

**Załącznik nr 3**  
do wniosku z dnia 20.09.2023 roku  
o przeprowadzenia postępowania  
w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego

**Autoreferat**

Adam Jan Dobrowolski  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt  
Instytut Biologii Środowiskowej  
Pracownia dla Zrównoważonego Biorozwju

Wrocław 2023

## Autoreferat

### 1. Imię i nazwisko.

Adam Jan Dobrowolski

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- 2012**     **Uniwersytet Groningen**, Niderlandy. “The re-entrant loop structures in secondary transporters”, 02.04.2012 -data nadania stopnia , **Doktor Nauk Przyrodniczych**
- 2004**     **Uniwersytet Wrocławski**, Wydział Nauk Przyrodniczych, **Magister Biologii**, specjalizacja Mikrobiologia,
- 2002**     **Uniwersytet Wrocławski**, Wydział Nauk Przyrodniczych, **Licencjat Biologii**, specjalizacja Mikrobiologia,

### 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- 10.2022-**     adiunkt, Instytut Biologii Środowiskowej, Pracownia dla Zrównoważonego Biorozwoju, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- 2012-2022**     adiunkt, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- 2010-2012**     asystent, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- 2009-2010**     Post-Doc, Department of Molecular Microbiology, Uniwersytet Groningen, Niderlandy
- 2005-2009**     Doktorant, Department of Molecular Microbiology, Uniwersytet Groningen, Niderlandy

### 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

## Omówienie celu osiągnięcia naukowego I

Celem badań było zbadanie oraz zoptymalizowanie biosyntezy lipidów – olejów mikrobiologicznych (ang. Single Cell Oils – SCO) przez drożdże *Yarrowia lipolytica* z niekonwencjonalnych źródeł węgla, dzięki modyfikacjom genetycznym drożdży oraz optymalizację procesu biosyntezy. W pracy wykorzystano substraty odpadowe; glicerol z odpadów przemysłowych oraz hydrolizaty biomasy brązowych makroalg. Otrzymane wyniki badań opublikowano w pięciu oryginalnych artykułach naukowych w czasopismach o międzynarodowym zasięgu. Publikacje naukowe przedstawione w cyklu są wynikiem badań przeprowadzonych w ramach dwóch projektów naukowych, których byłem kierownikiem. Pierwsza publikacja była wynikiem projektu Iuventus Plus finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, natomiast pozostałe 4 projektu, Sonata Bis7 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Dobrowolski A.**, Mitula P., Rymowicz W., Mirończuk, AM\*. (2016) Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 207 , 237-243, doi10.1016/j.biortech.2016.02.039  
IF=5,651, pkt. MEiN=45 (nowa punktacja 140), cyt=117 (WoS), 152 (GS)
2. **Dobrowolski A.\*** Drzymala K., Rzechonek DA., Mitula P., Mirończuk AM. (2019) Lipid Production From Waste Materials in Seawater-Based Medium by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Microbiology* Mar 18;10:547, doi 10.3389/fmicb.2019.00547  
IF=4,236; pkt. MEiN=100, cyt=35 (WoS), 44 (GS)
3. **Dobrowolski A.\*** Drzymala K., Mitula P., Mirończuk AM.(2020) Production of tailor-made fatty acids from crude glycerol at low pH by *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* vol. 314, 10.1016/j.biortech.2020.123746  
IF=9,642; pkt. MEiN=140, cyt=21 (WoS), 24 (GS)
4. **Dobrowolski A.\*** Mirończuk AM. (2020) The influence of transketolase on lipid biosynthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories*, 19,( 1), 1-9, doi 10.1186/s12934-020-01398-x  
IF=5,328; pkt. MEiN=100 (140), cyt= 21 (WoS), 22 (GS)
5. **Dobrowolski A.\*** Nawijn W., Mirończuk AM. (2022) Brown seaweed hydrolysate as a promising growth substrate for biomass and lipid synthesis of the yeast *Yarrowia*

lipolytica. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10:944228. doi: 10.3389/fbioe.2022.944228  
IF=5,7; pkt. MEiN=100; cyt=0 (WoS), 0 (GS)

\*autor korespondencyjny

Sumaryczny IF 5 przedstawionych publikacji to **30,557** a liczba punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki to **485 (nowa punktacja 620-** po ujednoczeniu liczby punktów na punktację czasopism z lipca 2023 roku). Współczynnik IF dla każdej publikacji został podany dla roku publikacji, natomiast punkty MEiN według ostatniej aktualizacji aby uniknąć dwóch systemów punktowych oraz ze względu na zmiany częstsze niż raz w roku.

### **Publikacja H1**

**Dobrowolski A.**, Mitula P., Rymowicz W., Mirończuk, A.M. Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*.

Bioresource Technology (2016) 207 , 237-243,

IF=5, 651; MNiSW=45 pkt (nowa punktacja 140)

Drożdże *Y. lipolytica* są znane z możliwości utylizacji nietypowych źródeł węgla takich jak glicerol, alkany czy kwasy tłuszczowe. Ponieważ badania prowadzone przeze mnie dotyczyły produkcji lipidów z wykorzystaniem glicerolu jako substratu, pierwszym etapem badań była możliwość zastosowania gliceroli odpadowych pochodzących z różnych przemysłów. W tej pracy przebadano glicerole odpadowe otrzymane z produkcji mydła (procesu saponifikacji, glicerol oznaczony G1), produkcji biodiesla – z różnych przedsiębiorstw (glicerole oznaczone G2-G4) oraz produkcji stearyny (G5), substratem kontrolnym była gliceryna kosmetyczna (G6) o czystości 100%. Początkowo zbadano skład gliceryn odpadowych: zawartość glicerolu, azotu, NaCl, popiołu oraz wody. Z analizy wyniknęło, że zawartość glicerolu waha się od 42% (G5) do 87% (G3), natomiast poziom NaCl od 7.59 % (G1) do 0,2% (G3). Pierwszym etapem badań było sprawdzenie zdolności szczepu dzikiego A101 do wzrostu na podłożu YNB suplementowanym różnymi glicerolami o końcowym stężeniu 2%. Zanieczyszczenia znajdujące się w glicerolu odpadowym mogą mieć znaczący wpływ na wzrost mikroorganizmów. Badania wykazały, że wzrost drożdży na podłożu z glicerolami z produkcji biodiesla (G2-G4) jest bardzo podobny do wzrostu na podłożu z gliceryną kosmetyczną. Jednakże, co było najistotniejsze, drożdże *Y. lipolytica* były zdolne do wzrostu na wszystkich testowanych substratach. W związku z tym przeprowadzono

hodowle wstrząsane na glicerolu kosmetycznym, w celu ustalenia optymalnego stosunku C/N do produkcji lipidów. Produkcja lipidów przez drożdże *Y. lipolytica* jest naturalnym procesem pojawiającym się przy głodzie azotowym. W pracy przebadano C/N 50, C/N 75, C/N 100, C/N 150 oraz C/N 200. Najlepszą produkcję biomasy oraz lipidów zaobserwowano dla proporcji C/N 75 oraz C/N 100, w związku z tym, takie parametry wybrano do produkcji lipidów z substratów odpadowych. Substratem, który okazał się być najbardziej wydajny w tym procesie był glicerol odpadowy z produkcji mydła (wartość suchej biomasy wyniosła 7.8 g/L, zawartość lipidów 1,29g/L) z tego powodu, został on wybrany do przeprowadzenia procesu w zwiększonej skali, w bioreaktorze. W tym eksperymencie również sprawdzono 2 różne stosunki C/N, C/N 75 oraz C/N 100. Z badań wynikało, że C/N 100 jest bardziej optymalny, ponieważ drożdże nagromadziły ponad 20% lipidów w suchej masie, co było jednym z większych ilości lipidów syntetyzowanych *de novo*, przez te mikroorganizmy. Ostatnim etapem badań było sprawdzenie profilu kwasów tłuszczowych wyprodukowanych na różnych substratach. Istotnym odkryciem był fakt, że profil kwasów tłuszczowych znacznie się różni w zależności od zastosowanego substratu. Dzięki doborowi substratu można zwiększyć pulę nasyconych (SFA), nienasyconych (MUFA) lub wielonienasyconych (PUFA) kwasów tłuszczowych w komórce. Było to bardzo istotne, ponieważ dotychczas sądzono, że profil kwasów tłuszczowych w *Y. lipolytica* może być zmieniony tylko dzięki modyfikacjom genetycznym i zmianie szlaków metabolicznych w tym organizmie. Z przedstawionych badań wynikało, że profil kwasów tłuszczowych, może być zmodyfikowany w zależności od potrzeby zastosowania, za pomocą doboru substratu oraz to, że glicerole odpadowe mimo wysokiej zawartości zanieczyszczeń, stanowią doskonale źródło węgla dla drożdży *Y.lipolytica* do syntezy lipidów. W przedstawionej pracy byłem pomysłodawcą, zaplanowałem eksperymenty, przeprowadziłem hodowle wstrząsane oraz bioreaktorowe, izolację lipidów, analizę danych oraz napisałem manuskrypt.

### Publikacja H2

**Dobrowolski A.\***, Drzymała K., Rzechonek D.A., Mituła P., Mirończuk A.M. (2019) Lipid Production From Waste Materials in Seawater-Based Medium by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Microbiology*, Mar 18;10:547

IF=4,26; MEiN= 100 pkt

\*autor korespondencyjny

W kolejnej pracy zbadano możliwość wykorzystania wody morskiej do hodowli drożdży *Y. lipolytica* i produkcji kwasów tłuszczowych w takich warunkach środowiska. Światowy problem dostępu do wody pitnej (słodkiej wody) przez powiększającą się populację ludzką i zmiany klimatyczne, skłonił mnie do sprawdzenia możliwości wykorzystania wody słonej (wody morskiej) w produkcji lipidów, które docelowo mogą być wykorzystane jako biodiesel trzeciej generacji. Co jest istotne, drożdże *Y. lipolytica* mają zdolność do wzrostu w środowisku o wysokim ciśnieniu osmotycznym, dzięki zdolności do produkcji osmoprotektantów takich jak erytrytol czy mannitol, co chroni te komórki przed niekorzystnym wpływem środowiska i utratą wody z komórek. Ponieważ w założeniu badań, kwasy tłuszczowe produkowane przez drożdże mają służyć jako substrat do produkcji biodiesla, niezbędna będzie ich masowa produkcja, a ta wymaga dużej ilości wody. W tym celu, najpierw przeprowadzono nadekspresję genu *DGA1* (*YALI0E32769g*), kodującego acylotransferazę diacyloglicerolu, którego nadekspresja skutkuje zwiększoną produkcją lipidów przez drożdże *Y. lipolytica*. Po uzyskaniu prawidłowego wektora, stransformowano szczep AJD, w wyniku czego uzyskano szczep AJD pAD-DGA1. W badaniach wykorzystano również szczep dziki (A101), który służył jako kontrola.

Pierwszym etapem badań, było sprawdzenie zdolności szczepu dzikiego do wzrostu na podłożu z wodą słoną (SW) oraz podłożu pełne YPD lub YPGly, gdzie źródłem węgla była glukoza lub glicerol kosmetyczny. Dzięki wzrostowi w czytniku mikroplatek, udowodniono, że wzrost szczepu A101 na każdym przebadanym podłożu jest niemal identyczny- zarówno z wykorzystaniem wody słodkiej (destylowanej) czy słonej (przygotowanej na bazie odczynnika o składzie soli morskiej). Następnie przeprowadzono hodowle wstrząsane z szczepami A101 oraz AJD pAD-DGA1 na podłożach minimalnych suplementowanych glukozą lub glicerolem odpadowym. Po zakończonym eksperymencie sprawdzono poziom produkcji biomasy oraz lipidów w badanych szczepach. Zgodnie z założeniem, szczep AJD pAD-DGA1, wyprodukował znacząco więcej lipidów- 43% suchej biomasy, niż szczep dziki (16,71%), natomiast wpływ słonej wody na syntezę lipidów był minimalny i dla szczepu zmodyfikowanego genetycznie produkcja biomasy wyniosła 12,07 g/L w wodzie słodkiej oraz 11,30 g/L w wodzie słonej. Profil kwasów tłuszczowych nie różnił się znacząco od rodzaju zastosowanej wody, tak samo nadekspresja genu *DGA1* nie skutkowała znaczącą różnicą. Głównym kwasem tłuszczowym był kwas oleinowy (C16:0), którego zawartość wyniosła ok. 60% wszystkich kwasów tłuszczowych.

Ostatnim etapem badań było zwiększenie skali produkcji w celu udowodnienia stabilności ustalonego procesu. Hodowle przeprowadzono w bioreaktorze o pojemności

całkowitej 5L, szczepem badanym był AJD pAD-DGA1 a jako substrat wykorzystano glicerol odpadowy (końcowe stężenie czystego glicerolu 150 g/L), woda słona stanowiła środowisko podłoża. Jako kontrolę zastosowano takie samo podłoże, lecz z wodą pitną (wodociągową). Z przeprowadzone badania udowodniły, że słona woda zastosowana do przygotowania podłoża nie ma negatywnego wpływu na wzrost drożdży oraz na produkcję lipidów. Zaskakująco, biomasa drożdży na podłożu opartego o wodę morską wyniosła aż 48 g/L natomiast w podłożu z wodą słodką 36,4 g/L. Ponieważ w obu przypadkach ilość nagromadzonych lipidów wyniosła ok. 8g/L, procentowy udział lipidów w suchej biomacie dla wody słonej był nieco niższy i wyniósł 21,2%, udział procentowy lipidów w przypadku wody pitnej wyniósł 28,5%.

W przedstawionych badaniach po raz pierwszy udowodniono, że zastosowanie wody morskiej oraz glicerolu odpadowego do produkcji lipidów przez drożdże *Y. lipolytica* jest możliwe i posiada potencjał aplikacyjny. Wykorzystanie glicerolu odpadowego, który nie został poddany żadnym wcześniejszym procesom oczyszczenia oraz wody morskiej umożliwia stworzenie taniego podłoża do syntezy produktów o podniesionej wartości, takich jak lipidy. Co jest istotne, również szczepy modyfikowane genetycznie są w stanie wydajnie rosnąć na tak skomponowanym podłożu.

W przedstawionej pracy byłem pomysłodawcą, planowałem klonowanie i eksperymenty, uczestniczyłem w przeprowadzonych badaniach, izolowaniu lipidów, analizie HPLC i analizie danych oraz napisałem część artykułu.

### Publikacja H3

**Dobrowolski A.\***, Drzymała K., Mituła P., Mirończuk A. M.(2020) Production of tailor-made fatty acids from crude glycerol at low pH by *Yarrowia lipolytica*

Bioresource Technology vol. 314, 2020

IF=9,642; MEiN=140 pkt.

\*autor korespondencyjny

Celem badań przedstawionych w publikacji była optymalizacja procesu produkcji lipidów z glicerolu odpadowego w niskim pH środowiska (pH=3.0) połączonego z inżynierią metabolizmu drożdży. Niskie pH procesu chroni przez przypadkowymi zakażeniami bakteryjnymi, zastosowanie glicerolu odpadowego obniża koszty produkcji, natomiast modyfikacja genetyczna umożliwia dobranie profilu kwasów tłuszczowych w zależności od celu ich zastosowania. Obecność nasyconych kwasów tłuszczowych jest korzystna w przypadku produkcji biodiesla, natomiast wysokie nagromadzenie wielonienasyconych

kwasów tłuszczowych (PUFA) jest pożądane przy produkcji suplementów diety lub dodatków do pasz zwierzęcych.

Pierwszym etapem badań było stworzenie kombinacji szczepów z nadekspresją genów *GUT1*, kodującego kinazę glicerolu, *SCT1* kodującego glicerol-3-P acylotransferazę oraz *DGA1*, kodującego acylotransferazę diacyloglicerolu, uzyskując w ten sposób kilka szczepów o różnych właściwościach: AJD pAD-SCT1, AJD GUT1/SCT1, AJD GUT1/DGA1 oraz AJD SCT1/DGA1. Dodatkowo w pracy wykorzystano wcześniej stworzony szczep AJD pAD-DGA1 (H2)

W pracy przeprowadzono hodowle wstrząsane w czterech różnych podłożach YNB z glicerolem odpadowym jako jedynym źródłem węgla: Podłoże A (Medium A) C/N 100; Podłoże B (Medium B) C/N 100, YE 1g/L; Podłoże C (Medium C) C/N 100, YE 1g/L, w buforze fosforanowym pH=6.0; Podłoże D (Medium D) C/N 100, YE 1g/L, pH=3.0.

Zgromadzone dane wykazały, że najbardziej optymalnym podłożem do produkcji lipidów przez zmodyfikowane drożdże jest podłoże D. Dzięki temu, że w niskim pH produkcja kwasu cytrynowego jest silnie ograniczona, przepływ węgla z glicerolu jest kierowany na syntezę lipidów. Co ciekawe, analiza profilu kwasów tłuszczowych wykazała, że nadekspresja *SCT1* skutkuje 10 krotnym wzrostem zawartości PUFA w suchej biomase drożdży. Zawartość kwasu linolowego (C18:2) wyniosła aż 20% kwasów tłuszczowych, co w porównaniu do szczepu kontrolnego (2,4%) daje niezwykley wynik. Po raz pierwszy wykazano, że nadekspresja *SCT1* znacząco wzmacnia syntezę PUFA, niezależnie od warunków środowiska. Ponieważ ko-ekspresja genów *GUT1* oraz *SCT1* również wykazała zwiększoną produkcję PUFA, szczep z nadekspresją obu genów został wybrany do badań na zwiększonej skali, w bioreaktorze. Jako szczep kontrolny wykorzystano A101, eksperyment przeprowadzono w podłożu D. Mimo że uzyskana ilość biomasy dla obu szczepów była na średnim poziomie (19,2 g/L i 18,0 g/L, dla AJD GUT1/SCT1 oraz kontroli, odpowiednio), istotnym faktem było to, że ponownie zaobserwowano znaczący wzrost zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych dla szczepu AJD GUT1/SCT1. Zmodyfikowany szczep nagromadził ponad 85% MUFA i PUFA w swojej biomase, co daje jeden najwyższych zawartości UFA (nienasyconych kwasów tłuszczowych) w opublikowanych pracach dotyczących *Y. lipolytica*. Przeprowadzone badania stwarzają możliwość aplikacyjnego zastosowania zmodyfikowanych drożdży oraz warunków ustalonych do wydajnego przeprowadzenia fermentacji w celu uzyskania biomasy bogatej w wielonienasycone kwasy tłuszczowe.



W opisanej pracy byłem pomysłodawcą przeprowadzonych badań, planowałem eksperymenty, uczestniczyłem w klonowaniu, przeprowadzaniu hodowli, izolacji lipidów, analizie danych oraz brałem udział w pisaniu manuskryptu.

#### Publikacja H4

**Dobrowolski A.\***, Mirończuk A. M., The influence of transketolase on lipid biosynthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. (2020) *Microbial Cell Factories* 19,( 1), 1-9, IF= 5,325; MEiN=100 pkt.

\*autor korespondencyjny

W przedstawionej publikacji, sprawdzono wpływ ko-ekspresji *DGA1* oraz genów kodujących enzymy wchodzące w szlak pentozofosforanowy (PPP), to jest; transaldolazy (*TAL1*), transketolazy (*TKL1*), epimerazy pentozofosforanowej (*RPE1*), dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (*ZWF1*) oraz dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej (*GND1*), na poziom produkcji lipidów przez drożdże *Y. lipolytica*. Szlak PPP generuje 2 istotne czynniki dla metabolizmu komórki, pentozy oraz pulę NADPH. Wcześniejsze badania wykazały, że ten szlak generuje czynnik redukcyjny niezbędny do syntezy lipidów przez drożdże *Y. lipolytica*, jednakże nie było wiadome, który z genów pełni kluczową rolę w tym procesie. W przedstawionej pracy, zbadano 5 kluczowych genów z tego szlaku. Dodatkowo przeprowadzono optymalizację warunków hodowli sprawdzając wpływ pH oraz suplementację wyciągiem drożdżowym (YE) dodanym do podłoża.

W pierwszym etapie pracy, sprawdzono, czy wprowadzone modyfikacje genetyczne są funkcjonalne i następuje nadekspresja obu genów w danym szczepie, tj. *DGA1* oraz 1 genu ze szlaku PPP. Analiza qRT-PCR potwierdziła, że w każdym ze zmodyfikowanych szczepów następuje nadekspresja wybranych genów. Dodatkowo, sprawdzono, czy wprowadzone modyfikacje genetyczne nie upośledzają zdolności wzrostu mutantów na podłożu minimalnym z glicerolem, jako źródłem węgla. Badanie przeprowadzone w czytniku mikropłytek potwierdziło stabilność i zdolność wzrostu taką samą jak szczep dziki. W związku z tym przeprowadzono hodowle wstrząsane z 6 szczepami AJD *DGA1*(kontrola), AJD D/*TKL1*, AJD D/*TAL1*, AJD D/*RPE1*, AJD D/*ZWF1* oraz AJD D/*GND1*. W badaniach wykorzystano 3 różne podłoża, Podłoże A (Medium A): YNB (bez aa i bez siarczanu amonu), 50 g/L glicerolu kosmetycznego, suplementowane  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , stosunek C/N 60, pH 6.0; Podłoże B (Medium B): YNB (bez aa i bez siarczanu amonu), 50 g/L glicerolu kosmetycznego, suplementowane  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 g/L YE, stosunek C/N 60, pH 3.0, 50 mM bufor cytrynianowy. Podłoże C (Medium C): YNB (bez aa i bez siarczanu amonu), 50 g/L

glukozy, suplementowane  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 g/L YE, stosunek C/N 60, pH 3.0, 50 mM bufor cytrynianowy. Zróżnicowane warunki hodowli mogły dać odpowiedź na pytania: czy istnieje różnica pomiędzy źródłem węgla (glicerol versus glukoza), wpływu pH oraz suplementacji wyciągiem drożdżowym, na produkcję biomasy oraz poziom produkcji lipidów, przez drożdże zmodyfikowane genetycznie?

Z przeprowadzonych badań wynikało się, że największy wpływ na poziom syntezy kwasów tłuszczowych ma ko-ekspresja *DGA1* oraz *TKL1*, niezależnie od warunków, poziom produkcji biomasy oraz lipidów był najwyższy dla tego szczepu. W podłożu z glicerolem, szczep AJD D/TKL1 wyprodukował 40% więcej lipidów niż szczep kontrolny AJD DGA1. Co ciekawe, nadekspresja dwóch dehydrogenaz *ZWF1* oraz *GND1*, które bezpośrednio odpowiadają za generowanie NADPH, nie miała pozytywnego wpływu na przyrost ilości lipidów w biomacie drożdży. Kolejną ciekawą obserwacją był wpływ niskiego pH i suplementacji YE na profil kwasów tłuszczowych. Ponieważ we wszystkich szczepach przeprowadzono nadekspresję *DGA1*, miały one podwyższony poziom kwasu stearynowego (C18:0) do ok. 16%, jednakże w niskim pH i przy suplementacji YE, wzrósł on gwałtownie do 30-40% w puli kwasów tłuszczowych (oprócz AJD D/GND1), co było zjawiskiem, wcześniej nie zaobserwowanym. Nadekspresja *TKL1* nie miała znaczącego wpływu na profil kwasów tłuszczowych i pozostał on prawie taki sam, jak w przypadku nadekspresji *DGA1*. Przeprowadzone badania, jasno wskazały kluczowy czynnik w PPP odpowiedzialny za wysoki poziom produkcji lipidów w drożdżach *Y. lipolytica*, a ustalenie lub zmiana warunków hodowli umożliwia dostosowanie profilu kwasów tłuszczowych do konkretnego produktu np. do produkcji biodiesla.

W przedstawionych badaniach byłem pomysłodawcą, zaplanowałem eksperymenty, uczestniczyłem w klonowaniu, przeprowadziłem hodowle wstrząsane, izolowałem lipidy, analizowałem dane oraz brałem udział w pisaniu manuskryptu.

#### Publikacja H5

**Dobrowolski A.\***, Nawijn W., Mirończuk AM. (2022) Brown seaweed hydrolysate as a promising growth substrate for biomass and lipid synthesis of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Aug 17;10:944228.

IF=6,02; MEiN=100 pkt.

\*autor korespondencyjny

W ostatniej z przedstawionych w cyklu publikacji pracy, skupiono się na wykorzystaniu przez drożdże *Y. lipolytica* niekonwencjonalnego źródła węgla jakim są

związki budujące biomasę brązowych alg morskich. W badaniach wykorzystano biomasę brunatnic: *Fucus vesiculosus* oraz *Saccharina latissima*. Makroaglie morskie stanowią niezwykle cenne źródło odnawialnego surowca, z powodu szybkiego tempa wzrostu, dostępności oraz wysokiej zawartości glukozy i mannitolu w biomasie. W przeciwieństwie do roślin lądowych, makroalgie nie zawierają ligninu w swojej ścianie komórkowej, z tego powodu proces scukrzania jest prosty. Ponieważ drożdże *Y. lipolytica* mogą naturalnie utylizować mannitol, taka biomasa wydaje się być atrakcyjnym, tanim surowcem. W dodatku, makroalgie, nie wymagają pól uprawnych- brak więc konkurencji z uprawą żywności, nawożenia a ich tempo wzrostu przewyższa prędkość wzrostu roślin lądowych. W badaniach skupiliśmy się na zoptymalizowaniu procesu hydrolizy biomasy alg, sprawdzeniu dynamiki wzrostu drożdży dzikich oraz zmodyfikowanych oraz produkcji lipidów z wykorzystaniem hydrolizatów jako podłoża produkcyjnego.

Pierwszym etapem badań było ustalenie optymalnego procesu hydrolizy biomasy alg, do testów została wybrana biomasa Morszczyzna pęcherzykowata (*F. vesiculosus*). Pierwszym pytaniem było, czy wstępna obróbka kwasowa i termiczna jest niezbędna do wydajnego uwolnienia glukozy i mannitolu z biomasy w etapie hydrolizy enzymatycznej. Uzyskane wyniki, wykazały że różnice pomiędzy dwoma testowanymi warunkami nie są istotne, w związku z tym, wybrano metodę bez obróbki kwasowej, jako szybszej, tańszej i łatwiejszej metody. Kolejnym etapem było zbadanie najlepszych warunków do hydrolizy enzymatycznej biomasy za pomocą koktajlu enzymatycznego Cellic CTec2 podarowanego do badań przez firmę Novozymes, z Danii.

Przetestowaliśmy trzy różne stężenia biomasy alg (10%, 15% oraz 20%, w/v) oraz enzymu w stężeniach 0%(kontrola), 1%, 2% oraz 4% (v/v), próbki zostały poddane analizie HPLC. Najwyższe stężenia cukrów uzyskano, stosując enzym w stężeniu 4%. Poziom glukozy, przy tej dawce CTec2, wahał się od 14.5 g/L do 17.5 g/L. Natomiast stężenie mannitolu wynosiło od 12.0 do 24.3 g/L, i było zależne od ilości biomasy a nie użytego stężenia enzymu. Próbkę z 15% i 20% biomasą alg były niezwykle gęste, dlatego też, by ułatwić proces fermentacji drożdży do dalszych badań wybrano hydrolizat z 10% (w/v) biomasy alg potraktowany 4% stężeniem enzymu.

Ponieważ nie oznaczaliśmy stężenia azotu w hydrolizatach z biomasy alg, do testów wzrostu dzikich drożdży *Y. lipolytica* A101, zastosowano dodatek podłoża YNB (Yeast Nitrogen Base). Badanie wzrostu przeprowadzono w czytniku mikropłytek, z pomiarem gęstości optycznej co 30 min, przez 96 godzin. Wzrost drożdży *Y. lipolytica* różnił się od rodzaju zastosowanego hydrolizatu biomasy makroalg *F. vesiculosus* lub *S. latissima*. Wzrost

na pierwszym surowcu, charakteryzował się wypłaszczoną fazą logarytmicznego wzrostu, co sugerowało obecność inhibitorów w hydrolizatach. Wzrost na hydrolizacie z biomasy *S. latissima*, był dynamiczny i charakterystyczny dla zdrowych komórek drożdżowych. Jednak, co jest istotne do podkreślenia, na obu hydrolizatach, wzrost drożdży był wystarczający do produkcji biomasy drożdży.

W związku z uzyskanymi wynikami, przeprowadzono hodowle wstrząsane drożdży *Y. lipolytica* na hydrolizatach uzyskanych z biomas obu gatunków makroalg. W celu zwiększenia ilości glukozy i mannitolu w hydrolizatach zastosowano 5% stężenie koktajlu enzymatycznego Cellic CTec2, uzyskując odpowiednio 17 g/L i 18 g/L glukozy oraz 11.0 g/L and 3.0 g/L mannitolu dla *F. vesiculosus* oraz *S. latissima*. Pomiar gęstości optycznej był przeprowadzany co 8 h przez 72 godziny. Pierwszym źródłem węgla, który został wykorzystany w przypadku obu hydrolizatów była glukoza, która została zutylizowana w ciągu 32-40 godzin, następnie drożdże zutylizowały mannitol w ciągu 64-72 h procesu. Gęstość optyczna była duża w obu przypadkach ( $OD_{600} = 25/30$ ), co wskazywało, że hydrolizaty biomas makroalg są dobrym substratem dla drożdży *Y. lipolytica*.

Ostatnim etapem badań, było sprawdzenia produkcji lipidów na tanim, odnawialnym substracie przez drożdże *Y. lipolytica*. W celu zwiększenia plonu lipidów, zastosowano również szczep z nadekspresją genów DGA1/DGA2. Do szczepu AJD DGA1 (publikacja H3), wprowadzono gen kodujący acyltransferazę diacylglicerolu *DGA2* (YALI0D07986g), uzyskując szczep o zwiększonej zdolności produkcji i akumulacji lipidów. W naturalnych warunkach, *Y. lipolytica* akumuluje lipidy w swojej biomase, jako odpowiedź na głód azotowy, przy nadmiarze węgla w środowisku. Ponieważ stosunek C/N w biomase alg może się znacząco różnić w zależności od zastosowanego gatunku czy pory roku, nie oznaczaliśmy ilości tych pierwiastków, by sprawdzić, czy bez optymalizacji stosunku C/N (optimum waha się od 60 do 100), można uzyskać plon lipidów. Ponieważ w poprzednim eksperymencie dowiedliśmy, że maksymalny wzrost biomasy drożdży przypada na 72 h procesu, w tym eksperymencie, próbki również pobrano w tym punkcie czasowym.

W przypadku hydrolizatów uzyskanych z *F. vesiculosus*, wzrost był drożdży był słaby a ilość lipidów w suchej biomase, niewielka. Szczep dziki wyprodukował 4,75 g/l biomasy, szczep zmodyfikowany tylko 3,55 g/L a w obu przypadkach stężenia lipidów nie przekroczyło 5%.

Jednakże zastosowanie hydrolizatów z *S. latissima* umożliwiło uzyskanie większego plonu biomasy dla obu szczepów, szczep kontrolny osiągnął 7,7 g/L, natomiast szczep AJD DGA1/DGA2 aż 8,9g/L, co jest dobrym wynikiem uzyskanym w krótkim czasie (72h

procesu). Ilość lipidów w obu przypadkach nie przekroczyła 10%, jednak była większa w przypadku zmodyfikowanego szczepu.

Najciekawszym odkryciem tego eksperymentu był fakt, że ponad 90% z puli kwasów tłuszczowych w suchej biomase drożdży, stanowiły kwasy nienasycone. Prawdopodobnie, ten efekt był spowodowany wysokim stężeniem kwasów nienasyconych w komórkach makroalg. Synteza *de novo* nienasyconych kwasów tłuszczowych w komórkach *Y. lipolytica*, była już przeprowadzana przez innych badaczy, jednakże nie przekroczyła ona 60%. W naszych badaniach, głównymi kwasami tłuszczowymi były kwasy oleinowy (C18:1) oraz linolowy (C:18:2), a co ciekawe, znacząco ograniczona została produkcja kwasu stearynowego (poniżej 4%). Z uzyskanych danych wywnioskowano, że zastosowana biomasa alg może dać inny profil kwasów tłuszczowych (co potwierdziło dane o użyciu różnych substratów z publikacji P1) i należy dobrać odpowiedni substrat do profilu badań. Wyprodukowana biomasa drożdży bogata w nienasycone kwasy tłuszczowe może być rozważona jako suplement diety lub suplement paszowy. Pozytywny wpływ tych kwasów na zdrowie ludzkie i dobrostan zwierząt został potwierdzony licznymi badaniami.

Podsumowując, przeprowadzone badania udowodniły, że hydrolizaty uzyskane z enzymatycznego procesu rozkładu biomasy makroalg, są dobrym substratem do produkcji biomasy i lipidów przez drożdże *Y. lipolytica*.

W przeprowadzonych badaniach byłem pomysłodawcą badań, zaplanowałem eksperymenty, przeprowadziłem hydrolizę makroalg, analizę HPLC, analizowałem dane oraz brałem udział w pisaniu manuskryptu.

### **Podsumowanie najważniejszych odkryć będących przedmiotem niniejszego osiągnięcia naukowego**

- 1) Profil kwasów tłuszczowych uzyskanych z biomasy drożdży *Y. lipolytica* może być kształtowany poprzez dobór odpowiedniego substratu
- 2) Glicerol odpadowy uzyskany z różnych gałęzi przemysłu stanowi doskonałe źródło węgla dla drożdży *Y. lipolytica* i może być stosowana do przygotowania podłoży mikrobiologicznych, bez wcześniejszego oczyszczania
- 3) Woda morską może być wykorzystywana do przygotowywania podłoża hodowlanego dla drożdży *Y. lipolytica*, nie ma negatywnego wpływu na kondycję komórek oraz ich zdolność do prowadzenia biosyntezy kwasów tłuszczowych
- 4) Nadekspersja genu *SCT1* u *Y. lipolytica*, powoduje 10-krotny wzrost ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w puli wszystkich kwasów tłuszczowych

- 5) Ko-ekspresja genów *DGAI* oraz *TKLI* ma największy wpływ na zwiększenie produkcji lipidów u *Y. lipolytica*
- 6) Hydrolizaty biomasy makroalg, stanowią odpowiednie, alternatywne źródło węgla dla drożdży *Y. lipolytica*

### **Pozostałe osiągnięcia naukowe:**

#### **Opis osiągnięcia naukowego II**

##### **„Badanie struktury i funkcji pętli powrotnych we wtórnych transporterach”**

Moim pierwszym osiągnięciem naukowym były wyniki badań, które uzyskałem podczas studiów doktoranckich pod opieką naukową dr Juke Lolkema, na Uniwersytecie w Groningen, w grupie Molecular Microbiology kierowanej przez Prof. Arnolda Driessena. Badania koncentrowały się na poszukiwaniu podobieństwa w budowie białek błonowych należących do dwóch rodzin tzw. wtórnych transporterów oraz jednocześnie na eksperymentalnym potwierdzeniu prawdziwości systemu klasyfikacji za pomocą profiliów hydrofobowości (baza MemGen). Poznane oraz udowodnione zostały nowe szczegóły na temat budowy dwu-domenowej tych białek oraz obecność, i kluczowym znaczeniu, pętli powrotnych w każdej z domen tych wtórnych transporterów, jak również na szczególnym znaczeniu motywów GGXG znajdujących się na wierzchołkach tych pętli. Zaproponowano model, w którym pętle powrotne w domenach N i C nakładają się na interfejsie domen w strukturze 3D, gdzie tworzą (część) ścieżki translokacji dla substratu i jonów. Mój wkład w badania polegał na przeprowadzeniu większości eksperymentów, pomocy przy części badań bioinformatycznych, w analizie danych oraz wraz z nabieraniem doświadczenia w planowaniu eksperymentów i przygotowywaniu manuskryptów. Byłem pomysłodawcą badań nad zamianą domen (ang. swap), które dostarczały informacji na temat ewolucji tego typu transporterów. Wyniki badań opublikowano w 6 artykułach naukowych, cztery artykuły w których byłem pierwszym autorem były częścią mojej pracy doktorskiej. Szczegółowy opis oraz lista publikacji znajduje się w kolejnej sekcji 5 (str. 17).

#### **Opis osiągnięcia naukowego III**

##### **„Doskonalenie procesu biosyntezy naturalnych substancji słodzących z surowców odpadowych przez drożdże *Y. lipolytica*”**

Po uzyskaniu stopnia doktora, byłem aktywnie zaangażowany w prace badawcze zespołów prowadzących badania naukowe, finansowane ze źródeł zewnętrznych, w których byłem wykonawcą. Kolejnym osiągnięciem naukowym jest uzyskanie wyników z badań w udoskonalaniu szlaku biosyntezy erytrytolu, czyli naturalnego słodzika, produkowanego przez drożdże *Y. lipolytica*. Projekt był finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (2015-2018). Celem tego projektu było zbadanie szlaku metabolicznego syntezy erytrytolu z glicerolu poprzez identyfikację kluczowych genów kodujących enzymy z tego szlaku. Mój wkład w projekt polegał na stworzeniu wektora integracyjnego do nadekspresji genów, zaplanowaniu i sklonowaniu genów do zwiększenia stopnia utylizacji glicerolu. Pomocy przy hodowlach bioreaktorowych oraz wspólnej z innymi pracownikami analizie wyników. Wyniki opublikowano w 7 artykułach naukowych, wyszczególnionych w kolejnej sekcji 5 (str. 20).

#### **Opis osiągnięcia naukowego IV**

##### **„Biodegradacja tworzyw sztucznych przez zmodyfikowane drożdże *Y. lipolytica*”**

Kolejnym tematem badawczym przy którym pracowałem było badanie możliwości degradacji tworzyw sztucznych przez zmodyfikowane genetycznie drożdże *Y. lipolytica*. Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki. Dzięki mojej znajomości biologii molekularnej drożdży *Y. lipolytica*, mój udział polegał na zaprojektowaniu i zamówieniu sztucznych genów, wklonowania ich do wektora i transformacja drożdży *Y. lipolytica*, oraz finalnie uzyskaniu szczepów drożdży o nowych właściwościach. Badania w tym temacie są niezwykle ważne ze względu na olbrzymi problem jaki stanowią tworzywa sztuczne na naszej planecie. Wyniki badań, w które byłem zaangażowany zostały opublikowane, a szczegóły projektu zostały opisane w następnej sekcji 5 (str. 21).

#### **Opis osiągnięcia naukowego V**

##### **„Wpływ nowo zsyntetyzowanych surfaktantów na mikroorganizmy”**

Kolejne badania, w które byłem zaangażowany, były prowadzone we współpracy z naukowcami z Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Badałem wpływ nowych, syntetycznych surfaktantów syntezowanych przez grupę badawczą z UE, na mikroorganizmy, w tym patogenne bakterie. Wyniki badań zostały opublikowane w dwóch artykułach naukowych, a dodatkowo, uzyskano dwa Patenty RP, w których jestem współautorem. W badaniach sprawdzałem bakteriobójczość nowych związków na bakterie z grupy bakterii Gram + (*Staphylococcus aureus* (ATCC 9538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus*

*hirae* (ATCC 10542) oraz Gram- (*Escherichia coli*, (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442); oraz drożdże *Candida albicans* (ATCC 10231). Badania wykazały, że nowe surfaktany mogą być wykorzystane jako dodatki w środkach do mycia, ponieważ oprócz właściwości myjących posiadają również właściwości bakteriobójcze, co jest istotne przy zachowaniu higieny. Szczegóły projektu opisano w sekcji poniżej w sekcji 5 (str. 22).

**5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

Swoje zawodowe doświadczenie międzynarodowe rozpocząłem w 2004 roku, dzięki stażowi zagranicznemu, które odbyłem jako student studiów magisterskich w ramach programu Erasmus. Zrealizowałem pięciomiesięczny projekt badawczy w Department of Molecular Microbiology, w Uniwersytecie Groningen, w Holandii, pod opieką dra. Eli van der Sluis. Podczas projektu badawczego zajmowałem się badaniem interakcji pomiędzy białkiem błonowym SecY i białkiem SecA bakterii *E.coli*, a dzięki realizowanej tam pracy, otrzymałem propozycję realizacji pracy doktorskiej pod opieką naukową dr Juke Lolkema w grupie Prof. Arnolda Driessena.

Podczas studiów doktoranckich, które rozpocząłem w 2005 roku, zająłem się badaniem budowy białek błonowych. Badania koncentrowały się na poszukiwaniu podobieństwa w budowie białek znajdujących się w dwóch rodzinach wtórnych transporterów oraz jednocześnie na eksperymentalnym potwierdzeniu prawdziwości systemu klasyfikacji za pomocą profilów hydrofobowości (baza MemGen). Prace były prowadzone na dwóch transporterach, CitS oraz GltS. Białko CitS jest zależnym od jonów sodu transporterem cytrynianu z bakterii *Klebsiella pneumoniae*, należącym do rodziny białek 2HCT (ang. 2-hydroxycarboxylate). Natomiast białko GltS z bakterii *Escherichia coli* transportuje w symporcie z dwoma jonami sodowymi glutaminian i należy do rodziny białek ESS (ang. glutamate-E sodium symporter). Białka te, oraz członkowie ich rodzin, nie są podobne do siebie na poziomie sekwencji aminokwasowej ale mają podobne profile hydrofobowości. Dlatego użyliśmy dobrze znanego modelu budowy białek z rodziny 2HCT, bazującego głównie na badaniach przeprowadzonych na białku CitS, do zbudowania modelu fałdowania białek z rodziny ESS. Dane uzyskane w czasie badań potwierdziły podobieństwo w strukturze



oraz w mechanizmie transportu pomiędzy transporterami z rodzin ESS i 2HCT. Poznane oraz udowodnione zostały nowe szczegóły na temat budowy dwu-domenowej tych białek oraz obecność, i kluczowym znaczeniu, pętli powrotnych w każdej z domen tych wtórnych transporterów, jak również na szczególnym znaczeniu motywów GGXG znajdujących się na wierzchołkach tych pętli. Zaproponowano model, w którym pętle powrotne w domenach N i C nakładają się na interfejsie domen w strukturze 3D, gdzie tworzą (część) ścieżki translokacji dla substratu i jonów. Rozpoczynając prace na danych bioinformatycznych uzyskanych za pomocą bazy danych MemGen oraz danych z wcześniejszych badań mogliśmy zbudować oraz udowodnić eksperymentalnie model budowy transportera GltS i tym samym wykazać że analiza profilów hydrofobowości rodzin białek błonowych jest potężnym i skutecznym narzędziem do studiowania struktur białek błonowych, zwłaszcza przy braku danych strukturalnych uzyskanych drogą krystalografii rentgenowskiej. Wyniki badań prowadzonych podczas studiów doktoranckich opublikowano w pracach:

1. **Dobrowolski A**, Sobczak-Elbourne I, Lolkema JS.(2007) Membrane topology prediction by hydropathy profile alignment: membrane topology of the Na(+)-glutamate transporter GltS. *Biochemistry*. 2007 Mar 6;46(9):2326-32
2. Lolkema JS, **Dobrowolski A**, Slotboom DJ. (2008) Evolution of antiparallel two-domain membrane proteins: tracing multiple gene duplication events in the DUF606 family. *Journal of molecular biology* 378 (3), 596-606
3. **Dobrowolski A**, Lolkema JS (2009) Functional importance of GGXG sequence motifs in putative reentrant loops of 2HCT and ESS transport proteins. *Biochemistry* 48 (31), 7448-7456
4. **Dobrowolski A**, Lolkema JS (2010) Cross-Linking of trans Reentrant Loops in the Na+-Citrate Transporter CitS of *Klebsiella pneumoniae*. (2010) *Biochemistry* 49 (21), 4509-4515
5. **Dobrowolski A**, Lolkema JS (2010) Evolution of antiparallel two-domain membrane proteins. Swapping domains in the glutamate transporter GltS. *Biochemistry*. 27;49(29):5972-4.
6. Krupnik T, **Dobrowolski A**, Lolkema JS.(2011) Cross-linking of dimeric CitS and GltS transport proteins. *Molecular Membrane Biology* 28 (5), 243-253.

Ponieważ wyniki badań były obiecujące, po zakończeniu studiów doktoranckich, pracowałem przy tym samym projekcie jako Post-Doc, przez kolejne 6 miesięcy. Wszystkie prace dotyczyły nauk podstawowych, a ich sumaryczne cytowanie wynosi 103.

Po uzyskaniu stopnia doktora (2012-):

Po ukończeniu studiów doktoranckich, w 2010 roku wróciłem do Polski, gdzie podjąłem pracę w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Już od samego początku byłem zainteresowany poszukiwaniem nowych tematów, w związku z tym zacząłem ubiegać się o finansowanie badań i w 2013 roku, uzyskałem finansowanie z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w ramach programu Iuventus Plus, na projekt (IP2012008972) pt.: „Doskonalenie procesu biosyntezy oleju mikrobiologicznego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* z surowców odpadowych” podczas, którego rozpocząłem pracę nad badaniem biosyntezy lipidów przez nie-konwencjonalne drożdże *Y. lipolytica*. Ponieważ podobne badania były już prowadzone przez naukowców w USA oraz grupy we Francji czy Belgii, skupiłem się na wykorzystaniu tanich, odnawialnych źródłach węgla, jakim są m.in. glicerol odpadowy- główny produkt uboczny przy produkcji biodiesla z rzepaku.

Wyniki badań przeprowadzone w ramach projektu zostały opublikowane w pracach:

1. **Dobrowolski A.**, Mitula P., Rymowicz W., Mirończuk, A.M. (2016) Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* (2016) 207 , 237-243,
2. Mirończuk AM, Rzechonek DA, Biegalska A, Rakicka M, **Dobrowolski A.** (2016) A novel strain of *Yarrowia lipolytica* as a platform for value-added product synthesis from glycerol. *Biotechnology for Biofuels*. Aug 30;9(1):180.

Ponieważ uzyskane wyniki były niezwykle obiecujące, skłoniło mnie to do ubiegania się o kolejne finansowanie moich badań, tym razem w ramach programu Sonata Bis 7, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. W 2018 rozpocząłem projekt (2017/26/E/NZ9/00975) pt: „Badanie wpływu alternatywnych źródeł węgla na proces biosyntezy lipidów w drożdżach *Yarrowia lipolytica*”, tym razem skupiając się nie tylko na odpadowym glicerolu ale przede wszystkim na wykorzystaniu biomasy makroalg jako surowcu dla zmodyfikowanych drożdży *Y. lipolytica*. Ponieważ w swoich badaniach przewidziałem wykorzystanie biologii syntetycznej, do umożliwienia utylizacji alginianu- jednego z głównych składników budujących ściany komórkowe makroalg, by móc przeprowadzić wszystkie modyfikacje genetyczne, już w **2017 odbyłem staż zagraniczny w grupie prof. Iriny Borodiny Yeast Metabolic Engineering na Duńskim Uniwersytecie**

**Technicznym (DTU).** Dwumiesięczny staż został finansowany z programu EMBO short-term fellowship, który udało mi się uzyskać. Podczas pobytu na DTU, poznawałem możliwości wykorzystania systemu CRISPR/Cas9 (wówczas nowość molekularna dla drożdży *Y. lipolytica*) oraz techniki EasyCloneYALI, którego współtwórcą była Prof. Borodina.

Wynik badań uzyskanych podczas realizacji projektu zostały przedstawione w publikacjach:

1. **Dobrowolski A.\***, Nawijn W., Mirończuk AM. (2022) Brown seaweed hydrolysate as a promising growth substrate for biomass and lipid synthesis of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Aug 17;10:944228.
2. Drzymała-Kapinos K, Mirończuk AM, **Dobrowolski A\***. Lipid production from lignocellulosic biomass using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain. *Microb Cell Fact.* 2022 Oct 28;21(1):226. doi: 10.1186/s12934-022-01951-w
3. **Dobrowolski A\*** Drzymała K. Rzechonek DA. Mitula P. Mirończuk AM. (2019) Lipid Production From Waste Materials in Seawater-Based Medium by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Microbiology* Mar 18;10:547,
4. **Dobrowolski A\***, Mirończuk AM. The influence of transketolase on lipid biosynthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microb Cell Fact.* 2020 Jul11;19(1):138.
5. **Dobrowolski A.\*** Drzymała K. Mitula P. Mirończuk AM.(2020) Production of tailor-made fatty acids from crude glycerol at low pH by *Yarrowia lipolytica*
6. Janek T\*, Mirończuk AM, Rymowicz W, **Dobrowolski A.** High-yield expression of extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica* and its interactions with lipopeptide biosurfactants: A biophysical approach. *Arch Biochem Biophys.* 2020 Aug 15;689:108475.

Poza prowadzeniem w/w badań byłem zaangażowany w projekty badawcze jako wykonawca. Ponieważ posiadam znajomość technik biologii molekularnej drożdży oraz umiejętność prowadzenia hodowli bioreaktorowych, byłem wykonawcą w projektach LIDER V (2015-2018) LIDER/010/207/L-5/13/NCBR/2014 „Doskonalenie procesu biosyntezy naturalnych substancji słodzących z surowców odpadowych przez drożdże *Yarrowia lipolytica*”, gdzie badania były skupione na identyfikacji szlaku metabolicznego syntezy erytrytolu z glicerolu. Moim jednym z istotniejszych wkładów w ten projekt, było stworzenie wektora wahadłowego, do integracji kasety ekspresyjnej w genomie drożdży i jest wykorzystywany

przez naszą grupę do tej pory. Wynik badań, w których uczestniczyłem w/w projekcie, przedstawiono w publikacjach:

1. Mirończuk AM, Rakicka M, Biegalska A, Rymowicz W, **Dobrowolski A\*** (2015) A two-stage fermentation process of erythritol production by yeast *Y. lipolytica* from molasses and glycerol. *Bioresour Technol.*198:445-55
2. Mirończuk AM, Rzechonek DA, Biegalska A, Rakicka M, **Dobrowolski A\***.(2016) A novel strain of *Yarrowia lipolytica* as a platform for value-added product synthesis from glycerol. *Biotechnol Biofuels.* Aug 30;9(1):180.
3. Mirończuk AM, Biegalska A., **Dobrowolski A.** (2017). Functional overexpression of genes involved in erythritol synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Biofuels*, Mar 24;10:77
4. Janek T, **Dobrowolski A**, Biegalska A, Mirończuk AM (2017) Characterization of erythrose reductase from *Yarrowia lipolytica* and its influence on erythritol synthesis. *Microb Cell Fact.* 2017 Jul 11;16(1):118
5. Rakicka M, Biegalska A, Rymowicz W, **Dobrowolski A**, Mirończuk AM. (2017) Polyol production from waste materials by genetically modified *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol.* 2017 Nov;243:393-399
6. Rzechonek DA, **Dobrowolski A**, Rymowicz W, Mirończuk AM (2018) Recent advances in biological production of erythritol.. *Crit Rev Biotechnol.* 38(4):620-633
7. . Mirończuk AM, Biegalska A, Zugaj K, Rzechonek DA, **Dobrowolski A.** (2018) A Role of a Newly Identified Isomerase From *Yarrowia lipolytica* in Erythritol Catabolism *Front Microbiol.* 30;9:1122

Projekt OPUS14, w którym jestem wykonawcą dotyczył badań nad rozkładem tworzyw sztucznych przez zmodyfikowane drożdże *Y. lipolytica*. Poprzez heterologiczną ekspresję esteraz (kutynaz oraz PETazę) w drożdżach *Y. lipolytica*, ustalono warunki do rozkładu poli(tereftalanu etylenu) (PET). W przedstawionych badaniach skonstruowałem szczep *Y. lipolytica* pozbawiony dwóch sekrecyjnych proteaz, oraz klonowałem syntetyczne geny (kutynazy oraz PETaz) do przeprowadzenia nadekspresji. Wynik badań, w których byłem zaangażowany opublikowano w pracy:

1. Kosiorowska KE, Biniarz P, **Dobrowolski A**, Leluk K, Mirończuk AM. (2022) Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for poly(ethylene terephthalate) degradation. *Sci Total Environ.* 20;831:154841.

Kolejny projekt, w którym obecnie jestem wykonawcą to projekt OPUS16 UMO-2018/31/B/NZ9/01025, „Molekularny mechanizm asymilacji polioli u drożdży *Yarrowia lipolytica*” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, w którym podjęto się zbadania mechanizmu utylizacji erytrytolu oraz innych polioli przez komórki eukariotyczne, na modelu drożdżowym. Badania w których uczestniczyłem, dotyczyły prześledzenia ostatniego kroku syntezy oraz utylizacji erytrytolu. Brałem udział w planowaniu eksperymentów, oraz przeprowadziłem hodowlę bioreaktorowe, a wynik badań, zostały opublikowane:

1. Szczepańczyk M, Rzechonek DA, **Dobrowolski A**, Mirończuk AM. (2021) The Overexpression of *YALIOB07117g* Results in Enhanced Erythritol Synthesis from Glycerol by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Molecules*. 13;26(24):7549.

W projekcie skupiono się jeszcze na szlaku utylizacji mannitolu, a ponieważ jest to częściowo powiązane z zadaniami w projekcie, który prowadzę (Sonata Bis7), przeprowadziliśmy wspólne badania, które obecnie znajdują się na etapie uzyskiwania zgłoszenia patentowego. Odkryliśmy gen u drożdży *Y. lipolytica*, dzięki badaniom RNAseq, którego delecja znacząco przyspiesza zdolność do utylizacji mannitolu, a ponieważ jest to główny polioli, który znajduje się w biomacie brązowych makroalg, przeprowadziliśmy hodowlę zmodyfikowanych drożdży na wypłukanym z biomasym alg mannitolu (nie trzeba stosować hydrolizy chemiczne, termicznej lub enzymatycznej). Tempo wzrost drożdży, uzyskana biomasa oraz synteza lipidów jest na wysokim poziomie. Prace są nadal prowadzone aby zoptymalizować proces syntezy lipidów.

Moja współpraca z innymi badaczami nie ograniczała się tylko do jednej Jednostki. W 2016 roku rozpocząłem współpracę z dr hab. inż. Darią Wieczorek z Katedry Technologii i Analizy Instrumentalnej, Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Celem badań był sprawdzenie wpływu nowo zsyntetyzowanych związków na mikroorganizmy. W badaniach sprawdzałem bakteriobójczość nowych związków na bakterie z grupy bakterii Gram + (*Staphylococcus aureus* (ATCC 9538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus hirae* (ATCC 10542) oraz Gram- (*Escherichia coli*, (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442); oraz drożdże *Candida albicans* (ATCC 10231). Badania wykazały, że nowe surfaktany mogą być wykorzystane jako dodatki w środkach do mycia. Wyniki badań zostały opatentowane, (uzyskano dwa patenty) a wyniki badań zostały przedstawione w pracach:

1. Wieczorek D, **Dobrowolski A**, Staszak K, Kwaśniewska D, Dubyk P (2017) Synthesis, Surface and Antimicrobial Activity of Piperidine-Based Sulfobetaines.. J Surfactants Deterg. 20(1):151-158.
2. Klimaszewska E., Wieczorek D, Zięba M, Małyś A, Staszak K, Kwaśniewska D, Adamczyk K, Drzymala K, **Dobrowolski A**. (2018) Effect of N-dodecyl-N-(propylpiperydinium-3-sulfonate) on Usage Properties of Liquid Soaps for Sensitive Skin. Tenside Surfactants Detergents 55(6):439-446

### Plany badawcze:

Ponieważ praca naukowca, to nieustanne poszukiwanie nowych wyzwań, w najbliższej przyszłości zamierzam zająć się badaniem ko-hodowli mikroorganizmów, czyli wpływu współistnienia i współpracy mikroorganizmów we wspólnych hodowlach. Obecnie na świecie obserwuje się trend badania i prowadzenia ko-hodowli mikroorganizmów z różnych grup np. mieszanina Gram+ i Gram- bakterii, lub mieszanina bakterii czy drożdży z mikroalgami. Prowadzenie takich hodowli ma na celu zbadanie wpływu wzajemnej koegzystencji na fizjologię, możliwości wymiany substancji odżywczych, czy też synergicznego działania przez np. wspólne wydzielanie enzymów, które działając razem umożliwiają np. hydrolizę tworzyw sztucznych lub utylizację trudnych substratów. Poznanie fizjologii mikroorganizmów, umożliwi przejścia do badań aplikacyjnych, a w końcu do wdrożenia wyników badań do przemysłu, co wydaje mi się być niezwykle ciekawe oraz potrzebne, ponieważ może to przynieść bezpośrednią korzyść ludzkości. W tym temacie nawiązałem współpracę z grupami z Katolickiego Uniwersytetu Leuven (BioTeC+ Chemical & Biochemical Process), Belgia, oraz grupy RISE-Processum ze Szwecji. Wspólnie złożyliśmy projekt w konkursie WEAVE-UNISONO pt.: „Algae-Yeast co-culturing for enhanced Sustainable bioproduction”, który jest w procesie oceny. Projekt zakłada badanie ko-kultur *Y.lipolytica* i mikroalg z gatunku *Chlorella vulgaris*, wpływu na dynamikę hodowli i syntezy lipidów. W projekcie wykorzystane zostanie metody modelowania matematycznego na podstawie danych z hodowli.

Kolejnym polem badań jakim planuję się zająć jest zgłębienie mikrobiologicznej elektrosyntezy (MES) do bio-elektro recyklingu CO<sub>2</sub>, w celu produkcji związków o wartości dodanej takich jak biopaliwa lub związki budujące polimery. W tym celu udaję się od października 2023 roku na roczny staż naukowy do Uniwersytet w Gironie, Hiszpania, do grup: (i) The Laboratory of Chemical and Environmental Engineering (LEQUIA), w której badania prowadzi Prof. Sebastia Puig oraz (ii) Molecular Microbial Ecology (MME) w

Institute of Aquatic Ecology gdzie liderem jest prof. Lluís Bañeras. Złożyłem projekt pt.: „Bio-electro recycling of CO<sub>2</sub> into biofuels in two steps process with use of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*” do NAWA w konkursie Bekker.

Nadal planuje badać możliwość produkcji biopaliw z lipidów mikrobiologicznych syntezowanych przez *Y. lipolytica* (lub inne mikroorganizmy) z surowców odnawialnych takich jak biomasa roślin wodnych (makroalg) lub lądowych (odpady z przemysłu rolniczego lub drzewnego). Tego typu badania są dla mnie niezwykle interesujące ze względu na wpisywanie się w cele zrównoważonego rozwoju.

## **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.**

### **Osiągnięcia dydaktyczne:**

Od początku swojej pracy naukowej byłem zaangażowany w pracę dydaktyczną. Już podczas studiów doktoranckich w Holandii, sprawowałem opiekę naukową nad studentami (Master Students) przy projektach badawczych lub kursu mikrobiologii. Od momentu rozpoczęcia pracy w Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, prowadziłem zajęcia laboratoryjne (wymienione poniżej) a od 2014 roku prowadziłem wykład „Podstawy Biologii Komórki”, dla I-go roku studiów kierunku Biotechnologia. Byłem również zaangażowany w pomoc naukową doktorantek oraz sprawowałem opiekę naukową nad magistrantami oraz inżynierantami. Każdego roku miałem pod opieką studentów zagranicznych z programu Erasmus, dla których prowadziłem zajęcia laboratoryjne Molecular Biology.

### **Promotor pomocniczy pracy doktorskiej:**

**2022** Badanie zdolności mikroorganizmów do rozkładu tworzyw sztucznych, Aneta Urbanek, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności 2022, Data obrony: 07-06-2022,

### **Promotor prac magisterskich:**

**2021** Wykorzystanie biomasy alg jako substrat dla drożdży *Yarrowia lipolytica*  
Badanie wpływu poziomu natlenienia hodowli na proces biosyntezy lipidów przez drożdże *Yarrowia lipolytica*

**2020** Mikrobiologiczna produkcja waniliny z kwasu ferulowego z zastosowaniem technologii CRISPR/Cas9  
Produkcja lipidów przez drożdże *Yarrowia lipolytica* z wykorzystaniem hydrolizatów uzyskanych z wycisków lnu, rzepaku i wiesiołka

- 2019** Brown seaweeds as a source of functional foods and as a feedstock for oleaginous yeast
- 2018** Konstrukcja szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* produkujących wanilinę z kwasu ferulowego.  
Wpływ nadekspresji genów ze szlaku pentozofosforanowego na syntezę lipidów w drożdżach *Yarrowia lipolytica*
- 2017** Produkcja lipidów przez drożdże *Yarrowia lipolytica* na podłożach przygotowanych na bazie wody morskiej  
Produkcja białka mirakuliny w drożdżach *Yarrowia lipolytica*
- 2016** Przeciwdrobnoustrojowe działanie nowo zsyntetyzowanych sulfobetain  
Zwiększenie produkcji SCO z glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*
- 2015** Zwiększenie konsumpcji glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*
- 2014** Doskonalenie biosyntezy oleju mikrobiologicznego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* z glicerolu odpadowego

Łącznie:13

#### **Promotor Prac inżynierskich:**

- 2020** Producenci olejów mikrobiologicznych – przegląd mikroorganizmów i możliwości ich wykorzystania  
Wykorzystanie biomasy wodorostów jako surowca do produkcji biopaliw
- 2019** Projekt wykorzystania systemu CRISPR/Cas9 do edycji genomu u drożdży *Yarrowia lipolytica* w celu produkcji resweratrolu  
Projekt syntezy kannabidiolu w komórkach drożdży *Yarrowia lipolytica* z zastosowaniem systemu CRISPR/Cas9
- 2018** Projekt wykorzystania odpadów lignocelulozowych jako odnawialne źródło węgla przez drożdże *Yarrowia lipolytica*
- 2017** Białka o właściwościach słodzących  
Biologia syntetyczna, jako nowa dziedzina biotechnologii
- 2016** Mirakulina – właściwości, zastosowanie oraz możliwość produkcji w drożdżach *Yarrowia lipolytica*.  
Możliwość wykorzystania surowców odpadowych-melasy, serwatki, glicerolu- do hodowli mikroorganizmów, ze szczególnym uwzględnieniem drożdży
- 2015** Wykorzystanie lipidów mikrobiologicznych do produkcji substancji wartościowych  
Produkcja bioplastiku przez mikroorganizmy



**2014** Perspektywy produkcji i wykorzystania olejów mikrobiologicznych  
Techniczne aspekty produkcji olejów mikrobiologicznych przez drożdże

Łącznie:13

**Opieka naukowa nad studentami realizujący projekt badawczy (Erasmus)**

**2018/2019** Enhanced glycerol utilization by overexpression of putative glycerol transporters in non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*

Recenzent pracy inżynierskich: 17

Recenzent prac magisterskich: 20

Prowadzenie zajęć dydaktycznych na studiach I-go stopnia (inżynierskie) od 2011:

- Biochemia
- Mikrobiologia
- Biologia Molekularna
- Molecular Biology (dla studentów programu Erasmus)
- Inżynieria Genetyczna
- Podstawy Genetyki

Wykłady

- Podstawy Biologii Komórki (1 rok studiów inżynierskich kierunku Biotechnologia)

**Osiągnięcia Organizacyjne:**

**2011-2019** Członek komisji rekrutacyjnej na kierunek studiów Biotechnologia

**2017** Organizacja konferencji 13<sup>th</sup> International Conference on Renewable Resources and Bio-refineries (RRB), Członek Komitetu Organizacyjnego

**2017** Przewodniczący sesji Single Cell Oil Production na konferencji RRB

**2019** Członek Komitetu Naukowego, 15<sup>th</sup> International Conference on Renewable Resources and Bio-refineries (RRB), Tuluza, Francja. Przewodniczący sesji Valorization of biomass waste streams na konferencji RRB, Tuluza, Francja

**2022** Współtwórca Pracowni dla Zrównoważonego Biorozwoju w Instytucie Biologii Środowiskowej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Od października 2022 roku wraz ze współpracownikami stworzyliśmy Pracownię dla Zrównoważonego Biorozwoju w Instytucie Biologii Środowiskowej, UPWr. W związku z tym byłem zaangażowany w wiele prac organizacyjnych związanych z tworzeniem nowego laboratorium. Prace dotyczyły prac remontowych i przygotowaniu pomieszczeń pod

laboratoria, zamawianie aparatury badawczej, przenoszenie aparatury zakupionej w ramach prowadzonych projektów oraz jednocześnie prowadzenie zadań badawczych, przewidzianych w projekcie. Prace organizacyjne są prowadzone prawie od roku, ponieważ nasza Pracownia otrzymała miejsce w nowo otwartym budynku Centrum Biologii Stosowanej oraz Innowacyjnych Technologii Produkcji Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego, którego ukończenie jest w toku. Laboratorium jest nowe, więc całkowicie puste, co spowodowało, że wyposażenie go zajęło dużo czasu, oraz pracy grupy ludzi. Jednakże nowe laboratorium stanowi doskonale miejsce na rozpoczęcie nowych wyzwań naukowych, które zamierzam podjąć.

### **Osiągnięcia popularyzujących naukę :**

- 1) Wystąpienie w Akademickim Radio Luz w 2017 dotyczące promowania i informowaniu o konieczności produkcji biodiesla z olejów mikrobiologicznych.
- 2) Wywiad w Gazecie Wyborczej po uzyskaniu finansowania na badania z Narodowego Centrum Nauki, w ramach programu Sonata Bis7 <https://wroclaw.wyborcza.pl/wroclaw/7,35771,23056554,biopaliwo-z-drozdzy-i-alg-naukowiec-z-universytetu-przyrodniczego.html> promujący charakter planowanych badań.

### **7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**

- |             |  |
|-------------|--|
| <b>2013</b> | Dwumiesięczne szkolenie Top500 Innovators (10-12.2013), Uniwersytet Stanforda, USA, finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, |
| <b>2013</b> | FEMS Young Scientist Meeting Grant (YSMG)  |
| <b>2015</b> | FEMS Young Scientist Meeting Grant (YSMG)  |
| <b>2017</b> | Uzyskanie stypendium na staż zagraniczny, short-term EMBO fellowship   |
| <b>2018</b> | Junior Researcher Grant - Metabolic Engineering  |
| <b>2022</b> | Współorganizowanie nowego grupy badawczej: Pracowni dla Zrównoważonego Biorozwoju w Instytucie Biologii Środowiskowej, UPWr                      |

W latach 2015-2022 zdobywca nagród Rektora UPWr: naukowych zespołowych (6), naukowych indywidualnych (3) oraz organizacyjnych (1).

Przerwy w pracy:

**10.2019-01.2020**      urlop rodzicielski

**01.2022-05.2022**      urlop rodzicielski



.....  
(podpis wnioskodawcy)