



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Kilian-Pięty

I. Informacje wstępne

Decyzją Rady Naukowej dyscypliny nauki o zdrowiu Wydziału Medycznego i Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Kaliskiego im. Prezydenta Stanisława Wojciechowskiego z dnia 10.04.2025 r., rozprawa doktorska mgr Ewy Kilian-Pięty pt. „Otrzymywanie i zastosowanie biofermentu *Yarrowia* sp. w produktach kosmetycznych do pielęgnacji twarzy podczas retinoidoterapii” została dopuszczona do publicznej obrony i skierowana do recenzji.

Na podstawie art. 191 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742, ze zm.), niniejszym przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej mgr Ewy Kilian-Pięty pt. „Otrzymywanie i zastosowanie biofermentu *Yarrowia* sp. w produktach kosmetycznych do pielęgnacji twarzy podczas retinoidoterapii”, przygotowanej pod kierunkiem dr hab. Joanna Matysiak, prof. UK oraz prof. dr hab. Darii Szymanowskiej, w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o zdrowiu. Recenzja stanowi szczegółową ocenę przedłożonej pracy, jej wartości merytorycznej, oryginalności ujęcia tematu oraz spełnienia wymogów formalnych określonych w obowiązujących przepisach dotyczących nadawania stopnia naukowego doktora.

II. Charakterystyka ogólna rozprawy

Rozprawa liczy 166 stron, składa się z 7 rozdziałów, 61 podrozdziałów oraz bibliografii obejmującej 69 pozycji. Rozprawa zawiera 30 rycin i 68 tabel (częściowo pozbawionych numeracji). Praca została napisana w sposób jasny, uporządkowany i zgodny z obowiązującymi standardami edytorskimi.

Doktorantka podejmuje ważne i aktualne zagadnienie, odpowiadając na rosnące potrzeby rynku kosmetycznego w zakresie tworzenia produktów wspomagających specjalistyczne terapie dermatologiczne, takie jak leczenie retinoidami. Tym samym wpisuje się w szerszy nurt współczesnych badań interdyscyplinarnych, prowadzonych na styku kosmetologii, dermatologii i nauk o zdrowiu. Praca nie tylko uwzględnia aspekty pielęgnacyjne, ale także bierze pod uwagę mikrobiologiczne bezpieczeństwo produktów kosmetycznych, ich trwałość i stabilność funkcjonalną.

Wstęp teoretyczny rozprawy doktorskiej został opracowany na wysokim poziomie merytorycznym i formalnym. Doktorantka trafnie identyfikuje kluczowe uwarunkowania rozwoju współczesnego przemysłu kosmetycznego, osadzając je w szerokim kontekście ekonomicznym, społecznym i regulacyjnym. Przedstawiona analiza opiera się na aktualnych danych liczbowych, raportach branżowych oraz wiarygodnych źródłach międzynarodowych i krajowych, co świadczy o staranności w doborze literatury oraz o dobrej orientacji Doktorantki w najnowszych trendach rynkowych.

Z perspektywy badawczej istotne jest również zwrócenie przez mgr Ewę Kilian-Piętę uwagi na dynamiczne zmiany preferencji konsumentów – w szczególności rosnące zapotrzebowanie na produkty naturalne, ekologiczne, wegańskie oraz dermokosmetyki o udowodnionej skuteczności działania. Trafnie podkreślono wpływ globalnych zjawisk – takich jak pandemia COVID-19, wojna w Ukrainie czy starzenie się populacji – na strukturalne przekształcenia rynku kosmetycznego. W tym kontekście warto również zauważyć, że Doktorantka wskazuje na zwiększoną rolę innowacji biotechnologicznych oraz wzrost znaczenia marketingu cyfrowego, co odpowiada aktualnym kierunkom rozwoju branży.



Na szczególne uznanie zasługuje także uwzględnienie aspektów normatywnych i regulacyjnych, które stanowią kluczowy element funkcjonowania przemysłu kosmetycznego na obszarze Unii Europejskiej. Przemysł ten podlega ścisłym wymaganiom prawnym, m.in. Rozporządzeniu (WE) nr 1223/2009 w sprawie produktów kosmetycznych, które określa m.in. obowiązki producentów w zakresie bezpieczeństwa, znakowania, oceny ryzyka oraz zakazu testowania produktów na zwierzętach. W pracy zarysowano również znaczenie dobrych praktyk produkcyjnych (GMP – Good Manufacturing Practice), zgodnych z normą ISO 22716:2007, oraz wzrastające znaczenie systemów zarządzania jakością, takich jak ISO 9001 czy normy środowiskowe ISO 14001. Ujęcie tych zagadnień nadaje opracowaniu dodatkowy wymiar praktyczny i potwierdza jego aktualność w świetle współczesnych wymogów rynku i prawa.

Podsumowując, część wstępna pracy stanowi solidne i dobrze umotywowane wprowadzenie do dalszej analizy problemu badawczego, jednocześnie w pełni uzasadniając wybór tematu i jego znaczenie dla nauki oraz praktyki gospodarczej.

III. Cel i zakres badań

Celem pracy doktorskiej było opracowanie nowej linii produktów kosmetycznych przeznaczonych dla osób w trakcie retinoidoterapii. Zakres badań został precyzyjnie określony, a przyjęta hipoteza badawcza/opis problemu badawczego logiczna i uzasadniona. Doktorantka potwierdziła swoją wiedzę i doświadczenie w branży kosmetycznej, trafnie identyfikując niszę rynkową i proponując innowacyjne rozwiązania odpowiadające na realne potrzeby konsumentów.

IV. Ocena oryginalności i wartości naukowej

Rozprawa doktorska przedstawia wysoką wartość naukową, wynikającą zarówno z aktualności tematu, jak i nowatorskiego podejścia badawczego. Doktorantka trafnie zidentyfikowała istotny problem kliniczno-kosmetologiczny związany z ubocznymi skutkami retinoidoterapii i podjęła próbę jego rozwiązania poprzez opracowanie innowacyjnych formułacji kosmetycznych. Oryginalność pracy przejawia się w zastosowaniu płynu pofermentacyjnego otrzymanego w wyniku biotechnologicznej fermentacji przez drożdże *Yarrowia lipolytica*, zawierającego m.in. kwas alfa-ketoglutarowy. Takie podejście łączy wiedzę z zakresu kosmetologii, biotechnologii oraz dermatologii, co nadaje pracy interdyscyplinarny charakter.

Warto podkreślić, że opracowane produkty zostały nie tylko teoretycznie zaprojektowane, ale również wytworzone i kompleksowo scharakteryzowane pod względem właściwości fizykochemicznych, mikrobiologicznych oraz funkcjonalnych. Całości dopełnia przygotowanie dokumentacji umożliwiającej wdrożenie preparatów na rynek, co znacząco zwiększa praktyczną użyteczność wyników pracy. Tak kompleksowe ujęcie tematu i umiejętne połączenie aspektów naukowych z aplikacyjnymi świadczą o dużej dojrzałości badawczej doktorantki i stanowią istotny wkład w rozwój kosmetologii funkcjonalnej.

Doktorantka skupiła się na najważniejszych aspektach związanych z wprowadzeniem nowego, innowacyjnego produktu kosmetycznego. Wskazała na kompleksowość podejścia i wieloetapowość procesu wprowadzania innowacyjnego produktu kosmetycznego, który wymaga uwzględnienia zarówno aspektów technologicznych, prawnych, jak i marketingowych. Pierwszym etapem jest faza badań i rozwoju (R&D), podczas której opracowuje się unikalną recepturę, wykorzystując innowacyjne składniki, nowoczesne formy aplikacji lub zaawansowane technologie produkcji. Produkt musi nie tylko odpowiadać na potrzeby rynku, ale również być bezpieczny i skuteczny. Niezwykle istotne jest również zapewnienie zgodności z obowiązującymi



przepisami prawnymi. W Unii Europejskiej kluczowym dokumentem jest Rozporządzenie (WE) nr 1223/2009 dotyczące produktów kosmetycznych, które definiuje wymagania w zakresie bezpieczeństwa, etykietowania, dokumentacji oraz procedur notyfikacyjnych. W kontekście bezpieczeństwa, każdy nowy produkt musi przejść szczegółową ocenę bezpieczeństwa, testy stabilności i kompatybilności z opakowaniem, które pozwalają przewidzieć, jak produkt zachowa się w czasie przechowywania. W wielu przypadkach wykonuje się również testy aplikacyjne na grupach ochotników, które pozwalają zweryfikować skuteczność działania i komfort użytkowania produktu. Kolejnym obszarem o kluczowym znaczeniu jest opakowanie – zarówno pod względem funkcjonalnym, estetycznym, jak i prawnym. Równolegle należy opracować skuteczną strategię marketingową, która obejmuje pozycjonowanie produktu, komunikację marki i wybór kanałów sprzedaży. W przypadku produktów innowacyjnych szczególne znaczenie ma budowanie zaufania konsumentów – poprzez przejrzystość komunikatów, poparte badaniami deklaracje marketingowe, a także współpracę z ekspertami, takimi jak dermatolodzy, kosmetolodzy czy influencerzy. Równie istotna jest analiza rynku i identyfikacja grupy docelowej – np. pod kątem wieku, typu skóry czy konkretnych potrzeb kosmetycznych. Analiza konkurencji pozwala na wyodrębnienie wyróżników produktu i zbudowanie jego unikalnej propozycji wartości. Wprowadzenie innowacyjnego produktu to inwestycja wymagająca nie tylko know-how i zasobów, ale także elastyczności i zdolności do reagowania na zmieniające się oczekiwania rynku i regulacje.

Te wszystkie aspekty zostały przez Doktorantkę uwzględnione w przygotowanej dysertacji, co świadczy o jej dogłębnym zrozumieniu procesów związanych z komercjalizacją produktów kosmetycznych oraz o umiejętności łączenia wiedzy teoretycznej z praktycznymi wymaganiami rynku, czyniąc pracę nie tylko wartościową naukowo, ale również użyteczną z perspektywy branży.

Hipoteza naukowa pracy, dotycząca wykorzystania uzyskanego na drodze biotechnologicznej płynu pofermentacyjnego zawierającego bio-funkcjonalne metabolity drożdży *Yarrowia* sp. jako składnika formułacji kosmetycznych została w pełni potwierdzona. Cel pracy został zrealizowany. Doktorantka zaprojektowała i wytworzyła dwa innowacyjne surowce kosmetyczne z wykorzystaniem metod biotechnologicznych. Na ich podstawie opracowała trzy formułacje kosmetyczne (serum do twarzy, krem do twarzy i żel do mycia twarzy), oceniała ich bezpieczeństwo, stabilność i właściwości funkcjonalne. Następnie przygotowała dokumentację pod kątem ich komercjalizacji.

V. Ocena metodologii

Metodyka badań, zwłaszcza część dotycząca oceny funkcjonalnej wytworzonych formułacji kosmetycznych jest imponująca - bardzo dobrze przemyślana, zaprojektowana i stanowi kompleksowe podejście do wytwarzania formułacji. W pracy zastosowano adekwatne metody badawcze, zgodne z przedmiotem i celem badań. Dobór metod jest trafny i uzasadniony, a ich zastosowanie świadczy o dojrzałości metodologicznej Doktorantki. Opis całej procedury badawczej, pomimo znacznej złożoności wynikając z dużego spektrum oznaczeń i testów, jest klarowny, co pozwala na ocenę rzetelności i powtarzalności badań.

VI. Ocena formy i języka pracy

Praca została napisana poprawnym językiem naukowym. Styl jest precyzyjny, terminologia – adekwatna do dyscypliny. Praca została zredagowana starannie, bez poważnych błędów językowych czy edytorskich.



VII. Ocena dorobku naukowego doktoranta

Brak możliwości oceny dorobku naukowego Doktorantki (nie przedstawiono listy publikacji i doniesień o charakterze prac naukowych).

VIII. Uwagi krytyczne i postulaty

Niniejszy rozdział zawiera zestawienie i omówienie uwag krytycznych oraz postulatów zgłoszonych przez recenzenta w ramach postępowania doktorskiego. Skupiono się w nim na elementach rozprawy wymagających dopracowania, doprecyzowania lub rozszerzenia. Celem tej części jest zaprezentowanie krytycznych spostrzeżeń, które mogą stanowić punkt wyjścia do dalszej pracy badawczej oraz ewentualnych przyszłych publikacji. Uwagi te odzwierciedlają oczekiwania środowiska naukowego wobec pracy doktorskiej i mają charakter konstruktywny.

Streszczenie pracy nie stanowi typowego streszczenia tzw. abstraktu charakterystycznego dla prac naukowych. Nie zawiera bowiem opisu najważniejszych wyników wraz z ich interpretacją i wnioskami. Kluczowym punktem powinien być choć jeden, najważniejszy wniosek płynący z porównania testowanych wariantów zawierających składniki bio-funkcjonalne pochodzenia drożdżowego z kontrolą (bez dodatku bio-funkcjonalnego).

W opisie metody dezintegracji komórek *Yarrowia lipolytica* w płynie hodowlanym z wykorzystaniem młyna kulowego podano jedynie czas dezintegracji pomijając wielkość kulek użytych do dezintegracji oraz rodzaj materiału, z których zostały wykonane. Brakuje również kolejnej kluczowej informacji w postaci częstotliwości wstrząsów (prędkości obrotowej urządzenia dezintegrującego).

Z kolei w opisie wyników jest już mowa o innej metodzie dezintegracji komórek drobnoustrojów – łaźni ultradźwiękowej. W ten sposób opis metodyki jest niespójny z opisem wyników – trudno się bowiem zorientować jak ostatecznie traktowany był płyn pofermentacyjny. Pojawiająca się w sekcji wynikowej metoda ultradźwiękowa z założenia charakteryzuje się skutecznością zależną od parametrów takich jak czas ekspozycji na działanie fali ultradźwiękowej. Pamiętać należy, że choćby ten parametr (podobnie jak wartość – częstotliwość stosowanej fali ultradźwiękowej) będzie wpływał na ostateczny efekt dezintegracji komórek. Ta metoda jest szeroko opisana w literaturze jako dezintegrująca biofilmy mikrobiologiczne ale jednocześnie nie będąca inwazyjną dla struktury samych komórek (wykorzystywana rutynowo do badania biofilmów tworzonych na powierzchniach abiotycznych takich jak powierzchnie robocze na liniach technologicznych w przemyśle spożywczym). W zależności od intensywności i wspomnianego czasu ekspozycji nie powoduje w tej funkcji uszkodzenia komórek drobnoustrojów (nie narusza integralności błony i ściany komórkowej) prowadząc do zbierania/odrywania wielokomórkowej struktury biofilmu z badanej powierzchni i łagodnej dyspersji komórek, które zachowują swoje parametry strukturalne i fizjologiczne (bez wpływu na żywotność i aktywność metaboliczną komórek).

Zastanawiające są również wyniki oznaczeń żywotności komórek drożdży *Yarrowia* po zastosowaniu inaktywacji metodą ultradźwiękową. Obserwowane wysokie wartości jtk wskazują na bardzo łagodne warunki dezintegracji. Proszę o komentarz dotyczący wspomnianej niespójności opisu aspektów metodycznych i konieczności wprowadzenia dodatkowego etapu inaktywacji komórek drożdży *Yarrowia* sp. (metoda termiczna).

Nie podano również informacji dotyczących materiału membrany 0,22 μm oraz zestawu filtracyjnego wykorzystywanego do filtracji biofermentu po inaktywacji komórek. Zakładam, że w obliczu znaczącej objętości roztworu biofermentu ten zabieg wymagał zastosowania albo



gotowego zestawu lub zbudowania własnego charakteryzującego się określoną wydajnością ale też odpornego na rozszczelnienia, które zaburzałyby wyniki oznaczeń.

Nie do końca jest jasne dlaczego postanowiono porównać ze sobą dwa surowce o potencjale aplikacyjnym (bioferment natywny i filtrat), które z założenia powinny charakteryzować się podobnym składem (ilościowym i jakościowym) substancji bio-funkcjonalnych. Należałoby się bowiem spodziewać (i to niezależnie od przyjętej metody dezintegracji komórek) „ekstruzji” soku komórkowego do płynu hodowlanego. W zasadzie efektem opisanych w pracy metod dezintegracji komórek jest powstanie frakcji (z różnym jej udziałem procentowym) stanowiącej pofragmentowane komórki drożdży *Yarrowia* sp.. To tzw. w nomenklaturze cytometrycznej debris komórkowe, do których zalicza się: i) fragmenty ściany komórkowej i błony komórkowej, ii) pofragmentowane organelle komórkowe, które w przypadku komórek eukariotycznych stanowią istotną część masy komórki oraz iii) płyn komórkowy, wśród którego należałoby wyróżnić jeszcze liczne koloidy zawierające białka, genomowe DNA oraz oczywiście metabolity komórkowe. Ten ostatni składnik „dezintegratu” komórek drożdży *Yarrowia* znalazłby się również we frakcji filtratu przy wykorzystaniu membrany o porowatości 0,22 mikrometra i to pomimo potencjalnego jej częściowego foulingu kompleksami DNA – białko. Znajduje to odzwierciedlenie w wynikach oznaczania składu biofermentu natywnego i filtratu. Proszę doktorantkę o ustosunkowanie się do tego komentarza.

W opisie tabeli, w której przedstawiono wyniki oznaczania składu biofermentu natywnego i filtratu brakuje informacji dotyczącej metodyki wykorzystywanej do wykrywania fragmentów ścian komórkowych drożdży *Yarrowia* sp. Takiej informacji nie ma również w opisie metodyki. W jaki sposób doktorantka rozróżniała fragmenty ścian komórkowych od innych składników komórek drożdży (np. wspomnianych wcześniej fragmentów organelli komórkowych). Ponadto co to oznacza, że fragmenty ściany komórkowej były obecne w filtracie – przydałby się bardziej precyzyjny opis, który wskazywałby na różnice we frakcji filtratu i natywnego biofermentu, jako że zastosowana membrana filtracyjna powinna zatrzymać część również tego składnika komórek drożdży (fragmentów ścian komórkowych). W końcu też, jak rozróżniano tzw. biomasę komórek *Yarrowia* sp. od fragmentów ścian komórkowych tych komórek (tabela zawiera informacje o zawartości obu tych elementów)? Ponownie by ocenić skuteczność filtracji brakuje zdecydowanie szczegółów opisu tej metody. Proszę doktorantkę o odpowiedź i komentarz w tej sprawie.

Na stronie 48 jest mowa o nieodwirowanej biomase drożdży, co ponownie nie zgadza się z opisem metodyki, która mówi o procesie filtracji wykorzystanym do usunięcia komórek (w tym tzw. debris komórkowego czyli „rozpadniętych” w wyniku dezintegracji komórek drożdży).

Strona 46 – określenie „lizat” użyte w tekście nie stanowi w rzeczywistości lizatu ponieważ odnosi się do płynu hodowlanego poddanego różnym metodom dezintegracji komórek mikroorganizmów z wyłączeniem substancji chemicznych (antybiotyków, enzymów czy detergentów).

W opisie metodyki oznaczania liczebności drobnoustrojów brakuje istotnej informacji o wartościach wykonanych rozcieńczeń dziesiętnych. To podstawowy parametr charakteryzujący tę metodę. Nie ma również informacji o warunkach inkubacji zwłaszcza w aspekcie hodowli względnie beztlenowej.

Ryciny prezentujące wyniki badań aplikacyjno – użytkowych i parametrów biofizycznych (ryciny: 19 – 27) nie zawierają słupków błędów. Proszę o informacje o liczbie powtórzeń biologicznych/technicznych wykonywanych testów.



W opisie testu konserwacji nie podano metody oznaczania liczebności komórek testowych szczepów drobnoustrojów (wskaźnikowych). Znajduje się tam tylko informacja o końcowym (roboczym) stężeniu komórek mikroorganizmów (10^5 jtk/ml). Nie wiadomo w jaki sposób oznaczano wyjściowe stężenie komórek, trudno jest zatem odnieść się do precyzji tych oznaczeń. Proszę Doktorantkę o doprecyzowanie tego zagadnienia.

Moje pytanie dotyczy również aktywności przeciwdrobnoustrojowej surowców wykorzystywanych w zaprojektowanych formułacjach kosmetycznych: natywnego biofermentu i filtratu. Porównanie stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów dla biofermentu natywnego i filtratu wskazuje na większą aktywność biofermentu (zmierzona wielkość stref zahamowania wzrostu była wobec połowy testowanych wskaźnikowych szczepów bakterii i drożdży blisko dwukrotnie wyższa w porównaniu z filtratem). W obliczu jednak niemal identycznego składu substancji bioaktywnych w obu frakcjach zastanawiam się skąd biorą się tak istotne różnice w aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Chciałbym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do tej kwestii.

Chciałbym też prosić Doktorantkę o komentarz odnośnie obserwowanej ograniczonej aktywności przeciwdrobnoustrojowej formułacji typu żel do mycia - z czego może ona wynikać?

IX. Wniosek końcowy

Wszystkie powyższe krytyczne uwagi i komentarze nie zmieniają ogólnej, jednoznacznie pozytywnej oceny przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr Ewy Kilian-Pięty. Mając na uwadze przede wszystkim aktualność i istotność podejmowanego problemu naukowego, precyzję w projektowaniu testowanych produktów kosmetycznych, szeroki i właściwie dobrany zestaw metod badawczych oraz wdrożeniowy potencjał uzyskanych wyników, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Ewy Kilian-Pięty pt. „Otrzymywanie i zastosowanie biofermentu *Yarrowia* sp. w produktach kosmetycznych do pielęgnacji twarzy podczas retinoidoterapii”:

- spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce,
- posiada oryginalny charakter i stanowi istotny wkład w rozwój nauki, a jej Autorka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr Ewy Kilian-Pięty do publicznej obrony rozprawy doktorskiej i kolejnych etapów postępowania o nadanie jej stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o zdrowiu.

prof. DPP dr hab. Wojciech Juzwa

profesor Uczelni

Wojciech Juzwa

dr hab., prof. Uczelni

Katedra Biotechnologii

i Mikrobiologii Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Data: 23.06.2025 r.