



Wrocław, 18.11.2022 r.

Dr hab. inż. Zbigniew Lazar, profesor uczelni

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Moniki Anny Kubiak-Szymendery

wykonanej  
w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu  
Pod kierunkiem dr hab. Eweliny Celińskiej, prof. UPP

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

### 1. Podstawowe dane o kandydatce

Pani mgr inż. Monika Kubiak-Szymendera tytuł magistra inżyniera biotechnologii uzyskała 19.06.2018 r. na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii (obecnie – Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii) Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, a jej praca magisterska dotyczyła doboru warunków prowadzenia hodowli bioreaktorowych typu okresowo-dolewowego do produkcji rekombinowanych enzymów przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. Praca ta była realizowana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu UPP pod kierunkiem dr hab. Eweliny Celińskiej.

Po uzyskaniu tytułu magistra inżyniera biotechnologii, Doktorantka podjęła kształcenie w Studium Doktoranckim przy Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu UPP. Pełniła funkcję kierownika projektu badawczego Diamentowy Grant nr DI 2017 001047 finansowanego przez MEiN (09.2018-09.2022). Z racji podjętej tematyki badawczej, przewód doktorski otworzyła w dyscyplinie Nauki Biologiczne poprzez złożenie stosownej dokumentacji do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach UPP. Postępowanie doktorskie zostało wszczęte w maju 2021 r.

Doktorantka nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora.



## 2. Charakterystyka formalna rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Moniki Kubiak-Szymendery pt. „Manipulacje komórkową odpowiedzią na stres jako strategia zwiększająca nadprodukcję heterologicznych białek w komórkach drożdży niekonwencjonalnych *Yarrowia lipolytica*” jest oparta na zestawie czterech prac opublikowanych w latach 2019-2022. Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich pracach wchodzących w skład dzieła, a Jej zadeklarowany udział procentowy w publikacjach wynosi pomiędzy 50 a 70%. Sumaryczny współczynnik IF (2-letni) publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 16,898, a liczba punktów ministerialnych to 290. W tym miejscu podkreślić należy, że międzynarodowa rozpoznawalność czasopism, w których Doktorantka opublikowała wyniki swoich prac, jest znacznie wyższa niż liczba punktów przydzielonych czasopismu przez MEiN. W opinii recenzenta, czasopisma te są znaczącymi periodykami naukowymi w dyscyplinie nauki biologiczne.

Rozprawa doktorska skonstruowana została w klasyczny sposób, a wspomniane powyżej publikacje i ich omówienie stanowią zasadniczą część zaprezentowanej pracy. Pracę podzielono na typowe rozdziały, jak: streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, hipotezy i cele badań, materiały i metody, wyniki, wykaz analiz, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz spis cytowanej literatury oraz wykaz tabel i rycin. Do pracy dołączona jest również dokumentacja związana z dorobkiem naukowym Doktorantki oraz oświadczenia współautorów prac, z których jasno wynika, że udział Pani Kubiak-Szymendery w powstaniu artykułów będących podstawą rozprawy doktorskiej jest znaczący i nie budzi wątpliwości, że jest ona autorem wiodącym. Podsumowując, można uznać przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską za autorskie dzieło Pani mgr inż. Moniki Kubiak-Szymendery.

## 3. Charakterystyka merytoryczna rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska stanowi spójne dzieło złożone z czterech powiązanych prac skupionych na temacie odpowiedzi komórek drożdży *Y. lipolytica* na stres i wykorzystaniu tego mechanizmu do poprawy produkcji heterologicznych białek, szczególnie wydzielanych pozakomórkowo. Autorka postawiła sobie dwie hipotezy badawcze:

1. Wprowadzenie czynników stresowych w zoptymalizowanym nasileniu i czasie trwania może mieć korzystny wpływ na produkcję rs-Protów w komórkach *Y. lipolytica*.
2. Warunki stresowe mogą mieć wpływ na stopień i profil metylacji genomowego DNA komórek *Y. lipolytica*, a zmiany te mogą być dziedziczone.

Aby zweryfikować postawione przez siebie hipotezy badawcze, w pracy sformułowano trzy cele:

1. Zbadanie wpływu czynników stresowych w postaci traktowania temperaturowego i stresu osmotycznego na efektywność produkcji rs-Protów przez komórki drożdży niekonwencjonalnych *Y. lipolytica*.



2. Dokonanie charakterystyki molekularnych mechanizmów komórkowej odpowiedzi na stres środowiskowy w badanym układzie w powiązaniu z efektywnością syntezy i sekrecji docelowego białka.
3. Analiza stopnia i profilu metylacji genomowego DNA drożdży *Y. lipolytica*, w tym także poddanych działaniu czynników stresowych, oraz zbadanie możliwości ewentualnego dziedziczenia profilu metylacji DNA.

Czynnikami stresowymi analizowanymi w przedstawionej rozprawie doktorskiej były podwyższona oraz obniżona temperatura jak również zwiększone ciśnienie osmotyczne. Jak powszechnie wiadomo, czynniki te wpływają u drożdży *Y. lipolytica* na zmianę profilu produkowanych metabolitów, czy to w kierunku produkcji alkoholi wielowodorotlenowych (podnoszenie ciśnienia osmotycznego), czy zmianę zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych (obniżona czy podwyższona temperatura procesu). Zastosowanie w badaniach glicerolu, w tym odpadowego, było w mojej opinii zasadne z ekonomicznego punktu widzenia prowadzenia procesów biotechnologicznych, szczególnie jednak z punktu widzenia preferencji drożdży *Y. lipolytica* w kierunku wykorzystania tego związku przed glukozą. Szybkość wykorzystania glicerolu przez ten gatunek drożdży jest bardzo duża, co pozwoli również na opracowanie procesu charakteryzującego się dużą produktywnością. Jednakże, jak słusznie Autorka pracy zauważyła we wstępie, pozyskiwanie białek heterologicznych o właściwościach terapeutycznych z podłoża na bazie glicerolu odpadowego mogłoby być trudne z uwagi na zanieczyszczenia zawarte w tym surowcu, jednakże nie stanowi to problemu dla enzymów o zastosowaniu przemysłowym. Podjęte przez Doktorantkę manipulacje temperaturą oraz czasem ekspozycji drożdży na te zmienione warunki pozwoliły udowodnić, że oba parametry znacząco wpływają na produkcję wydzielanych białek heterologicznych. Obniżona do 20°C temperatura nie tylko zwiększyła żywotność komórek drożdży, ale znacząco poprawiła poziom ekspresji oraz produkcję rekombinowanych białek. Dobrane, zoptymalizowane warunki traktowania termicznego Autorka zastosowała do biosyntezy heterologicznych białek z odpadowej gliceryny w opracowaniu bezodpadowego modelu produkcji w skali pilotażowej. Podejście to umożliwiło oszacowanie korzyści, zwłaszcza ekonomicznych, prowadzenia takich procesów oraz pozwoliło na określenie, które etapy procesu wymagają dalszych prac optymalizacyjnych. Bogaty wachlarz analiz związanych z oceną wpływu ciśnienia osmotycznego na biosyntezę białek heterologicznych przez drożdże *Y. lipolytica*, pozwolił Doktorantce na weryfikację postawionej przez siebie hipotezy. Okazało się, że zastosowanie różnych z chemicznego punktu widzenia związków zwiększających osmolalność, nie wpłynęło na statystycznie istotne zwiększenie produkcji białek heterologicznych, a jedynie na ich ekspresję. W opinii recenzenta, na szczególne wyróżnienie zasługuje podejście Doktorantki do wyjaśnienia molekularnych podstaw obserwowanych procesów. Bardzo często prace biotechnologiczne, związane z opracowaniem procesu produkcji jakiegoś metabolitu, skupiają się głównie na



optymalizacji warunków prowadzenia takiego procesu i poprawie jego wydajności i produktywności. W przedstawionej mi do recenzji pracy Autorka zaprezentowała bardzo dojrzałe podejście naukowe, starając się wyjaśnić również molekularne implikacje obserwowanych przez siebie wyników badań. Jak wiadomo, zwiększanie ciśnienia osmotycznego przekierowuje metabolizm *Y. lipolytica* z produkcji kwasów organicznych, zwłaszcza cytrynowego, w kierunku biosyntezy erytrytoli i mannitolu. Jest to widoczne również w ekspresji genów glikozylotransferaz TPS zaangażowanych w metabolizm oligo- i polisacharydów oraz aldo-keto reduktaz. Doktorantka wyjaśniła ponadto, że komórki drożdży w odpowiedzi na tak dobrane warunki stresowe, charakteryzują się zwiększoną ekspresją genów zaangażowanych w odpowiedź na stres, w szczególności czynników transkrypcyjnych (SKN7, SKO1) czy wielu białek szoku cieplnego (HSPs). Jednocześnie obserwowano spadek ekspresji genów związanych z centralnym metabolizmem węgla. Brak zwiększonej produkcji białka heterologicznego oraz obserwowana zmniejszona biosynteza białek oznaczona w badaniach proteomicznych związana była ze zmniejszoną ilością syntetaz aa-tRNA, czynnika translacyjnego eEF-1 gamma jak również białek związanych z biosyntezą aminokwasów i podjednostek rybosomów. Z kolei zastosowanie równoczesnego zwiększania ciśnienia osmotycznego oraz obniżonej temperatury znosiło negatywny wpływ tego pierwszego parametru na stres komórkowy.

Zaprezentowane dotychczas wyniki badań już stanowiły bardzo szeroką analizę odpowiedzi komórek drożdży *Y. lipolytica* na warunki stresowe traktowania podwyższoną lub obniżoną temperaturą jak również na zwiększanie ciśnienia osmotycznego. Niemniej jednak, Doktorantka przeprowadziła również analizy epigenetyczne, które dodatkowo mogły pomagać komórkom drożdży w dostosowaniu się do niekorzystnych warunków środowiska zewnętrznego jak również być przekazywane pokoleniom potomnym. W mojej opinii ta część pracy stanowi znaczący wkład Doktorantki w holistyczne podejście do wyjaśnienia molekularnych odpowiedzi komórek na stres środowiskowy. Choć nie wykazano odpowiedzi epigenetycznej komórek *Y. lipolytica* na zadany stres cieplny, udowodniono, że poziomu metylacji genomu u tych drożdży różni się znacząco pomiędzy fazą wzrostu logarytmicznego a fazą stacjonarną. Częstotliwość występowania 5mC w genomie w fazie stacjonarnej jest niższa w porównaniu z epigenomem późnej fazy wykładniczego wzrostu. Doktorantka wskazuje również, że konieczne są dalsze badania poziomu metylacji DNA u tego gatunku drożdży, szczególnie, że prac z związanych z tym tematem w literaturze światowej jest mało, a napotkane trudności w oznaczeniu stopnia metylacji DNA za pomocą sekwencjonowania ONT mogą sugerować, że zjawisko to występuje u *Y. lipolytica* rzadko.

Podsumowując część merytoryczną, chciałbym zwrócić również uwagę na bardzo dojrzałe napisaną dyskusję wyników. Ponadto, ilość literatury, którą Doktorantka wykazała w pracy, zarówno we wstępie jak i w części związanej z porównaniem wyników do literatury światowej, jak również jakość merytoryczna tych rozdziałów, świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu Doktorantki w temacie pracy.



Z ogromnym zainteresowaniem przeczytałem przedstawioną mi do recenzji pracę i uważam ją za bardzo wartościowe dzieło naukowe, jednakże prosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie kilku kwestii, które wzbudziły moją konsternację.

1. Dlaczego do produkcji białek heterologicznych zastosowano bogate podłoże, w którym znajdował się zarówno ekstrakt drożdżowy jak i pepton? Czy Doktorantka nie przewiduje problemu z oczyszczaniem czy nawet zwyczajnym podczyszczaniem uzyskiwanego preparatu enzymatycznego?
2. Dlaczego w badaniach, które publikowane były jako odrębne prace zastosowano dwa różne szczepy wyjściowe Po1d i Po1h, które różniły się genotypem?
3. W rozdziale „Materiały i metody” znalazło się zdanie dotyczące zsekwencjonowanego genomu szczepu *Y. lipolytica* W29. W bazie NCBI czy na platformie GRYC dostępny jest genom szczepu *Y. lipolytica* E150 bądź innych szczepów dzikich jak H222 czy A101. Czy Doktorantka miała dostęp faktycznie do genomu szczepu W29?
4. W opisie hodowli bioreaktorowych opisane jest, że podłoże było zaszczipiane 10% inokulum. Czy inokulum było standaryzowane do konkretnej wartości OD<sub>600</sub> czy może do bioreaktora wprowadzano za każdym razem taką samą ilość komórek, by OD<sub>600</sub> początkowe było takie samo? Ponadto, czy prowadzona hodowla inokulacyjna była za każdym razem przygotowywana w ten sam sposób? Operacje te będą miały znaczenie w przypadku badań transkryptomicznych.
5. Czy utrzymywanie poziomu natlenienia na 20% nigdy nie było problematyczne? Szczególnie w bogatym podłożu, dynamiczny wzrost *Y. lipolytica* będących wybitnymi tlenowcami, powoduje drastyczny spadek poziomu natlenienia do 0%.
6. Z doświadczenia pracy z *Y. lipolytica* wiem, że zmiana prowadzenia hodowli prowadzi do nieprzewidywalnych początkowo obserwacji w samym procesie. Czy dwa różne bioreaktory zastosowane w różnych pracach, nie dostarczały rozbieżnych wyników?
7. W opisie suplementacji hodowli związkami osmotycznie aktywnymi (pp. 3.3.2 str. 32) nie jest wskazane jak długo trwała hodowla po suplementacji.
8. W opinii Doktorantki, jak dobrze sprawdza się metoda krzywej standardowej OD<sub>600</sub> i sucha masa, czy różne szczepy nie charakteryzują się różnym stopniem filamentacji?

Ciekaw jestem również opinii Doktorantki w następujących kwestiach:

1. Które z wspomnianych we wstępie 150 białek heterologicznych produkowane jest na skalę przemysłową?
2. Jak bardzo zbliżony jest wzorzec glikozylacji białek u drożdży *Y. lipolytica* do komórek ssaczy, czy nie stanowi on problemu w produkcji białek heterologicznych?



3. Jaką Doktorantka widzi alternatywę dla intensywnej inżynierii genetycznej *Y. lipolytica* w celu zastosowania odpadów ligninocelulozowych jako substratu w procesach z ich udziałem?

Zadane pytania podyktowane są ciekawością recenzenta i dyskusji z Doktorantką w tym temacie. Chciałbym jednak zwrócić uwagę, że wykazane wcześniej wątpliwości natury bardziej metodycznej, nie umniejszają wysokim wartościom merytorycznym i uzyskanym wynikom zaprezentowanym przez Doktorantkę. Pragnę po raz kolejny podkreślić, że recenzowana praca i jej holistyczne podejście do tematu zasługują na duże uznanie.

#### 4. Podsumowanie dorobku naukowego Doktorantki

Jako recenzent chciałbym również zwrócić uwagę na bogaty dorobek naukowy Pani Monika Kubiak-Szymendery. Doktorantka jest pierwszą autorką czterech prac wchodzących w recenzowaną rozprawę doktorską oraz współautorką siedmiu innych publikacji. Ponadto, uczestniczyła w realizacji trzech projektów badawczych, z których dwoma kierowała. Doktorantka odbyła trzymiesięczny staż zagraniczny w Instytucie MICALIS, INRAE, AgroParis, Tech w Jouy-en-Josas we Francji w zespole dra Jean-Marc Nicaud. Oprócz tego, Pani Kubiak-Szymendera jest współautorką dwudziestu trzech komunikatów konferencyjnych oraz dwóch monografii pokonferencyjnych. Jak na tak młodego naukowca, dorobek Doktorantki uznaję za znaczący i uważam, że należy podkreślić i wyróżnić jej dużą aktywność naukową.

#### 5. Podsumowanie

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr inż. Moniki Kubiak-Szymendery na uwagę zasługuje wysoka jakość przeprowadzonych badań, co znajduje odzwierciedlenie w poziomie opublikowanych prac naukowych. Bardzo wysoko oceniam zakres przeprowadzonych prac eksperymentalnych, jak również wielokierunkowość podejść i ilość różnorodnych technik, dzięki czemu zaproponowano kompleksowe podejście do analizowanego problemu. W opinii recenzenta przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, wraz ze składającymi się na nią publikacjami, stanowi bardzo wartościowy i nowatorski wkład do światowej nauki zajmującej się szlakiem sekrecyjnym białek, szczególnie u drożdży, jak również produkcją białek heterologicznych. Uzyskane wyniki stanowią również niewątpliwie znaczący wkład w dalsze zrozumienie odpowiedzi komórkowej drożdży *Y. lipolytica* na warunki stresowe.

#### 6. Wniosek końcowy

Po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej i na podstawie opublikowanych wartościowych prac naukowych będących jej podstawą stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art. 13. ust. 1 ustawy z dnia 14



UNIwersytet  
Przyrodniczy  
we Wrocławiu

KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

marca 2003 r, o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017, poz. 1789) i na tej podstawie **wnioskuje** do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu **o nadanie stopnia naukowego doktora** nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne **mgr inż. Monice Annie Kubiak-Szymenderze**. Równocześnie **wnioskuje** do ww. Rady Naukowej **o wyróżnienie** rozprawy doktorskiej. Wniosek o wyróżnienie podyktowany jest bardzo szeroką analizą i zastosowaniem dużej ilości różnych podejść metodycznych do tematu, które w mojej ocenie zasługuje na ogromne uznanie. Ponadto, dojrzałość naukowa w omawianiu i dyskusji wyników stawiają w mojej opinii doktorantkę wśród czołówki młodych naukowców i pozwalają sądzić, że prowadzone przez nią badania w przyszłości również będą na światowym poziomie.

Zbigniew Łazarz