

RECENZJA ROZRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Edyty Majewskiej

pt. „BIAŁKA AFP Z PSYCHROFILNYCH DROŻDŻY Z RODZAJU GLACIOZYMA I ICH POTENCJAŁ
BIOTECHNOLOGICZNY”

wykonanej

w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności

Politechniki Łódzkiej

pod kierunkiem Prof. Uczelni dr hab. inż. Anety Białkowskiej

Recenzja została przygotowana w nawiązaniu do Uchwały nr 35/2025 Rady dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia, Politechniki Łódzkiej, z dnia 13 maja 2025 roku, w odpowiedzi na pismo Pani Dziekan Prof. Uczelni dr hab. Edyty Gendaszewskiej-Darmach z dnia 16 maja 2025 roku.

1. Sylwetka Doktorantki

Pani Mgr inż. Edyta Majewska jest absolwentką kierunku Biotechnologia (specjalność biotechnologia molekularna i biochemia techniczna) na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechniki Łódzkiej. Studia drugiego stopnia Doktorantka ukończyła w 2015 roku.

Na podstawie dostarczonej dokumentacji można wnioskować, że oprócz rozpoczęcia kształcenia w Szkole Doktorskiej Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem Prof. Uczelni dr hab. inż. Anety Białkowskiej, Pani mgr inż. Majewska podjęła także pracę w firmie o profilu diagnostyka medyczna. Pani Doktorantka nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

2. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Edyty Majewskiej pt. „BIAŁKA AFP Z PSYCHROFILNYCH DROŹDŹY Z RODZAJU GLACIOZYMA I ICH POTENCJAŁ BIOTECHNOLOGICZNY” stanowi rozprawę w postaci jedno-autorskiego dzieła (monografii). Jednakże, jak można wnioskować na podstawie lektury dzieła oraz artykułów wskazanych w rozdziale „Dorobek Naukowy autorki pracy” (s. 148), przedłożone opracowanie stanowiło także zasadniczą część dwóch artykułów naukowych opublikowanych w latach 2020 i 2025 w czasopismach z listy JCR: Biomolecules (praca przeglądowa) oraz PLoS ONE (praca wynikowa). Stąd całość dzieła z jednej strony jest oparta na nowym modelu przygotowywania rozpraw doktorskich (na podstawie publikacji), a jednocześnie stanowi oryginalne opracowanie wraz z kompleksowym omówieniem całości (przygotowana monografia).

Manuskrypt jest skonstruowany w sposób klasyczny dla rozpraw naukowych. W dokumencie zawarto typowe rozdziały, takie jak streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie do przedmiotu rozprawy, cel i zakres pracy, opis zastosowanych materiałów i metod, wyniki bogato opatrzone elementami graficznymi, dyskusję i wnioski, spis cytowanej literatury, oraz syntetyczne zestawienie dorobku naukowego Doktorantki (w tym 4 doniesienia konferencyjne oraz wspomniane 2 artykuły naukowe). Reasumując strukturę rozprawy, można stwierdzić, że konstrukcja pracy jest klarowna i logiczna. Manuskrypt jest przygotowany niezwykle starannie, z dużą dbałością o estetykę pracy, jak również poprawny, precyzyjny język naukowy. Przedstawienie wyników prac eksperymentalnych w postaci jednolitej, spójnej rozprawy, oraz rola pierwszego/drugiego Autora w kluczowych dla dzieła artykułach, pozwala stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi **autorskie dzieło mgr inż. Edyty Majewskiej**, realizowane pod opieką Pani Promotor.

3. Przedmiot rozprawy oraz zastosowane podejście metodyczne

W ogólnym ujęciu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy

przeciwwymarzaniowych białek (AFP) z psychrofilnych drożdży z rodzaju *Glaciozyma* – *G. martinii* i *G. antarctica*, oraz ich przydatności w technologii żywności. Doktorantka bardzo wyraźnie rozdziela etap prac z natywnym białkiem AFP pochodzącym z gatunku *G. martinii* (produkowanym natywnie przez organizm swego pochodzenia) od etapu prac z homologicznym białkiem, oryginalnie kodowanym w genomie *G. antarctica*, a w niniejszej pracy produkowanym w systemie heterologicznego gospodarza. Nie ulega jednak wątpliwości, że przedstawiona praca stanowi spójne tematycznie, kompleksowe dzieło, obejmujące zarówno problem badawczy z zakresu badań podstawowych, jak i aplikację nowo zdobytej wiedzy w rozwiązaniu problemu technologicznego. Bardzo wysoko oceniam takie podejście.

Znaczenie podjętej tematyki badawczej w obu aspektach - poznawczym i aplikacyjnym, Doktorantka uzasadnia m.in. w treściach doskonale przygotowanego wprowadzenia do tematyki (rozdział 1. „Stan wiedzy w obszarze badań”). Przedstawia tam, w bardzo przekonujący sposób, dlaczego podjęta tematyka badawcza zasługuje na dalsze zgłębianie, zwracając uwagę na to, co już wiadomo, ale też i na braki w obecnej wiedzy. Nie sposób nie odnieść się do tego rozdziału bardziej szczegółowo. Przegląd stanu wiedzy i techniki przedstawiony w dziele został przygotowany niezwykle starannie, kompleksowo, a przy tym – bardzo ciekawie. Pragnę zwrócić szczególną uwagę na fakt, iż w treści tego rozdziału Doktorantka odwołuje się do licznych pozycji literaturowych, ale robi to z pełną świadomością – cytuje oryginalne prace, w których dokonano danego odkrycia/obserwacji. Stąd w wykazie referencji znajdują się zarówno najnowsze pozycje literaturowe opublikowane po 2020 roku, jak również liczne prace z lat '90 ubiegłego wieku, a także pozycje opublikowane wcześniej. W mojej ocenie jest to jedyne właściwe podejście, bardzo często zaniedbywane w najnowszych pracach naukowych. Z przygotowanego przeglądu można dowiedzieć się na temat organizmów ekstremofilnych oraz białkach wiążących się do lodu – ich charakterystyce i mechanizmach przyczyniających się do ich szczególnych właściwości. Wyraźnie wyróżniono także podrozdziały opisujące praktyczne zastosowania białek o tych niezwykłych właściwościach – o ich implementacji w postaci wyizolowanych preparatów białkowych (w przetwórstwie żywności, medycynie, czy wytwarzaniu sztucznego śniegu, str. 51), jak i w formie genów transferowanych do organizmów gospodarza o znaczeniu przemysłowym celem zmian ich właściwości (przykład łososia na str. 49). Ten recenzent jest pod ogromnym wrażeniem wiedzy Doktorantki i jakości treści zaprezentowanych w rozdziale 1.

Cele szczegółowe rozprawy, a tym samym główne etapy badań i zastosowane podejścia metodyczne, można skrótowo ująć w następujących punktach:

1. Prace badawcze z natywnym białkiem przeciwwzmarzaniowym pochodzącym z *G. martinii* z kolekcji Instytutu BMiP. Zastosowane podejście metodyczne obejmowało:

- Identyfikację taksonomiczną drożdży IBMiP 186 z zastosowaniem technik biologii molekularnej (uprzednia klasyfikacja była oparta o testy biochemiczne) i usytuowanie zidentyfikowanego gatunku na drzewie filogenetycznym. Metodyka: hodowla drożdży, izolacja genomowego DNA, namnożenie fragmentów zmiennych/konserwatywnych w reakcji PCR i sprawdzenie jakości produktów, sekwencjonowanie w jednostce zewnętrznej i analizę filogenetyczną przy użyciu oprogramowania MEGA11.
- Produkcję natywnego białka GmAFP w natywnym organizmie – dobór warunków hodowli celem maksymalizacji produkcji białka docelowego. Metodyka: hodowle węgłne w zakresie temperatur i mediów hodowlanych, zateżnianie supernatantu i analiza profili białkowych w elektroforezie SDS-PAGE.
- Oczyszczanie natywnego białka GmAFP przy zastosowaniu samodzielnie skonstruowanego zestawu i wg własnej procedury, oraz oznaczenie w elektroforezie SDS-PAGE jego wielkości i obecności reszt cukrowych.
- Oznaczenie aktywności termicznej histerezy (HT) oraz aktywności inhibicji rekrytalizacji lodu (IRI) natywnego białka GmAFP. Metodyka: zastosowanie skaningowej kalorymetrii różnicowej, oraz obserwacje mikroskopowe i pomiar wielkości kryształów. Ze względu na ograniczenia sprzętowe ta ostatnia procedura została wykonana we współpracy z Kolegami z Instytutu Nauk o Żywności, Katedry Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego.
- W kolejnym etapie przeprowadzono analizę strukturalną mrożonej marchwi w obecności lub bez natywnego białka GmAFP jako krioprotektanta przy zastosowaniu obserwacji mikroskopowych.
- Próby izolacji genu kodującego natywne białko GmAFP z cDNA *G.*

martinii. Metodyka: izolacja całkowitego RNA, odwrotna transkrypcja, zaprojektowanie primerów w oparciu o sekwencję genomu blisko spokrewnionych drożdży *G. antarctica* oraz analiza jakości kwasów nukleinowych i cDNA poprzez rozdział elektroforetyczny.

W mojej ocenie, wyniki tych badań przyczyniają się **do uzupełnienia światowej wiedzy** na temat AFP pochodzących z zimnolubnych drożdży **o ciekawy i uprzednio nie opisany przykład**.

2. Produkcja rekombinowanego białka AFP4 z *G. antarctica* w komórkach heterologicznego producenta.

- Optymalizacja sekwencji DNA kodującej białko GaAFP4 i jej charakterystyka. Metodyka: komercyjne i otwarte algorytmy/narzędzia: GeneArt, SignalP-6.0, pakiet Expasy i Glikosite.
- Subklonowanie fragmentu DNA w komórkach *E. coli* i przeniesienie do docelowych wektorów ekspresyjnych dedykowanych dla gospodarzy drożdżowych: *S. cerevisiae* i *P. pastoris* (*Komagataella phaffi*). Metodyka: projektowanie specyficznych primerów, modyfikujących flanki fragmentu kodującego gen *gaAfp*, reakcje PCR, ligacje, trawienie enzymami restrykcyjnymi, elektroforeza, transformacja *E. coli* i komórek drożdżowych, selekcja pozytywnych klonów na drodze colonyPCR, nadprodukcja białka w komórkach gospodarza wg standardowej metodyki opracowanej dla danego typu systemu ekspresyjnego, analiza obecności białka wewnątrz komórek drożdży i w supernatancie, chromatografia powinowactwa syntetycznie wprowadzonej metki histydynowej do złoża niklowego lub wiązanie do lodu i SDS-PAGE.
- Oznaczenie aktywności inhibicji rekrytalizacji lodu rekombinowanego białka GaAFP. Metodyka: metoda mikroskopowa i pomiar wielkości kryształów, jak dla GmAFP.
- W kolejnym etapie badano potencjał aplikacyjny rekombinowanego białka GaAFP – jego właściwości krioprotekcyjne w procesie mrożenia wybranych owoców i warzyw, oraz komórek drożdżowych. Metodyka: marchew, kalarepę, borówkę, oraz drożdże piekarskie przygotowano do

eksperymentu według opisanej w rozprawie procedury. Wybrane parametry oznaczano przed i po etapie mrożenia: zmiany strukturalne na drodze obserwacji mikroskopowych, oznaczenie utraty wody, czy, w przypadku komórek drożdżowych, przeżywalność. W eksperymentach zawsze przygotowywano próby kontrolne: bez użycia krioprotektanta i z użyciem glicerolu.

- Badanie wpływu GaAFP na aktywność metaboliczną i występowanie stanu zapalnego w zwierzęcych liniach komórkowych. Wybrane linie komórkowe (Caco-2, HT-29, RAW 264., w tym indukowanych LPS) hodowano wg standardowej procedury a następnie traktowano serią roztworów GaAfp. Badano następnie aktywność metaboliczną komórek zwierzęcych i produkcję mediatora stanu zapalnego (NO). Zastosowano specyficzne dla tych testów odczynniki – MTT i odczynnik Griessa.
- Modelowanie struktury GaAFP z użyciem programu (SWISS-MODEL) w oparciu o homologiczny szablon AFP - LeIBP pochodzącego z psychrofilnych drożdży *Glaciozyma* sp. AY30. Charakterystyka struktury i wnioskowanie o poszczególnych domenach i miejscu wiązania do lodu na podstawie wiedzy literaturowej i uprzednio rozwiązanych eksperymentalnie struktur.

W mojej ocenie, ten etap badań, dzięki zastosowanemu podejściu metodycznemu (ekspresja heterologiczna i otrzymanie wystarczającej ilości rekombinowanego białka), pozwolił na dokonanie charakterystyki **potencjału aplikacyjnego** przedmiotowego produktu biotechnologicznego (białka AFP) **dla rozwiązania realnego problemu technologicznego**. Nie brakuje w nim jednak bardzo ciekawych elementów novum naukowego.

Aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zastosowała szereg zróżnicowanych technik, które w sposób adekwatny odnosiły się do problemów badawczych. Podejścia eksperymentalne zostały szczegółowo przedstawione w sekcji 3 i 4 rozprawy. Bardzo wysoko oceniam stronę metodyczną pracy, w tym dbałość o szczegóły w przebiegu prac eksperymentalnych (równowagowe ilości kulek szklanych do ekstrakcji, sposób składania pożywek hodowlanych) oraz jej innowacyjnych charakter (samodzielnie

skonstruowany system do izolacji białek wykazujących powinowactwo do lodu, str. 62). Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera wyniki bardzo dobrze zaplanowanych, wielokierunkowych badań, o bardzo szerokim zakresie metodycznym, obejmującym podejścia z zakresu mikrobiologii, biochemii, inżynierii genetycznej, biologii molekularnej, jak również analizy bioinformatyczne (modelowanie struktur 3D białek). Tak szeroki zakres przeprowadzonych prac obrazuje szerokie spektrum kompetencji, jakie Doktorantka nabyła w trakcie wykonywania pracy doktorskiej i zasługuje na duże uznanie.

W tym zakresie chciałabym odnieść się do opisanej w pracy niemożności izolacji genu *gmAfp* z cDNA z *G. martinii*. Dla tego recenzenta przedstawiony sposób radzenia sobie z zaistniałą sytuacją (staranność w przygotowaniu dobrej jakości RNA, zastosowanie szeregu protokołów do przygotowania cDNA, odniesienie się do filogenezy gatunków z kładu *Glaciozyma*) dowodzi dojrzałości naukowej Doktorantki. Podjęto szereg środków zaradczych celem identyfikacji możliwych słabych punktów w procedurze, oraz wyeliminowania błędów technicznych, a następnie zaproponowano wartościowe rozwiązanie, które umożliwiło ukończenie założonego planu badawczego z sukcesem.

4. Kluczowe wyniki i wnioski uzyskane w toku realizacji pracy oraz znaczenie osiągnięć dla środowiska naukowego

Do kluczowych osiągnięć naukowych przedstawionych w rozprawie w mojej opinii należą:

- Wykazanie zdolności drożdży z gatunku *G. martinii* do syntezy białka o właściwościach termicznej histerezy oraz inhibicji rekrytalizacji lodu (oznaczone jako GmAfP).
- Określenie parametrów sprzyjających produkcji tegoż białka w komórkach natywnego organizmu (w temperaturze 4°C na podłożu NB).
- Dokonanie charakterystyki właściwości natywnego białka GmAfP – wielkości, obecności glikozylacji, wartości aktywności HT i IRI – 27 kDa, obecność glikozylacji, 0,08°C, aktywność IRI określona opisowo (wielkość kryształów lodu z dodatkiem GmAfP po 60 minutowej inkubacji w -8°C, pozostaje 3x mniejsza niż w roztworze sacharozy), oraz potencjału aplikacyjnego jako krioprotektanta.
- Opracowanie systemu do wydajnej (140 mg/L) ekspresji białka GaAfP w komórkach *P. pastoris* i dopracowanie protokołu promującego produkcję rekombinowanego białka (1% metanolu 2x na dobę, 72h, w 28°C, przy 200 rpm).
- Wykazanie aktywności IRI białka rekombinowanego (kryształy lodu, uzyskane po

60 minutowej inkubacji w -8°C , są 3-krotnie mniejsze w obecności GaAFP niż w roztworze sacharozy) oraz potencjału aplikacyjnego jako krioprotektanta w procesie mrożenia warzyw: marchwi oraz kalarepy; jak również działania ochronnego podczas zamrażania drożdży piekarskich.

- Wstępne wykazanie bezpieczeństwa stosowania białka GaAFP – braku działania cytotoksycznego i prozapalnego na wybrane linie komórek zwierzęcych.

Wyniki uzyskane w toku prac eksperymentalnych, po trafnej interpretacji biologicznej i szczegółowym przedyskutowaniu z danymi literaturowymi, pozwoliły na sformułowanie aż 17 finalnych obserwacji i wniosków, zaprezentowanych na str. 146 - 147 dokumentu. Postawione wnioski są uzasadnione i poparte przedstawionymi danymi eksperymentalnymi.

5. Komentarze

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska w znacznej części już przeszła proces recenzencki, jako że stanowi zbiór treści i wyników przedstawionych w artykułach opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. W ocenie recenzenta, praca jest bardzo ciekawa, przygotowana niezwykle starannie, prezentuje bardzo szeroki zakres dobrze zaplanowanych prac eksperymentalnych, a interpretacje i wyjaśnienia uzyskanych rezultatów są szczegółowe i wyczerpujące. Z tego względu pozwolę sobie jedynie na drobne komentarze oraz zapytania kierowane do Doktorantki z prośbą o ustosunkowanie się do nich w trakcie publicznej obrony:

1. W rozdziale 1. Doktorantka wskazuje, że wśród gatunków drożdży zdolnych do produkcji białek AFP są także m.in. drożdże z gatunku *Candida parapsilosis*. Czy w opinii Doktorantki szczep drożdży należący do tego gatunku, ale wyizolowany z wędliny (salami) wyprodukowanej w Polsce także posiadałby zdolność do produkcji AFP?
2. Bardzo zaciekał mnie fragment tekstu zaprezentowany na str. 37, gdzie wskazano, że dystrybucja genów kodujących białka o aktywności AFP to kombinacja zarówno konwergencji, jak i lateralnego transferu genów. Czy w literaturze przedmiotu przedstawiono przekonywujące dane na temat międzygenomowego przeniesienia tychże genów pomiędzy organizmami znacznie oddalonymi filogenetycznie na drodze zjawiska horyzontalnego transferu? Czy opisano mechanizm takiego zdarzenia?

3. Chciałam też zapytać o stronę techniczną, w tym - opisany na str. 61 zestaw wariantów hodowli. Czym się kierowano przy projektowaniu tych wariantów - dlaczego w hodowlach przy 40°C stosowano mieszanie, a hodowle w temp. 10°C prowadzono bez mieszania. Tutaj chciałam też zauważyć, że tak długi czas trwania hodowli wymagał od Doktorantki bardzo dobrego planowania prac eksperymentalnych.
4. Podobnie – dlaczego do hodowli rekombinowanego szczepu *S. cerevisiae* niosącego wektor pYES2 suplementowano chloramfenikol? Czy tutaj selekcja nie następowała na drodze komplementacji auksotrofii uracylowej (mapa wektora przedstawiona na rysunku 4.2)?
5. Istotne wydaje mi się także stwierdzenie, na jakiej podstawie stwierdzono, że prążek zaznaczony na Rysunku 5.5 (*Analiza SDS-PAGE białek zewnątrzkomórkowych po hodowli w głębokiej drożdży G. martinii 186 na różnych podłożach i w różnych warunkach hodowli*) odpowiada białku AFP? Czy wiadomo, że jest to główne białko zewnątrzkomórkowe produkowane przez te drożdże w zadanych warunkach temperaturowych? Czy wiadomo, że inne białka zewnątrzkomórkowe są także produkowane? Tutaj zaznaczę, że w toku kolejnych badań wykazano słuszność tego stwierdzenia – dokonując imponująco selektywnego oczyszczania techniką chromatografii powinowactwa do lodu, czy też wykazanie aktywności HT i IRI (Rysunki 5.8 i 5.9/5.10).
6. W pełni zgadzam się z Doktorantką, że ani jakość wyizolowanego RNA (Rysunek 5.12), ani reakcja odwrotnej transkrypcji przeprowadzona z wykorzystaniem aż trzech różnych zestawów komercyjnych (w tym zarówno jedno- i dwustopniowych) nie wydają się być prawdopodobnymi przyczynami niemożności namnożenia genu *gmafp* na matrycy wygenerowanego cDNA. Podobnie jak Doktorantka przyczyny poszukiwałamby w komplementarności primerów. W związku z tym chciałam zapytać, czy zaprojektowane primery testowano na matrycy genomowego DNA z *G. martinii*? Czy takie podejście mogłoby być zasadne?
7. Komentarz – w badaniach własnych recenzenta także produkcja sekrecyjnych białek w komórkach *S. cerevisiae* była nieefektywna i poszukiwano alternatywnych systemów drożdżowych.

6. Posumowanie

W recenzowanej rozprawie doktorskiej mgr inż. Edyty Majewskiej na uwagę zasługuje szeroki zakres przeprowadzonych badań. Wysoko oceniam wielokierunkowość podejść i mnogość zastosowanych technik, co skutkuje kompleksowym i rzetelnym podejściem do badanego problemu. Uważam, iż przedstawiona rozprawa doktorska wraz z towarzyszącymi jej publikacjami stanowi merytorycznie wartościowy wkład do światowej wiedzy naukowej z zakresu biologii psychrofilnych drożdży, jak i wartościowych biomolekuł przez nie produkowanych, stanowiąc zarazem rzetelną podstawę do kontynuowania badań w tej tematyce i dalszych prac o charakterze aplikacyjnym.

7. Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Edyty Majewskiej spełnia warunki określone Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 ze zm.). Zwracam się zatem do Rady dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Edyty Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

8. Wniosek o wyróżnienie

Jednocześnie, mając na uwadze walory merytoryczne recenzowanej rozprawy oraz jakość opublikowanych artykułów naukowych towarzyszących rozprawie, wnoszę do Rady dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Politechniki Łódzkiej o jej wyróżnienie.

Poznań, 20-06-2025



.....