

prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska,
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Eweliny Pawlikowskiej
pt. „**Drożdże *Metschnikowia spp.* jako potencjalny czynnik biokontroli**”
wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Doroty Kręgiel,
oraz promotora pomocniczego dr inż. Huberta Antolaka
na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechniki Łódzkiej

1. Podstawa opracowania recenzji

Podstawą formalną opracowania niniejszej recenzji jest Uchwała nr 81/2021 Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej, z dnia 6 lipca 2021 oraz pismo Pani Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, dr hab. inż. Anny Diowkszej, prof. uczelni, z dnia 14.11.2022.

2. Dobór i znaczenie tematu

Praca doktorska mgr inż. Eweliny Pawlikowskiej pt. „**Drożdże *Metschnikowia spp.* jako potencjalny czynnik biokontroli**” stanowi spójny tematycznie cykl sześciu publikacji dotyczących charakterystyki drożdży z rodzaju *Metschnikowia* wyizolowanych z polskich upraw ekologicznych. Temat rozprawy jest nowatorski i niezwykle aktualny, czego potwierdzeniem jest nadal stosunkowo niewielka liczba publikacji dotyczących wykorzystania tych drożdży w warunkach praktycznych. Zdolność drożdży z rodzaju *Metschnikowia* do produkcji pulcherrimy – czerwonego barwnika o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, wpisuje się w bardzo aktualne trendy poszukiwania biologicznych metod ochrony roślin. Obecnie świat nauki koncentruje się na poszukiwaniu drobnoustrojów prowadzących kontrolę biologiczną dla zwalczania szkodników i patogenów roślin. Ta idea badań nad biokontrolą ma na celu zmniejszenie użycia chemicznych środków ochrony roślin, a tym samym zmniejszenia ryzyka zagrożeń dla zdrowia ludzi i środowiska naturalnego.

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy wpisuje się w trendy poszukiwania nowych mikroorganizmów o zdolnościach do produkcji cennych metabolitów. Oprócz aspektów naukowych, wybór tematyki badawczej jest trafny i wartościowy pod względem aplikacyjnym. W świetle powyższych informacji, badania przeprowadzone przez mgr inż. Ewelinę Pawlikowską w ramach pracy doktorskiej, uważam za niezwykle aktualne i uzasadnione. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań są pionierskie, wpisują się w trendy i założenia zrównoważonego rolnictwa, a opracowane technologie wykorzystania pofermentacyjnej biomasy w zaproponowanych przez Doktorantkę procesach biotechnologicznych odpowiadają założeniom gospodarki w obiegu zamkniętym. Uzyskane efekty w istotny sposób mogą posłużyć do rozwoju dyscypliny technologia żywności i żywienia.

3. Formalna ocena pracy

Rozprawa liczy ponad 50 stron tekstu i zawiera: słowa kluczowe, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, genezę i cel pracy, zakres badań, syntetyczne omówienie osiągnięć badawczych przedstawionych do oceny, wnioski, bibliografię, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz dodatkowo kserokopie artykułów stanowiących cykl publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 76 pozycji w tym 64 stanowią oryginalne prace twórcze o zasięgu międzynarodowym. Literatura z ostatnich 5 lat obejmuje 29 pozycji, co stanowi ponad 43%. Ponadto Autorka wykorzystwała 5 aktów prawnych w postaci rozporządzeń i ustaw oraz 7 stron internetowych. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o sześć publikacji wydanych w latach 2017-2022 w recenzowanych czasopismach naukowych z listy JCR: 1 publikacja w czasopiśmie *Postępy Mikrobiologii* (IF=0,354, MEiN=20 pkt), 1 publikacja w *International Journal of General and Molecular Microbiology* (IF=2,674, MEiN =70 pkt), 2 publikacje w czasopiśmie *Fermentation* (IF=5,123, MEiN = 40pkt) oraz w czasopismach: *BioResources* (IF=1,614, MEiN =100 pkt) i *Processes* (IF=2,753, MEiN = 70pkt). Sumaryczny wskaźnik IF publikacji wynosi 16,493, a liczba punktów MEiN =340.

Wszystkie publikacje są opracowaniami zbiorowymi (od 2 do 7 autorów), w 5 pracach mgr inż. Ewelina Pawlikowska jest pierwszym autorem w jednej drugim. Z oświadczeń współautorów wynika, że Autorka niniejszej rozprawy miała znaczący udział w realizacji prac na poziomie od 35 do 70%, polegał on na współtworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu przeglądu literatury, wykonaniu eksperymentów, opracowaniu i interpretacji wyników,

analizie statystycznej, przygotowaniu manuskryptów oraz pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego.

4. Ocena merytoryczna rozprawy

Tytuł recenzowanej pracy doktorskiej odpowiada tematyce zaprezentowanej w cyklu publikacji. Wprowadzeniem w tematykę badawczą realizowaną w ramach pracy doktorskiej jest rozdział zatytułowany „geneza i cel pracy”. W rozdziale tym Doktorantka nakreśliła wyzwania współczesnego rolnictwa w zakresie dążenia do uzyskania wysokich i dobrych jakościowo plonów, wskazała na problemy wynikające z chorób roślin wywołanych przez patogeny grzybowe oraz wytwarzane przez nie mykotoksyny. Opisała sposoby zapobiegania i zwalczania infekcji grzybiczych roślin, podając przykłady różnych środków chemicznych (fungicydów), wraz z analizą wad i zagrożeń wynikających z ich zastosowania. W odniesieniu do strategii Europejskiego Zielonego Ładu zwróciła uwagę na wzrost zainteresowania biologicznymi metodami ochrony roślin, wskazując jednocześnie na potencjał drożdży z rodzaju *Metschnikowia* do produkcji czerwonego barwnika pulcherriminy o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Na tle dostępnej literatury oraz charakterystyki problemów współczesnego rolnictwa uzasadniła potrzebę podjęcia prac nad poszukiwaniem nowych, ciekawych czynników biokontroli. Rozdział ten stanowi dobre wprowadzenie i uzasadnienie pojętej w rozprawie doktorskiej tematyki badań.

Przedmiotem pracy była izolacja i charakterystyka szczepów drożdży należących do rodzaju *Metschnikowia*. Cel pracy poddano weryfikacji w ramach kolejno zaplanowanych eksperymentów, które Doktorantka zrealizowała w pięciu etapach badań. Poszczególne etapy pracy zostały dobrze zaplanowane, ich zakres jest bardzo szeroki i stanowi spójną całość.

Kluczową częścią autoreferatu jest przegląd literatury oraz syntetyczne omówienie osiągnięć badawczych szeroko opisanych w poszczególnych pracach składających się na przedstawioną do oceny rozprawę doktorską.

Przegląd literatury został przygotowany w oparciu o pierwszą publikację wchodzącą w skład rozprawy doktorskiej i został poświęcony charakterystyce niekonwencjonalnych, mało poznanych drożdży z rodzaju *Metschnikowia*. W tej części Doktorantka zebrała informacje na temat charakterystyki, ekologii, taksonomii, morfologii i fizjologii tych niekonwencjonalnych drożdży, wskazując na ich potencjał do produkcji wielu metabolitów, szczególnie niezwykle cennej pulcherriminy. Ponadto Doktorantka zwróciła uwagę na bardzo dobre zdolności adaptacyjne szczepów oraz ich zdolność dominacji nad innymi grupami mikroorganizmów, wskazując tym samym na ich wysoki potencjał aplikacyjny oraz możliwość wykorzystania

w różnych procesach biotechnologicznych. Rozdział ten został przygotowany z należytą starannością w oparciu o szeroki przegląd literatury i stanowi dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej. Analiza i charakterystyka dostępnej literatury na temat potencjału drożdży rodzaju *Metschnikowia* skłoniła Doktorantkę do podjęcia prac badawczych ukierunkowanych na szczegółową charakterystykę tego niezwykle ciekawego i mało poznanego materiału biologicznego.

Początkowe prace eksperymentalne Doktorantki zostały poświęcone izolacji i identyfikacji epifitycznych szczepów drożdży zdolnych do produkcji pulcherrimy- metabolitu, którego synteza stanowi główny mechanizm biokontroli. Materiałem wyjściowym do izolacji drożdży były kwiaty i owoce z upraw ekologicznych centralnej Polski. Dokonano analizy podstawowych cech morfologicznych i fenotypowych izolatów (oceniono m.in.: profile enzymatyczne, asymilacyjne czy tolerancję na wybrane warunki stresowe, hydrofobowość komórek drożdży i ich aktywności adhezyjne). Ważną i trudną częścią badań była ocena przynależności taksonomicznej izolatów z wykorzystaniem technik biologii molekularnej - analizy sekwencji domeny D1/D2. W efekcie przeprowadzonych badań Doktorantka zidentyfikowała epifity *Metschnikowia andauensis* i *M. sinensis*, a opracowane sekwencje zostały zdeponowane w publicznie dostępnej bazie GenBank NCBI. Ponadto Doktorantka oceniła antagonistyczne działanie szczepów w stosunku do grzybów strzępkowych, drożdży winiarskich czy drożdży niekonwencjonalnych. Potwierdziła, że uzyskane z polskich roślin izolaty drożdży *Metschnikowia* spp., w porównaniu do szczepów referencyjnych z kolekcji kultur, wykazywały korzystne cechy fenotypowe m.in. zdolność wzrostu w szerszym zakresie temperatur, pH środowiska oraz wyższą tolerancję na czynniki stresowe jak: etanol czy zawartość glukozy. Ponadto wyizolowane z polskich roślin izolaty drożdży *Metschnikowia* spp. wykazywały duży potencjał do zastosowania, jako środki ochrony roślin. Charakteryzowały się silnym antagonizmem wobec grzybów strzępkowych, co potwierdzono w testach przechowalniczych owoców miękkich. Uzyskane wyniki opublikowano w publikacji nr 2. Badania opisane przez Doktorantkę i współpracowników stanowiły pionierskie opracowanie wskazujące na potencjał drożdży *Metschnikowia* spp. wyizolowanych z polskich ekologicznych upraw, jako czynnik biokontroli.

W kolejnych doświadczeniach Doktorantka oceniła zdolność wytwarzania pulcherimy przez szczepy *Metschnikowia* spp. Przedmiotem badań było 10 najbardziej aktywnych izolatów drożdży otrzymanych w pierwszym etapie badań oraz 5 szczepów pochodzących z zagranicznych kolekcji kultur. Charakter chemiczny barwnika po hodowli komórek oceniono metodą spektroskopii rezonansu magnetycznego ($^1\text{H NMR}$). Opracowano również

metodę spektrofotometryczną, umożliwiającą pomiar stężenia pigmentu w środowisku. Wyniki badań wykazały, że tworzenie pulcherrimy przez drożdże, której mechanizm stanowi podstawę hamowania wzrostu mikroorganizmów, jest cechą zależną od szczepu drożdży, obecności jonów żelaza i składu pożywek hodowlanych. Uzyskane wyniki stanowią jedno

z pierwszych doniesień w literaturze na temat jakościowej i ilościowej oceny pulcherrimy wytwarzanej przez drożdże *Metschnikowia* spp.

W czwartej publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej Doktorantka oceniła potencjał wykorzystania drożdży z kladu *M. pulcherrima* w procesie winifikacji z polskich owoców: jabłek i aronii. Proces winifikacji prowadzono z udziałem monokultur oraz kultur mieszanych drożdży kladu *M. pulcherrima* oraz *S. cerevisiae* Tokay, *Wickerhamomyces anomalus* i *Dekkera bruxellensis*. Analiza profilu chemicznego win owocowych, z wykorzystaniem analiz chromatograficznych wykazała pożądane cechy win jabłkowych uzyskanych z udziałem drożdży *Metschnikowia* spp. i *S. cerevisiae*. Wina charakteryzowały się niższą zawartością etanolu, wyższym poziomem związków lotnych. Nowatorski charakter tych badań stanowił podstawę zgłoszenia patentowego, a przygotowana publikacja stanowi jedno z pierwszych opracowań wskazujących możliwość wykorzystania drożdży kladu *M. pulcherrima* do poprawy cech technologicznych win owocowych.

Przedmiotem kolejnej pracy było otrzymanie lizatów z pofermentacyjnej biomasy drożdży *Metschnikowia* spp. oraz charakterystyka ich profili aminokwasowych. Lizę komórek indukowano w sposób konwencjonalny (NaCl) oraz niekonwencjonalny, stosując saponinę z mydłokrzewu. W otrzymanych lizatach dominowały: alanina, hydroksyprolina, prolina, walina i leucyna. Ponadto Doktorantka i współautorzy wykazali, że zawartość hydroksyproliny w lizatach drożdży *Metschnikowia* spp. była kilkukrotnie wyższa w porównaniu do *Saccharomyces* spp. Uzyskano lizaty o wysokiej zawartości hydroksyproliny i proliny stymulującej tworzenie u drożdży *M. pulcherrima* barwnika pulcherrimy odpowiedzialnej za procesy biokontroli. Niewątpliwym osiągnięciem Doktorantki było opracowanie pierwszej chemicznej charakterystyki lizatów komórek drożdży *Metschnikowia* spp., a uzyskane wyniki stanowiły podstawę kolejnego zgłoszenia patentowego.

Ponadto Doktorantka i współautorzy ocenili możliwość zastosowania pofermentacyjnej biomasy drożdży z rodzaju *Metschnikowia* do odtleniania brzeczek fermentacyjnych sterylizowanych metodą ozonowania. W pracy wykazano, że badana biomasa drożdży była najskuteczniejszym środkiem odtleniającym, w porównaniu do innych zastosowanych metod

jak: ultradźwięki czy siarczany żelaza (II). W najkrótszym czasie uzyskano całkowite odtlenienie brzeczek melasowych i słodowych przeznaczonych dla procesów beztlenowych. Opracowanie to uzyskało ochronę patentową.

Zakres prac powadzonych przez Doktorantkę w ramach przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej był on bardzo obszerny. Układ i model poszczególnych doświadczeń został dobrze zaplanowany i przemyślany. Do jego realizacji wykorzystano szerokie spektrum badań analitycznych, rekomendowane techniki badawcze, oraz właściwą aparaturę. Wśród wielu badań na podkreślenie zasługują m.in. analizy dotyczące oceny przynależności taksonomicznej izolatów z wykorzystaniem technik biologii molekularnej - analizy sekwencji domeny D1/D2, charakterystyka chemiczna barwnika pulcherrimy z wykorzystaniem metody spektroskopii rezonansu magnetycznego (^1H NMR), skład chemiczny win metodami chromatografii gazowej sprzężony ze spektrometrią mas (GC/MS) oraz chromatografii cieczowej HPLC. Doktorantka opracowała również metodę spektrofotometryczną pomiaru stężenia pigmentu pulcherrimy w środowisku. Metody badawcze zostały właściwie dobrane i opisane w poszczególnych publikacjach, ich przyjęcie nie budzi wątpliwości.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała 6 wniosków. Sposób zredagowania wniosków jest poprawny, a ich strona merytoryczna znajduje uzasadnienie w analizie prezentowanych wyników badań. Treść wniosków potwierdza dokonanie przez Doktorantkę weryfikacji przyjętych założeń badawczych.

Pracę kończy streszczenie w języku polskim i angielskim. W streszczeniu pracy Doktorantka w sposób syntetyczny, wyczerpujący, przedstawia genezę, cel badań, zakres badań oraz uzyskane wyniki, ze wskazaniem głównych osiągnięć pracy.

Oceniana praca doktorska jest niewątpliwie oryginalnym dziełem naukowym, w którym Doktorantka wykazała dobre przygotowanie teoretyczne, samodzielność w prowadzeniu badań naukowych, umiejętność posługiwania się nowoczesnymi metodami analitycznymi. Określony w pracy cel badawczy został zrealizowany. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres badań obejmujący nie tylko izolację i niezwykle trudną identyfikację nowych szczepów, ale również ich pełną charakterystykę oraz potencjał wykorzystania świeżej biomasy jak i biomasy pofermentacyjnej w procesach biotechnologicznych. Większość uzyskanych wyników została zastrzeżona zgłoszeniami patentowymi i stanowi autorski wkład Doktorantki w rozwój dyscypliny technologia żywności i żywienia. O wysokim poziomie naukowym rozprawy doktorskiej świadczą prace opublikowane w czasopiśmie międzynarodowym o wysokim współczynniku oddziaływania JCR.


Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Eweliny Pawlikowskiej pt. „**Drożdże *Metschnikowia spp.* jako potencjalny czynnik biokontroli**” jest oryginalnym i wartościowym opracowaniem. Zawarte w niej wyniki badań są źródłem wiedzy o charakterze naukowym, jak i aplikacyjnym, na temat możliwości wykorzystania badanych mikroorganizmów w procesach biokontroli i wybranych procesach biotechnologicznych. Doktorantka sprawnie sformułowała temat i cel pracy, poprawnie zaplanowała i przeprowadziła prace eksperymentalne służące jego realizacji, umiejętnie wykorzystwała narzędzia badawcze, analityczne, co podnosi znacząco wiarygodność ustaleń naukowych prezentowanych w rozprawie. Potwierdzeniem tego są publikacje naukowe wchodzące w skład recenzowanej dysertacji. Przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko i stwierdzam, że rozprawa ta spełnia wszystkie ustawowe wymogi i kryteria określone w art.187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022, poz.574 ze zm).

Na tej podstawie wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Eweliny Pawlikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny pracy, niezwykle szeroki zakres badań oraz ich nowatorski potencjał potwierdzony publikacjami, 1 patentem i 3 zgłoszeniami patentowymi, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Pawlikowskiej.

Wrocław, dnia 07.02.2023 r.


Joanna Kawa-Rygielska


Wrocław 07.2.2023

prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska,
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej

Pani mgr inż. Eweliny Pawlikowskiej pt. „**Drożdże *Metschnikowia spp.* jako potencjalny czynnik biokontroli**” wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Doroty Kręgiel, oraz promotora pomocniczego dr inż. Huberta Antolaka na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest oryginalnym i wartościowym opracowaniem. Zawarte w niej wyniki badań są źródłem wiedzy o charakterze naukowym, jak i aplikacyjnym, na temat możliwości wykorzystania badanych mikroorganizmów w procesach biokontroli i wybranych procesach biotechnologicznych. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres badań obejmujący nie tylko izolację i niezwykle trudną identyfikację nowych szczepów, ale również ich pełną charakterystykę oraz potencjał wykorzystania świeżej biomasy jak i biomasy pofermentacyjnej w procesach biotechnologicznych. Większość uzyskanych wyników została zastrzeżona zgłoszeniami patentowymi i stanowi autorski wkład Doktorantki w rozwój dyscypliny technologia żywności i żywienia. O wysokim poziomie naukowym rozprawy doktorskiej świadczą prace opublikowane w czasopismach międzynarodowych o wysokim współczynniku oddziaływania JCR. Mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny pracy, niezwykle szeroki zakres badań oraz ich nowatorski potencjał potwierdzony publikacjami, 1 patentem i 3 zgłoszeniami patentowymi, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Pawlikowskiej.


Prof. Joanna Kawa-Rygielska