



Wrocław, 07.11.2022

dr hab. Donata Wawrzycka  
Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki  
Wydział Nauk Biologicznych  
Uniwersytet Wrocławski

### RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Ewy Kosiorowskiej**  
zatytułowanej „**Badanie zdolności fizjologicznych drożdży *Yarrowia lipolytica* do rozkładu tworzyw sztucznych**”, wykonanej pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Marii Mirończuk prof. uczelni, w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Syntetyczne polimery tzw. tworzywa sztuczne ze względu na niskie koszty produkcji, atrakcyjność form, wytrzymałość, elastyczność itd. szybko stały się jednym z bardziej pożądanych materiałów w przemyśle. Zwiększająca się produkcja i powszechne użycie materiałów z polipropylenu (PP, np. strzykawki, naczynia laboratoryjne), polistyrenu (PS, np. styropian), polietylenu (PE, np. folia), politereftalan etylenu (PET, np. butelki), bez jednoczesnego rozwoju systemów segregacji, odzysku i rozkładu, przełożyła się na postępujące zanieczyszczenie środowiska. Dodatkowym problemem jest uwalnianie w wyniku rozkładu tworzyw sztucznych mikro- i nanoplastik, którego obecność wykazano nie tylko na obszarach zamieszkałych przez człowieka, ale również w morzach i oceanach, na obszarach podbiegunowych, a nawet w obrębie Rowu Marjańskiego. Dostarczany wraz z pożywieniem mikroplastik stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia zwierząt i człowieka. Najnowsze doniesienia wskazują na obecność mikroplastiku we krwi ludzkiej i w mleku matki. Rozwiązaniem problemu zanieczyszczeń tworzywami sztucznymi upatruje się w zwiększeniu odzysku i recyklingu ale również w biodegradacji. Zidentyfikowano już enzymy, które z powodzeniem rozkładają syntetyczne polimery na monomery. Obecnym wyzwaniem jest modyfikacja tych enzymów w taki sposób, by biologiczny rozpad był kontrolowany, wydajny i nie wymagał trudnych do osiągnięcia warunków. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska wpisuje się w tą aktualną i niezmiernie ważną tematykę badawczą, stanowi bowiem próbę wykorzystania narzędzi inżynierii genetycznej do przystosowania drożdży *Yarrowia lipolytica* do ekspresji enzymów (kutynazy i PETazy) zdolnych do rozkładu politereftalan etylenu (PET).

Praca doktorska mgr Katarzyny Kosiorowskiej to cykl publikacji, który został opracowany i przedłożony mi do recenzji jako rozprawa doktorska. Praca została napisana w języku polskim, stylem naukowym. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich z dyscypliny nauk biologicznych, przygotowanych w formie cyklu publikacji naukowych. Opracowanie do cyklu składa się z 62 stron, zawiera 7 rozdziałów i materiały uzupełniające (dorobek naukowy; informacje o finansowaniu; streszczenia w języku polskim i angielskim; załączniki). W pracy umieszczono 4 publikacje stanowiące cykl, w trzech z nich mgr Katarzyna Kosiorowska jest



pierwszym autorem (badania oryginalne), w jednej głównym współautorem (praca przeglądowa). Prace zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w aktualnym wykazie czasopism MNIŚW, charakteryzujących się wysokim współczynnikiem oddziaływań. Z informacji o źródłach finansowania badań Doktorantki wynika, że badania zaprezentowane w rozprawie doktorskiej zostały wykonane w ramach projektu OPUS14 (UMO-2017/27/B/NZ9/02218, kierownik: dr hab. Aleksandra Mirończuk), w którym Doktorantka była wykonawcą.

Rozprawę otwiera *Wstęp* wprowadzający w tematykę projektu, w którym Doktorantka opisała problem zanieczyszczenia środowiska tworzywami sztucznymi, wskazała na niebezpieczeństwo skażenia mikroplastikiem, przedstawiła enzymy mające potencjał degradacyjny tworzyw sztucznych i opisała cykl degradacji enzymatycznej PET. Całość przedstawiono w sposób okrojony. Choć jest to tylko opracowanie do cyklu publikacji i wiele dodatkowych informacji wprowadzających znajduje się w odpowiednich, dołączonych artykułach, brakuje dokładnych informacji o wpływie mikroplastiku na organizm człowieka/zwierząt. Doktorantka wskazuje np. wpływ na indukcję odpowiedzi immunologicznej lub na ekspresję genów, nie analizując podstaw/mechanizmu tego zjawiska. Analiza zmian ekspresji genów pod wpływem ekspozycji na mikroplastik może pomóc badaczowi w doborze odpowiednich szczepów (mutantów) w badaniach. Nie podano informacji o już znanych modyfikacjach genetycznych wpływających na zwiększenie naturalnych zdolności mikroorganizmów do rozkładu tworzyw sztucznych, choć informacje te zostały w szerszym zakresie opisane w jednej z dołączonych publikacji. W opracowaniu brak rycin i/lub tabel, które zwykle ułatwiają czytelnikowi analizę tekstu. Dodanie do *Wstępu* Ryc.2 z pracy przeglądowej (P1) przedstawiającej schemat biodegradacji PET z uwzględnieniem enzymów biorących udział w tym procesie, wzbogaciłoby opracowanie. Ponieważ *Wstęp* ma być wprowadzeniem do danych ze wszystkich publikacji cyklu, a podstawą badań Doktorantki jest szczep drożdży *Yarrowia lipolytica*, brakuje mi rozwinięcia uzasadnienia wyboru tego organizmu, zwłaszcza w kontekście heterologicznej ekspresji enzymów z *Trichoderma reesei*. Szczepy *T. reesei* są z powodzeniem używane w biotechnologii. Cel pracy został jasno określony i w pełni odpowiada tematowi rozprawy. Doktorantka prawidłowo wyznaczyła cele szczegółowe.

Kolejny rozdział (*Materiały i metody*) Doktorantka poświęciła na charakterystykę materiałów i metod użytych w trakcie przygotowywania rozprawy. Pochwalam dołączenie tego rozdziału do rozprawy, bo chociaż w artykułach badawczych zwykle jest rozdział *Materials and methods/Experimental procedures* wydawca często narzuca ograniczenia informacji. Doktorantka przytoczyła istotne dla opracowania dane dotyczące technik eksperymentalnych i materiałów użytych w pracy laboratoryjnej. Mam kilka niewielkich uwag do tej części opracowania. W tabeli 1 błędnie według mnie nazwano kolumnę „szczepy” – ponieważ wpisano tam jeden szczep *E. coli*, pozostałe informacje dotyczą plazmidów. Zauważyłam nieścisłość w podanych warunkach hodowli – podłoże z 2% czy 5% glukozą? Ilość dodawanego mikroplastiku podana jest w gramach, lecz nie wskazano objętości hodowli- lepiej określać stężenie procentowe. Jako niefortunne uważam użycie sformułowania „Kit-u do izolacji”, powinno być „zestawu do izolacji”. Określenie „metodę rekombinacji z rDNA” sugeruje rekombinację z rybosomalnym DNA. Nie podano stężenia użytego oleju. Uwagi te mają charakter edytorski i nie wpływają na ocenę pracy.

Rozdział dotyczący wyników pracy (*Komentarze do publikacji*) został podzielony na 4 podrozdziały, każdy z nich stanowi rekapitulację najważniejszych osiągnięć opisanych w



poszczególnych publikacjach cyklu. Włączone do cyklu 4 artykuły zostały opublikowane w wysoko ocenianych czasopismach (*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology; International Biodeterioration and Biodegradation; Science of Total Environment*), a ich sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact factor, IF) jest imponujący i wynosi 32,4. Wszystkie te prace poddane zostały wnikliwej ocenie niezależnych, międzynarodowych ekspertów – to samo w sobie świadczy o wysokiej jakości badań i zdecydowanie ułatwia mi ocenę merytoryczną rozprawy.

Pierwsza z załączonych w ramach cyklu publikacji praca (P1), jest to praca przeglądowa (*Front. Bioeng. Biotechnol; 2021r*), której Doktorantka jest jednym z dwóch głównych autorów. W doskonały, wnikliwy i analityczny sposób przedstawia dotychczasowy stan wiedzy na temat biodegradacji poli(tereftalan etylenu). Praca wzbogacona jest bardzo dobrze skonstruowanymi rycinami i tabelami. Dogłębnej i krytycznej analizie poddano wpływ notowanych dotychczas modyfikacji na aktywność enzymów i efektywność rozkładu PET. Analizie poddano PETazy i MHETazy, jak również chimeryczne enzymy powstałe np. przez fuzję kutynazy i lipazy. Opracowanie wskazuje na bardzo dogłębne zaznajomienie się Doktorantki z tematyką badań i umiejętność krytycznej analizy opracowań naukowych. Taka analiza jest bardzo dobrą podstawą do trafnego wyboru źródła materiału genetycznego do klonowania i stanowi płynne wprowadzenie do przedstawionych wyników badań Doktorantki.

Trzy kolejne dołączone w ramach rozprawy doktorskiej prace (P2; P3; P4) opisują wyniki badań eksperymentalnych. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Swoje badania Doktorantka rozpoczęła od konstrukcji zmodyfikowanych genetycznie szczepów *Yarrowia lipolytica* dostosowanych do heterologicznej ekspresji genów kutynazy z *Fusarium solani* (CUT\_Fs) i *Trichoderma reesei* (CUT\_Th). Zdolność genetycznie modyfikowanych szczepów do rozkładu tworzyw sztucznych oceniano przy użyciu poli(e-kaprolaktanu) (PCL) jako tworzywa modelowego (P2; *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2021r). Heterologiczna ekspresja obcych genów kutynaz nie wpłynęła na dynamikę wzrostu *Yarrowia lipolytica*. Ilość powstałego transkryptu obu genów oceniana metodą qRT-PCR wskazuje na wyższy poziom mRNA genu CUT\_Th niż CUT\_Fs, chociaż zastosowano ten sam promotor. Nasuwa się pytanie czy ta różnica wynika np. ze zmniejszonej stabilności transkryptu CUT\_Fs? Zbadano również wpływ nadprodukcji natywnej lipazy (Lip2) z *Y. lipolytica* na aktywność enzymatyczną obu kutynaz, powodowało to jednak zmniejszenie poziomu transkryptów koekspresjonowanych genów. Warto sprawdzić, czy efekt ten utrzymuje się w przypadku zastosowania różnych promotorów a nie wynika z mechanizmów wewnątrzkomórkowych, kontrolujących stabilność mRNA. Wysoka ekspresja genu nie zawsze przekłada się na wysoki poziom produktu białkowego, czy możliwe jest sprawdzenie ilości/jakości białka kutynaz np. z wykorzystaniem przeciwciał? Analizy aktywności enzymatycznej supernatantów wskazały na zdecydowanie zwiększoną efektywność degradacji PCL w przypadku nadekspresji CUT-Fs, bez zauważalnego zwiększenia wydajności procesu w przypadku jednoczesnej nadprodukcji lipazy Lip2. Analogiczne wyniki otrzymano również w badaniach degradacji folii PCL bezpośrednio w hodowli mikroorganizmów. W oparciu o uzyskane dane szczep produkujący CUT\_Fs wykorzystano do badań nad rozkładem docelowego substratu - poli(tereftalanu etylenu) (PET). Wyniki tych badań przedstawiono w kolejnej dołączonej do cyklu pracy (P3; *Sci. Total Environ.*, 2022r). Zaobserwowano, że zmodyfikowane szczepy *Y. lipolytica* produkujące CUT\_Fs z powodzeniem mogą być wykorzystane do biodegradacji PET. Ilość TPA, produktu degradacji PET, znacząco rosła w czasie trwania hodowli, z maksimum uwalniania po ~240h kultywacji. Wydajność tego procesu



zwiększono w przypadku zastosowania hodowli w dużych objętościach, w bioreaktorach. Co ważne, zaobserwowano iż skala objętości hodowli wpływa na stosunek uwalnianych TPA i MHET – co może być wykorzystane jako czynnik faworyzujący pożądany produkt rozpadu. Obiecujące wyniki otrzymano również w analizach degradacji folii PET w bezpośredniej hodowli drożdżowej, gdzie po miesiącu zaobserwowano ubytki, co wskazuje na możliwość zastosowania szczepu do bezpośredniej hydrolizy polimeru podczas fermentacji w niewymagających warunkach (standardowe podłoże i temp. 28st).

Najciekawsze według mnie wyniki dotyczą użycia *Y. lipolytica* do heterologicznej ekspresji PETazy z bakterii *Idonellas sakaiensis*, które zostały przedstawione w czwartej publikacji (P4, *Sci.Total Environ.*, 2022r). Pochodzący z bakterii *I. sakaiensis* enzym uważany jest za jeden z najaktywniejszych obecnie systemów hydrolizy PET do monomerów MHET, minusem jest konieczność podgrzewania do 75st C. Doktorantce z sukcesem udało się stworzyć modyfikowany genetycznie szczep *Y. lipolytica* produkujący PETazę z *I. sakaiensis* (PET\_Is). Ekspresja obcego, bakteryjnego białka nie zaburzała wzrostu komórek drożdży, a poziom transkryptu genu PETazy był zadowalający. W serii dobrze zaprojektowanych eksperymentów badano zarówno aktywność produkowanej przez *Y. lipolytica* PETazy jak i podjęto próby optymalizacji warunków reakcji (dodatek aktywatorów np. soli, oliwy z oliwek; zwiększanie objętości hodowli). Najlepszą stymulację rozkładu PET zaobserwowano po dodaniu oliwy z oliwek do hodowli prowadzonej w kolbach. Miesięczna inkubacja folii PET w hodowli *Y. lipolytica* produkującej PET\_Is skutkowała znacznymi uszkodzeniami na powierzchni materiału, których wzór zmieniał się w obecności oliwy z oliwek. Otrzymane przez Doktorantkę wyniki wskazują na możliwość zastosowania heterologicznej ekspresji hydrolaz PET w *Y. lipolytica* jako nowego systemu degradacji tworzyw sztucznych w niskiej temperaturze, w krótkim czasie, bez wstępnej obróbki materiału plastikowego, z zastosowaniem tanich podłoży mikrobiologicznych. Nasuwają się w tym miejscu kolejne pytania badawcze. W literaturze są informacje o substytucjach w sekwencji aminokwasowej PETazy *I. sakaiensis* zwiększających efektywność procesu rozkładu PET (np. doi.org/10.1038/s41467-019-09326-3), czy wprowadzenie tych zmian zwiększy aktywność enzymu produkowanego w *Y. lipolytica*? Analogiczne pytanie odnosi się do potencjalnych modyfikacji sekwencji aminokwasowej CUT-FS. Zaprezentowana w P2 analiza porównawcza sekwencji enzymów z kilkunastu organizmów pozwoliła na identyfikację 5-aminokwasowego wysoce konserwatywnego regionu, czy można te wyniki wykorzystać do zaprojektowania miejsc substytucji? Wyniki najnowszych badań z wykorzystaniem sztucznej inteligencji wskazują na zaprojektowanie sekwencji syntetycznej FAST-PETazy (ang. FAST-PETase: functional, active, stable and tolerant PETase), enzymu który zdolny jest do rozkładu PET w zaledwie kilka godzin w temp. 50 C (Lu, H., Diaz, D.J., Czarnecki, N.J. *et al.* Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature* 604, 662–667 (2022)). Kuszące jest sprawdzenie czy produkcja tej formy PETazy w *Y. lipolytica* pozwoli na zachowanie wysokiej aktywności enzymu z jednoczesnym utrzymaniem niskiej temperatury reakcji. Z uwag ogólnych, w wielu miejscach opracowania powtórzone jest sformułowanie, najprawdopodobniej wynikające ze skrótu myślowego, o „zewnątrzkomórkowej produkcji” enzymu – enzym produkowany jest w komórce i ewentualnie podlega sekrecji.

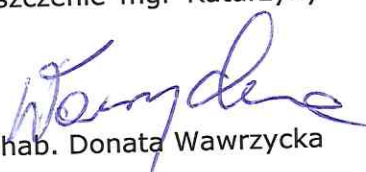
Na zakończenie opracowania podsumowano wyniki publikacji (Podsumowanie) i w osobnym rozdziale „Wnioski” przedstawiono najważniejsze wnioski wynikające z prowadzonych przez Doktorantkę badań. Jako załączniki do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów, w których wykazują swoją rolę w powstaniu poszczególnych publikacji cyklu. Wszystkie

oświadczenia wskazują na istotną rolę Pani Katarzyny Kosiorowskiej w wykonaniu eksperymentów, doborze metod, przygotowaniu i edycji manuskryptu.

Jak wcześniej wspomniałam, prace opublikowane zostały w doskonałych czasopismach i przed publikacją poddane wnikliwej ocenie ekspertów, zarówno w kontekście prawidłowego doboru metod badawczych jak i krytycznej oceny przedstawionych wyników. Jest to dowód na wysoki poziom wykonanych badań, ich duże znaczenie dla rozwoju podstawowych dziedzin nauki oraz możliwe praktyczne wykorzystanie uzyskanej wiedzy.

Zgodnie z informacjami zawartymi w rozprawie doktorskiej wyniki badań Pani Katarzyny Kosiorowskiej prezentowane były na 8 międzynarodowych konferencjach, przy czym p. Katarzyna dwukrotnie została zaproszona do ustnej prezentacji wyników. W czasie trwania studiów doktorskich mgr Katarzyna Kosiorowska odbyła cztery krótkoterminowe staże naukowe/szkoleniowe: w Imperial College London, dwukrotnie w CIEMAT w Hiszpanii i w Technical University of Denmark. Poza czterema publikacjami stanowiącymi podstawę tej rozprawy doktorskiej mgr Katarzyna Kosiorowska jest współautorem kolejnych trzech publikacji. Pani Katarzyna Kosiorowska była wykonawcą w grantach OPUS 14 (UMO-2017/27/B/NZ9/02218), stypendystą projektu NCN SONATA BIS 7 (UMO-2017/26/E/NZ9/00975), a staże zagraniczne Doktorantki finansowane były z projektu PROM, NAWA, (PPI/PRO/2019/1/0004/U/001) i z projektu INCREaSE, NAWA. Widać, że Pani mgr Katarzyna Kosiorowska jest w pełni ukształtowanym młodym badaczem, który posiada szeroką wiedzę i umiejętności z zakresu biologii molekularnej.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018r *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2018, poz.1668 ze zm.) stawiane rozprawom doktorskim i składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Katarzyny Kosiorowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
dr hab. Donata Wawrzycka

