



Prof. dr hab. inż. Anna Gliszczyńska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy

Wrocław, dnia 15.07.2025 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Edyty Majewskiej
pt. „Białka AFP z psychrofilnych drożdży z rodzaju *Glaciozyma* i ich potencjał biotechnologiczny”**

Podstawa formalna: Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na wniosek Rady Dyscypliny Naukowej Technologia Żywności i Żywnienia Politechniki Łódzkiej (Uchwała nr 35/2025) z dnia 13 maja 2025 roku.

Organizmy ekstremofilne, będące źródłem biomolekuł o unikalnych właściwościach biochemicznych i strukturalnych, są przedmiotem intensywnych badań wielu ośrodków naukowych na świecie ze względu na ich wysoki potencjał aplikacyjny. Jedną z grup biomolekuł budzących szczególne zainteresowanie są białka przeciwdziałające zamarzaniu (AFP – *antifreeze proteins*), które dzięki zdolności do hamowania wzrostu i rekrytalizacji lodu mogą pełnić funkcję nowej generacji krioprotektantów do zastosowań w sektorze spożywczym, farmaceutycznym, rolniczym i medycznym. Białka przeciwarzamraniowe izolowane z ryb, owadów i roślin zostały dotychczas scharakteryzowane pod względem struktury oraz mechanizmu działania, a ich potencjalne zastosowania technologiczne są przedmiotem licznych badań przedwdrożeńiowych. Znacząco mniej wiadomo natomiast o białkach AFP produkowanych przez mikroorganizmy psychrofilne. Wstępne badania sugerują, że białka te mogą wykazywać przewagę zarówno pod względem efektywności działania w niskich temperaturach jak i łatwości produkcji biotechnologicznej oraz podatności na modyfikacje z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej.

Rozprawa doktorska mgr inż. Edyty Majewskiej pt. „*Białka AFP z psychrofilnych drożdży z rodzaju *Glaciozyma* i ich potencjał biotechnologiczny*” stanowi próbę uzupełnienia tej luki badawczej. Podejmuje temat istotny zarówno z punktu widzenia nauki podstawowej, jak i aplikacyjnej. Badania zostały zrealizowane w doświadczonym i uznanym zespole naukowym działającym w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej (IBMiP) Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem dr hab. inż. Anety Białkowskiej, prof. uczelni. Zespół ten od lat z sukcesem zajmuje się eksploracją zimnolubnych (psychrofilnych) mikroorganizmów w celu identyfikacji i charakterystyki biomolekuł o unikalnych właściwościach biologicznych i potencjale aplikacyjnym w biotechnologii przemysłowej. Prace prowadzone w ramach zespołu wpisują się w aktualne światowe kierunki rozwoju biotechnologii przemysłowej opartej na zastosowaniu mikroorganizmów ekstremofilnych jako źródła nowatorskich enzymów, białek ochronnych oraz związków bioaktywnych.

Doktorantka, wykorzystując interdyscyplinarne podejście badawcze, obejmujące techniki biologii molekularnej, inżynierii genetycznej, analizy biochemiczne oraz testy aplikacyjne, przeprowadziła szeroko zakrojone badania ukierunkowane na identyfikację szczepu drożdży z kolekcji IBMiP *Glaciozyma martinii* 186 zdolnego do syntezy białka przeciwdziałającego zamarzaniu (AFP). W ramach realizowanych badań opracowano następnie rekombinowaną formę białka GaAFP, a także przeprowadzono ocenę jego właściwości i potencjału aplikacyjnego.

W zgodzie z art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 2018 roku przedłożona do oceny rozprawa została przygotowana w formie monografii i odpowiada formalnym kryteriom zgodnie z obowiązującym stanem prawnym. Dysertacja liczy 167 stron i została przygotowana w języku polskim zgodnie z obowiązującymi przy pisaniu prac naukowych zasadami. Zawiera kolejno: streszczenie (w języku polskim i angielskim), *wstęp z przeglądem literatury prezentujący stan wiedzy w obszarze badań, cele pracy, materiały i metody, wyniki, następnie ich omówienie i dyskusję, wnioski, dorobek naukowy autorki pracy oraz wykaz bibliografii*. Zważywszy na tak obszerne opracowanie, błędy językowe, redakcyjne i edytorskie są nieliczne i nie wpływają istotnie na odbiór ani merytoryczną wartość pracy.

W pierwszej części rozprawy doktorskiej Autorka prezentuje na ponad 40 stronach rozbudowany przegląd literatury, który zawiera aktualny stan wiedzy na temat organizmów ekstremofilnych, ze szczególnym uwzględnieniem psychrofilii i syntetyzowanych przez nie białek wiążących się do lodu (IBPs) dzielących się na białka nukleacyjne lodu (INPs) oraz białka

przeciwzamarzaniowe (AFPs). Omawia ich klasyfikacje, mechanizmy działania, a także potencjał przemysłowy. Obszerny wstęp stanowi wartościowe tło merytoryczne, ułatwiające czytelnikowi zrozumienie kontekstu i znaczenia prezentowanych w dalszych etapach pracy celów badawczych chociaż można go było przedstawić bardziej kompleksowo z ukierunkowaniem na najnowsze osiągnięcia w zakresie AFPs pochodzenia mikrobiologicznego wskazując wyraźnie na luki w wiedzy, które Autorka zamierza wypełnić oraz sposób w jaki niniejsza praca rozwija dotychczasowe ustalenia wskazując wyraźnie na innowacyjność prowadzonych badań.

Sformułowane w rozprawie cele badawcze nie w pełni oddają szeroki zakres i złożoność prac eksperymentalnych zrealizowanych przez Doktorantkę. Rozróżnienie celów głównych i przyporządkowanie im celów szczegółowych oraz postawienie brakującej w tym rozdziale hipotezy badawczej zwiększyłoby przejrzystość i odzwierciedliło rzeczywisty przebieg prowadzonych badań.

Poszczególne zadania badawcze zostały zaplanowane prawidłowo, rozdział Materiały i Metody (30 stron) ma logiczną strukturę, prezentuje różnorodność zastosowanych metod jednak wiele z nich opisanych jest powierzchownie bez podania szczegółów pozwalających zorientować się na przykład w ilości badanych wariantów czy kluczowych parametrów. Przy tak szerokim warsztacie metodycznym przydatne byłoby także określenie w jakim stopniu Doktorantka była bezpośrednio zaangażowana w przeprowadzenie wszystkich wymienionych procedur, a w jakim stopniu jej udział polegał na współpracy z członkami zespołu.

W odczuciu recenzenta zdecydowanie korzystniejsze i ułatwiające analizę danych byłoby również połączenie przyjętej przez Autorkę formy prezentacji wyników i następującej po niej dyskusji na tle danych literaturowych z tego obszaru. Niektóre etapy wykonanych badań zostały pominięte w jednym bądź drugim podrozdziale i dopiero ich kompilacja daje recenzentowi pełny obraz ogromu wykonanej pracy i ich znaczenia w kontekście aktualnego stanu wiedzy z tego zakresu.

Rozdział Wyniki prezentuje eksperymentalny dorobek i kluczowe obserwacje związane z badaniami nad izolowaniem, charakterystyką i wykorzystaniem białek AFP pochodzenia drożdżowego. W pierwszym etapie badań Doktorantka dokonała identyfikacji taksonomicznej badanego szczepu drożdży, klasyfikowanego początkowo na podstawie testów biochemicznych jako *Leucosporidium antarcticum*. Zastosowała na tym etapie podejście molekularne obejmujące amplifikację i sekwencjonowanie regionu D1/D2 dużej podjednostki 26S rDNA oraz ITS1/ITS2 co

pozwoło na jednoznaczne przypisanie drobnoustroju do gatunku *Glaciozyma martinii* z ponad 99,6% zgodnošcią sekwencyjnà.

Wyniki dotyczàce produkcji natywnego białka GmAFP przez drożdże *G. martinii* 186 obejmowały szereg wariantów i analizę parametrów hodowli tj. rodzaj podłoŹa, temperatura, czas inkubacji, szybkość wytrząsania lub jego brak. W tym miejscu warto byłoby rozszerzyć dyskusję prezentacji wyników z poszczególnych wariantów, opisać dokładniej wpływ podłoŹa i badanych warunków procesu. Autorce udało się w toku przeprowadzonych eksperymentów potwierdzić, Źe w temperaturze 4°C na podłoŹu NB przy wytrząsaniu (180 rpm) po 14 dniach hodowli następuje biosynteza zewnàtrzkomórkowego białka przeciwwamarzaniowego GmAFP o masie 27 kDa. Do tej części pracy nasuwajà się pytania: 1) choć w przypadku zimnolubnych drobnoustrojów problemem jest często niska wydajność syntezy, która i w tym wypadku uniemoŹliwiła iloœciowe oznaczenie stęŹenia białka oraz stopnia jego oczyszczenia za pomocà chromatografii powinowactwa do lodu to czy Doktorantka widzi moŹliwoœci dalszej optymalizacji tego procesu hodowli? 2) czy rozwaŹałaby jeszcze zasadnoœć prowadzenia eksperymentów w zakresie od mikrobiologicznego producenta do aktywnego białka poprzez zastosowanie metody planowania eksperymentów (ang. *Design of Experiments*) DoE/zwiêkszenie skali namnaŹania droŹdŹy w wariancie optymalnym w aspekcie oceny ekonomicznej?

Na podkreœlenie zasługujà wyniki badania aktywnoœci termicznej histerezy oraz hamowania rekrytalizacji lodu natywnego białka GmAFP ponad trzykrotnie wyŹsze w porównaniu z próbà kontrolnà. Mocnym punktem pracy jest test aplikacyjny z zastosowaniem hodowanego GmAFP w procesie mroŹenia marchwi i potwierdzenie ograniczenia uszkodzeń komórkowych oraz utraty karotenoidów. Uzyskane wyniki wskazujà na cenne, innowacyjne i praktyczne wlaœciwoœci krioprotekcyjne uzyskanego białka GmAFP, szczególnie Źe *G. martinii* jest trzecim gatunkiem psychrofilnych droŹdŹy, dla których produkcja białek AFP została potwierdzona (wyniki zostały opublikowane w tym roku w czasopiœmie PLOS One).

W kolejnych etapach dokonano próby izolowania genu kodujàcego biało GmAFP. Choć izolacja genu z biomasy w warunkach niskotemperaturowych nie powiodła się, warto byłoby rozwinàć dyskusję dotyczàcà strategii projektowania starterów np. zoptymalizowanych sekwencji dla droŹdŹy ekspresyjnych. Jakie alternatywne podejœcie do identyfikacji sekwencji genu AFP Doktorantka mogłaby wskazać?

Ekspresję genu przeprowadzono z powodzeniem w mezofilnym gospodarzu *Pichia pastoris* GS115, uzyskując białko GaAFP w ilości około 140 mg/L. Hodowlę zoptymalizowano względem temperatury i stężenia metanolu jako induktora. Zdolność rekombinowanego białka do inhibicji rekrytalizacji została potwierdzona funkcjonalnie. Szczególnie istotną obserwacją jest potwierdzenie działania rekombinowanego białka GaAFP jako krioprotektanta, który nie tylko redukuje uszkodzenia warzyw po mrożeniu, ale również chroni komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (45% wyjściowej liczby komórek drożdżowych przeżywa) skuteczniej niż klasyczny krioprotektant, glicerol. W zakresie badań cytotoksyczności potwierdzono bezpieczeństwo stosowania GaAFP i jego brak cytotoksyczności wobec komórek linii Caco-2 i HT-29. Warto jednak doprecyzować, dlaczego te linie komórkowe zostały wyselekcjonowane do badań? Caco-2 i HT-29 są liniami pochodzenia nowotworowego, co czyni je modelem do badań *in vitro* nad barierą jelitową i cytotoksycznością, ale nie w pełni odzwierciedlają zdrową tkankę. Czy nie byłoby zasadnym uwzględnić dodatkowo testów na liniach nienowotworowych, w celu kompleksowej oceny bezpieczeństwa? Czy rozważała Pani wydłużenie testów żywotności do 72 godzin, by uzyskać szerszy obraz potencjalnych efektów?

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi interesującą i wartościową pozycję naukową. Zakres przeprowadzonych eksperymentów był szeroki, starannie zaplanowany i właściwie zrealizowany. Uzyskane wyniki posiadają znaczący potencjał aplikacyjny, a obserwacje wnoszą istotny wkład w rozwój wiedzy podstawowej w zakresie biotechnologii ekstremofilnych mikroorganizmów. Praca zawiera elementy nowości naukowej, a Doktorantka udowodniła, że dysponuje bardzo dobrym warsztatem badawczym oraz umiejętnością rozwiązywania złożonych problemów eksperymentalnych. Zastosowanie różnorodnych metod potwierdza wysoki poziom interdyscyplinarnego podejścia do realizacji celów badawczych. Powyższe pytania i komentarze wynikają głównie z niepełnego rozwinięcia niektórych aspektów w dysertacji i w żaden sposób nie umniejszają one mojej pozytywnej oceny wartości merytorycznej i poziomu naukowego rozprawy.

Warto podkreślić, że Doktorantka jest autorką dwóch artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach oraz aktywnie uczestniczyła w czterech konferencjach naukowych, prezentując wyniki swoich badań.

Podsumowując, praca doktorska spełnia wszystkie wymagania ustawowe oraz zwyczajowe zgodnie z obowiązującymi przepisami. Zaprezentowane wyniki mają duże znaczenie w dziedzinie biotechnologii przemysłowej jak i technologii żywności, rzucając nowe światło na możliwości



zastosowania białek przeciwdziałających zamarzaniu pochodzenia drożdżowego jako naturalnych krioprotektantów. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Technologia Żywności i Żywnienia Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.