

dr hab. Adrian Wiater, prof. UMCS
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej

Lublin, dn. 09.11.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Moniki Anny Kubiak-Szymendery

pt. „Manipulacje komórkową odpowiedzią na stres jako strategia zwiększająca nadprodukcję heterologicznych białek w komórkach drożdży niekonwencjonalnych *Yarrowia lipolytica*”
wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego
w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Eweliny Celińskiej, prof. UPP

Podstawa formalna opracowania recenzji

Formalną podstawą opracowania recenzji jest pismo Pani Dziekan Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Profesor dr hab. Małgorzaty Szumacher z dnia 10 października 2022 r. wraz z umową. Promotorem rozprawy doktorskiej jest Pani dr hab. Ewelina Celińska, prof. UPP. Rozprawa mieści się w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie: nauki biologiczne.

Podstawowe dane o kandydatce

Pani mgr inż. Monika Kubiak-Szymendera tytuł magistra inżyniera biotechnologii uzyskała w 2018 r. na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii (obecnie – Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii) Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Praca ta była realizowana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu UP w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Eweliny Celińskiej i dotyczyła



doboru warunków prowadzenia hodowli bioreaktorowych typu okresowo-dolewowego w produkcji rekombinowanych enzymów przez drożdże *Y. lipolytica*.

Po uzyskaniu tytułu magistra inżyniera biotechnologii, Doktorantka podjęła kształcenie na Studium Doktoranckim przy Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu UP w Poznaniu. 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 UP w Poznaniu. Postępowanie doktorskie zostało wszczęte w maju 2021 r.

Doktorantka nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora.

Ocena istotności i celowości podjętego tematu

Drożdże można uznać za najstarsze mikroorganizmy przemysłowe wykorzystywane przez człowieka. Organizmy te przyciągały uwagę ze względu na ich liczne zastosowania przemysłowe oraz efekty prozdrowotne, np. jako suplementy diety o wysokiej wartości odżywczej czy bogate źródło witamin z grupy B. Drożdże są również używane jako „workhorse” w biotechnologii, szczególnie do produkcji białek wykorzystywanych w celach przemysłowych, terapeutycznych oraz diagnostycznych. *Yarrowia lipolytica* jest jednym z najszerzej badanych „niekonwencjonalnych” gatunków drożdży, zdolnym do wytwarzania ważnych metabolitów i posiadającym intensywną aktywność wydzielniczą. Ponadto, Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA), przyznała im status GRAS, dzięki czemu możliwe jest ich stosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. W celu zwiększenia aktywności sekrecyjnej *Y. lipolytica*, prowadzonych jest obecnie wiele badań obejmujących metodologię klasyczną i zaawansowane techniki inżynierii genetycznej oraz manipulacje wykorzystujące narzędzia biologii molekularnej. Strategie te odnoszą się do ingerencji w materiał genetyczny komórek gospodarza ale również do modyfikacji parametrów technologicznych bioprosesów i warunków ich prowadzenia. W tym kontekście tematyka badań, którą podjęła Doktorantka wydaje się niezmiernie ciekawa i istotna, a ponadto stanowi uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat prezentowanych zagadnień. Należy podkreślić, że założone cele badawcze były niezwykle złożone i prowadzone wielopłaszczyznowo. Realizowano je w oparciu o różne techniki laboratoryjne, zarówno biochemiczne, genetyczne,



statystyczne jak i inżynierskie, co wymaga znajomości i umiejętności posługiwania się różnymi narzędziami. Proponowane przez Doktorantkę rozwiązania mogą okazać się bardzo przydatne z punktu widzenia praktycznego, szczególnie w ujęciu wykorzystywania produktów odpadowych w procesie technologicznym.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Anny Kubiak-Szymendery bazuje na czterech, spójnych tematycznie publikacjach, które stanowią załącznik recenzowanej pracy. Artykuły zostały opublikowane w latach 2019-2022, w renomowanych czasopismach z bazy JCR:

- P.1. **Kubiak M.**, Białas W., Celińska E. Thermal treatment improves a process of crude glycerol valorization for the production of a heterologous enzyme by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Reports* (2021) 31:1-11.

2-letni Impact Factor 4,982, 5-letni Impact Factor 5,557, 100 punktów MEiN (2021),

- P.2. **Kubiak M.**, Borkowska M., Białas W., Korpys P., Celińska E. Feeding strategy impacts heterologous protein production in *Yarrowia lipolytica* fed-batch cultures- Insight into the role of osmolarity. *Yeast* (2019) 36(5):305-318.

2-letni Impact Factor 3,239, 5-letni Impact Factor 3,018, 70 punktów MNiSW (2019),

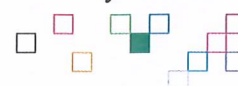
- P.3. **Kubiak-Szymendera M.**, Skupień-Rabian B., Jankowska U., Celińska E. Hyperosmolarity adversely impacts recombinant protein synthesis by *Yarrowia lipolytica* - molecular background revealed by quantitative proteomics. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2022) 106:349-367.

2-letni Impact Factor 4,813, 5-letni Impact Factor 4,651, 100 punktów MEiN (2022),

- P.4. **Kubiak-Szymendera M.**, Pryszcz L., Białas W., Celińska E. Epigenetic response of *Yarrowia lipolytica* to stress: tracking methylation level and search for methylation patterns via whole genome sequencing. *Microorganisms* (2021) 9(1798):1-16.

2-letni Impact Factor 3,864, 5-letni Impact Factor 3,864, 20 punktów MEiN (2021).

Sumaryczny współczynnik wpływu IF (ang. *Impact Factor*) dla wszystkich czterech artykułów osiągnął wartość 16,898 i 17,090, odpowiednio w przypadku 2- i 5-letniego IF. Artykuły naukowe będące podstawą rozprawy są pracami zespołowymi, w których liczba



współautorów wahała się od 3 do 5. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej udział w ich realizacji i przygotowaniu, zgodnie z oświadczeniami współautorów, był wiodący i wyniósł od 50 do 70%. Moim zdaniem, określenie wkładu własnego Doktorantki przeprowadzono bardzo rzetelnie, a dołączenie dodatkowych informacji w Oświadczeniach autorów oraz Wykazie analiz (Rozdział 5), sprawia że wyliczenia te są w pełni transparentne. Wg zamieszczonych informacji, wynika, że Doktorantka m. in., prowadziła szereg badań laboratoryjnych (w tym hodowle bioreaktorowe), wykonała znaczną część eksperymentów i analiz, uczestniczyła w opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptów oraz, co jest godne podkreślenia, zapewniała finansowanie realizowanych przedsięwzięć. Przeprowadzone badania były częściowo finansowane z dwóch grantów, w tym Diamentowego Grantu MNiSW, w obu grantach Doktorantka pełniła funkcję Kierownika.

Układ przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest bardzo przejrzysty i posiada format charakterystyczny dla tego typu prac, opartych na monotematycznym cyklu publikacji. Całość rozprawy obejmuje Autoreferat, który zawiera 8 głównych rozdziałów (124 strony) oraz załączniki. Układ Autoreferatu przedstawia się następująco:

- wykaz stosowanych skrótów,
- streszczenie (w języku polskim i angielskim),
- wstęp,
- hipotezy i cele badawcze,
- materiały i metody,
- wyniki,
- wykaz analiz,
- dyskusja,
- podsumowanie i wnioski,
- literatura,
- wykaz tabel,
- wykaz rycin
- dorobek naukowy.



Zaprezentowane na początku Rozprawy doktorskiej Streszczenie oraz Wstęp, bardzo dobrze wprowadzają w tematykę badań. Lektura tych rozdziałów, pozwala na szybkie zorientowanie się w zakresie opracowania oraz celowości podjęcia badań opisanych w załączonym cyklu publikacji (P.1-4). Głównym celem badawczym recenzowanej pracy była ocena wpływu wybranych stresów środowiskowych jako strategii zwiększających nadprodukcję heterologicznych białek w komórkach drożdży niekonwencjonalnych *Yarrowia lipolytica*. Dodatkowo, w ramach celu głównego Doktorantka postawiła sobie również cele szczegółowe, które dotyczyły:

- zbadania wpływu czynników stresowych w postaci traktowania temperaturowego i stresu osmotycznego na efektywność produkcji rs-Prot przez komórki drożdży niekonwencjonalnych *Y. lipolytica*,
- dokonania charakterystyki molekularnych mechanizmów komórkowej odpowiedzi na stres środowiskowy w badanym układzie w powiązaniu z efektywnością syntezy i sekrecji docelowego białka,
- oraz, analizy stopnia i profilu metylacji genomowego DNA drożdży *Y. lipolytica*, w tym także poddanych działaniu czynników stresowych.

Pierwsza z prac (P.1.), stanowiących cykl spójnych i uzupełniających się publikacji, dotyczyła optymalizacji warunków traktowania temperaturowego w odniesieniu do produkcji rs-Prot przez niekonwencjonalne drożdże *Y. lipolytica*. W pracy zbadano również wpływ traktowania temperaturowego na akumulację biomasy drożdżowej i produkcję wybranych metabolitów (erytrytol, kwas cytrynowy i mannitol). W odniesieniu do przyrostu biomasy drożdży *Y. lipolytica* w trzynastu różnych wariantach hodowli, nie zaobserwowano istotnego wpływu zastosowanej temperatury na jej akumulację. Natomiast wykazano, że spośród metabolitów syntetyzowanych przez drożdże, głównym produktem w analizowanych hodowlach był kwas cytrynowy, którego synteza zgodnie z analizą statystyczną, zależała od czasu traktowania temperaturowego, ale nie od zadanej temperatury. Przeprowadzone badania dostarczają dowodów, iż czasowa ekspozycja na obniżoną temperaturę wpływa pozytywnie na produkcję rs-Prot (SoA – alfa-amylazy) przez komórki *Y. lipolytica*. Wyniki te oparto na bezpośredniej ocenie aktywności amylolitycznej jak i określeniu poziomu ekspresji genu



kodującego SoA, który jak wykazano, w warunkach obniżonej temperatury uległ wyraźnemu wzmocnieniu, a także był dodatnio skorelowany z czasem zadawanego stresu. W omawianej pracy, określono również możliwość zastosowania tańszych substratów w procesie ze zoptymalizowanym traktowaniem temperaturowym do produkcji rs-Prot (SoA). Hodowle prowadzono na podłożu suplementowanym glicerolem, pozyskiwanym z wytwórni biodiesla oraz innymi substratami technicznymi, np. technicznym ekstraktem drożdżowym (podłoże techYPG). Hodowle prowadzono w oparciu o wiedzę zdobytą na podstawie realizacji planu optymalizacji i modelowania procesów, stosując zoptymalizowane warunki traktowania temperaturowego (20°C, 153 min) w procesie produkcyjnym. Analiza porównawcza wykazała, że proces prowadzony na podłożu techYPG był równie wydajny pod względem produkcji rs-Prot, jak ten prowadzonych z wykorzystaniem substratów o jakości laboratoryjnej (labYPG). W ostatnim etapie pracy, w celu ilościowego wyrażenia korzyści ekonomicznych wynikających ze zoptymalizowania procesów produkcyjnych, opracowano symulacje dwóch sposobów produkcji enzymu w skali pilotażowej, w oparciu o dane z eksperymentów prowadzonych na podłożach labYPG i techYPG. Jak wykazała analiza otrzymanych danych, symulowane procesy zostały dobrze zrównoważone. Prowadzenie procesu z wykorzystaniem substratów alternatywnych (czyli wymiana labYPG na techYPG) wraz z traktowaniem ↓Temp, skutkowałoby 2,35-krotnym obniżeniem rocznych kosztów procesu produkcyjnego oraz wymierną korzyścią związaną z utylizacją problematycznego odpadu ubocznego z produkcji biodiesla, przez co projektowany proces byłby prawie całkowicie bezodpadowy.

Badania opisane w kolejnej publikacji (P.2.) są w pewien sposób kontynuacją badań zaprezentowanych w publikacji pierwszej. Celem pracy była ocena wpływu ciśnienia osmotycznego wywołanego dodatkiem różnych związków osmoaktywnych (tj. chlorku sodu, sacharozy, sorbitolu i gliceryny) na produkcję białek rs-Prot (TIGAMY – glukoamylazy). Wykazano, że we wszystkich przypadkach czynnik stresowy w postaci hiperosmolalności utrzymywał się przez cały czas trwania hodowli, a użyte związki nie zostały w tym czasie zutylizowane. Ponadto, wszystkie badane substancje osmoaktywne przyczyniły się do ograniczenia wzrostu rekombinowanego szczepu w porównaniu z wariantem kontrolnym (nietraktowanym). Ogólna konkluzja wynikająca z przeprowadzonych badań sprowadza się do wniosku, iż pomimo wyraźnie promującego wpływ substancji osmoaktywnych na syntezę białka



reporterowego, nie ma bezpośredniej korelacji między średnią osmolalnością a specyficzną aktywnością glukoamylazy (TIGAMY). Co sugeruje, że poza poziomem osmolalności, istotny wpływ na produkcję białek rs-Prot w hodowlach drożdży niekonwencjonalnych *Y. lipolytica*, ma również charakter chemiczny związku osmoaktywnego.

Trzecia część pracy (P.3.) opierała się na wynikach badań uzyskanych w dwóch omówionych już publikacjach. W tym artykule, Autorzy postawili sobie pytanie, czy ekspozycja rekombinowanych drożdży *Y. lipolytica* zdolnych do nadprodukcji rs-Prot na czynniki stresowe przyczyni się do zwiększenia syntezy tego białka. W badaniach tych określono fizjologiczną, transkrypcyjną i proteomiczną odpowiedź komórek *Y. lipolytica* na warunki \downarrow Temp i \uparrow Osm indywidualnie lub w połączeniu (\uparrow Osm \downarrow Temp). Należy tu nadmienić, że wybrane warunki traktowania temperaturowego (20°C przez 153,5 min) zoptymalizowano już wcześniej w publikacji P.1., natomiast do wyboru odpowiedniego związku osmoaktywnego oraz poziomu osmolalności, posłużyły badania przeprowadzone w publikacji P.2. Jak wykazano traktowanie temperaturowe (\downarrow Temp) nie powodowało zwiększonej ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres, zarówno na poziomie transkrypcji, jak i totalnego proteomu, co sugeruje że reakcje te muszą być regulowane na poziomie innym niż transkrypcyjny lub zaangażowane są tu geny spoza analizowanego zestawu. Z kolei zadana hiperosmolalność nie zwiększyła syntezy rs-Prot, a jedynie jego transkrypcję, ale przyczyniła się do remodelowania proteomu w kierunku ograniczenia syntezy białek. Zjawisko ograniczenia syntezy białek na skutek wprowadzenia warunków \uparrow Osm zostało wyjaśnione na poziomie molekularnym. Wykazano, że jest ono związane ze zmniejszoną reprezentacją syntetaz aa-tRNA, czynnika translacyjnego eEF-1 gamma, białek związanych z biosyntezą aminokwasów i podjednostek rybosomów. Ekspozycja komórek drożdży na \uparrow Osm wykazała znaczną nadekspresję kilku białek opiekuńczych, które wspomagają syntezę, fałdowanie i dojrzewanie białek u *Y. lipolytica*, ale nie zwiększyła ilość docelowego rs-Prot. Stres osmotyczny \uparrow Osm prowadził również do redystrybucji szlaków metabolicznych i przekierowania strumienia węgla z produkcji kwasu cytrynowego i wzrostu komórek na produkcję polioli (tj. erytrytolu i mannitolu). Podsumowując, traktowanie \downarrow Temp nie spowodowało żadnych istotnych zmian na poziomie proteomu, a w połączeniu z hiperosmolalnością (\uparrow Osm \downarrow Temp), obniżona temperatura przyczyniła się do ograniczenia negatywnego wpływu \uparrow Osm.



Czwarta praca (P.4) zamykająca cykl publikacji, dotyczyła próby zbadania zjawiska metylacji genomowego DNA (gDNA) w hodowlach okresowych *Y. lipolytica*. Obecność metylowanego DNA u drożdży jest ciągle przedmiotem dyskusji i wielu badań. Dlatego, celem pracy jaki określiła sobie Doktorantka było, m. in. zweryfikowanie występowania metylacji DNA w gDNA *Y. lipolytica*, które przeprowadziła przy użyciu dwóch różnych technik, tj. testu immunoenzymatycznego i sekwencjonowania całogenomowego (WGS) ONT. Ponadto, badania zmierzały w kierunku określenia epigenetycznej odpowiedzi drożdży na traktowanie termiczne (\uparrow Temp) w trakcie hodowli w trybie powtórzeniowym (RB). Dodatkowo, Autorka podjęła próbę określenia potencjalnego zjawiska międzypokoleniowego dziedziczenia wzorca metylacji. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń, Doktorantka uzyskała sprzeczne wyniki z zastosowaniem testu immunoenzymatycznego i WGS ONT, co jak sama stwierdziła wymaga dalszych i pogłębionych badań. Jednak, co jest godne podkreślenia, już na tym etapie badań Autorka sugeruje, że brak możliwości detekcji metylacji DNA za pomocą sekwencjonowania ONT może sugerować, iż ta modyfikacja jest rzadka w genomie *Y. lipolytica*, występuje na bardzo niskim poziomie, bądź nie występuje wcale. Badania epigenetyczne prowadzone na komórkach *Y. lipolytica* traktowanych wysoką temperaturą i wielokrotnie pasażowanych wykazały brak odpowiedzi epigenetycznej komórek drożdży na zadany stres cieplny, natomiast zwróciły uwagę na zjawisko obniżenia poziomu metylacji genomu fazy stacjonarnej w porównaniu z epigenomem późnej fazy wykładniczej, oraz istotny wpływ wielokrotnego pasażowania na globalny poziom metylacji genomu.

Podsumowując ten etap, stwierdzam, że treść recenzowanej pracy odpowiada tytułowi a sposób jej zredagowania oceniam jako bardzo dobry. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę stanowią nowoczesny i oryginalny wkład w rozwój szeroko pojętych nauk biologicznych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka w momencie braku odpowiedzi na postawione pytanie badawcze, poszukuje nowych skuteczniejszych narzędzi do rozwiązania problemu, np. gdy użyte modele, ukierunkowane na wykrywanie metylacji w kontekście bakteryjnym (dam/dcm) jak i eukariotycznym (CpG), nie były efektywne w wykrywaniu metylacji w gDNA drożdży *Y. lipolytica*, przyjęła Ona inne podejście i przeszukała sekwencję gDNA pod kątem występowania metylacji w sposób niezależny od kontekstu, wykorzystując



wysokoprzepustowe sekwencjonowanie nanoporowe (ONT). Świadczy to o dojrzałości naukowej badawczyni. Do największych zalet recenzowanej pracy zaliczyłbym próby suplementowania podłoża hodowlanego *Y. lipolytica*, składnikami pochodzenia technicznego, tj. ekstraktem drożdżowym oraz glicerolem odpadowym pochodzącym z produkcji biodiesla. To działanie wpisuje się w ideę „zero waste” oraz model Gospodarki o obiegu zamkniętym (GOZ), co razem z analizą kosztów procesów technologicznych i wyliczeniami oszczędności, które wykonała Doktorantka, świadczy o dobrej znajomości prowadzenia procesów w skali przemysłowej i wskazuje na innowacyjny charakter badań. Ponadto, na podkreślenie zasługują badania epigenetyczne przeprowadzone przez Doktorantkę na komórkach *Y. lipolytica*, które ze względu na niejednoznaczność otrzymywanych wyników stanowią obszar badań, na który wkraczają tylko nieliczni badacze. Biorąc pod uwagę, przedstawione wyżej fakty, można jednoznacznie stwierdzić, że mgr Monika Anna Kubiak-Szymendera w swojej pracy doktorskiej nie dążyła do rozwiązania problemu jedynie z zakresu nauk podstawowych, lecz zajęła się zagadnieniem holistycznie, co ma istotne przełożenie na praktyczny potencjał pracy.

W mojej opinii, przedstawioną pracę doktorską należy ocenić wysoko. Niemniej jednak, lektura recenzowanej pracy nasuwa pewne pytania/uwagi do dyskusji w trakcie dalszych etapów obrony doktorskiej:

- Dlaczego jako model badawczy został wybrany gatunek *Y. lipolytica*? Nie znalazłem takiej informacji w tekście Autoreferatu, a myślę że takie wyjaśnienie, poza szeroką charakterystyką gatunku przedstawioną we Wstępie, rozwiałoby wątpliwości, dlaczego nie wybrano również wydajnych gatunków *Pichia pastoris*, czy chociażby *Saccharomyces cerevisiae*.

- W trakcie realizacji zadań badawczych użyto trzy różne szczepy *Y. lipolytica*, tj. dwa rekombinowane szczepy: GGY237 i 8.5, oraz szczep dziki W29. Czym było to spowodowane i czy w związku z użyciem trzech różnych szczepów można analizować uzyskane dane całościowo?

- W pracy doktorskiej zastosowano stres termiczny i osmotyczny. Czy Autorka wykorzystywała w swoich badaniach inne rodzaje stresów środowiskowych, np. stres oksydacyjny, stres związany z niskim bądź wysokim pH, czy obecnością metali ciężkich, itp.?



- W trakcie badań, do przygotowania podłoża hodowlanego techYPG, używano glicerol odpadowy pochodzący z produkcji biodiesla. Drożdże *Y. lipolytica* znane są z utylizacji całego wachlarza substancji o różnym pochodzeniu, takich jak tłuszcze lub węglowodory. Czy w trakcie Pani badań były prowadzone próby suplementowania podłoża hodowlanych odpadami pochodzącymi, np. z przemysłu olejarzkiego czy petrochemicznego?

- W rozdziale 3.1., Autorka pisze, że hodowle w kolbach prowadzono przez 23 godziny. Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić dlaczego 23 godziny a nie pełną dobę?

- W rozdziale 3.3.1.1.1., Doktorantka pisze: „Za wariant kontrolny uznano ekspozycję na 31°C w odpowiednich okresach czasu” Dlaczego nie była to temperatura 28°C, zgodnie ze stwierdzeniem z rozdziału 3.3.1.1., „Temperaturę utrzymywano na poziomie 28°C przez cały czas trwania hodowli, z wyjątkiem czasu zadania traktowania temperaturowego”?

- W rozdziale 3.3.1.2., Doktorantka pisze, że hodowle prowadzono w bioreaktorach Minifors 2, a „Mieszanie i napowietrzanie ustawiono odpowiednio na 700 rpm i 2 vvm”. Dlaczego stosowano tak szybkie mieszanie i czy nie powodowało ono nadmiernego pienienia oraz dezintegracji komórek drożdży?

- W rozdziale 3.4.2. Stężenie biomasy, Autorka pisze „Wyniki wyrażano w jednostkach OD600”. Moim zdaniem to skrót myślowy, ale proszę wyjaśnić co to za jednostki.

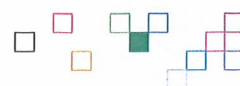
Uwagi edytorskie, językowe, redakcyjne i inne

Recenzowana rozprawa doktorska napisana jest bardzo dobrym językiem, układ i struktura pracy jest prawidłowa. Praca jest również bardzo dobrze przygotowana od strony edycyjnej. Niemniej jednak Doktorantce zdarzają się drobne błędy edytorskie oraz językowe (m. in. stylistyczne i interpunkcyjne), takie jak:

- w Wykazie stosowanych skrótów, brak jest skrótu RT, który jest używany w tekście,
- str. 27, Doktorantka pisze, „...pochodzącą z pleśni *Thermomyces lanuginosus* [128]”.

Pleśnie to określenie potoczne, w pracy naukowej lepiej używać określeń grzyb strzępkowy lub nitkowaty,

- w rozdziale 3.1., Autorka pisze „Wszystkie wymienione składniki cechowały się czystością laboratoryjną”, takie określenie jest slangiem laboratoryjnym, w odniesieniu do



odczynników stosowanych w laboratorium należy używać określeń: czysty (cz.), czysty do analizy (cz.d.a.), chemicznie czysty (ch.cz.) lub czysty spektralnie (spektra. cz.),

- w rozdziale Materiały i metody, w opisie dotyczącym stosowanych odczynników oraz aparatury, Doktorantka wymienia zazwyczaj tylko nazwę producenta, należałoby uzupełnić te informacje o miasto i kraj pochodzenia,

- w tytule rozdziału 3.3.2., Autorka pisze „Hodowle w kolbach wytrząsanych z suplementacją związków osmotycznie aktywnych (P.2)” moim zdaniem tytuł powinien brzmieć „Hodowle wytrząsane w kolbach z suplementacją związków osmotycznie aktywnych”,

- na Rycinie 6. mylące są kolorowe słupki oznaczające aktywność alfa-amylazy, oznaczenie na wykresach wskazuje, że powinny one być szare,

- na str. 89 błędnie podano „(Ryciny 18 i 20)”, powinno być (Ryciny 18 i 19),

- w większości przypadków (choć nie zawsze) Autorka w odniesieniu do czasu używa litery „h”. Moim zdaniem w polskich tekstach naukowych lepiej używać godz. a nie h.

- w całym tekście należy ujednoczyć wyjaśnienia anglojęzycznych skrótów, powinny one być pisane z dużej litery,

- Autorka używa różnych oznaczeń dla jednostki objętości - litr, tj. l lub L, powinno to być ujednoczone.

Wobec szerokiego zakresu prezentowanych badań i bardzo wartościowych wyników, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, przedstawione powyżej uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości całej pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr Moniki Anny Kubiak-Szymendery.

Podsumowanie i Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Anny Kubiak-Szymendery, stanowi jednolity cykl czterech prac, które prezentują badania Doktorantki na drodze do zwiększenia sekrecji rekombinowanych białek przez komórki drożdży niekonwencjonalnych *Yarrowia lipolytica* oraz próby wyjaśnienia tego mechanizmu. Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną oraz posiadaniem umiejętności samodzielnego prowadzenia eksperymentów naukowych i prawidłowego interpretowania wyników.



Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska Pani mgr. Moniki Anny Kubiak-Szymendery, pt. „Manipulacje komórkową odpowiedzią na stres jako strategia zwiększająca nadprodukcję heterologicznych białek w komórkach drożdży niekonwencjonalnych *Yarrowia lipolytica*” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r., nr 65, poz. 595 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.) i dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr. Moniki Anny Kubiak-Szymendery do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na olbrzymią wartość naukową wyników badań opublikowanych w wysokopunktowanych czasopismach naukowych wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Wiater Adrian

dr hab. Adrian Wiater, prof. UMCS

