiema metodami; metodą sączenia molekularnego oraz metodą elektroforezy.

Do badania kinetyki częściowo oczyszczonych enzymów używała enzymów oczyszczonych metodą sączenia molekularnego. Określała zdolności fermentacyjne bakterii na podstawie wyników pomiarów stężenia krótko-łańcuchowych kwasów tłuszczowych (KKT) wydzielonych do podłoża podczas inkubacji tych bakterii z węglowodanami, które stanowiły jedyne źródło węgla.

Pomiar kwasów tłuszczowych wykonała metodą chromatografii gazowej z zastosowaniem chromatografu gazowego HP 5890 Series (Hewlett-Packard) wyposażonego w kolumnę kapilarną i detektor płomieniowo-jonizacyjny.

Podkreślam wielką dbałość Autorki o precyzyjny opis stosowanej metodyki, aby można było powtórzyć każdy eksperyment w innych laboratoriach bez problemów metodycznych.

Obliczenia wyników analiz eksperymentalnych i obliczenia statystyczne wykonała przy zastosowaniu programów Excel 2003 i Statistica 10.0. Obliczenia statystyczne wykonała metodą jedno- i dwuczynnikowej analizy wariancji, po wcześniejszym sprawdzeniu jednorodności wariancji testem Levene'a. Istotność różnic między średnimi wartościami określała testem najmniejszej istotnej różnicy (NIR). W przypadku wariancji niejednorodnych stosowała nieparametryczny test Kruskal-Wallis i test mediany.

W tym rozdziale Autorka umieściła 1 tabelę i 1 rysunek.

Rozdział 3. – Wyniki zawierają rezultaty przeprowadzonych badań. W tym rozdziale umieściła 4 tabele i 41 rysunków.

Rozdział 4. – Dyskusja zawiera omówienie wyników własnych badań na tle badań światowych w tej dziedzinie.

Rozdział 6. – Spis literatury - Cytowana literatura to 230 pozycji piśmiennictwa naukowego, starannie dobrane do zagadnienia opracowanego w Rozprawie.

WYNIKI BADAŃ

Autorka przeprowadziła badania nad enzymami u bakterii szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis* w surowym preparacie enzymatycznym, w jego frakcji nadsącza, frakcji rozpuszczalnej a także w podfrakcjach. Wykazała, że zdolność rozkładu węglowodanów przez poszczególne frakcje zależała od węglowodanu dodanego do podłoża, na którym te bakterie hodowano. Surowy preparat enzymatyczny bakterii hodowanych na fruktanie z tymotki rozkładał najszybciej właśnie ten węglowodan. Surowy preparat enzymatyczny bakterii hodowanych na podłożu z inuliną i sacharozą rozkładał najszybciej sacharozę. Surowe preparaty bakterii hodowanej na podłożach uzupełnianych cukrami prostymi, a zwłaszcza fruktozą, posiadały o wiele mniejszą aktywność degradacyjną w porównaniu do innych preparatów. Te, starannie wykonane eksperymenty, narzucają jednoznaczny wniosek, że węglowodany dodawane do podłoża hodowlanego są czynnikiem wybiórczo indukującym syntezę poszczególnych enzymów fruktanolitycznych i sacharolitycznych w komórkach badanej bakterii.

Następnym etapem badań była identyfikacja i charakterystyka enzymów w surowym preparacie enzymatycznym, w jego frakcji sedymentującej, frakcji rozpuszczalnej oraz w podfrakcjach frakcji rozpuszczalnej wykazujących dużą aktywność enzymatyczną. Autorka w wyniku szczegółowych analiz zidentyfikowała 4 enzymy. Dwa enzymy katalizowały wyłącznie rozkład fruktanu z tymotki, czyli polimeru w którym reszty fruktozylowe są połączone wiązaniami β -2,6-glikozydowymi. Stwierdzono, że końcowymi produktami rozkładu substratu były frukto-oligosacharydy, złożone z dwóch do sześciu reszt fruktozylowych. Oba te enzymy należą do fruktanohydrolaz 2,6- β -D-fruktanu (EC 3.2.1.65), których potoczna nazwa brzmi endolewanazy. Te enzymy wykazywały największą

aktywność katalityczną przy pH mieszaniny reakcyjnej jest 6,0 a temperatura optymalna reakcji wynosiła 45⁰ C. Mas cząsteczkowa została oznaczona odpowiednio 60,000 i 53,000. Stała Michaelisa (K_m) tych endolewanaz wynosiła odpowiednio 0,75% oraz 1,75% a maksymalna szybkość reakcji (V_{max}) wynosiła odpowiednio 2,03 μM fruktozy/mg białka substratu na minutę oraz 2,6 μM fruktozy/mg białka na minutę. Swoista aktywność częściowo oczyszczonych endolewanaz wynosiła odpowiednio 0,13 i 0,23 μM uwolnionego produktu/mg białka na min.

W dalszych ustaleniach i badaniach, Autorka zidentyfikowała następnego enzym, który okazał się niesspecyficzną β-fruktofuranazydazą, określaną także jako fruktohydrolaza β-D-fruktanu (EC 3.2.1.80) albo fruktohydrolaza β-D-fruktofuranazydów (EC 3.2.1.26). Ten enzym katalizuje rozkład sacharozy oraz odłączenie końcowej reszty fruktozylowej od polimerów fruktozy, w których reszty fruktozy są połączone wiązaniami β-2.6 (lewan) oraz β-2.1 (inulina) glikozydowymi. Ciężar cząsteczkowy tego enzymu wynosi 121,000. Ten enzym katalizuje najszybciej rozkład inuliny gdy w mieszaninie reakcyjnej pH wynosiło 6,5 a fruktanu z tymotki oraz sacharozy - 6,0. Optymalna temperatura reakcji 40⁰ C. Enzym nie wysycił się substratem w obecności sacharozy a zależność między szybkością rozkładu sacharozy a jej stężeniem w mieszaninie reakcyjnej była prostoliniowa. Taka zależność nie pozwoliła wyznaczyć stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej reakcji rozkładu.

Czwartym zidentyfikowanym przez Autorkę enzymem była fosforylaza sacharozy. Opisany enzym posiada również nazwę - glukotransferaza dwusacharydu (EC 2.4.1.7). Końcowymi produktami rozkładu sacharozy była fruktoza, glukozo-1-fosforan a także mała ilość glukozy. Enzym ten nie posiadał cech przypisywanych enzymowi syntazie. Jego aktywność była zależna od obecności fosforu nieorganicznego w mieszaninie reakcyjnej przy czym stężenie optymalne jonów fosforanowych wynosiło 56 mM. Optymalne pH dla aktywności tego enzymu zostało przez Autorkę określone jako 6,0, a optymalna temperatura reakcji 45⁰ C. Stała Michaelisa (K_m) formowania się glukozo-1-fosforanu wynosiła 4,4 mM sacharozy a uwalniania fruktozy 6,39 mM sacharozy. Szybkość maksymalna (V_{max}) reakcji syntezy glukozo-1-fosforanu i uwalniania fruktozy z rozkładanej sacharozy wynosiły 1,19 mM i 1,56 mM produktu/mg białka na min. Przy dalszej charakterystyce tego enzymu okazało się, że posiada on również pewne zdolności do katalizowania hydrolizy sacharozy, która prawdopodobnie wspomagała fosforolizę przy wyższych stężeniach substratu w mieszaninie reakcyjnej. Autorka wykryła także, że fosforylaza sacharozy była obecna w surowych preparatach enzymatycznych badanej bakterii, hodowanych na fruktanie z tymotki, inulinie i sacharozie.. Swoista aktywność częściowo oczyszczonej fosforylasy wynosiła 0,29 μM uwolnionego produktu białka na min., a ciężar cząsteczkowy wynosił 48,000.

Autorka przeprowadziła również badania fermentacyjne poddając inkubacji indywidualne węglowodany z badaną bakterią. Podczas tej fermentacji tworzył się i był uwalniany do podłoża głównie kwas masłowy i kwas l-mlekowy. Ich stężenie w podłożu było większe rosło się wraz postępującym czasem inkubacji.. W przypadku inuliny, fermentacja była mała natomiast duży przyrost mleczanu dawała fermentacja sacharozy i fruktanu z tymotki. Autorka oznaczyła tempo syntezy kwasu masłowego, które było w przedziale od 0,1 do 0,35 μM/mg białka bakteryjnego/ godzinę i kwasu L-mlekowego, którego produkcja była w przedziale od 0,30 do 7,35 μM/mg białka bakteryjnego/godzinę i zawsze zależała od okresu inkubacji i od węglowodanu poddanego fermentacji.

Udowodniła więc, że fermentacja prowadząca do kwasu L-mlekowego była podstawową drogą przemian węglowodanów w komórkach bakterii szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis*.

Z tych wyników badań można sformułować stwierdzenie, że ta bakteria jest dobrze zaadaptowana do fermentacji i wykorzystywania węglowodanów traw, będących podstawowym źródłem naturalnej paszy przeżuwaczy.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów, po ich opracowaniu i ocenie, Autorka sformułowała następujące wnioski, mające pełne udokumentowanie i uzasadnienie w uzyskanych przez nią wynikach badań:

1. Podłoża hodowlane, uzupełnione sacharozą lub węglowodanami złożonymi z fruktozy, zaspokajało zapotrzebowanie bakterii żwaczowych szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis* na składniki odżywcze, które umożliwiały rozwój populacji tych bakterii w warunkach *in vitro*.
2. Bakterie szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis* wykorzystywały sacharozę i określone inne polimery fruktozy dzięki zdolnościom syntezy enzymów katalizujących rozkład tych węglowodanów.
3. Szczep k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis* posiadał zdolność biosyntezy swoistej endolewanazy oraz fosforylasy sacharozy i nieswoistej β -fruktofuranazydazy. Synteza i aktywność tych enzymów mogła być indukowana obecnością węglowodanów w podłożu hodowlanym dodawanych do tego podłoża jako źródło węgla.
4. Aktywność enzymu endolewanazy była ukierunkowana wyłącznie na katalizowanie rozkładu fruktanu z tymotki a fosforylaza sacharozy na trawienie sacharozy. Nieswoista β -fruktofuranazydaza posiada ogólne zdolności katalityczne uczestnicząc w rozkładzie wszystkich badanych węglowodanów.
5. Rozkład sacharozy a także frukto-oligosacharydów i inulo-oligosacharydów był prawdopodobnie procesem wewnątrzkomórkowym. Rozkład wielkocząsteczkowego fruktanu z tymotki na frukto-oligosacharydy był natomiast procesem pozakomórkowym, który katalizuje swoista endolewanaza, związana prawdopodobnie z błoną zewnętrzną komórek bakterii.
6. Nieobecność endoinulinazy w badanych preparatach enzymatycznych sugeruje niezdolność bakterii szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis* do jej syntezy i wykorzystania wielkocząsteczkowej inuliny.
7. Rozkład fruktanu z tymotki i inulo-oligosacharydów miał charakter hydrolityczny. Trawienie sacharozy odbywało się na drodze fosforolizy, która była wspomagana trawieniem hydrolitycznym przy wyższych stężeniach substratu, przy czym obydwie te procesy katalizowała fosforylaza sacharozy.
8. Produkty trawienia sacharozy oraz polimerów i oligomerów fruktozy a także cukry proste były wykorzystywane przez bakterie jako źródło węgla, którego przemiany dostarczały im energii zużywanej następnie w reakcjach anabolicznych, takich jak synteza białka. Skład produktów ubocznych usuwanych do podłoża sugeruje, że bakterie szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis* nie posiadały albo nie wykorzystywały szlaków przemian, które mogły dostarczyć im większą porcję energii z węglowodanów ulegających fermentacji.
9. Zdolność wykorzystania sacharozy oraz fruktanu z tymotki i inulo-oligosacharydów przez bakterie szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis* oraz niezdolność wykorzystania wielkocząsteczkowej inuliny może sugerować ich przystosowanie do

użytkowania węglowodanów występujących przeważnie w trawach, które są stałym składnikiem naturalnej diety przeżuwaczy.

Po przeczytaniu rysunku 3.3 na stronie 42, bardzo wartościowego i pięknego, odczułem pewien niedosyt z powodu zbyt małego opisu umieszczonego w nim drzewa filogenetycznego niektórych bakterii żwacza. Jest to na pewno spowodowane bardzo krótkim czasem, którym Autorka dysponowała, na ostatnim etapie przygotowania manuskryptu. Sugeruję, aby w najbliższej przyszłości, Autorka jeszcze przeanalizowała swoje i innych autorów, ustalenia sekwencji i sprawdziła, czy można z *synteny* w sekwencji genów wnioskować o tym, czy te geny są wzajemnymi *ortologami* czy *paralogami* i jak przebiegała ścieżka przystosowań genomu bakterii do warunków dostępności określonego pokarmu. Nie jestem zbyt mocny w tej dziedzinie więc proszę potraktować to co napisałem jako moją nieśmiałą sugestię. Ta moja mała uwaga nie umniejsza nawet w najmniejszym stopniu mojej bardzo wysokiej oceny Rozprawy.

Autorka prowadziła i wykonywała eksperymenty w laboratorium dość długi okres czasu. Dbała o to aby były wykonane bardzo starannie i powtórzone. Dało to w końcowym wyniku efekt znakomity.

Gdy sięgam swoją pamięcią do początków istnienia laboratorium mikrobiologicznego w Instytucie w Jabłonie to taki był w nim styl pracy od początku. Pierwszy kierownik, dr Aleksander Ziotecki i dr Maria Wojciechowicz spełniali się w badaniach, niekoniecznie dbając o to aby szybciej otrzymać następny awans akademicki. Również obecny zespół prof. Tadeusza Michałowskiego przejął taki sam styl pracy.

O takich laboratoriach i pracujących w nich uczonych powiedział **Ludwik Pasteur (1822-1895)**, twórca mikrobiologii, dobroczyńca ludzkości, to piękne zdanie :

„ Les laboratoires, demeures sacrées, où notre l'humanité grandit, se fortifie et devient meilleure.”

(Laboratoria – miejsca święte, gdzie nasz humanizm i humanitaryzm wzrasta, wzmacnia się i staje się lepszym).

Podsumowując moja ocenę , stwierdzam, że Mgr inż. Katarzyna Elżbieta Stan-Głasek jest młodym, bardzo utalentowanym i bardzo pracowitym pracownikiem naukowym a Rozprawa doktorska jest jej bardzo wartościowym dziełem eksperymentalnym, świadczącym o wielkich możliwościach twórczych i eksperymentalnych Autorki. Rozprawa ta jest wielkim osobistym osiągnięciem naukowym Autorki a także zespołu, w którym pracuje i całego Instytutu w Jabłonie.

Dlatego stwierdzam, z moim głębokim przekonaniem i posiadaną wiedzą, że Rozprawa Doktorska Mgr Katarzyny Elżbiety Stan-Głasek pt.:” Zdolność wykorzystania sacharozy i polimerów fruktozy przez bakterie żwaczowe szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis*” jest oryginalną rozprawą badawczą, noszącą cechy nowości naukowej a opisane eksperymenty i wyniki są rezultatami właściwych i prawidłowo zastosowanych metod, przynosząc konkretne i ważne odkrycia naukowe oraz poszerzenie istniejącej już wiedzy w zakresie badanego tematu naukowego. Spełnia ona wszystkie warunki i wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 roku o

stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 z 16 kwietnia 2003 r., poz. 595) wraz ze zmianami wprowadzonymi Ustawą – Prawo o szkolnictwie wyższym z dnia 27 lipca 2005 r. (Dz.U. Nr 164 poz. 1365).

Dlatego formułuję i przedstawiam następujący wniosek końcowy mojej oceny, najpierw w uniwersalnym języku akademickim a następnie w języku polskim:

Illustrium Consilium Scientiarum Jabloniensis, Honestissimi atque Sapientissimi iudici sapientiae atque scientiae, excerpti ex nobilissimis et amplissimis Facultatibus Biologiae Polonorum: queso acceptare dissertationem Dominae Katarzyna Elżbieta Stan-Głasek summa cum laude.

Nil amplius oro !!!

Wielce Szanowny Przewodniczący Rady Naukowej i Wysoka Rado Naukowa Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie : wnioskuję i proszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani Magister inż. Katarzyny Elżbiety Stan-Głasek z najwyższą pochwałą i najwyższym wyróżnieniem.



Prof. dr hab. Kazimierz Kochman

Jabłonna, 3 lipca 2013 r.