



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Kraków, dn. 16 maja 2023 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Patrycji Szczepańskiej, pt. „Produkcja związków bioaktywnych z wykorzystaniem drożdży *Yarrowia lipolytica*”

z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Promotorzy: prof. dr hab. inż. Zbigniew Lazar
dr hab. Andrzej Rapaka, prof. nadzw. PAN

Praca doktorska przedłożona do recenzji składa się z cyklu 4 artykułów opublikowanych w czasopismach znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR) – sumaryczny współczynnik oddziaływania (*impact factor*) wynosi 21,496 (w oparciu o bazę Web of Science), zaś punktacja krajowa MEiN = 490 punktów. Pierwsza praca cyklu jest artykułem przeglądowym i stanowi doskonale wprowadzenie w tematykę całego doktoratu.

Rozprawa doktorska liczy w sumie 133 strony. Całość została skomponowana w następujący sposób: Wstęp; Cele pracy; Komentarze do publikacji (wraz z reprodukcjami tychże publikacji); Podsumowanie; Wnioski końcowe; Literatura; Dorobek naukowy; Załączniki.

Temat pracy dotyczył badań zdolności drożdży *Y. lipolytica* do syntezy dużych ilości fosfolipidów, zwłaszcza fosfatydylocholiny oraz resweratrolu (RES) przy zastosowaniu substratu jakim był glicerol. Ogólnie, tematyka badań wpisuje się w aktualny nurt poszukiwań tanich i ekologicznych metod biosyntezy nutraceutyków. W pracy znajdujemy także wątek dotyczący badań nad właściwościami prozdrowotnymi RES, a zatem praca doktorska ma charakter interdyscyplinarny.

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysa 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Wstęp liczy 15 stron i zawiera część wprowadzającą czytelnika w problematykę pracy doktorskiej. Ogólnie charakteryzuje mikroorganizmy olejogenne oraz bardziej szczegółowo drożdże produkujące substancje lipidowe. Następnie Doktorantka szczegółowo charakteryzuje *Y. lipolytica* w kontekście ich biotechnologicznych zastosowań. Dalej znajduje się zwięzły opis fosfolipidów oraz resweratrolu i ich biosyntezę w komórkach mikroorganizmów. Na końcu został zamieszczony podrozdział traktujący o lipidowych modyfikacjach RES, celem poprawy jego aktywności i biodostępności. Ta część pracy doktorskiej stanowi bardzo dobrą merytoryczną podbudowę dla zrozumienia części eksperymentalnej i wyników uzyskanych w przez Doktorantkę.

Cele pracy główne zostały precyzyjnie określone: „*wydajna mikrobiologiczna synteza wybranych związków charakteryzujących się aktywnością biologiczną z wykorzystaniem transformantów drożdży Y. lipolytica*” (tj. fosfolipidy oraz resweratrol) oraz „*ocena właściwości przeciwnowotworowych i antyoksydacyjnych estrów resweratrolu i wybranych kwasów tłuszczowych na wybranych ludzkich liniach nowotworowych*”.

Cele główne zostały sprecyzowane jako 6 celów szczegółowych:

1. *uzyskanie transformantów Y. lipolytica o zwiększonej zdolności do produkcji fosfolipidów poprzez inżynierię metabolizmu natywnego szlaku biosyntezy tych związków;*
2. *uzyskanie transformantów drożdży Y. lipolytica wydajnie syntetyzujących resweratrol w szlaku katabolizmu tyrozyny i fenyloalaniny;*
3. *optymalizację warunków hodowli transformantów drożdży Y. lipolytica w celu wydajnej biosyntezy zarówno resweratrolu jak i fosfolipidów w warunkach bioreaktorowych;*
4. *uzyskanie estrów resweratrolu z kwasami: palmitynowym, oleinowym i sprzężonym kwasem linolowym metodą syntezy chemicznej;*
5. *ocenę wpływu lipidowych pochodnych resweratrolu na żywotność ludzkich komórek nowotworowych linii BxPC3, A549, HT29 oraz ich wpływu na zdrowe komórki linii BJ, stanowiące grupę kontrolną, poprzez analizę cytotoksyczności, apoptozy i ekspresji głównych genów apoptotycznych;*



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

6. ocenę właściwości antyoksydacyjnych lipidowych pochodnych resweratrolu poprzez pomiar ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej, będącej kluczowym enzymem ochrony antyoksydacyjnej organizmu.

W kolejnej części pracy liczącej w sumie 78 stron znajdują się tzw. „komentarze do publikacji” w liczbie 4, które stanowią streszczenie artykułów stanowiących cykl pracy doktorskiej. Takie podejście bardzo ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z treścią naukową i w razie potrzeby stanowi dogodny punkt wyjścia do szczegółowej lektury artykułów.

Pierwsza praca jest artykułem przeglądowym i wprowadzającym w tematykę doktoratu. Drugi artykuł przedstawia opis opracowanej przez autorów oraz Doktorantkę platformy do wydajnej produkcji fosfolipidów przez drożdże *Y. lipolytica*. Artykuł jest także dowodem świetnej znajomości technik inżynierii genetycznej przez Doktorantkę. Trzecia praca dotyczyła skonstruowania szczepów *Y. lipolytica* zdolnych do biosyntezy RES. Ostatni artykuł cyklu doktorskiego przedstawia badania nad właściwościami przeciwnowotworowymi i antyoksydacyjnymi lipidowych pochodnych RES – te prace prowadzono na ludzkich liniach nowotworowych raka płuc, gruczolaka jelita grubego, gruczolaka trzustki oraz fibroblastów.

Podsumowanie liczy 2 strony tekstu i jest syntetycznym opisem uzyskanych wyników. Doktorantka wskazuje na ogromny potencjał drożdży *Y. lipolytica* do produkcji zwiększonych ilości zarówno związków lipidowych - fosfolipidów, jak i związków polifenolowych i opisuje kluczowe osiągnięcia.

Rozdział Wnioski zawiera 7 punktów i zdaniem recenzenta są one wyważone oraz obiektywne.

Spis literatury to 125 pozycji, w zdecydowanej większości nowych lub najnowszych (2023), ale znalazły się także bardziej historyczne (1972), jednakże ich zacytowanie było

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysza 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

merytorycznie uzasadnione. Tak bogata lista literatury świadczy o tym, że Doktorantka doskonale orientuje się w tematyce badań jakie prowadziła i śledzi najnowsze doniesienia w tej dziedzinie.

Zamieszczenie spisu dorobku naukowego nie jest niezbędne do wykazania w postępowaniu doktorskim w aspekcie oceny recenzenta jednak dopełnia obrazu sylwetki naukowej Doktorantki, która aktywnie bierze udział w konferencjach naukowych oraz stażach, a także w realizacji grantów badawczych.

Załączniki zawierają oświadczenia współautorów prac stanowiących cykl doktorski i wskazują na dominującą rolę Doktorantki w prowadzeniu badań oraz przygotowywaniu manuskryptów artykułów.

Podczas lektury pracy nasunęły mi się dodatkowe pytania, na które odpowiedzi doprecyzują informacje zawarte w tekście rozprawy doktorskiej:

1. Jaka jest zaleta estrów resweratrolu z kwasami długołańcuchowymi, kiedy wiadomo, że wiele jego pochodnych jest szybko metabolizowanych i wydalanych z organizmu nigdy nie osiągając stężeń zastosowanych w badaniach Doktorantki?
2. Czy zastosowana linia BJ jest optymalna jako kontrola dla np. komórek A549 (tj. ludzkich komórek nabłonka podstawnego gruczołakoraka)?
3. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować jakiś proces pozyskiwania resweratrolu po hodowli na odpadowym glicerolu? Czy zanieczyszczenia zawarte w tym substracie nie będą miały wpływu na produkt końcowy?
4. Ponieważ resweratrol charakteryzuje się również właściwościami antymikrobiologicznymi, co Doktorantka zaobserwowała w swoich badaniach (zwiększona zawartość resweratrolu, niższe stężenie biomasy), w jaki sposób można byłoby wyeliminować ten problem w produkcji resweratrolu w większej skali z udziałem drożdży *Y. lipolytica*?

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysa 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Z obowiązku jaki spoczywa na recenzencie muszę zwrócić uwagę na dwie drobne sprawy natury językowej. Doktorantka czasem używała określenia „ilość” zamiast „liczba” w kontekście np. kopii genów. Poza tym, nie należy stosować określenia „zdrowych”, zamiast „prawidłowych” komórek, linii komórkowych, etc.

Podsumowując, przedstawiona do oceny Praca doktorska mgr inż. Patrycji Szczepańskiej spójne tematycznie dzieło naukowe. Przeprowadzone i opublikowane badania poza wysokim walorem poznawczym, mają także znaczenie dla dalszych aplikacyjnych badań, co jest pożądaną wartością dodaną. Doktorantka ponad wszelką wątpliwość udowodniła, że zna metodologię pracy naukowej i potrafi ją skutecznie zastosować, czego dowodem jest cykl prac stanowiących kanwę pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187. ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.) i na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne mgr inż. Patrycji Szczepańskiej.

Ponadto, z uwagi na wysoki walor naukowy pracy przejawiający się w sumarycznych parametrach bibliometrycznych oraz poznawczy i aplikacyjny, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Poza tym, Doktorantka wykazała, że doskonale radzi sobie prowadząc badania naukowe w dwóch ośrodkach oraz potrafi połączyć uzyskane w ten sposób rezultaty w spójnym dziele naukowym, jakim jest rozprawa doktorska.

Prof. dr hab. Tomasz Gosiewski

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysta 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl