



Olsztyn, dn. 11 października 2022 roku

Dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. uczelni
Katedra Mikrobiologii i Mykologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 1A
10-719 Olsztyn

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Ewy Kosiorowskiej
pod tytułem
„Badanie zdolności fizjologicznych drożdży *Yarrowia lipolytica* do rozkładu
tworzyw sztucznych”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Ewy Kosiorowskiej pt. „Badanie zdolności fizjologicznych drożdży *Yarrowia lipolytica* do rozkładu tworzyw sztucznych” została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod opieką naukową Pani dr hab. Aleksandry Mirończuk, prof. uczelni - promotora oraz Pani dr inż. Magdaleny Rakickiej-Pustułki – promotora pomocniczego. Badania przedstawione w dysertacji były realizowane w ramach projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS 14 UMO-2017/ 27/ B/NZ9/02218), w którym Pani mgr inż. Katarzyna Kosiorowska pełniła rolę wykonawcy, natomiast kierownikiem była Promotorka pracy doktorskiej Pani dr hab. Aleksandra Mirończuk, prof. uczelni.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się poszukiwaniu sposobów efektywnego unieszkodliwiania odpadów z polimerów syntetycznych. Świadomość narastającego problemu skłania do badania możliwości zastosowania drobnoustrojów w celu efektywnej degradacji tworzyw sztucznych. Tematyka przedłożonej do oceny

rozprawy doktorskiej jest więc związana z niezwykle ważnym zagadnieniem poszukiwania nowatorskich metod degradacji polimerów syntetycznych. Problematyka pracy doktorskiej dotyczy oszacowania zdolności zmodyfikowanych genetycznie drożdży *Yarrowia lipolytica* do rozkładu tworzyw sztucznych na przykładzie poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL) oraz poli(tereftalanu etylenu) (PET). Biorąc pod uwagę powyższe, realizacja pracy doktorskiej poszerzyła dotychczasową wiedzę oraz stanowi rozwiązanie oryginalnego problemu badawczego, a postawiony cel naukowy jest aktualny i można go uznać za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się rozprawa doktorska.

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Katarzyny Kosiorowskiej stanowi cykl czterech, spójnych tematycznie artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych z zakresu biotechnologii, mikrobiologii i ochrony środowiska, indeksowanych w bazie Journal Citation Reports tj. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (IF=6.064; MEiN=100 pkt), *International Biodeterioration & Biodegradation* (IF=4.907; MEiN=140 pkt) oraz *Science of the Total Environment* (2 publikacje; IF=10.753; MEiN = 200 pkt). Jedna praca to artykuł przeglądowy, natomiast trzy kolejne publikacje to prace przedstawiające oryginalne wyniki eksperymentalne. Publikacje wchodzące w skład dysertacji zostały opatrzone streszczeniem (w języku polskim oraz angielskim), wstępem, zwięzłym opisem celu pracy, krótkim opisem stosowanych metod i uzyskanych wyników, podsumowaniem i wnioskami, jak również bibliografią wykorzystaną do przygotowania wyżej wymienionego omówienia i opisem dorobku naukowego Doktorantki. Ponadto, do pracy dołączono oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej opisujące udział Doktorantki oraz współautorów w powstaniu wyżej wymienionego cyklu publikacji. Z dołączonych do dysertacji oświadczeń współautorów wynika, że Doktorantka przeprowadziła badania laboratoryjne, poddała analizie i zwizualizowała uzyskane wyniki oraz napisała manuskrypty. W mojej ocenie brakuje oddzielnego oświadczenia Doktorantki, w którym szczegółowo scharakteryzowałaby zakres prac wykonanych samodzielnie. Z treści oświadczeń przedłożonych przez współautorów nie wynika, że Pani mgr inż. Katarzyna Kosiorowska brała udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań. Ponadto, brakuje informacji w jakim stopniu Doktorantka opracowała i wykonała poszczególne etapy pracy badawczej, które analizy wykonała samodzielnie, na których wykresach, rycinach czy też tabelach zostały one zaprezentowane, co najważniejsze, która część przedłożonych do oceny publikacji została napisana samodzielnie przez Doktorantkę. Niemniej jednak

chciałabym podkreślić, że nie mam wątpliwości co do wiodącego wkładu Doktorantki w powstanie publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, jest pierwszym autorem w trzech pracach eksperymentalnych oraz drugim wiodącym (z równoważnym wkładem z pierwszym autorem) w artykule przeglądowym. Publikacje składające się na rozprawę doktorską były poddane wnikliwej analizie i ocenie przez redakcję czasopism oraz niezależnych recenzentów, a sam fakt opublikowania wskazuje na ich wysoką wartość naukową.

Pierwsza publikacja składająca się na rozprawę doktorską zatytułowana „*Current knowledge on polyethylene terephthalate degradation by genetically modified microorganisms*” stanowi bardzo dobry teoretyczny wstęp do przedłożonej pracy. W artykule tym opisano aktualny stan wiedzy związany z procesem degradacji poli(tetraftalenu etylenu). W pracy tej zaprezentowano skutki nadmiernego wykorzystania polimerów syntetycznych dla środowiska naturalnego, jak również szczegółowo opisano biologiczne metody degradacji PET. Szkoda, że nie rozszerzono tematyki badawczej powyższej pracy o opis dotychczasowych osiągnięć w zakresie możliwości wykorzystania drobnoustrojów do degradacji poli(ϵ -kaprolaktonu), który również stanowił materiał do badań zaprezentowanych w cyklu publikacji.

Wyniki badań prezentowanych w pracach eksperymentalnych można zaliczyć do badań podstawowych, niemniej jednak mają one również wymiar aplikacyjny z potencjałem do wykorzystania w przyszłości w praktyce biotechnologicznej. Dane przedstawione w tych publikacjach mają charakter nowatorski. Przedłożone do oceny prace stanowią logiczną całość, ich cele badawcze zostały jasno sprecyzowane, analiza otrzymanych wyników jest satysfakcjonująca, a dyskusja została przeprowadzona w sposób prawidłowy. W publikacji „*Efficient biodegradation of aliphatic polyester by genetically engineered strains of the yeast *Yarrowia lipolytica**” Doktorantka zaprezentowała wyniki aktywności degradacyjnej zmodyfikowanych genetycznie drożdży *Yarrowia lipolytica* wobec poli(ϵ -kaprolaktonu). Dowiodła, że skonstruowane mutanty były zdolne do hydrolizowania wiązań estrowych w PCL, aczkolwiek z różną efektywnością. Ponadto wykazała, że kutynaza kodowana przez geny pochodzące z *Fusarium solani* wykazywała lepszy potencjał w degradacji analizowanego tworzywa aniżeli ta pochodząca od *Trichoderma reesei*. Co ważne, zdolność do ekspresji wklonowanych genów została potwierdzona przy użyciu metody qRT-PCR. Niemniej jednak, nasuwają się następujące pytania: (1) Dlaczego hodowle, z których pozyskiwano

materiał do weryfikacji ubytku masy folii PCL prowadzono przez 144 h? (2) Czy przed wykonaniem reakcji real-time PCR Doktorantka sprawdziła skuteczność zastosowanej DNazy? (3) Przy użyciu jakiej metody obliczono poziom ekspresji badanych genów?

Celem kolejnej pracy eksperymentalnej pt. „*Metabolic engineering of Yarrowia lipolytica for poly(ethylene terephthalate) degradation*” było określenie zdolności zmodyfikowanego szczepu *Yarrowia lipolytica* zawierającego gen kodujący kutynazę pochodzący z *Fusarium solani* do rozkładu poli(tereftalanu etylenu). Ponadto, zweryfikowano wpływ dodatków w hodowli takich jak: sole nieorganiczne, oliwa z oliwek i olej rzepakowy na poziom degradacji PET. Doktorantka wykazała, że jedynie dodatek chlorku wapnia istotnie wpłynął na poziom kwasu tereftalowego (TPA) oraz kwasu mono(2-hydroksyetylo)tereftalowego (MHET). Ponadto, Doktorantka dowiodła, że wraz ze zwiększeniem objętości roboczej prowadzonych hodowli, stosunek TPA do MHET zmieniał się na korzyść terminalnego produktu rozpadu PET. Analizie poddano również folie PET podczas hodowli z badanym szczepem AJD 2 pAD CUT_FS potwierdzające widoczne zmiany w strukturze tworzywa świadczące o zdolności degradacyjnej zmodyfikowanego szczepu. Stwierdzono, że szczep kontrolny nie wykazał zdolności do uszkodzenia polimeru, zauważono niewielkie zarysowania, które prawdopodobnie powstały podczas procesów produkcji materiału lub przygotowania folii do doświadczeń. Niemniej jednak, aby potwierdzić powyższe przypuszczenie należałoby wykonać analizę próbki folii z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego przed ich umieszczeniem w hodowli.

Cykl publikacji wchodzących w skład przedłożonej dysertacji zamyka artykuł „*Production of PETase by engineered Yarrowia lipolytica for efficient poly(ethylene terephthalate) biodegradation*” opublikowany w *Science of The Total Environment*, w którym Doktorantka potwierdziła zdolność badanego szczepu *Yarrowia lipolytica* zawierającego gen kodujący PETazę pochodzący z *Ideonella sakaiensis* do rozkładu PET. Ponadto, wykazała, że dodatek oliwy z oliwek korzystnie wpłynął na wzrost stężenia uwolnionego TPA, a charakter uszkodzeń folii PET po hodowli różnił się w zależności od zastosowanej suplementacji podłoża hodowlanego.

W skład przedłożonej rozprawy doktorskiej, oprócz kopii publikacji, wchodzi 46-stronicowy manuskrypt będący autorskim opracowaniem Doktorantki. W „Streszczeniu” pojawiły się błędy literowe oraz stylistyczne tj.: „Proces rozkładu PET został przeprowadzono...” (str. 7), „...zmodyfikowane szczepy kutynazę...” (str. 8).

W rozdziale „Wstęp” Pani mgr inż. Katarzyna Kosiorowska przedstawiła dotychczasowy stan wiedzy z zakresu biodegradacji tworzyw sztucznych. Dobór opisanych zagadnień jest ściśle związany z prezentowanymi wynikami własnymi Doktorantki. Pozycje literaturowe, które cytuje Doktorantka zostały wybrane w sposób prawidłowy i opisują najnowsze badania naukowe w kontekście przedstawionego zagadnienia. Jednakże, w rozdziale tym pojawia się kilka nieścisłości i skrótów myślowych np.: „Ostateczne potwierdzenie faktu spożywania plastiku przez ludzi zostało zdeterminowane...” (str. 13); „...dobór szczepu będącego organizmem gospodarza...” (str. 14). Ponadto, Doktorantka w bardzo oszczędny sposób opisała kryteria wyboru *Yarrowia lipolytica* do przeprowadzenia prac badawczych, co budzi mój niedosyt. Cel główny pracy oraz cele szczegółowe są zrozumiałe. Rozdział „Materiały i metody” został opisany w sposób szczegółowy, jednakże pojawiają się liczne błędy np.: „Inokulum *Y. lipolytica* podłoża...” (str. 18); „...krzywe wzrostu szczepów drożdżowych hodowano...” (str. 18); „Testy stref przejaśnień przeprowadzone w Publikacji 1...” (str. 18) – Publikacja 1 to praca przeglądowa; „...zgodnie z protokołem metody chemicznej ... opisanego wcześniej...” (str. 19). Ponadto, po przeczytaniu powyższego rozdziału nasunęły mi się następujące spostrzeżenia i pytania: (1) Skąd pochodził dziki szczep *Yarrowia lipolytica*? (2) Dlaczego jako suplementy zastosowano oliwę z oliwek oraz olej rzepakowy? Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka? (3) Nie podano nazwy zastosowanego antypieniacza? Czy sprawdzono jego wpływ na wzrost badanych drożdży? Przedstawione powyższe spostrzeżenia nie umniejszają wartości naukowej rozprawy i nie wpływają na jej ocenę. Opracowanie zamykają rozdziały „Podsumowanie” oraz „Wnioski”, które potwierdzają, że postawione cele pracy zostały zrealizowane i stanowią istotny wkład w poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat zdolności mikroorganizmów do rozkładu tworzyw sztucznych.

WNIOSEK KOŃCOWY

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr inż. Katarzyny Ewy Kosiorowskiej uważam, że uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i wartościowe. Należy podkreślić, że otrzymane wyniki stanowią nie tylko wartość poznawczą, ale są również podstawą do planowania i prowadzenia dalszych doświadczeń naukowych.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Ewy Kosiorowskiej pt. „Badanie zdolności fizjologicznych drożdży *Yarrowia lipolytica* do rozkładu tworzyw sztucznych” spełnia

warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Ewy Kosiorowskiej oraz dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Biorąc pod uwagę fakt, że uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozwój badań nad możliwością zastosowania drobnoustrojów do degradacji tworzyw sztucznych oraz zostały opublikowane w uznanych periodykach naukowych, wnoszę o wyróżnienie przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej.

Jurajna Horjko - Czentelna