Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Dr hab. Maciej Guzik, Profesor IKiFP PAN

Kraków, 4/10/2022

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera

Polskiej Akademii Nauk

Niezapominajek 8

30-239 Kraków

Polska

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Szacherskiej pt.

"Short and medium chain fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production"

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została zrealizowana pod kierunkiem dr hab. inż. Justyny Możejko-Ciesielskiej, prof. UWM oraz prof. dr hab. inż. Piotra Oleśkowicza-Popiela, w Katedrze Mikrobiologii i Mykologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Szacherskiej liczy łącznie 36 stron oraz załączniki, w skład których wchodzą 4 publikacje złożone wcześniej do międzynarodowych czasopism JCR, które formalnie wchodzą w skład wspomnianej rozprawy. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.), tj. złożona jest z opublikowanych prac. Podstawą niniejszej rozprawy jest spójny tematycznie zestaw czterech artykułów naukowych dotyczących losów kwasów tłuszczowych o krótkiej i średniej długości łańcucha jako źródeł węgla do produkcji polimerów polihydroksyalkanianowych. Prezentowana praca obejmuje trzy publikacje oryginalne i jeden artykuł przeglądowy, wszystkie opublikowane w międzynarodowych i renomowanych czasopismach, w latach 2021-2022:

I **Szacherska K.**, Oleskowicz-Popiel P., Ciesielski S., Mozejko-Ciesielska J. 2021. Volatile Fatty Acids as Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates Production. *Polymers*. 13, 321. DOI: 10.3390/polym13030321.

(IF1= 4.329; MEiN2 = 100 punktów)

I **Szacherska K.**, Moraczewski K., Rytlewski P., Czaplicki S., Ciesielski S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Polyhydroxyalkanoates production from short and medium chain carboxylic acids by *Paracoccus homiensis*. *Scientific Reports*. 12, 7263. DOI: 10.1038/s41598-022-11114-x.

(IF1= 4.996; MEiN2 = 140 punktów)

I **Szacherska K.**, Moraczewski K., Czaplicki S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Conversion of Short and Medium Chain Fatty Acids into Novel Polyhydroxyalkanoates Copolymers by *Aeromonas* sp. AC_01. *Materials*. 15, 4482. DOI: 10.3390/ma15134482.

(IF1= 3.748; MEiN2 = 140 punktów)

II **Szacherska** K., Moraczewski K., Czaplicki S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Effect of short- and medium-chain fatty acid mixture on polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas* strains grown under different culture conditions. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 10, 951583. DOI: 10.3389/fbioe.2022.951583.

(IF1= 6.064; MEiN2 = 100 punktów)

Wszystkie przedstawione publikacje są wieloautorskie. Rozprawa zawiera więc także deklaracje każdego z autorów o ich udziale w tych wspólnych pracach, z których mogę wnioskować, że Pani Szacherska miała wiodącą rolę w opracowaniu koncepcji prezentowanych wyników, wykonaniu głównych eksperymentów, sporządzeniu manuskryptów, wizualizacji danych itd. Jasno wynika z tego rola Kandydatki w przedstawionych manuskryptach; jest ona również głównym, pierwszym autorem w przedstawionych pracach.

Ocena pracy dyplomowej

Prezentowany dokument, będący zwięzłym podsumowaniem zbioru manuskryptów, dotyczy bardzo ważnego aspektu naszego codziennego życia - polimerów biodegradowalnych, które już wkrótce zajmą bardziej wyraziste miejsce w naszych społeczeństwach. Pani mgr Szacherska w swojej pracy skupiła się na ocenie kwasów tłuszczowych o krótkiej i średniej długości łańcucha do bakteryjnej produkcji jednego z rodzajów tworzyw biodegradowalnych, a mianowicie polihydroksyalkanianów (PHA). Z rozprawy Czytelnik dowie się, że biopolimery te są wszechobecne w świecie drobnoustrojów. Służą one bakteriom jako źródło węgla i energii. Mają jednak również inne godne uwagi cechy, które mogą być wykorzystane przez człowieka. Głównie ze względu na ich biodegradowalność i biokompatybilność polimery te mogą być stosowane w medycynie, farmacji, a także w produkcji biodegradowalnych zamienników dla przedmiotów codziennego użytku. Kandydatka w swoim krótkim wprowadzeniu opisała również budowę chemiczną i funkcje biologiczne PHAs. Dalej zwraca uwagę Czytelnika na ważny aspekt cyrkularności, gdzie przy syntezie tych cennych cząsteczek uwzględnia się strumienie odpadów. Kandydatka słusznie stwierdza, że należy prowadzić więcej prac nad wykorzystaniem odpadów jako substratów fermentacyjnych. Ponadto, Pani mgr Szacherska przedstawia aktualny stan wiedzy na temat strategii fermentacyjnych mających na celu wykorzystanie kwasów tłuszczowych o krótkiej i średniej długości łańcucha (SMCFA)

do produkcji PHA. O tych aspektach Czytelnik dowie się pokrótce nie tylko we wstępie, ale także w dalszej części pierwszej publikacji z Jej cyklu - "Volatile Fatty Acids as Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates Production" opublikowanej w ubiegłym roku w Polymers. Obejmuje ona aspekty źródeł tych krótkich kwasów tłuszczowych i podaje liczne przykłady ich konwersji do kruchych i twardych PHA o krótkiej długości łańcucha oraz tych bardziej elastomerycznych - PHA o średniej długości łańcucha w procesach fermentacyjnych.

Praca doktorska Pani mgr Szacherskiej koncentruje się na jednym strumieniu odpadów cząsteczkowych do produkcji SMCFA, a mianowicie serwatce, i jej wykorzystaniu do produkcji PHA przy użyciu trzech różnych szczepów, co było głównym celem pracy. Ten produkt uboczny wytwarzania sera jest produkowany na całym świecie w dużych ilościach dziennie i stanowi realne zagrożenie dla środowiska. Dlatego też jego przekształcenie w produkty o wartości dodanej ma ogromne znaczenie. Za pomocą metod chemicznych lub biologicznych można go łatwo przekształcić w substraty fermentacyjne. Trzy publikacje zawarte w pracy magisterskiej skupiają się na wykorzystaniu biologicznie przekształconej serwatki do SMCFA, jej biokonwersji do szeregu polimerów PHA oraz dogłębnej charakterystyce fizykochemicznej polimerów.

Pierwsza publikacja oryginalna pt. "Polyhydroxyalkanoates production from short and medium chain carboxylic acids by *Paracoccus homiensis*" bada wpływ poszczególnych syntetycznych SMCFA oraz pochodzących z beztlenowej fermentacji mieszanej kultury serwatki kwasowej na syntezę PHA. Kandydatka przedstawia swoje prace eksperymentalne dotyczące wzrostu i syntezy PHA z substancji modelowych w podłożu mineralnym w kolbach wstrząsanych. Zaobserwowała, że wykorzystanie prawdziwego substratu powoduje lepszy wzrost, ale niższą zawartość PHA i powiązała to z innymi składnikami użytego substratu. Chciałbym zapytać, czy może to być spowodowane obecnością dodatkowych źródeł azotu/fosforanu obecnych w podłożu, które mogłyby zapobiec ograniczającej składniki odżywcze fazie akumulacji PHA. Jeśli tak, to jaką obróbkę wstępną SMCFA można wdrożyć w przyszłości dla tej konkretnej fermentacji? Bardzo interesującym odkryciem było to, że syntetyzowany kopolimer *P. homiensis* jest znacznie bardziej stabilny temperaturowo, gdy pochodzi z prawdziwego substratu, w porównaniu do tego pochodzącego z syntetycznej mieszaniny. Ponadto kopolimer ten charakteryzował się wysoką krystalicznością około 50% posiadając jedynie ułamek jednostek HV. Chciałbym poznać opinię Kandydatki, czy jest to wpływ składu podłoża, czy może jakiś inny czynnik, który wpłynął na wytworzenie PHA w tych specyficznych warunkach.

Drugi prezentowany manuskrypt pracy magisterskiej Pani mgr Szacherskiej wykorzystuje *Aeromonas* sp do produkcji PHA zarówno z syntetycznych jak i rzeczywistych substratów. Dzięki manipulacji mediami i warunkami wzrostu udało się jej zoptymalizować proces w małej skali do produkcji unikalnego polimeru PHA, który jest kopolimerem monomerów scl i mcl PHA. Szczególnie intrygującym odkryciem jest pojawienie się jednostek monomerycznych (*R*)-3-hydroksytridekanianu w zgromadzonym mix-PHA. Chciałbym dowiedzieć się jakie jest prawdopodobne wyjaśnienie takiego składu PHA w mniemaniu Kandydatki.

Trzecia publikacja z cyklu, zatytułowana "Effect of short- and medium-chain fatty acid mixture on polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas* strains grown under different culture

conditions", jest badaniem kolejnej bakterii akumulującej PHA, która może syntetyzować biopolimer o średniej długości łańcucha. W tej ciekawej pracy wyraźnie widać, że przetworzona serwatka może być wykorzystana do produkcji polimeru o odmiennych właściwościach ze względu na inny skład polimeru. Kandydatka udowodniła, że potrafi prowadzić proces fermentacji w bioreaktorze, co jest bardzo ważne dla jej przyszłej kariery, tj. w przemyśle.

Praca doktorska zakończona jest zwięzłymi wnioskami, w których Pani mgr Szacherska podsumowuje główny wniosek ze swojej pracy. Głównym przesłaniem wynikającym z tej pracy, które w znacznym stopniu poszerza naszą podstawową wiedzę, jest to, że przetworzona serwatka na kwasy tłuszczowe o krótkiej i średniej długości łańcucha jest odpowiednim substratem fermentacyjnym, który może być wykorzystany do produkcji różnorodnych PHA o odmiennych właściwościach fizykochemicznych, co może stanowić dla społeczeństwa alternatywę dla petrochemicznych polimerów. Należy również zauważyć, że Kandydatce udało się zrealizować wszystkie cele pracy, czyli zaplanować eksperymenty, wykonać je i zinterpretować wyniki. Myślę, że nie muszę komentować jakości prezentowanych manuskryptów, gdyż zostały one już ocenione przez kilku ekspertów w tej dziedzinie, gdyż były recenzowane.

Wnioski

Podsumowując, jestem głęboko przekonany, że rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Szacherskiej wnosi istotny wkład do nauki w dziedzinie biologii, biotechnologii i mikrobiologii przemysłowej oraz spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). W związku z powyższym uprzejmie proszę o dopuszczenie przez Radę Naukową dyscypliny nauk biologicznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie Pani mgr Karoliny Szacherskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, biorąc pod uwagę doskonały, merytoryczny i metodologiczny poziom prezentowanej rozprawy uprzejmie proszę Radę o wyróżnienie tej rozprawy.

Dr hab. Maciej Guzik, prof. IKIFP

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Dr hab. Maciej Guzik, Associate Professor

Jerzy Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry

Polish Academy of Sciences

Niezapominajek 8

30-239 Kraków

Poland

Kraków, 4/10/2022

A review of the Doctoral Thesis of Ms. Karolina Szacherska, MSc

"Short and medium chain fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production"

Formal evaluation

The doctoral desideration submitted for review was completed under the supervision of dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. UWM and prof. dr hab. inż. Piotr Oleśkowicz-Popiel, at the Department of Microbiology and Mycology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn. The doctoral desideration of Ms Karolina Szacherska comprises a total of 36 pages and appendixes, which include 4 publications submitted beforehand to international JCR journals that formally are part of the said desideration. The doctoral dissertation meets the requirements specified in Art. 187 of the Act of July 20, 2018 The Law on Higher Education and Science (uniform text: Dz. U. from 2022, item 574, as amended.), i.e., is composed of published works. The basis of this dissertation is a thematically coherent set of four scientific articles on the fate of short and medium chain length fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoate polymers production. The presented work includes three original publications and one review article, all published in international and reputable journals, in 2021-2022:

I **Szacherska K.**, Oleskowicz-Popiel P., Ciesielski S., Mozejko-Ciesielska J. 2021. Volatile Fatty Acids as Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates Production. *Polymers*. 13, 321. DOI: 10.3390/polym13030321.

(IF1= 4.329; MEiN2 = 100 points)

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351

I **Szacherska K.**, Moraczewski K., Rytlewski P., Czaplicki S., Ciesielski S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Polyhydroxyalkanoates production from short and medium chain carboxylic acids by *Paracoccus homiensis*. *Scientific Reports*. 12, 7263. DOI: 10.1038/s41598-022-11114-x.

(IF1= 4.996; MEiN2 = 140 points)

I **Szacherska K.**, Moraczewski K., Czaplicki S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Conversion of Short and Medium Chain Fatty Acids into Novel Polyhydroxyalkanoates Copolymers by *Aeromonas* sp. AC_01. *Materials*. 15, 4482. DOI: 10.3390/ma15134482.

(IF1= 3.748; MEiN2 = 140 points)

II **Szacherska** K., Moraczewski K., Czaplicki S., Oleskowicz-Popiel P., Mozejko-Ciesielska J. 2022. Effect of short- and medium-chain fatty acid mixture on polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas* strains grown under different culture conditions. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10, 951583. DOI: 10.3389/fbioe.2022.951583.

(IF1= 6.064; MEiN2 = 100 points)

All of the presented publications are multiauthor. The dissertation thus includes also each author's declarations of their participation in these joint works, from which I can conclude that Ms Szacherska had a leading role in working on the concept of presented results, performing main experiments, drafting the manuscripts, data visualisation and so on. It clearly states the Candidate's role in the submitted manuscripts; she is also the main, first author in the presented papers.

Thesis evaluation

The presented document, which is a concise summary of the collection of manuscripts, deals with a very important aspect of our daily life – biodegradable polymers that soon will take a more pronounced place in our societies. Ms Szacherska has focused her work on the evaluation of short and medium chain length fatty acids for bacterial production of one of the biodegradable plastics types, namely polyhydroxyalkanoates (PHAs). The Reader will learn from the thesis that these biopolymers are ubiquities in the microbial world. They serve as carbon and energy source for bacteria. However, they also have other noteworthy features that can be exploited by humans. Mainly due to their biodegradability and biocompatibility these polymers can be used in medicine, pharmacy and also in the manufacturing of biodegradable alternatives for daily used objects. The Candidate in Her short introduction described also the chemical structure and biological function of PHAs. Further the Reader's attention is brought to an important aspect of circularity, where for the synthesis of these valuable molecules waste streams are considered. The Candidate rightfully states that more work needs to be performed on waste utilisation as fermentation substrates. Further, Ms Szacherska presents an up-to-date state-of-the-art application for fermentative strategies aiming at using the short and medium chain length fatty acids (SMCFAs) for

the production of PHAs. Said so, not only in the introduction the Reader will briefly learn about these aspects but also later in the first publication of Her cycle – "Volatile Fatty Acids as Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates Production" published last year in Polymers. It covers aspects of sources of these short fatty acids and gives multiple examples of their conversion to brittle and hard short chain length PHAs and these more elastomeric – medium chain length PHAs via fermentative processes.

Ms Szacherska's dissertation focuses on one particulate waste stream to produce SMCFAs, namely whey, and its use to produce PHA with three different strains, which was the main aim of the thesis. This by-product of cheese making is produced globally in large quantities daily and possess a real threat to the environment. Therefore, its conversion to value-added products is of great importance. Through either chemical or biological methods, it can be easily converted into fermentation substrates. The three publications included in the thesis focus on the use of biologically converted whey to SMCFAs, its bioconversion to a range of PHA polymers, and the polymers' in-depth physicochemical characterisation.

The first original publication entitled "Polyhydroxyalkanoates production from short and medium chain carboxylic acids by *Paracoccus homiensis*" studies the effect of the individual synthetic SMCFAs and those derived from anaerobic mixed culture fermentation of acid whey on PHA synthesis. The Candidate presents her experimental work on growth and PHA synthesis from model substances in a mineral medium in shake flasks. She has observed that utilisation of real substrate results in better growth, but lower PHA content and She related it to the other components of the used substrate. I would like to ask whether this could be due to the presence of the additional nitrogen/phosphate sources present in the substrate, which could prevent the nutrient-limiting PHA accumulation phase. If yes, what pre-treatment of the SMCFAs can be implemented in future for this particular fermentation? A very interesting finding was reported that *P. homiensis* synthesised is a much more temperature stable polymer when derived from a real substrate when compared to this originating from a synthetic mixture. Also, this copolymer was characterised by a high crystallinity of around 50% having only a mere fraction of HV units. I would like to learn the Candidate's opinion if it is an impact of the substrate composition or maybe some other factor that influenced the PHA produced under these specific conditions.

The second presented manuscript of Ms Szacherska's thesis exploits the use of *Aeromonas* sp to produce PHA from both synthetic and real substrates. Through media and growth condition manipulation She was able to optimize the process at a small scale to produce a unique PHA polymer which is a copolymer of scl and mcl PHA monomers. Especially, the intriguing finding is the appearance of (*R*)-3-hydroxytridecanoate monomeric units in the accumulated mix-PHA. I would like to as the Candidate what is a plausible explanation for such PHA composition.

The third publication in Her cycle, entitled "Effect of short- and medium-chain fatty acid mixture on polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas* strains grown under different culture conditions", is a study on another PHA accumulator that can synthesise medium chain length biopolymer. In this interesting study, we clearly can see that processed whey can be utilised to produce a polymer with distinct properties due to a different polymer composition. The Candidate

proved that She can conduct the fermentation process in a bioreactor, which is very important for her future work, i.e., in industry.

The thesis is finished with concise conclusions, where Ms Szacherska summarises the main finding of her work. The main home-take-message from this desideration, that profoundly expand our basic knowledge, is that processed whey to short and medium chain length fatty acids is a suitable fermentation substrate that can be used to produce a variety of PHAs with distinct physiochemical properties, thus providing society with alternatives to petroleum polymers. It should also be noted that the Candidate was able to achieve all the goals of Her work, namely planning the experiments, performing them and interpreting the results. I believe I do not need to comment more on the quality of the presented manuscripts as they had been already assessed by several experts in the field as they had had been peer reviewed.

Conclusions

In summary, I strongly believe that Ms Szacherska PhD dissertation contributes significantly to science in the field of biology, biotechnology and industrial microbiology and meets the requirements specified in Art. 187 of the Act of July 20, 2018 The Law on Higher Education and Science (uniform text: Dz. U. from 2022, item 574, as amended). Therefore, I kindly ask that the Scientific Council of the Biological Sciences discipline of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn admit Ms Karolina Szacherska to further stages of the doctoral program. Additionally, taking into account the excellent, substantive and methodological level of the presented thesis I kindly ask the Council that this dissertation should be awarded distinction.

Dr hab. Maciej Guzik, prof. IKIFP

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351