



Dr hab. Justyna Ruchała, prof. UR  
Doktor habilitowany w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych,  
dyscyplinie nauki biologiczne  
Profesor nadzwyczajny Uniwersytetu Rzeszowskiego

Rzeszów, 19/10/2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej**  
**Mgr inż. Katarzyny Kosiorowskiej**

pt. „*Badanie zdolności fizjologicznych drożdży *Yarrowia lipolytica* do rozkładu tworzyw sztucznych*”

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Ewy Kosiorowskiej została wykonana w Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu pod kierunkiem Pani dr hab. Aleksandry Mirończuk, prof. uczelni z Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Promotorem pomocniczym była Pani dr inż. Magdalena Rakicka-Pustułka. Wykonane w pracach badania współfinansowane były z projektu naukowego Opus (Narodowe Centrum Nauki), którego kierownikiem był Promotor niniejszej pracy.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy ważnego, globalnego problemu degradacji tworzyw sztucznych oraz zakłada zbadanie możliwości drożdży *Yarrowia lipolytica* do rozkładu tworzyw sztucznych oraz kolejno zakłada wprowadzenie metody degradacji poliestrów bezpośrednio w hodowli mikroorganizmów. Produkcja tworzyw sztucznych z roku na rok rośnie, dlatego w mojej ocenie poszukiwanie sposobów degradacji oraz recyklingu plastiku, w tym wykorzystujących mikroorganizmy, jest wysoce istotnym problemem naukowym dzisiejszych czasów.

W tym celu w pierwszej kolejności dokonano ekspresji genów kutynaz z *Fusarium solani* i *Trochoderma reesei*, a także nadekspresji natywnej lipazy 2 (YALI0A20350g) w *Y. lipolytica*. Następnie określono zdolności uzyskanych szczepów do rozkładu plastiku z wykorzystaniem jako substratów modelowych PCL oraz PET. W kolejnym etapie zbadano zdolność drożdży do wzrostu na produktach degradacji PET. Ostatnim etapem była ekspresja



genu kodującego PETazę pochodzącego z *Ideonella sakaiensis* wraz z sekwencją sygnałową XPR2 u *Y. lipolytica* po optymalizacji kodonów oraz kolejno optymalizacja procesu degradacji PET.

Na całość pracy składa się 10 rozdziałów głównych. Praca zawiera przy tym streszczenie w języku polskim i języku angielskim. Zasadnicza część pracy uzupełniona jest o życiorys naukowy Doktorantki, cztery publikacje wchodzące w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej wraz z suplementami, oświadczeniami współautorów tych publikacji o ich udziale w przygotowaniu poszczególnych artykułów naukowych.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi trzy oryginalne prace naukowe i jedna przeglądowa stanowiące tematycznie związany cykl:

1. Urbanek, A.K., Kosiorowska, K.E.†, Mirończuk, A.M., 2021. Current Knowledge on Polyethylene Terephthalate Degradation by Genetically Modified Microorganisms. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 1–15.
2. Kosiorowska, K.E., Połomska, X., Wang, G., Borodina, I., Mirończuk, A.M., 2021. Efficient biodegradation of aliphatic polyester by genetically engineered strains of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 161, 105232.
3. Kosiorowska, K.E., Biniarz, P., Dobrowolski, A., Leluk, K., Mirończuk, A.M., 2022. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for poly(ethylene terephthalate) degradation. *Sci. Total Environ.* 831, 154841.
4. Kosiorowska, K.E., Moreno, A.D., Iglesias, R., Leluk, K., Mirończuk, A.M., 2022. Production of PETase by engineered *Yarrowia lipolytica* for efficient poly(ethylene terephthalate) biodegradation. *Sci. Total Environ* 846, 10 November 2022.

Taka forma pracy doktorskiej, której zasadniczą część stanowią opublikowane artykuły naukowe jest dopuszczalna poprzez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Sumaryczny współczynnik wpływu wspomnianych publikacji naukowych to 32,477, a liczba punktów MEiN to 640 zgodnie z komunikatem Ministra Edukacji i Nauki z dnia 1 grudnia 2021 r. We wszystkich publikacjach Pani Katarzyna Kosiorowska jest pierwszym autorem, z czego w pierwszej wchodzącej w skład tematycznie związanego cyklu jest równoważnym pierwszym autorem. We wszystkich czterech publikacjach, zgodnie z oświadczeniami współautorów, udział Pani mgr inż. Katarzyny Kosiorowskiej był znaczący, z czego w publikacji przeglądowej, co warto podkreślić, odpowiadała ona za ustalenie koncepcji oraz planu manuskryptu, co świadczy o wysokim stopniu samodzielności Doktorantki.

Pierwszą pracą włączoną jako osiągnięcie jest praca przeglądowa opublikowana w *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* dotycząca biodegradacji PET przez genetycznie modyfikowane organizmy, co jest dobrym wstępem do całości cyklu. Strukturę tej pracy przeglądowej oceniam na dobrze zaplanowaną. We wstępie nakreślono wagę problemu



zanieczyszczenia środowiska naturalnego przez plastik, w tym zagrożenia wynikające przez akumulację w organizmach mikro- i nano-plastiku poprzez uwalnianie go do środowiska. Po wprowadzeniu Autorka opisuje enzymy zaangażowane w degradację PET, w tym dogłębnie analizuje modyfikacje tychże enzymów w celu zwiększenia efektywności degradacji PET. Zwięźczeniem pracy przeglądowej są perspektywy zastosowania modyfikowanych mikroorganizmów oraz modyfikowanych białek do zarządzania odpadami typu PET. Ciekawym, a jednocześnie prawdopodobnym jest konkluzja Autorki, iż w przyszłości być może odpady tworzyw sztucznych będą mogły być wykorzystywane jako tanie podłoża dla wzrostu genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów w celu wytworzenia wysokowartościowych związków. Biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną tej pracy przeglądowej może być ona rekomendowana naukowcom, którzy chcieliby rozpocząć badania w kierunku inżynierii białek bądź mikroorganizmów zdolnych do degradacji plastiku. Uważam, że w przeglądzie zbyt mało uwagi poświęcono roli lipaz w degradacji tworzyw sztucznych, głównie rozpatrywano użycie fuzyjnych enzymów zawierających lipazy, w tym procesie.

Kolejny artykuł naukowy, to praca oryginalna opublikowana w czasopiśmie *International Biodeterioration & Biodegradation*, w pracy tej dokonano ekspresji genów kodujących enzymy kutynazy z *Fusarium solani f. sp. pisi* oraz *Trichoderma reesei* pojedynczo lub z nadekspresją genu kodującego natywną lipazę 2 w odpowiednich szczepach *Y. lipolytica*. Okazało się, że modyfikowane szczepy wykazywały aktywność biodegradacji poliestrów w przedziale pH pomiędzy 4 a 9. Przeprowadzono badania bioinformatyczne, które miały na celu analizę filogenetyczną enzymów użytych w pracy z innymi  $\alpha/\beta$ -hydrolazami wykazując homologię białka lipazy 2 z *Y. lipolytica* (AFH77825) z PETazą z *Ideonella sakaiensis* (6EQD\_A), podczas gdy kutynaza z *T. reesei* (ETS02914) wykazywała homologię (53,49 % identyczności) z kutynazą z *Monilinia fructicola* (AAZ95012) natomiast kutynaza z *F. solani* (AAA33334) okazała się być blisko spokrewniona (55,33 % identyczności) z kutynazą z *Humicola insolens* (4OYY\_A). Następnie przeprowadzono badanie RT-PCR który wykazał, iż wytworzone w trakcie badań szczepy zdolne były do ekspresji wprowadzonych do nich genów. Tu nasuwa się moje pytanie czy nie bardziej miarodajnym badaniem byłoby oznaczenie aktywności enzymatycznej? Uważam, że praca wzbogaciłaby się w przypadku eksperymentalnego oznaczania odpowiednich aktywności enzymatycznych. Podobnie jak w artykule przeglądowym, zbyt krótko uzasadniono rolę własnej lipazy w biodegradacji PET. Głównym osiągnięciem niniejszej pracy było otrzymanie szczepów zdolnych do jednoczesnej ekspresji genu kodującego heterologiczną kutynazę oraz natywną lipazę 2 w drożdżach *Y. lipolytica* oraz potwierdzenie zdolności tych otrzymanych szczepów do wydajnej degradacji poliestru, potwierdzono również, że wydzielane przez szczepy enzymy zdolne są do degradacji PCL w ciągu sześciu dni hodowli.

Kolejne moje pytanie, powszechnie wiadomo, że drożdże *Y. lipolytica* zdolne są do aktywnej sekrecji produkowanych białek, czy zdaniem Autorki sekrecję produkowanych heterogenicznych białek kutynaz należałoby zwiększyć?



Następna oryginalna praca poświęcona została skalowaniu procesu degradacji PET z wykorzystaniem skonstruowanych we wcześniejszej publikacji modyfikowanych szczepów drożdży *Y. lipolytica*. W pracy opisano oraz optymalizowano metodę bezpośredniej degradacji PET w hodowli zmodyfikowanych drożdży *Y. lipolytica* zdolnych do pozakomórkowej produkcji kutynazy z *F. soloni*. Ponadto zbadano efekt dodawania suplementów takich jak sole nieorganiczne, oliwa z oliwek i olej rzepakowy w celu zwiększenia efektywności degradacji PET. Głównym osiągnięciem publikacji jest potwierdzenie zdolności do degradacji PET przez modyfikowane szczepy drożdży *Y. lipolytica*. Ponadto co bardzo ciekawe, udowodniono, poprzez przeprowadzenie hodowli w różnych skalach laboratoryjnych, że stosunek produktów degradacji PET, tj. MHET i TPA jest zależny od stosowanej objętości roboczej prowadzonego procesu na korzyść powstawania MHET w większych objętościach roboczych. Czy zatem istnieje naukowe wyjaśnienie tego fenomenu?

Celem ostatniej publikacji naukowej, którą włączono w pracę doktorską była ekspresja genu kodującego enzym PETazę z bakterii *Ideonella sakaiensis*. Badania przeprowadzone w niniejszej pracy udowodniły również, że zmodyfikowane drożdże *Y. lipolytica* zdolne są do degradacji PET w hodowli bezpośredniej, a także, że suplementacja oliwą z oliwek w stężeniu 1% znacząco poprawia efektywność hydrolizy PET. Dodatkowo ujawniono również, dzięki przeprowadzonym badaniom, że skład podłoża istotnie wpływa na szybkość degradacji PET o czym świadczy fakt, że obecność soli istotnie spowalnia ten proces. Co zdaniem Doktorantki jest przyczyną tego zjawiska? Dodatkowo istotnym osiągnięciem tej pracy jest wykazanie, iż w przeciwieństwie do innych produktów degradacji PET, *Y. lipolytica* nie jest zdolna do asymilowania TPA, chociaż literatura naukowa donosi, że drożdże są do tego zdolne. Czym zatem Doktorantka może wyjaśnić rozbieżność otrzymanych w niniejszej pracy wyników badań w porównaniu z literaturą naukową?

Wnioski pracy przytoczone są na stronie 37, odpowiadają one treści wyżej wymienionych publikacji naukowych.

Wszelkie moje uwagi nie wpływają jednak na poziom naukowy i merytoryczny przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej, a są jedynie sugestiami Recenzenta lub zwykłą dociekliwością naukową.

Istotnym jest, iż Doktorantka może pochwalić się uczestnictwem w wykonywaniu 4 projektów naukowych, z których dwa finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki, a pozostałe dwa pozwoliły jej na zrealizowanie dwóch staży zagranicznych w Madrycie (Hiszpania), które miały bezpośredni wpływ na powstanie niniejszej rozprawy doktorskiej, gdyż ich głównym tematem była wstępna obróbka plastiku w celu zwiększenia zdolności do jego degradacji przez modyfikowane drożdże *Y. lipolytica* oraz optymalizacja warunków hodowli w celu efektywnej degradacji plastiku. Świadczy to o chęci wzbogacania swojego warsztatu metodycznego oraz o profesjonalnym podejściu do tematu swojej pracy doktorskiej poprzez korzystanie z wiedzy ekspertów spoza swojego środowiska uniwersyteckiego.



Recenzowana przeze mnie praca doktorska mgr inż. Katarzyny Kosiorowskiej wykonana jest z zachowaniem właściwej metodologii badań biologicznych, uważam, że temat pracy jest wysoce istotny, a przy tym bardzo innowacyjny. Na uwagę zasługuje ogromny wachlarz metodyczny, co wskazuje na szerokie podejście badawcze oraz świadczy o wysokich kompetencjach naukowych Doktorantki. Wyniki otrzymane w toku wykonywania pracy mają ponadto wysoce aplikacyjny potencjał, co mam nadzieję, że będzie mieć odzwierciedlenie w przyszłych planach dotyczących rozwoju tej tematyki badawczej.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Ewy Kosiorowskiej pt. „Badanie zdolności fizjologicznych drożdży *Yarrowia lipolytica* do rozkładu tworzyw sztucznych” spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc po uwagę wysoki poziom niniejszej rozprawy doktorskiej zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Kosiorowskiej stosownym wyróżnieniem przyjętym w Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu.

Rzeszów, 19.10.2022 r.