



Dr hab. Justyna Ruchała, prof. UR  
Doktor habilitowany w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych,  
dyscyplinie nauki biologiczne  
Profesor nadzwyczajny Uniwersytetu Rzeszowskiego

Rzeszów, 10/05/2023

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**Mgr inż. Patrycji Szczepańskiej**

pt. „*Produkcja związków bioaktywnych z wykorzystaniem drożdży *Yarrowia lipolytica**”

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Patrycji Szczepańskiej została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Zbigniewa Lazara z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, drugim promotorem jest dr hab. Andrzej Rapak z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Praca doktorska realizowana była w toku realizacji projektu „BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii” współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy produkcji związków aktywnych przez drożdże *Yarrowia lipolytica*, tj. fosfatydylocholiny oraz resweratrolu. Zarówno zagadnienia związane z zagospodarowaniem odpadowego substratu, jakim bez wątpienia jest gliceryna, który wykorzystywano do produkcji fosfatydylocholiny przez drożdże *Y. lipolytica*, jak i zwiększony popyt na produkcją nutraceutyków wynikający z faktu, że obecnie wiek ok. 10% populacji świata przekracza 65 lat są wysoce istotnymi zagadnieniami dla współczesnych biotechnologów, stąd rozwój badań w tej tematyce uważany jest za priorytetowy.

Na całość pracy doktorskiej składa się 6 rozdziałów głównych. Praca zawiera przy tym wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wraz z suplementami, streszczenie w języku polskim i języku angielskim, dorobek naukowy oraz oświadczenia współautorów publikacji o ich wkładzie w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.



Jako podstawę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycja Szczepańska przedstawia jedną pracę przeglądową oraz trzy oryginalne publikacje naukowe. Z oświadczeń Doktorantki oraz współautorów tychże publikacji wynika, że we wskazanych publikacjach opracowywała Ona metodologię, prowadziła badania laboratoryjne, analizy ilościowe oraz jakościowe, a także brała udział w merytorycznym opracowywaniu wyników oraz ich dyskusji, była również autorem manuskryptów. Zatem warunek dotyczący umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę uważam za w pełni spełniony.

Wprowadzeniem w tematykę rozprawy doktorskiej jest jej **Wstęp**. Doktorantka osadza tematykę podejmowanych przez siebie badań popierając ją informacjami zaczerpniętymi z światowej literatury naukowej. Podejmuje Ona próby oceny dotychczas wykorzystywanych metod produkcji nutraceutyków, uwzględniając również ich niedoskonałość oraz problemy. Następnie pokrótce omawia dotychczas poznane mikroorganizmy olejogenne, skupiając się szczególnie na gatunku *Y. lipolytica*. Należy jednak podkreślić, że recenzowana rozprawa podejmuje temat produkcji dwóch zupełnie różnych związków aktywnych tj. fosfolipidów i rezweratrolu, w obu przypadkach wykorzystywany jest jako substrat do produkcji glicerol oraz modyfikowane szczepy drożdży *Y. lipolytica* jako producenci. Trudno o wyodrębnienie wspólnego podejścia metodologicznego dla rozwiązania obu wspomnianych problemów, gdyż szlaki biosyntezy tych związków są zupełnie inne. Z ciekawości Recenzenta nasuwa się pytanie – co było pierwotnym przyczynkiem do sformułowania takiej koncepcji rozprawy doktorskiej?

Kolejny rozdział to **Cele badań**, przedstawione w sposób jasny i odpowiadający tematowi rozprawy doktorskiej.

Pierwsza publikacja prezentowana jako podstawa rozprawy doktorskiej to praca przeglądowa (*Critical Review in Biotechnology*, 2022). Warto podkreślić jest szczegółowość prezentowanego przeglądu, a co za tym idzie jego merytoryczna wartość. W niniejszym przeglądzie omówione zostały najnowsze trendy i wyzwania dotyczące strategii inżynierii metabolicznej oraz genetycznej wykorzystywane w kierunku poprawy produkcji cennych lipidów, takich jak kwas eikozapentaenowy, kwas dokozaheksaenowy, kwas linolowy, kwas  $\gamma$ -linolenowy, ponadto opisano również mniej powszechne pochodne kwasów tłuszczowych takie jak woski, laktany oraz kwasy dikarboksylowe. Praca jest cennym materiałem źródłowym dla specjalistów w dziedzinie badań nad lipidami produkowanymi przez drożdże olejogenne oraz podsumowuje najnowsze badania w tej tematyce również wykorzystujące metody biologii syntetycznej, co umożliwiło bezpośrednią produkcję lipidów czyniąc proces bardziej opłacalnym.

Kolejno przedłożona została praca oryginalna (*International Journal of Molecular Sciences*, 2022), której głównym założeniem było zbadanie możliwości produkcji fosfolipidów (głównie fosfatydylocholiny) przez drożdże *Y. lipolytica*. W tym celu na drodze inżynierii genetycznej wyizolowano odpowiednie szczepy *Y. lipolytica*, charakteryzujące się nadekspresją genów zaangażowanych w szlak biosyntezy fosfolipidów w różnych



kombinacjach, jak również z delecją genów odpowiedzialnych za ich degradację. Kolejno w celu zwiększenia produkcji fosfolipidów wykorzystując glicerol jako substrat, zdecydowano się na nadekspresję genu kodującego kinazę glicerolu (*GUT1*) oraz nadekspresję kinazy diacyloglicerolowej (*DGK1*). Zgodnie z założeniem pozwoliło to na niemal 3-krotne zwiększenie produkcji fosfolipidów. Niestety nie prowadzono inżynierii szlaku bezpośrednio uczestniczącego w biosyntezę fosfolipidów. Zastanawia mnie jednak czy badano konsumpcję glicerolu przez badane szczepy drożdży? Czy wysokie stężenie glicerolu nie wpływało negatywnie na produkcję fosfolipidów przez badane transformaty? Jaka była produktywność procesu?

Następna, przedłożona jako podstawa rozprawy doktorskiej praca opublikowana została w czasopiśmie *Metabolic Engineering Communications* (2020), dotyczy ona produkcji resweratrolu przez modyfikowane szczepy drożdży *Y. lipolytica* na podłożu z glicerolem. Autor opisuje doświadczenia dotyczące pomyślnej ekspresji heterologicznych genów syntezy polifenolu resweratrolu z fenyloalaniny oraz tyrozyny. Uzyskano dość wysokie stężenia resweratrolu, co stwarza perspektywę dla dalszego ulepszania producentów w przyszłości. Należy jednak zaznaczyć, że w tej bardzo konkurencyjnej dziedzinie innym autorom udało się skonstruować bardziej wydajnych producentów resweratrolu wykorzystując ten sam organizm, tj. *Y. lipolytica*. Nasuwa się zatem pytanie – jakie są kolejne plany Doktorantki w tej tematyce? Natomiast jeśli takich planów nie ma, to jaki kierunek dalszych badań, zdaniem Doktorantki należałoby obrać poprawić produkcję resweratrolu przez badane szczepy?

Czwarta praca Pani mgr inż. Patrycji Szczepańskiej odbiega od poprzednich, gdyż jest to multidyscyplinarna praca dotycząca badania wpływu pochodnych lipidowych resweratrolu na właściwości przeciwnowotworowe i antyoksydacyjne w ludzkich komórkach nowotworowych. Praca opublikowana została w *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. Doktoranta udowodniła, że badane pochodne resweratrolu znacząco obniżały żywotność badanych linii komórek nowotworowych, nie wykazując przy tym takiego wpływu na komórki fibroblastów. W przypadku estru resweratrolu z kwasem oleinowym zaobserwowano mocną indukcję apoptozy komórek nowotworowych. Badane związki wykazały również specyficzne działanie antyoksydacyjne na normalne komórki fibroblastów. Dane te pokazują wysoki potencjał badań w tym kierunku, jednak przyczyny zaobserwowanej swoistości działania pochodnych lipidowych resweratrolu na komórki nowotworowe nie zostały w pełni wyjaśnione. Czy Doktorantka potrafi wskazać potencjalne przyczyny tego zjawiska?

Wnioski pracy przytoczone są na stronie 107, odpowiadają one treści wyżej wymienionych publikacji naukowych.

Wszelkie moje uwagi nie wpływają jednak na poziom naukowy i merytoryczny przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej, a wynikają jedynie z ciekawości naukowej Recenzenta.



Na dorobek naukowy Doktorantki składa się ponadto 6 publikacji naukowych w czasopiśmie z listy JRC. Ponadto Doktorantka zrealizowała dwa zagraniczne staże naukowe (Imperial College Londyn, Wielka Brytania; Monash University, Melbourne, Australia), których tematy ściśle korespondują z tematyką pracy doktorskiej. Była również wykonawcą jednego projektu naukowego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki – Opus, a także kierownikiem projektu Innowacyjny Doktorat. Dodatkowo Doktorantka była współautorem 7 doniesień konferencyjnych, szkoda jednak, że nie wskazała czy była autorem prezentującym oraz czy forma prezentacji to poster czy prezentacja ustna.

Recenzowana przeze mnie praca doktorska mgr inż. Patrycji Szczepańskiej wykonana jest z zachowaniem właściwej metodologii badań biologicznych. Na uwagę zasługuje fakt wykorzystania surowców odpadowych do produkcji związków bioaktywnych. Takim surowcem bez wątplenia jest glicerol, którego głównym źródłem jest produkcja estrów kwasów tłuszczowych tj. biodiesla. Co istotne, jak do tej pory nie znaleziono skutecznego sposobu jego zagospodarowania, stąd najczęściej znajduje on zastosowanie techniczne przy produkcji m.in. środków antyadhezyjnych, a także jest wykorzystywany jest w biogazowniach. Z uwagi zatem na fakt tak ogromnej produkcji glicerolu będącego odpadem, przemysł petrochemiczny wciąż poszukuje skutecznych oraz opłacalnych sposobów jego utylizacji, stąd wyniki otrzymane w niniejszej pracy doktorskiej, po odpowiednich optymalizacjach produkcji, w perspektywie mają ogromny potencjał aplikacyjny. Uważam, iż rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwinięcie podejmowanego problemu naukowego, również o wysokim stopniu aplikacyjności.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Patrycji Szczepańskiej pt. „pt. „Produkcja związków bioaktywnych z wykorzystaniem drożdży *Yarrowia lipolytica*” spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc po uwagę wysoki poziom niniejszej rozprawy doktorskiej zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Szczepańskiej stosownym wyróżnieniem przyjętym w Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu.

Rzeszów, 10.05.2023 r.