



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

PRACOWNIA BIOLOGII FARMACEUTYCZNEJ I BIOTECHNOLOGII
KATEDRA I ZAKŁAD KOSMETOLOGII PRAKTYCZNEJ I PROFILAKTYKI CHOROÓB SKÓRY

Collegium Pharmaceuticum
ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel. 506135359
e-mail: kikowska@ump.edu.pl

Poznań, 25.04.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej zatytułowanej

**„Fizjologiczne podstawy syntezy wybranych metabolitów wtórnych
w elicytowanych i transformowanych kulturach tkankowych roślin
Dionaea muscipula J. Ellis i ich właściwości antybakteryjne”**

wykonanej przez **mgra inż. Wojciecha Makowskiego**

w Katedrze Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin
Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

pod kierunkiem dr hab. inż. A. Królickiej, prof. UG i dra inż. K. Tokarza, prof. URK

Niniejszą recenzję przygotowano w odpowiedzi na pismo nr **N002/2022/35** z dnia 30.03.2022 roku Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego dra hab. Mariusza Grinholca, prof. UG.

Podstawą ubiegania się o **stopień naukowy doktora w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze, dyscyplinie nauki biologiczne** jest spójny tematycznie cykl **trzech oryginalnych publikacji** opublikowanych w latach 2019-2021, w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (Molecules/MDPI, Applied Microbiology and Biotechnology/Springer, BMC Plant Biology/Springer Nature). Sumaryczny współczynnik oddziaływania *impact factor* dla tych prac wynosi **12,295**, co odpowiada punktacji **MEiN = 340 pkt.** Opublikowanie wyników badań

eksperymentalnych przez prestiżowe wydawnictwa naukowe o znaczącym współczynniku oddziaływania świadczy o wysokim poziomie osiągnięcia zgłoszonego do postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Warto podkreślić, że we wszystkich trzech publikacjach Pan mgr inż. Wojciech Makowski jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Wkład doktoranta w powstanie prac był dominujący, polegał na opracowaniu koncepcji badań i sformułowaniu hipotez badawczych, zaprojektowaniu doświadczeń, przeprowadzeniu analiz, interpretacji uzyskanych wyników, opracowaniu i redakcji manuskryptu. Znaczący wkład merytoryczny Doktoranta został poświadczony stosownymi oświadczeniami i nie budzi zastrzeżeń recenzenta. W skład dorobku naukowego Pana Magistra wchodzi także: jeden rozdział w monografii naukowej i osiem artykułów w czasopismach naukowych o sumarycznym współczynniku oddziaływania *impact factor* 27,958, co odpowiada punktacji MEiN = 660 pkt. Według informacji naukometrycznych, opracowanych na podstawie Web of Science, sumaryczny IF, zgodnie z rokiem publikacji, jest bardzo wysoki i wynosi 41,397, co odpowiada punktacji MEiN 1000 pkt. Natomiast sumaryczna liczba cytowań wszystkich prac Doktoranta (na dzień opracowania pracy doktorskiej) wynosi 89, bez autocytowań 54. Index Hirscha równa się 6. W trakcie swojej kariery naukowej, wyniki podjętych badań Doktorant przedstawił także w postaci 24 doniesień naukowych na konferencjach polskich i międzynarodowych. Dorobek naukowy mgr inż. Wojciecha Makowskiego jest niewątpliwie dużym osiągnięciem i spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora w dziedzinie nauki ścisłej i przyrodniczej, dyscyplinie nauki biologicznej. Doktorant był kierownikiem tematu (numer 2516) w ramach projektu finansowanego z dotacji celowych na prowadzenie badań naukowych dla młodych pracowników oraz uczestników studiów doktoranckich w roku akademickim 2018/2019 oraz projektu (numer 2018/31/N/NZ9/00) Preludium 16 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki i realizowanego w latach 2019-2021. W trakcie wykonywania pracy doktorskiej Doktorant odbył krajowe staże naukowe w Ośrodku Bioremediacji Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie i w Pracowni Badania Związków Biologicznie Czynnych w Katedrze Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Warty podkreślenia jest także odbycie stażu zagranicznego w ramach programu Erasmus + w Czeskiej Akademii Wiedzy w Instytucie Botaniki Eksperymentalnej w Ołomuńcu. Odbyte staże naukowe świadczą o chęci doskonalenia warsztatu naukowego przez Doktoranta.

Recenzowana praca ma formę autoreferatu zawierającego wstęp teoretyczny przedstawiający zasadność wyboru badanego gatunku, ze względu na obecne w muchołówce amerykańskiej związki fenolowe oraz techniki biotechnologiczne wykorzystywane w celu zwiększenia produkcji biomasy i akumulacji wybranych bioaktywnych związków w kulturach *in vitro* tej cennej rośliny mięsożernej. Doktorant nakreśliła główne i szczegółowe cele i zadania badawcze – adekwatne

do problemu badawczego a następnie omawia wyniki eksperymentów, co stanowi podstawę do sformułowania trafnych wniosków i nakreślenia podsumowania. Po wykazie publikacji i doniesień konferencyjnych stanowiących całkowity dorobek naukowy Doktoranta, mgr inż. Makowski umieszcza cykl publikacji wchodzących w zakres pracy doktorskiej. Całość zamyka zbiór oświadczeń współautorów publikacji.

Muchołówka amerykańska (*Dionaea muscipula* J. Ellis), należąca do rodziny rosczkowatych (*Droseraceae*), gatunek modelowy w pracach badawczych syndromu mięsożerności u roślin, stał się dla Doktoranta niemodelowym gatunkiem w nowatorskich badaniach poświęconych produkcji bioaktywnych związków fenolowych metodami biotechnologicznymi. Na syntezę związków fenolowych, cechujących się szerokim spektrum właściwości biologicznych, w wyrównanej biomacie z kultur *in vitro* Doktorant wpływał stosując zabiegi elicytacji z wykorzystaniem lizatów bakteryjnych z *Cronobacter sakazakii* oraz transformacji wektorowej dzikimi szczepami bakterii *Rhizobium rhizogenes*. Dla surowców otrzymywanych metodami biotechnologicznymi, scharakteryzowanych pod względem zawartości związków z głównych grup metabolitów wtórnych, określono aktywność antyoksydacyjną i przeciwbakteryjną. Aby moc zrealizować główne cele Doktorant opracował system hodowli roślin wytrząsanych w płynnych pożywkach w warunkach *in vitro*. Na podstawie oszacowanych parametrów biometrycznych ocenił możliwości tego systemu do akumulacji biomasy muchołówki oraz stosując techniki spektrofotometryczne i chromatograficzne podjął się oceny analiz akumulacji związków fenolowych w otrzymanych surowcach. Metodami enzymatycznymi i nieenzymatycznymi określił właściwości antyoksydacyjne, natomiast na podstawie wartości MIC (minimalnego stężenia hamującego) i MBC (minimalnego stężenia bakteriobójczego) otrzymanych ekstraktów z kultur tkankowych elicytowanych i transformowanych klonów określił właściwości przeciwbakteryjne w stosunku do antybiotykoopornych szczepów. Ponadto, Doktorant wykazał się znajomością i umiejętnością wykorzystania metodyki badawczej z zakresu metod biologii molekularnej. W mojej opinii najcenniejsze wyniki badań to opracowanie systemu *in vitro* kultur tkankowych muchołówki amerykańskiej, określenie efektywności zastosowania elicytacji lizatem z bakterii *C. sakazakii* oraz transformacji bakteryjnej na produkcję wybranych związków fenolowych w hodowanej biomacie oraz badanie aktywności przeciwutleniających i przeciwbakteryjnych otrzymanych ekstraktów. Praca stanowi nowatorskie i całościowe podejście do opracowania modelu do badań akumulacji związków fenolowych w roślinach leczniczych z zastosowaniem metod biotechnologicznych. Ponadto prawidłową realizację badań na wysokim poziomie zagwarantowało wieloletnie doświadczenie promotorów pracy - dr hab. inż. Aleksandry Królickiej, prof. UG oraz dra inż. Krzysztofa Tokarza, prof. URK.

W trakcie zapoznawania się z pracą doktorską nasunęły mi się następujące uwagi:

1) Dlaczego w ocenie przyrostu biomasy muchołówki amerykańskiej w pożywkach płynnych wytrząsanych i na pożywkach stałych w systemie stacjonarnym wiarygodniejszym parametrem biometrycznym jest porównanie suchej masy tkanki niż oszacowanie współczynnika przyrostu biomasy na podstawie świeżej masy? I kontynuacja pytania – dlaczego nie obliczano współczynnika namnażania pędów? W jaki sposób powiększała się biomasa?

2) Czy Doktorant celowo pominął wpływ regulatorów wzrostu i rozwoju roślin w planowaniu badań ukierunkowanych na przyrost biomasy muchołówki i zwiększenie akumulacji wybranych grup/metabolitów wtórnych?

3) Zastosowanie elicytacji biotycznej w celu podwyższenia zawartości metabolitów wtórnych w hodowanej biomacie jest skuteczne przy odpowiednio dobranym stężeniu czynnika elicytującego i czasu ekspozycji komórek roślinnych na ten elicytor. Proszę o komentarz w kwestii wyboru badanych stężeń i czasu ekspozycji (liczonego w dniach) dla elicytora w postaci lizatu z bakterii.

4) Proszę Doktoranta o próbę wyjaśnienia jakie procesy mogą stać u podstawy zrozumienia faktu, że tkanki muchołówki amerykańskiej transformowane dzikimi szczepami bakterii *Rhizobium rhizogenes* nie wytwarzały korzeni transformowanych? Czy modyfikacja metodologii badań (w jakim zakresie) mogłaby wpłynąć na indukcję korzeni włóśnikowatych?

5) Proszę Doktoranta o podsumowanie w jaki sposób transformacja genetyczna muchołówki wpłynęła na realizację metabolizmu pierwotnego i wtórnego w komórkach tego gatunku.

Powyższe pytania nie umniejszają wartości recenzowanej pracy – biorąc pod uwagę wieloletnie doświadczenie naukowe Doktoranta i sukcesy całego zespołu, z którym współpracuje mgr inż. Makowski, bardzo dobra znajomość stosowanych technik oraz wysoki poziom publikowanych artykułów, zakładam że Autor pracy doktorskiej udzieli merytorycznych odpowiedzi na powyższe pytania.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska zatytułowana „Fizjologiczne podstawy syntezy wybranych metabolitów wtórnych w elicytowanych i transformowanych kulturach tkankowych roślin *Dionaea muscipula* J. Ellis i ich właściwości antybakteryjne” spełnia formalne stawiane tego typu pracom w dyscyplinie nauki biologiczne. Wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgra inż. Wojciecha Makowskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie ze względu na duże walory naukowe rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie. Jeszcze raz podkreślam, że wyniki badań eksperymentalnych zostały opublikowane przez prestiżowe wydawnictwa naukowe o znaczącym współczynniku oddziaływania. Badania biotechnologiczne z wykorzystaniem technik elicytacji oraz transformacji bakteryjnej wpływających na zawartość cennych związków aktywnych, o udokumentowanej aktywności biologicznej, a tym samym jakoś surowca roślinnego, mają charakter nowatorski, ale również potencjalnie aplikacyjny. Ponadto podkreślam aktualność i istotność podjętej problematyki badawczej.

KIEROWNIK
Pracowni Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii
Kul. i Zesł. Kosmetycznej i Profilaktyki Chorób Skóry
dr hab. Małgorzata Kikowska

Małgorzata Kikowska

Dr hab. n. farm. Małgorzata Kikowska