



Prof. dr hab. inż. Małgorzata Darewicz
Wydział Nauki o Żywności
Katedra Biochemii Żywności
tel. +48 895245171
e-mail: darewicz@uwm.edu.pl

Olsztyn, 11.07.2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Edyty Majewskiej
zatytułowanej

„ Białka AFP z psychrofilnych drożdży z rodzaju *Glaciozyma* i ich potencjał
biotechnologiczny”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Anety Białkowskiej, prof. uczelni,
na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej

Recenzję wykonano na podstawie pisma Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o
Żywności Politechniki Łódzkiej dr. hab. inż. Edyty Gendaszewskiej-Darmach, prof.
uczelni z dnia 29.05.2025r., zgodnie z Uchwałą Rady dyscypliny technologia
żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej z dnia 13.05.2025 roku.

Sylwetka kandydatki

Pani Edyta Majewska urodziła się 15 sierpnia 1991 r. w Tomaszowie Mazowieckim.
W 2015 roku ukończyła studia magisterskie na kierunku biotechnologia Politechniki
Łódzkiej, specjalność biotechnologia molekularna i biochemia techniczna. Jest
współautorką dwóch prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach z listy
ministerialnej oraz czterech komunikatów naukowych (w tym dwóch wystąpień ustnych).
Informacja czy Kandydatka ubiegata się uprzednio o nadanie stopnia doktora oraz
przebieg pracy naukowo-zawodowej nie są ujęte w recenzji ze względu na brak takich
informacji w przekazanych materiałach.



Dobór i znaczenie tematyki

Obecnie zidentyfikowano i scharakteryzowano wiele czynników, które regulują funkcjonowanie organizmów żywych, wśród nich - białka. Białka, pełniąc jako podstawową funkcję odżywczą, mogą być źródłem aminokwasów oraz fragmentów o aktywności biologicznej. Oprócz tego pełnią one funkcje takie jak np. sterowanie procesami metabolicznymi organizmu, transport substancji odżywczych czy stymulowanie proliferacji i różnicowania limfocytów. Wykorzystywane są w technologii żywności jako biokatalizatory a także ze względu na swoje właściwości funkcjonalne, takie jak zdolność do wiązania wody, emulgowania czy żelowania. Niektóre białka, jak np. lizozym, wykazują działanie antybakteryjne i są stosowane jako naturalne konserwanty. Obecnie na znaczeniu zyskują badania w zakresie identyfikacji i wykorzystania białek enzymowych z ekstremalnych środowisk w celu tworzenia produktów o wysokiej wartości dodanej. Takie ekstremozymy, będące efektem przystosowania organizmów do np. niskich lub wysokich temperatur, mogą być wykorzystane do produkcji nowych, innowacyjnych produktów, które mają dużą wartość ekonomiczną i użytkową. Z kolei organizmy psychrofilne posiadają np. białka obniżające temperaturę zamarzania płynów wewnątrzkomórkowych oraz umożliwiające aktywny transport składników odżywczych w niskich temperaturach. Podstawą ich technologicznego wykorzystania jest opracowanie np. metod efektywnej izolacji genu kodującego, biosyntezy, oczyszczania/izolowania, charakterystyki struktury białka oraz zdefiniowania pełnionych funkcji tj. właściwości biologicznych obok klasycznie określanych właściwości fizyko-chemicznych czy funkcjonalnych. Potencjalnym źródłem białek przeciwarzamrznawczych – krioprotektantów mogą być psychrofilne mikroorganizmy w tym drożdże. Drożdże są wyjątkowo odporne na zimno i tolerują temperatury nawet do -200 °C. W temperaturze 0 °C niektóre gatunki drożdży mogą namnażać się powoli i powodować fermentację. Bardzo interesujący wątek o dużym znaczeniu poznawczym i istotnym potencjale aplikacyjnym, dotyczący opracowania metod wykorzystania białek przeciwlodowych drożdży z rodzaju *Glaciozyma* w aspekcie ich otrzymywania i charakterystyki stał się podstawą wykonanego eksperymentu badawczego przez Panią mgr inż. Edytę Majewską. Stąd podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest niezwykle ciekawa poznawczo, aktualna, ważna i potrzebna. Wybór tematyki pracy doktorskiej wpisującej się w trendy naukowe oraz sposób jej realizacji uważam za interesujące, mające wartościowy charakter nowości naukowej i aplikacyjnej. Problem ten jest umiejscowiony w naukach rolniczych i może być podstawą opracowania dysertacji na stopień naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona przez mgr inż. Majewską do recenzji dysertacja zatytułowana „Białka AFP z psychrofilnych drożdży z rodzaju *Glaciozyma* i ich potencjał

biotechnologiczny” spełnia wymagania formalne stawiane tego rodzaju opracowaniom przedkładanym w postępowaniu na stopień naukowy doktora, tzn. ma charakter eksperymentalny i zawiera wszystkie niezbędne rozdziały ułożone w typowej sekwencji. Przedmiotem recenzji jest 167 stronicowe opracowanie, wykonane w oparciu o wyniki badań Autorki. Rozprawa, rozpoczynająca się streszczeniem w języku polskim i angielskim ma strukturę typową dla tego rodzaju opracowań i zawiera 7 rozdziałów wraz z podrozdziałami: przegląd literatury, opis celu i zakresu pracy, charakterystykę użytych materiałów oraz metod analitycznych i badawczych, omówienie wyników i ich dyskusję, wnioski i wykaz piśmiennictwa. Dodatkowo umieszczono wykaz dorobku naukowego Doktorantki. Całość zawiera 50 rysunków, 7 tabel, oraz 270 pozycji literaturowych. Przedstawione ilustracje i tabele cechuje dobry poziom graficznego opracowania tzn. są przejrzyste i łatwe w interpretacji. Uzupelnienie pracy o wykaz stosowanych skrótów, umożliwiłoby czytelnikowi sprawniejsze poruszanie się po tekście rozprawy. Powyższy sposób prezentacji wyników pracy jest właściwy i spełnia formalne wymagania ustawowe dotyczące przedstawienia osiągnięcia w przewodzie doktorskim. Praca stanowi zwartą całość. Została napisana poprawnie pod względem formy językowej i dobrze zilustrowana. Drobne błędy stylistyczne jak np. małe aminokwasy czy np. brak cytowania rysunku 1.5 lub np. wymienne stosowanie określenia próba i próbka zaznaczyłam w egzemplarzu pracy do oceny.

Ocena merytoryczna rozprawy

Po zapoznaniu się z treścią pracy stwierdzam, że tytuł dysertacji choć został sformułowany w sposób poprawny i zwięzły to nie w pełni adekwatnie do jej treści. Być może nie wybrzmiały w sposób wystarczający aspekty właściwości krioprotekcyjnych badanych białek. Zastrzeżeń nie budzą streszczenia, zarówno wersja w j. polskim jak i wersja w j. angielskim, gdzie Doktorantka, wskazując na ograniczoną liczbę eksperymentów dotyczących izolowania i charakterystyki białek przeciwlodowych z psychrofilnych drożdży uzasadnia cel badań jakim było wytypowanie białek o właściwościach krioprotekcyjnych spośród psychrofilnych i psychrotrofowych drożdży z kolekcji Instytutu Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej. Jednakże zaproponowany cel pracy nie zawiera odniesienia do zawartego w tytule pracy aspektu aplikacji o charakterze technologicznym.

W części pracy dotyczącej uzasadnienia podjętej tematyki badawczej Autorka dokonuje analizy zagadnienia w świetle literatury (42 strony) oraz w ciekawy sposób zapoznaje i wprowadza czytelnika w tematykę dysertacji. Pani Magister w prawidłowy sposób, korzystając z właściwie dobranych źródeł, wprowadza w przedmiot swoich badań ukazując ich zasadność. Ta część pracy została opracowana, na podstawie trafnie dobranej bibliografii, zacytowanej w sposób prawidłowy, wskazując na wnikliwość p. mgr Majewskiej. Dobór poszczególnych pozycji jest odpowiedni i obejmuje spis najważniejszej literatury z zakresu przedmiotu badań z ostatnich lat, wskazując na

rozeznanie tematyki, co potwierdza wkład pracy Doktorantki i przygotowanie się do podjęcia przedmiotowych badań. Dobór merytoryczny źródeł oraz sposób ich wykorzystania uważam za prawidłowy. Tak opracowana część pracy spełnia swoją funkcję w aspekcie nakreślenia stanu wiedzy i badań odnośnie problemów badawczych podejmowanych w rozprawie. Analiza tekstów źródłowych pozwoliła na podsumowanie zawierające stwierdzenie o małej liczbie doniesień naukowych dotyczących białek wiążących się do lodu pochodzących z drożdży czy grzybów strzępkowych w porównaniu do ich homologów izolowanych z innych organizmów psychrofilnych w aspekcie ich potencjalnych zastosowań w przemyśle spożywczym oraz np. do krioprezervacji komórek i tkanek.

Tak zdefiniowane wnioski z podsumowania stanu wiedzy stały się bazą do sformułowania założeń badawczych w ocenianej pracy tj. zakresu badań, który można do pewnego stopnia uznać za tożsamy z celami szczegółowymi pracy. Obejmował on: (i) optymalizację warunków hodowli wyselekcjonowanego szczepu w aspekcie wydajności biosyntezy; (ii) oczyszczanie białka wraz z określeniem jego aktywności inhibicji rekrytalizacji lodu; (iii) izolację genu kodującego docelowe białko pochodzące z drożdży z rodzaju *Glaciozyma martinii*; (iv) syntezę genu AFP z *Glaciozyma antarctica*; (v) ekspresję syntetycznego genu AFP w mezofilnym gospodarzu *Pichia pastoris*; (vi) charakterystykę właściwości otrzymanego rekombinowanego białka w aspekcie określenia aktywności inhibicji rekrytalizacji lodu wraz ze wskazaniem możliwości zastosowania w przemyśle spożywczym, oceną cytotoksyczności białka, oceną odpowiedzi prozapalnej oraz przedstawieniem modelu struktury 3D rekombinowanego białka. Należy podkreślić, że cel pracy został dość jednoznacznie uwypuklony i znajduje uzasadnienie we wcześniej przedstawionym przeglądzie piśmiennictwa. Postawiony zakres zadań badawczych jest poznawczy z aspektami aplikacyjnymi oraz nowatorski co w pełni uzasadniało podjęcie badań. Mam jednak uwagę dotyczącą konieczności doprecyzowania hipotezy/hipotez badawczej/badawczych w aspekcie ich weryfikacji oraz sformułowania odpowiedzi na pytania badawcze ze wskazaniem elementów nowości naukowej w kontekście prezentowanej dyscypliny naukowej.

Metodyka pracy (32 strony) jest dobrze przemyślana i właściwie merytorycznie dobrana. Wyróżnia się nowoczesnością szeregu metod jak np. metoda chromatografii powinowactwa do lodu wykorzystana podczas oczyszczania białek AFP (tutaj w oparciu o dane literaturowe Doktorantka samodzielnie zaprojektowała odpowiednią aparaturę), metoda skaningowej kalorymetrii różnicowej, metoda PCR do identyfikacji taksonomicznej psychrofilnych drożdży, klonowanie i ekspresja genu *afp Glaciozyma antarctica*, oznaczanie cytotoksyczności białka GaAFP w hodowlach linii komórkowych Caco-2 i HT-29 czy metoda modelowania homologicznego z użyciem programu SWISS-MODEL. Materiał biologiczny stanowiły szczepy drożdży należące do kolekcji Instytutu Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej. Do pełnego opisu

zabrakło m.in. informacji nt. numerów katalogowych zastosowanych odczynników chemicznych, odnośników literaturowych do niektórych zastosowanych metod analitycznych lub informacji o modyfikacji własnej albo też opracowaniu własnym, zastosowania w każdym przypadku jednostek układu SI, uzasadnienia dla wyboru wartości długości fali podczas selekcji frakcji przeznaczonych do analizy SDS-PAGE lub umieszczenia daty dostępu do stosownych baz danych i algorytmów czy podania czasu trwania rozmrażania. Przeprowadzone przez Doktorantkę eksperymenty zostały zaplanowane w sposób logiczny a ich realizacja i przebieg są przystępnie opisane. Prawdłowo dobrana metodyka zapewniała kompleksowe podejście do analizowanej problematyki badawczej zaś dobrze ustawiony warsztat badawczy umożliwiał osiągnięcie celów badawczych. W konsekwencji opracowanie sposobu postępowania metodycznego umożliwiło osiągnięcie celu badań jakim było otrzymanie rekombinowanego białka przeciwarzarnianowego (AFP) wraz z badaniem potencjału biotechnologicznego w aspekcie możliwości zastosowania jako krioprotektanta w procesie mrożenia owoców i warzyw.

Czytając tą część rozprawy doktorskiej nasuwa się pytanie, o ustosunkowanie się do którego proszę Panią mgr inż. Majewską podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej: (i) jakie inne sposoby rozmrażania mięsa można zastosować w przedmiotowym eksperymencie; (ii) jakie inne kryteria niż wyniki z pracy doktorskiej Pani mgr Marzeny Pazgier były/mogły być podstawą do wytypowania szczepu drożdży o numerze 186 spośród wszystkich szczepów należących do kolekcji Instytutu Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej.

W najobszerniejszym (43 str.) rozdziale dysertacji pt. „Wyniki” Doktorantka w przystępny sposób opisała rezultaty poszczególnych badań. Podział na podrozdziały nawiązujące do opisu etapów badań w rozdziałach Materiały oraz Metody ułatwił analizę wyników poszczególnych eksperymentów z zastrzeżeniem dotyczącym braku potrzeby powtórnego opisu etapów postępowania metodycznego, jaki jest zastosowany w kilku akapitach rozdziału „Wyniki”. Dyskusję otrzymanych wyników przeprowadzonych eksperymentów Kandydatka zawarła w rozdziale 6. Kandydatka kolejno przedstawiła wyniki badania białka przeciwlodowego AFP pochodzącego z psychrofilnych drożdży *Glaciozyma martinii* 186 (GmAFP) w kontekście jego biosyntezy i charakterystyki. Wdrożona procedura oczyszczania pozwalała wnioskować, że szczep *G. martinii* jest potencjalnym producentem białka AFP. Doktorantka kolejno oznaczyła aktywność termicznej histerezy natywnego białka GmAFP, aktywność inhibicji rekrytalizacji lodu dla białka GmAFP a następnie analizowała strukturę mrożonej marchwi z dodatkiem natywnego białka GmAFP jako krioprotektanta. Trudności w izolowaniu genu *gmAFP* spowodowały, że obiektem badań stało się białko AFP pochodzące z blisko spokrewnionych z *G. martinii* 186 psychrofilnych drożdży *Glaciozyma antarctica* PI12. W badaniach Doktorantka skoncentrowała się na białku Afp4 w aspekcie klonowania i

ekspresji genu *gaafp* w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, oczyszczania rekombinowanego białka GaAFP, klonowania i ekspresji genu *gaafp* w drożdżach *Pichia pastoris*, oczyszczania rekombinowanego białka GaAFP, oznaczenia aktywności inhibicji rekrytalizacji lodu rekombinowanego białka GaAFP, analizy strukturalnej mrożonych warzyw i owoców w obecności rekombinowanego GaAFP, aktywności metabolicznej komórek i wydzielaniu tlenu azotu oraz modelowaniu struktury GaAFP w oparciu o homologiczny szablon. W rozdziale Dyskusja wyników (14 str.) Doktorantka w przystępny i wyczerpujący sposób omówiła rezultaty swoich eksperymentów porównując otrzymane wyniki z danymi literaturowymi oraz usiłując wytłumaczyć podstawy molekularne obserwowanych zjawisk. Doktorantka po przeprowadzeniu wyżej opisanych eksperymentów wykazała, że obydwie białka GmAFP oraz GaAFP posiadają właściwości krioprotekcyjne i mogą potencjalnie być stosowane w przemyśle spożywczym. Podczas opisu wyników przeprowadzonych eksperymentów doktorantka nie ustrzegła się pewnych niedociągnięć np. niejednoznaczne oznaczenia literami a, b, c w rysunku 5.28 czy j. angielski zastosowany w rysunku 5.29. Ekspresja białka GaAFP w drożdżach *P. pastoris* GS115, a tym samym zwiększenie jego ilości, pozwoliła na wykonanie badań ukazujących potencjał biotechnologiczny docelowej cząsteczki. Doktorantka wykazała przynależność badanych drożdży do gatunku *Glaciozyma martinii*. Potwierdziła możliwość produkcji glikozyłowanego białka przeciwwzrostowego przez psychrofilne drożdże *G. martinii*. Mimo braku możliwości wyizolowania genu tego białka Doktorantka sprawdziła potencjał biotechnologiczny białek AFP. Po uzyskaniu syntetycznego genu jako gospodarza ekspresyjnego wybrano drożdże *Pichia pastoris* co pozwoliło udowodnić potencjał biotechnologiczny białka GaAFP. Doktorantka kolejno wykazała jego potencjał inhibicji rekrytalizacji lodu oraz możliwość wykorzystania właściwości krioprotekcyjnych podczas zamrażania twardych warzyw i miękkich owoców a także zmniejszenia stopnia wycieku wody i zwiększenia jędrności po rozmrożeniu. Dodatkowo Pani Magister wykazała, że białko GaAFP pozytywnie wpływa na przeżywalność drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Tutaj nasuwa się kolejne pytanie do dyskusji podczas publicznej obrony: (i) jakie czynniki mogą mieć wpływ na obserwowane obecnie trendy w poszukiwaniu nowych czynników bioaktywnych w aspekcie zastosowań w żywności; (ii) w jakim obszarze badania zainicjowane przez Doktorantkę mogą być kontynuowane ?

Podsumowaniem pracy jest rozdział 7. Zawarte tam stwierdzenia mają odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach badań aczkolwiek zastrzeżenia w tym aspekcie budzi stwierdzenie 1 (sklasyfikowane nieślusnie jako wniosek) i stwierdzenie 7 dla białka GmAFP czy stwierdzenie 1 dla białka GaAFP (określenie właściwy dobór jest niejednoznaczne). Otrzymane rezultaty potwierdzają zarówno poznawczy charakter jak i potencjał aplikacyjny dysertacji.

Wniosek końcowy

Moje uwagi/pytania zawarte w recenzji mają głównie charakter komentarzy i sugestii odnośnie ewentualnych dalszych analiz bogatego materiału zgromadzonego w ramach pracy. Reasumując, dysertację oceniam wysoko, doceniam jej oryginalność, trud wniesionej pracy, dociekliwość, konsekwencję, prawidłowo zaplanowaną część metodyczną, merytoryczną dyskusję odniesioną do wyników innych autorów, prawidłowe wnioskowanie oraz walory estetyczne. Uwzględniając wymagania stawiane rozprawom doktorskim należy w przypadku dysertacji mgr inż. Edyty Majewskiej stwierdzić, że: przedstawiona rozprawa doktorska prezentuje wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie chemii i biotechnologii białek w tym enzymologii. Doktorantka posiada bardzo dobre rozeznanie w krajowej i światowej literaturze związanej z prowadzonymi badaniami. Doktorantka wykazała się umiejętnościami samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Dysertacja mgr inż. E. Majewskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu zdefiniowanego w tytule oraz w celu rozprawy.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej mgr inż. Edyty Majewskiej stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja stanowiąc w pełni oryginalne i wartościowe rozwiązanie problemu badawczego, spełnia wymagania formalne stawiane pracom doktorskim, jak również stanowi osiągnięcie naukowe odpowiadające wymaganiom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm). Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Edyty Majewskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Katarzyna Darcu'z