



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

Rzeszów, 20/11/2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej**  
**Mgr inż. Moniki Kubiak-Szymendery**

pt. „Manipulacje komórkową odpowiedzią na stres jako strategia zwiększająca nadprodukcję heterologicznych białek w komórkach drożdży niekonwencjonalnych *Yarrowia lipolytica*”

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.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Moniki Kubiak-Szymendery została wykonana w Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu pod kierunkiem Pani dr hab. Eweliny Celińskiej, prof. uczelni z Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego



w Poznaniu. Wykonane w pracach badania finansowane były dzięki dwóm projektom naukowym, tj.:

1. Projekt *Diamentowy Grant* VII nr DI 2017 001047, finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (obecnie Ministerstwo Edukacji i Nauki),
2. Projekt dla młodych naukowców 2019, 506.JOR.DC.00, finansowany przez Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu.

Kierownikiem obydwu projektów naukowych była Doktorantka.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy zbadania wpływu czynników stresowych oraz dokonania charakterystyki molekularnych mechanizmów odpowiedzi komórkowej na stres środowiskowy w celu zwiększenia efektywności produkcji heterologicznych białek przez niekonwencjonalne drożdże *Y. lipolytica*. Ponadto dodatkowym celem, który Doktorantka postawiła w swojej pracy doktorskiej była analiza stopnia i profilu metylacji genomowego DNA drożdży *Y. lipolytica*, również poddanych działaniu czynników stresowych, a także zbadanie możliwości dziedziczenia profilu metylacji DNA.

Drożdże, w tym drożdże niekonwencjonalne, są znakomitymi gospodarzami do produkcji funkcjonalnych białek rekombinowanych do zastosowań przemysłowych lub medycznych. Ze względu na zdolność do wytwarzania dużych ilości białek heterologicznych i metabolitów drożdże *Y. lipolytica* są wykorzystywane do wielu zastosowań przemysłowych, w tym do produkcji białek rekombinowanych, erytrytolu, kwasu cytrynowego i lipidów i innych. Zatem temat pracy doktorskiej jest aktualny oraz stanowi istotny wkład w badania nad heterologiczną produkcją białek przez modyfikowane szczepy *Y. lipolytica*, tym bardziej, iż szlaki komórkowej odpowiedzi na stresse środowiskowe są szczegółowo opisane i dobrze poznane dla takich organizmów modelowych jak drożdże *Saccharomyces cerevisiae* oraz bakterie *Escherichia coli*, jednak dla niekonwencjonalnych drożdży *Y. lipolytica* istnieje wciąż niewiele badań w tej tematyce, podobnie występowanie zjawiska metylacji DNA jest przedmiotem badań u drożdży, w tym drożdży *Y. lipolytica*. Co ciekawe, opublikowane zostało szereg rozbieżnych publikacji naukowych, stąd prace w tej tematyce są wysoce pożądanym kierunkiem badań podstawowych, mogących mieć wpływ na rozwój badań aplikacyjnych np. poprzez możliwość zwiększenie stabilności rekombinowanych komórek drożdży wykorzystywanych do produkcji rekombinowanych białek.

Praca doktorska przedłożona do recenzji to zbiór czterech artykułów oryginalnych opatrzonych omówieniem. Wszystkie artykuły opublikowane zostały w czasopiśmie



anglojęzycznych, a ich łączny 5-letni współczynnik oddziaływania *Impact factor* to 17,09; liczba punktów MEiN to 290.

Na całość pracy składa się 8 rozdziałów głównych. Praca zawiera przy tym streszczenie w języku polskim i języku angielskim. Zasadniczą część pracy uzupełniona jest o prezentację dorobku naukowego Doktorantki, oświadczenia współautorów przedstawionych jako podstawa rozprawy doktorskiej o ich udziale w przygotowaniu poszczególnych artykułów naukowych oraz cztery publikacje wchodzące w skład cyklu stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej wraz z suplementami.

Taka forma pracy doktorskiej, której zasadniczą część stanowią opublikowane artykuły naukowe jest dopuszczalna poprzez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

We wszystkich publikacjach Pani mgr inż. Monika Kubiak-Szymendra jest pierwszym autorem. Ponadto, we wszystkich czterech publikacjach, zgodnie z oświadczeniami współautorów, udział Pani mgr inż. Moniki Kubiak-Szymendery był znaczący. Udział Doktorantki szacowany jest jako 50 – 70 %, z czego w każdej publikacji naukowej, stanowiącej podstawę rozprawy doktorskiej, Doktorantka odpowiedzialna była za prowadzenie badań laboratoryjnych, zebranie i przygotowanie danych do analiz statystycznych, udział w merytorycznym opracowaniu wyników oraz ich dyskusji, napisanie manuskryptu oraz zapewnienie finansowania badań.

Dokonania będące przedmiotem publikacji opisane zostały na 78 stronach, w skład których wchodzi Wstęp, Hipotezy i cele badań, Materiały i metody, Wyniki, Wykaz analiz, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, ponadto do całości załączono listę piśmiennictwa stanowiącą dodatkowo 22 strony oraz Wykazy tabel i rycin.

Doskonałym wprowadzeniem w tematykę podejmowaną w ocenianej rozprawie doktorskiej jest **Wstęp**. Doktorantka zapoznaje nas z charakterystyką drożdży *Y. lipolytica* jako komórkowej platformy ekspresyjnej, podkreślając zalety tego gatunku drożdży oraz ich znaczenie przemysłowe. W tej części pracy doktorantka prezentuje również informacje dotyczące mechanizmów odpowiedzi drożdży *Y. lipolytica* na stres spowodowany czynnikami środowiskowymi w oparciu o aktualnie dostępną literaturę naukową. Ponadto Doktorantka szeroko omawia dostępne w literaturze naukowej dane dotyczące molekularnych mechanizmów odpowiedzi na stres, w tym metylacji DNA. Część ta zakończona jest możliwościami praktycznego wykorzystania modulacji czynnikami środowiskowymi, w tym stresowymi m.in. podczas produkcji heterologicznych białek przez drożdże *Y. lipolytica*.



Kolejny rozdział to **Hipotezy i cele badań**, przedstawione w sposób jasny i odpowiadający tematowi pracy doktorskiej.

W rozdziale **Materiały i metody** Doktorantka szczegółowo opisuje skład podłoży mikrobiologicznych wykorzystywanych w swoich pracach oraz procedury przygotowywania kultur startowych, opisuje również szczepy wykorzystywane w swoich badaniach, w tym ich genotypy. Z właściwą starannością, i co szczególnie przypadło do gustu Recenzentowi, z przyporządkowaniem do poszczególnych publikacji naukowych, opisuje metodykę stosowaną w pracach eksperymentalnych. Rozdział ten opatrzony jest opisem metod statystycznych stosowanych do obróbki danych uzyskanych z poszczególnych eksperymentów. Interesującą i bardzo cenną metodą wykorzystaną w pracy doktorskiej jest modelowanie procesu produkcji rekombinowanej alfa-amylazy w skali pilotażowej, co szczegółowiej zostało opisane w **P1** przedłożonej jako podstawa rozprawy doktorskiej.

W pierwszym, przedstawionym jako osiągnięcie, artykule naukowym (**P1**) Doktorantka podjęła się optymalizacji warunków traktowania temperaturowego w odniesieniu do produkcji białek rekombinowanych w komórkach *Y. lipolytica*. Bazując na dowodach świadczących o tym, że kontrolowana ekspozycja na stres poprzez obróbkę termiczną pozytywnie wpływa na bioprocess, zaproponowała systematyczne dostosowywanie obróbki termicznej komórek drożdży (20-40°C) w celu zmaksymalizowania produkcji alfa-amylazy przez drożdże *Y. lipolytica* rosnące na podłożu z odpadowym glicerolem w celu opracowania bioprocessu waloryzacji odpadowego glicerolu. Ponadto Doktorantka opracowała model matematyczny, który wskazał, iż optymalne warunki obróbki to 20°C w czasie 153 min. Największym osiągnięciem tej publikacji jest udowodnienie wpływu temperatury oraz czasu poddawania komórek obróbce na wydajność procesu produkcji heterologicznych białek. Co istotne, Doktorantka przeprowadziła również bioprocess z wykorzystaniem substratów technicznych oraz glicerolu pochodzącego z wytwórni biodiesla. Ponadto Doktorantka, co jest szczególnie cennym osiągnięciem tej publikacji, przedstawia symulację procesu wytwarzania preparatu enzymatycznego alfa-amylazy w skali pilotażowej, popartą szczegółowymi obliczeniami. Z ciekawości Recenzenta, czy Doktorantka mogłaby przedstawić szczegółu dotyczące przygotowania tej symulacji oraz, jeśli to możliwe, odnieść się do kosztów produkcji tego enzymu z wykorzystaniem obecnych technologii?

Kolejny artykuł naukowy (**P2**) dotyczy badania różnych strategii dostarczania pożywek paszowych i oceny ich wpływ na produkcję heterologicznego białka sekrecyjnego przez rekombinowany szczep *Y. lipolytica* w hodowlach półokresowych typu *fed-batch*. Wykorzystany w badaniu rekombinowany szczep *Y. lipolytica* charakteryzuje się heterologiczną ekspresją genu kodującego glukoamylazę z termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* (TIGAMY).



Glukoamylaza posiada kilka, pożądaných w przemyśle cech, takich jak termostabilność, wysoka czystość formowanych produktów i zdolność do trawienia surowej skrobi. Ciekawą obserwacją, wynikającą z badań Doktorantki, przedstawioną w ramach tej publikacji jest to, że różne strategie żywienia silnie modulują średnią osmolarność i produkcję docelowego białka. W celu zrozumienia tego zjawiska, Doktorantka przeprowadziła serię kultur wsadowych poddanych stresowi hiperosmotycznemu poprzez dodanie różnych związków osmoaktywnych (NaCl, sorbitol, sacharoza i glicerol, każdy na dwóch poziomach) i przeanalizowała ich wpływ na średnią osmolarność i syntezę TIGAMY. Co zatem, zdaniem Doktorantki jest najistotniejszym czynnikiem molekularnym regulującym produkcję docelowego białka w kontekście różnych strategii żywieniowych?

W następnym przedłożonym do recenzji artykule naukowym (**P3**) Doktorantka postawiła sobie za cel zbadanie czy poddanie odpowiedniego szczepu *Y. lipolytica*, nadprodukującego rekombinowane sekrecyjne białko zoptymalizowanym czynnikiem stresowym może zwiększyć syntezę tego białka. Doktorantka wykorzystwała czułą metodę do zbadania wpływu hiperosmolarności na syntezę sekrecyjnych białek heterologicznych przez *Y. lipolytica*. Wspierając się wynikami, które Autorka otrzymała w **P1**, dotyczącymi korzystnego wpływu obniżonej temperatury na syntezę sekrecyjnych białek heterologicznych przez drożdże *Y. lipolytica*, wykorzystwała ten wariant sam lub w połączeniu z hiperosmolarnością do zbadania ich/jego wpływu na poziomie proteomu. Ciekawe wyniki Autorka otrzymała dzięki zastosowaniu wysokoprzepustowej analizy proteomicznej. Czy zatem dane otrzymane przez Doktorantkę dotyczące zwiększonej i zmniejszonej reprezentacji białek DAPs (*differentially abundant proteins*) w odpowiedzi na podwyższony stres osmotyczny i temperaturowy zostaną w przyszłości wykorzystane do modyfikacji obecnie dostępnych szczepów *Y. lipolytica* w celu ich modyfikacji dla zwiększenia wydajności produkcji sekrecyjnych białek heterologicznych? Jeśli tak to w jaki sposób?

W publikacji **P4** Doktorantka opisuje zróżnicowane poziomy metylacji DNA w genomie drożdży *Y. lipolytica* poddanych hodowli w trybie powtórzeniowym z czasową ekspozycją na warunki stresu cieplnego. W celu przeanalizowania zmienności metylacji DNA między kulturami poddanymi stresowi i kulturami kontrolnymi, Autorka określiła ilościowo globalny stan metylacji DNA za pomocą testu opartego na teście ELISA oraz zbadała wzorce metylacji DNA za pomocą sekwencjonowania całego genomu Oxford Nanopore Technology (ONT).

Ciekawym i, w rzeczy samej, intrygującym wynikiem prezentowanym przez Doktorantkę w publikacji była niezdolność do wykrycia 5-metylocytozyny, 5 mC i N6-metylodeoksyadenozyna, 6 mA, amplifikowanych z wykorzystaniem metody PCR na poziomie powyżej kontroli negatywnej w genomowym DNA *Y. lipolytica*, niezależnie od obróbki/czasu hodowli lub przyjętego trybu wyszukiwania. Jak Doktorantka pisze w publikacji, zaskakujący, równy wynik dla kontroli negatywnej



i wszystkich analizowanych próbek z pewnością nie wynika z fałszywie dodatnich sygnałów z metylowanego RNA, co zatem zdaniem Doktorantki mogło być przyczyną takiego wyniku analizy lub jakie dodatkowe eksperymenty należałoby przeprowadzić w celu wyjaśnienia tego fenomenu?

Doktorantka pisze: “(i) nadekspresja istotnych enzymów zaangażowanych w syntezę polioli, o których wiadomo, że są regulowane na poziomie transkrypcyjnym przez  $\uparrow$ Osm, przy jednoczesnej (ii) zmniejszonej ekspresji innych strumieni węgla, w tym glikolizy, biosyntezy TCA i FA”. Interesującym dla Recenzenta byłoby zapoznać się z sugestiami Doktorantki dotyczącymi tego, w jaki sposób osiąga się zmniejszenie strumienia węgla przez glikolizę w przypadku konstytutywnej syntezy enzymów glikolitycznych, częściowo dotyczy to także cyklu kwasów trikarboksylowych.

Najbardziej wartościowym wynikiem, który dostarcza ta, włączona w prace doktorską, publikacja jest dostarczenie wglądu w reakcje na stres i adaptację drożdży *Y. lipolytica* do czynników stresowych na poziomie epigenetycznym.

**Podsumowanie i wnioski** pracy przytoczone są na stronach 90 - 91, odpowiadają one treści wyżej wymienionych publikacji naukowych.

Wszelkie moje uwagi nie wpływają jednak zupełnie na poziom naukowy i merytoryczny przedłożonej mi do recenzji pracy doktorskiej, a są raczej dociekliwością naukową.

Na szczególną pochwałę Recenzenta zasługuje bardzo bogaty dorobek naukowy Doktorantki. Poza dorobkiem publikacyjnym, będącym podstawą rozprawy doktorskiej, jest ona współautorem 6 publikacji naukowych, których sumaryczny współczynnik wpływu *Impact factor* to 19,63 oraz jednego rozdziału opublikowanego w monografii wydawnictwa *Springer*. Ponadto w celu wzbogacenia swojego warsztatu metodycznego, doktorantka odbyła staż naukowy w ramach projektu Power (POWR.03.01.00-00-S237/15), zrealizowany w INRA, Micalis Institut w Paryżu (Francja) pod opieką Pana Prof. Jean-Marca Nicaud, którego tematyką było konstruowanie szczepów *Y. lipolytica* z wykorzystaniem metod Golden Gate oraz CRISPR-Cas9, co świadczy o chęci doskonalenia swojego warsztatu naukowego oraz świadomości wagi korzystania z wiedzy ekspertów w osiąganiu zaplanowanych przez siebie celów. Doktorantka była przy tym aktywnym uczestnikiem licznych konferencji naukowych, z których 14 o zasięgu międzynarodowym, a 9 o zasięgu ogólnopolskim. Swoje wyniki badań prezentowała w postaci prezentacji posterowych lub prezentacji ustnych. Jest ona również autorem dwóch rozdziałów w monografiach pokonferencyjnych.

Ponadto Doktorantka brała udział w wykonywaniu w latach 2017 – 2020 projektu Iuventus Plus V finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (IP2015 O11074).



Recenzowana przeze mnie praca doktorska mgr inż. Moniki Kubiak-Szymendery wykonana została z należytą starannością oraz zachowaniem właściwej metodologii badań biologicznych. Czytałam ją z przyjemnością oraz uznaniem dla jej Autorki. Pragnę przy tym podkreślić, że wyniki są imponujące i inspirujące, a jednocześnie są przyczynkiem do stawiania dalszych hipotez i pytań.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji praca 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*” 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 Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach UPP Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc po uwagę wysoki poziom przedłożonej mi do recenzji rozprawy doktorskiej, zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Kubiak-Szymendery stosownym wyróżnieniem przyjętym w Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu.

Rzeszów, 20.11.2022 r.

  
Dr hab. Justyna Ruchala