



Kraków, 30.03.2023 r.

dr hab. Marta Kolasińska-Sojka

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Pauliny Perczyk
zatytułowanej
„Badanie oddziaływań wybranych fosfolipaz
z modelowymi membranami destruentów glebowych”

Podstawa: *Decyzja Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz stosowne pismo nr 405.510.10.2022 Pana Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne prof. dr hab. Artura Michalaka.*

Przedłożona do recenzji praca doktorska pt. „Badanie oddziaływań wybranych fosfolipaz z modelowymi membranami destruentów glebowych” autorstwa Pani mgr Pauliny Perczyk została zrealizowana w Zakładzie Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, w Zespole Fizykochemicznych Badań Środowiskowych pod kierunkiem dr hab. Marcina Broniatowskiego, prof. UJ, uznanego eksperta w modelowaniu błon biologicznych i wykorzystaniu związków powierzchniowo czynnych w ochronie środowiska.

Podczas oceny przedłożonej rozprawy doktorskiej brano pod uwagę przede wszystkim: (i) oryginalność badań i ich nowatorski charakter, (ii) trafność wyboru problemu badawczego, (iii) metodologię, (iv) dobór wykorzystanych metod i technik badawczych oraz (v) poprawność interpretacji wyników, a także ich dyskusji z uwzględnieniem aktualnego stanu wiedzy.

Od pewnego czasu w dyskursie publicznym, jako proponowana nazwa obecnej epoki geologicznej, funkcjonuje określenie antropocen, nawiązujące do destrukcyjnego i nieodwracalnego wpływu działalności człowieka na funkcjonowanie procesów przyrodniczych, zachodzących w skali całego globu. Na szczęście widoczna jest coraz większa świadomość społeczna oraz intensyfikacja działań mających na celu ograniczenie negatywnych



skutków naszej aktywności, jakie ponosi środowisko, a pośrednio również - ludzie. Istotne zagadnienia w obszarze szeroko rozumianej ochrony przyrody wiążą się z wdrażaniem nowych technologii, które ograniczą emisję wszelkich zanieczyszczeń, jak i tych, które zredukują już istniejące i szkodliwe uboczne produkty działalności człowieka.

Niezwykle ważnemu, moim zdaniem, aspektowi prac związanych z remediacją skażonych gruntów poświęcona została rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Perczyk, która postanowiła opisać, jak wybrane enzymy hydrolizujące fosfolipidy oddziałują na modelowe membrany bioreduktorów glebowych.

Oceniana dysertacja stanowi spójny tematycznie zbiór sześciu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych indeksowanych na liście JCR wraz z opisem zredagowanym w języku polskim. Całość pracy zawiera się na 273 stronach maszynopisu i jest podzielona na dwanaście rozdziałów. Otwiera ją (1) *Aktywność naukowa* Doktorantki, gdzie wyszczególniono: publikacje, których Pani mgr Paulina Perczyk jest współautorką, udział w konferencjach międzynarodowych oraz wykaz artykułów naukowych stanowiących podstawę rzeczowej rozprawy doktorskiej. Następnie przedstawiony jest (2) *Spis użytych skrótów*, (3) *Streszczenie* w języku polskim oraz (4) *Abstract* w języku angielskim. Dalsze składowe polskojęzycznego opisu to: (5) *Część literaturowa*, (6) *Cel naukowy*, (7) *Omówienie artykułów*, (8) *Podsumowanie* i (9) *Oświadczenia współautorów*, które kończą tę część pracy. Kolejny rozdział (10) *Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej* to przedruki artykułów stanowiących osiągnięcie naukowe, uzupełnione o (11) *Aneks Materiały uzupełniające (Supplementary Materials) do publikacji z cyklu*. Całość domyka (12) *Bibliografia*.

Wybrany przez Panią mgr Paulinę Perczyk sposób przedstawienia i oznaczenia wszystkich elementów rozprawy umożliwia czytelnikom poprawną orientację oraz analizę zawartego w niej materiału badawczego, co jest bardzo istotne przy tak dużej ilości zaprezentowanych badań i znacznym stopniu ich złożoności.

Literaturową część Dysertacji Doktorantka podzieliła na osiem podrozdziałów, które nakreślają podstawy teoretyczne prowadzonych badań oraz przybliżają aktualny stan wiedzy w tematyce pracy. W podrozdziale 5.1 *Zanieczyszczenie środowiska* Autorka zdefiniowała różne typy emitowanych zanieczyszczeń oraz przedstawiła zagrożenia dla świata wynikające



z nadmiernego skażenia ekosystemów trwałymi zanieczyszczeniami organicznymi. W kolejnym podrozdziale 5.2 *Gleba i zanieczyszczenia gromadzące się w glebach* Doktorantka opisała problemy związane z nadmierną ilością trwałych związków organicznych w glebie i ich toksycznym wpływem na natywne mikroorganizmy. Zagadnienie to było kontynuowane w części 5.3 *Metody remediacji gleb. Bioaugmentacja.*, w której Pani mgr Perczyk opisała strategię stosowane w oczyszczaniu gleb, skupiając się w szczególności na zasadach prowadzenia skutecznej bioaugmentacji gleby. Następnie, w podrozdziale 5.4 *Fosfolipazy* Autorka przedstawiła tę grupę enzymów, opisując ich funkcje oraz podział w odniesieniu do hydrolizowanych wiązań estrowych. Dopiero pod koniec części 5.4 Doktorantka wyjaśniła rolę fosfolipaz w procesie bioaugmentacji, sygnalizując jednocześnie motywację podjętych badań. Kolejny podrozdział - 5.5 *Błony komórkowe organizmów żywych. Model płynnej mozaiki* poświęcony został budowie błon biologicznych, gdzie Autorka pokrótce wyjaśniła zasadę modelu płynnej mozaiki Singer'a - Nicolson'a, omawiając jego trzy podstawowe założenia. Następnie, w podrozdziale 5.6 *Budowa błon komórkowych mikroorganizmów glebowych* Pani mgr Paulina Perczyk scharakteryzowała typy lipidów najbardziej rozpowszechnione w błonach komórkowych bakterii i grzybów. Opisała również budowę takich błon, wskazując różnice między nimi. Kolejny podrozdział 5.7 *Modelowanie błon komórkowych* jest najbardziej obszerny tematycznie i w związku z tym został podzielony na dziesięć części, w których scharakteryzowano funkcjonujące modele błon lipidowych. Najwięcej uwagi zostało poświęcone monowarstwom Langmuira jako jednowarstwowemu modelowi błon biologicznych, który Doktorantka wykorzystywała w swoich badaniach. Autorka przedstawiła sposób ich tworzenia przy pomocy wagi Langmuira, skupiając się na dokładnym wyjaśnieniu poszczególnych stanów monowarstwy w zależności od stopnia jej kompresji. Wyjaśniła znaczenie parametru ściśliwości w ocenie stanu fizycznego monowarstwy oraz sposób analizy oddziaływań pomiędzy składnikami w monowarstwie w oparciu o termodynamiczne funkcje mieszania. Część Literaturową zamyka podrozdział 5.8. *Metody badania monowarstw Langmuira*, w którym omówiono pokrótce wybrane techniki wykorzystywane do charakterystyki monowarstw Langmuira i opisano bardziej szczegółowo te, które Doktorantka wykorzystywała w swojej pracy badawczej. Podsumowując, część literaturową uznaję za poprawną w świetle prowadzonej tematyki naukowej. Pozwolę sobie,



jedynie, podnieść kwestię wybranej przed Autorkę struktury tej części. Myślę, że korzystniej byłoby scalić trzy pierwsze podrozdziały, tj.: 5.1, 5.2 i 5.3 w jeden, o wspólnym tytule *Wstęp*. Taka zmiana pozwoliłoby lepiej skupić uwagę na myśli przewodniej Dysertacji.

Dokonany przegląd literaturowy, podparty dobrze wybraną i aktualną bibliografią, stał się podstawą do zdefiniowania celu naukowego pracy Pani mgr Pauliny Perczyk, którym było opracowanie modeli błon komórkowych bakterii i grzybów glebowych odpornych na działanie wybranych fosfolipaz. Dodatkowo Doktorantka postanowiła zbadać wpływ obecności cząsteczek trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO) w membranie na ich podatność na działanie fosfolipaz. Zostało to opisane przez Autorkę w rozdziale 6. *Cel naukowy*.

Wyszczególnione przez Panią mgr Paulinę Perczyk cele zostały zrealizowane w prowadzonych przez Nią badaniach, opisanych w rozdziałach 7. *Omówienie artykułów*. oraz 10. *Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej*. W pracy oznaczonej 7.1.; 10.1. *Publikacja 1* zbadano wpływ składu modelowej grzybiczej błony komórkowej w postaci monowarstwy Langmuira na jej odporność na działanie fosfolipazy A2. Wytypowane modele były zbudowane wyłącznie z fosfolipidów (cztery różniące się składem typy błon) lub z fosfolipidów i zadanej ilości ergosterolu. Doktorantka z powodzeniem wytypowała modele o największej odporności na degradację enzymatyczną oraz jednoznacznie udowodniła pozytywny wpływ ergosterolu na odporność błony poprzez zwiększanie stopnia jej kondensacji. Dodatkowo, Autorka zdefiniowała trzy dwuwymiarowe fazy krystaliczne zależne od zawartości ergosterolu. W 7.2.; 10.2. *Publikacji 2* Pani mgr Paulina Perczyk kontynuowała badania modelowych błon destruentów glebowych oraz ich oddziaływań z fosfolipazą A2, odwzorowując tym razem błony plazmatyczne bakterii Gram dodatnich oraz Gram ujemnych. Wytypowane do badań dziewięć modeli różniło się składem trzech głównych typów fosfolipidów. Doktorantka w swojej pracy skupiła się na określeniu, jak wzajemna proporcja fosfolipidów z tych trzech klas wpływa na degradację enzymatyczną. Autorka wykazała, iż obecność kardiolipiny w składzie błony zwiększa jej odporność na działanie fosfatazy A2 oraz, że najważniejszą rolę w podnoszeniu odporności błony ma interakcja kardiolipiny z fosfatydyloetanoliną. W kolejnej pracy, umieszczonej w omawianym cyklu, 7.3.; 10.3. *Publikacja 3*. Autorka poszerzyła zakres swoich badań o inne lipazy, tj. α -toksynę (model fosfolipazy C) oraz lipazę wyizolowaną z grzyba glebowego *Candida rugosa*, skupiając się



na ich interakcjach z monowarstwami Langmuira o składzie typowym dla błon komórek bakterii i grzybów. Na podstawie przeprowadzonych prac Doktorantce udało się uszeregować badane lipidy pod względem stopnia odporności na działanie fosfolipazy C, szacując stopień hydrolizy wybranych lipidów w kontakcie z badanym enzymem. Jednocześnie zaobserwowano pozytywny wpływ kardiolipin na ochronę błony przed rozkładem katalizowanym przez fosfolipazę C. Pozwoliło to wytypować bakterie Gram dodatnie, zbudowane głównie z kardiolipin, jako potencjalnych kandydatów do wykorzystania w procesie bioaugmentacji. W *Publikacji 4 (podrozdział 7.4 i 10.4)* oraz *Publikacji 5 (podrozdział 7.5 i 10.5)* Pani mgr Paulina Perczyk opisała oddziaływanie innego enzymu pochodzenia grzybiczego o aktywności A1 – *Lecitase ultra* z różnymi klasami fosfolipidów błonowych. W pierwszej z nich Doktorantka potwierdziła wpływ stopnia kondensacji monowarstwy na aktywność enzymatyczną fosfolipazy. Podobnie jak w poprzedniej pracy, uszeregowała klasy fosfolipidów pod względem powinowactwa do badanego enzymu. Dodatkowy, istotny, wniosek z prowadzonych badań dotyczył powiązania szybkości hydrolizy ze strukturą łańcuchów kwasów tłuszczowych, od której zależy stopień kondensacji monowarstwy. W *Publikacji 5* Autorka skupiła się na interakcji lipazy z jedno-, dwu- i wieloskładnikowymi modelami błon cyjanobakterii, wykazując, iż badany enzym degradowuje glikolipidy budujące monowarstwy oraz, że preferencja substratowa zależy od struktury polarnej części glikolipidu. Autorka wytypowała również układ o największej odporności na degradację enzymatyczną. W artykule zamykającym cykl, *Publikacja 6 (podrozdział 7.6, 10.6)* Pani mgr Paulina Perczyk zbadała wpływ pewnych trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO) na właściwości fizyczne wybranych modelowych błon oraz na ich interakcje z fosfolipazami C i A1. Doktorantka wykazała, iż włączenie TZO do modelowych błon grzybów nieligninolitycznych nie ma wpływu na zmiany strukturalne błon pod wpływem fosfolipaz, co stanowi bardzo obiecujące odkrycie w kontekście potencjalnej bioremediacji gleby.

Na uznanie zasługuje zmierzenie się z tematyką nowatorską, nie mającą szerokiej bazy literaturowej, zwłaszcza w kontekście dużego stopnia złożoności składu jakościowego membran i wpływu różnych czynników na zachodzące reakcje enzymatyczne. Potwierdza to oryginalność badań Doktorantki. Prowadzone prace obejmowały wiele aspektów eksperymentalnych i zostały przeprowadzone w sposób szczegółowy i zgodny



ze współczesnym stanem wiedzy przy poprawnym doborze metod i technik badawczych. Co więcej, wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy doktorskiej w znacznym stopniu poszerzają wiedzę w zakresie interakcji modelowych błon mikroorganizmów glebowych z różnymi fosfolipazami. Pani mgr Paulina Perczyk wykazała się dojrzałą postawą naukową prowadząc badania w sposób kompleksowy, porównując wpływ wytypowanych enzymów hydrolitycznych na wybrane typy destruentów o różnym (kontrolowanym) jakościowo i ilościowo składzie. Dzięki takiemu podejściu Doktorantce udało się uzyskać szczegółowy wgląd w badane oddziaływania oraz opracować modele błon komórkowych grzybów i bakterii glebowych o znacznym stopniu odporności na rozkład hydrolityczny. Potwierdzeniem tego jest rozdział 8. *Podsumowanie*, w którym Autorka sformułowała najważniejsze konkluzje wynikające z Jej pracy, udowadniając tym samym umiejętność poprawnej interpretacji wyników. Na szczególne podkreślenie zasługują badania wpływu pewnych trwałych zanieczyszczeń organicznych na właściwości fizyczne błon oraz na ich odporność na hydrolizę katalizowaną fosfolipazami PLC i PLA1.

Wyniki zawarte w rozprawie Pani mgr Pauliny Perczyk wraz z ich dyskusją rozbudzają ciekawość poznawczą i prowokują do pewnych pytań. Najistotniejsze z nich przedstawię poniżej.

1. Czy potrafi Pani skomentować (lub zna wyniki takich badań) jak na interakcje enzym-lipidy wpłynęłoby zastosowanie innego modelu błony lipidowej niż monowarstwa Langmuira – np. biwarstwy lipidowe?
2. Czy może Pani wyjaśnić jaki mechanizm odpowiada za synergizm kardiolipiny z fosfatydyloetanolaminą w ochronie membrany przed hydrolizą katalizowaną przez fosfolipazę?
3. Ponieważ otrzymane wyniki i wnioski z Pani badań są obiecujące w kontekście prowadzenia realnych procesów remediacji, czy planuje Pani poszerzyć zakres prowadzonych prac o – aplikacyjne, być może przy współpracy z innymi jednostkami badawczo-wdrożeniowymi?

Poza wysokim poziomem merytorycznym rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Perczyk wyróżnia się jakością edytorską i dbałością o szczegóły. Dysertacja zawiera niewielką



ilość literówek i błędów stylistycznych, które absolutnie nie umniejszają wartości merytorycznej dzieła. Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na kilka uchybień, jakie znalazłam w ocenianej rozprawie:

- pozycja podpisów tabel: powinny być one umieszczane nad tabelami, a w polskojęzycznym opisie są pod nimi;
- w języku polskim na końcu podpisów rysunków i tabel nie stosuje się kropki;
- Angstrom nie jest jednostką długości w układzie SI, choć oczywiście – zwyczajowo - jest używany w analizie wielu badań.

W mojej ocenie cele rozprawy Pani mgr Pauliny Perczyk zostały osiągnięte, a biorąc pod uwagę wysoką jakość opisanych w niej badań naukowych, stanowi ona bardzo wartościowy wkład w obecny stan wiedzy na temat oddziaływania fosfolipaz z modelowymi błonami destruentów glebowych, co oceniam pozytywnie. Znajomość literatury przedmiotu oraz umiejętność analizy i interpretacji własnych wyników na tle światowych badań świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz pozwalają jednoznacznie pozytywnie ocenić ogólną wiedzę teoretyczną Autorki. Zastosowanie w pracy nowoczesnych i poprawnie dobranych technik eksperymentalnych wraz z właściwym zaplanowaniem prowadzonych eksperymentów wskazuje natomiast na bardzo dobre opanowanie przez Panią mgr Paulinę Perczyk warsztatu badawczego i potwierdza Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Formułując wniosek końcowy chciałabym podkreślić, że moje uwagi nie mają wpływu na zdecydowanie pozytywną ocenę niniejszej rozprawy doktorskiej, charakteryzującej się wysokim poziomem merytorycznym oraz przejrzystym i jasnym sposobem opracowania tematu, dzięki czemu praca ta stanowi logiczną całość. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki, ze względu na aktualność i wagę tematu, mają ogromną wartość naukową.

Reasumując, przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Pauliny Perczyk pt. „Badanie oddziaływań wybranych fosfolipaz z modelowymi membranami destruentów glebowych”, stanowi sformułowanie oryginalnego problemu naukowego i przedstawia jego rozwiązanie oparte na aktualnej i rzetelnej wiedzy, a tym samym spełnia wszystkie kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. z późn. zm.). Wnoszę zatem



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Perczyk do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora. Jednocześnie, biorąc pod uwagę jakość wykonanych badań, jak i fakt, iż ich wyniki zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach z listy JCR oraz - wysoką aktywność naukową popartą bardzo dużym dorobkiem publikacyjnym Doktorantki (12 artykułów w listy JCR), stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy Pani mgr Pauliny Perczyk.