WROCŁAW UNIVERSITY
OF ENVIRONMENTAL
AND LIFE SCIENCES

INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL BIOLOGY

Aleksandra M. Mirończuk, PhD;
Associate Professor

Wrocław, 26th October, 2022

A Review of the Doctoral Dissertation of Karolina Szacherska, MSc entitled "Short and medium chain fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production"

The submitted thesis was done in the Department of Microbiology and Mycology at University of Warmia and Mazury in Olsztyn, under supervision of dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. UWM and prof. dr hab. inż. Piotr Oleśkowicz-Popiel.

PhD thesis of Mrs. Karolina Szacherska is based on four thematically coherent set of scientific articles published in 2021-2022 in the journals listed in Journal Citation Reports, with average IF≈4.8, what is a very good results for a young scientist. The research was financed by five projects and Karolina Szacherska was the recipient of a scholarship from the Interdisciplinary Doctoral Studies in Bioeconomy Programme (POWR.03.02.00-00-I034/16-00), which is funded by the European Social Fund. Mrs Szacherska is the first author of all the published articles, one review article and three original works:

1. 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/polym13030 321
2. 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.
3. 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.
4. 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

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

WROCŁAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES
LABORATORY FOR BIOSUTAINABILITY
Kożuchowska 5b
51-631 Wrocław
www.upwr.edu.pl

Pseudomonas strains grown under different culture conditions. Front. Bioeng. Biotechnol. 10, 951583. DOI: 10.3389/fbioe.2022.951583.

Beside the articles, the dissertation consists of a short summary in Polish and English, a general introduction, aim of the thesis, material and method, description of the Results, Conclusions and References. In the thesis declarations of the co-authors were also included. This form of dissertation is accepted with art.187 paragraph 3 of Higher Education and Science Act, dated 20 July 2018 and the guideline of the Council of Scientific Excellence (Communique 19/2020, dated 9 November 2020), i.e., composed of the published works.

In the PhD thesis author focused on polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis form short and medium chain fatty acids (SMCFAs). Growing accumulation of the plastic wastes in the nature, force the scientists to search for an alternative for petrochemical plastic, one of them is PHA. Unfortunately, relative high production cost of PHA causes that its production is still on the limited level. Therefore, one alternative to decrease production rate is a finding low-cost substrate to convert it into value-added product, such PHAs. Nowadays, one of the bottlenecks in the production of these polymers, is high productivity and the yield. Finding a new solution of this problem is crucial for commercial production. For this reason, the aim of the dissertation is important, not only from the scientific point of view since it will put a new insight into the field, but also for practical applications.

Article 1, published in *Polymers* in 2021, is a review article and it is a good introduction for the dissertation since it summarize the current knowledge in the field. The article is good written, it is easy for reader to follow all abundant information. Authors describe the types of polymers, however here I missed the schematic figure grouping the types of polymers, the Figure presenting a segregation of polymer types could be useful for readers. The reviews consist of all crucial parts and describe the most important and recent finding in PHA biosynthesis from volatile fatty acids. The article was first, published article by Szacharska et al. a first author, and that is why it could not contains the finding of the PhD Candidate. It is pity, since the review article is a good way to propagate the own findings on the scientific area.

The second article, published in *Scientific Reports*, describes biosynthesis of PHAs by *Paracoccus homiensis* from acidogenic mixed culture fermentation of acid whey. The obtained results, showed, that this bacteria is capable for production 2.5g/L with PHAs content 17% CDM. The authors tested different composition of medium, varying in carboxylic acid (CA) percent form 5%-30%. Next,

HR EXCELLENCE IN RESEARCH
WROCŁAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES
LABORATORY FOR BIOSUTAINABILITY
Kożuchowska 5b
51-631 Wrocław
www.upwr.edu.pl

the extracted PHA composition and theirs thermal properties were established. Authors described in details physical properties of the extracted PHA. However, in relation to the obtained results, I want to ask Mrs. Szacherska, what is the significance of physical properties a newly obtained polymers for the practical application of PHA?

Article 3, published in *Materials*, describes production of PHAs copolymers by *Aeromonas* sp. AC_01. Similar, like in previous work, as a short and medium chain fatty acids (SMCFAs) was used as a substrate. Authors tested synthetic and waste derived SMCFAs in range 1 g/L, 2g/L and 3g/L and its impact on PHA titre and the productivity. Interestingly, authors had found that the high concentration of CA (with exception for acetic acid) inhibits production of the desired polymers. Moreover, under non-limited nitrogen conditions, PHAs production was observed- does the Author know the explanation of this phenomenon?

Next, the impact of different ratio between acetic acid and butyric acid was on copolymer composition was tested. In the final step, a thermal properties of copolymers were tested. Author describe in details thermal differences between different copolymers, but unfortunately she did not explain connection between Tg and Tm and physical properties or bioavailability of this copolymer for microorganisms.

Article 4, published in *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, describe optimization of PHAs biosynthesis by three *Pseudomonas* strains under varies conditions, including N-limited and non-limited conditions or application of synthetic and waste SMCFA. In additions, the impact on PHAs composition was investigated. The most interesting finding was, that $SMCFA_{extracted}$ -rich stream from MCF using food waste , under N-limited conditions is a suitable, low-cost substrate for PHA production. This observation was proved by bioreactor study, what is very significant, since up-scaling the experiments very often fails, because of changed experiment conditions. In addition, thermal properties of newly synthetized copolymers were analysed .

Regarding, this article, I would like to ask about the results from bioreactor study (Fig.3). It is clearly seen, that after 32 hours of cultivation PHA titre decrease, what is the most probably connected to the C and N depletion in the medium and using a storage material by the bacteria. Why you did not try to repeat the experiment with feeding system, I mean by adding fresh medium after 24 hours of cultivation? Next, why the SD are missing on the graph?

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

WROCŁAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES
LABORATORY FOR BIOSUTAINABILITY
Kożuchowska 5b
51-631 Wrocław
www.upwr.edu.pl

Since all articles were published in the respectable, a peer-review journals, the obtained results and the form of presentation was accepted by many experts in the field. It proves a high importance of the research and its quality. Despite the comments mentioned above, I would like to ask some more questions:

1) Why did the authors cultivate the bacteria (*P. homiensis* , *Pseudomonas sp.*) at 150 rpm? A higher rotary, shaking improves dissolved oxygen (DO) concentration in the medium, resulting in a higher productivity.
2) Between three tested species : *P. homiensis* , *Pseudomonas* and *Aeromonas sp*. which of them possesses the best potential for application?
3) I think in the dissertation a General Discussion is missing, summarizing the most important finding of the Author. For the reason that all three original works were published almost at the same time, they could not be discussed in the articles neither.
4) What level of the productivity or concentration of PHA should be achieved for profitable production?

Here, I would like underline, that the dissertation presents an original and important findings. In my opinion, the study should be continued for large- scale process optimization. The PhD Candidate used a wide range of methods in her research, proving her scientific competence.

In conclusion, I state that the dissertation of Karolina Szacherska contributes significant impact in the field of knowledge and meets all 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 request that the Scientific Council of the discipline of Biological Sciences of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, admit Mrs Karolina Szacherska to further stages of the doctoral programme.

Taking into account high level of the research and significant practical application of the obtained results, I would like to request that this dissertation be recognized with an award.

A. Mirończuk

Dr hab. Aleksandra M. Mirończuk, prof. UPWr

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

WROCŁAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES
LABORATORY FOR BIOSUTAINABILITY
Kożuchowska 5b
51-631 Wrocław
www.upwr.edu.pl

UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

INSTYTUT BIOLOGII ŚRODOWISKOWEJ

Dr hab. Aleksandra M. Mirończuk, prof. UPWr

Wrocław, 26. 10. 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Szacherskiej
pt. „Krótko- i średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe jako źródła węgla do produkcji polihydroksykwasów”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Mikologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem dr hab. inż. Justyny Możejko-Ciesielskiej, prof. UWM oraz prof. dr hab. inż. Piotra Oleśkowicza-Popiela. Rozprawa mgr Karoliny Szacherskiej oparta została na czterech spójnych tematycznie artykułach naukowych opublikowanych w latach 2021-2022, w czasopismach wymienionych w Journal Citation Reports, ze średnim IF≈4,8, co jest bardzo dobrym wynikiem dla młodego naukowca. Badania sfinansowano z pięciu projektów, a mgr K. Szacherska była stypendystką programu „Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie w Biogospodarce” (POWR.03.02.00-00-I034/16-00), finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego. Mgr Szacherska jest pierwszą autorką wszystkich opublikowanych artykułów, jednego artykułu przeglądowego oraz trzech prac oryginalnych:

1. 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/polym13030 321
2. 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.
3. 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.

HR EXCELLENCE IN RESEARCH
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
PRACOWNIA DLA ZRÓWNOWAŻONEGO BIOROZWOJU
ul. Kożuchowska, 51-631 Wrocław
www.upwr.edu.pl

4. 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.

Na pracę doktorską, oprócz wymienionych artykułów, składa się krótkie streszczenie w języku polskim i angielskim, ogólne wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody, opis wyników, wnioski oraz spis literatury. W pracy znalazły się również deklaracje współautorów o ich udziale w pracach badawczych. Taką formę rozprawy dopuszcza art.187 ust. 3 ustawy o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. oraz wytyczne Rady Doskonałości Naukowej (Komunikat 19/2020 z dnia 9 listopada 2020 r.).

W pracy doktorskiej Autorka skupiła się na biosyntezie polihydroksyalkanianów (PHA) z krótko- i średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SMCFA). Rosnąca akumulacja odpadów tworzyw sztucznych w środowisku naturalnym zmusza naukowców do szukania dla nich dobrej alternatywy, jedną z nich jest PHA. Niestety stosunkowo wysoki koszt otrzymywania PHA powoduje, że jego produkcja jest wciąż na ograniczonym poziomie. Dlatego jedną z alternatyw dla zmniejszenia cen produkcji jest znalezienie taniego substratu, który może być wykorzystany do przekształcenia go w produkt o wartości dodanej, taki jak biodegradowalny PHA. Obecnie jednym z problemów w produkcji tych polimerów jest uzyskanie wysokiej wydajności. Rozwiązanie tego problemu jest kluczowe dla rozpoczęcia produkcji komercyjnej. W związku z tym, cel rozprawy doktorskiej jest ważny, nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale także z powodu możliwości zastosowania wyników badań w praktyce.

Artykuł 1, opublikowany w Polymers, w 2021, jest artykułem przeglądowym, co stanowi dobry wstęp do rozprawy doktorskiej, gdyż zawiera najbardziej aktualną wiedzę z tego zakresu. Artykuł jest napisany dobrze, łatwo się go czyta mimo dużej ilości danych. Autorka opisuje rodzaje polimerów, jednakże w tym miejscu przydał by się Schemat przedstawiający ich klasyfikację, co ułatwiło by czytelnikowi odbiór. Artykuł zawiera wszystkie istotne części przeglądu, oraz opisuje najnowsze doniesienia w produkcji PHA z lotnych kwasów tłuszczowych. Ten artykuł, jest pierwszym, opublikowanym przez Doktorantkę artykułem, dlatego tez nie zawiera opisu wyników uzyskanych przez Doktorantkę. Szkoda, ponieważ artykuł przeglądowy jest doskonałym środkiem do rozpowszechnienia własnych badań w środowisku naukowym.

Drugi Artykuł, opublikowany w Scientific Reports, opisuje biosyntezę PHA przez *Paracoccus homiensis* z beztlenowej fermentacji z wykorzystaniem kwaśniej serwatki. Uzyskane wyniki wykazały, że bakteria ta jest zdolna do produkcji 2,5g/L przy zawartości PHA 17% CDM. Autorzy badali różny skład podłoża, różniący się zawartością kwasów karboksylowych (CA) od 5%-30%. Następnie ustalono skład wyekstrahowanych PHA oraz ich właściwości fizyczne. W związku z otrzymanymi wynikami chciałbym zapytać Panią K. Szacherską, jakie znaczenie dla praktycznego zastosowania PHA mają właściwości fizyczne nowo otrzymanych polimerów?

Artykuł 3, opublikowany w *Materials*, przedstawia produkcję kopolimerów PHAs przez *Aeromonas* sp. AC_01. Podobnie jak w poprzedniej pracy, jako substrat zastosowano krótko- i średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SMCFA). W badaniach przetestowano syntetyczne oraz pochodzące z odpadów SMCFA w zakresie 1 g/L, 2 g/L i 3 g/L oraz ich wpływ na poziom PHA oraz jego produktywność. Co ciekawe, autorzy stwierdzili, że wysokie stężenie CA (z wyjątkiem kwasu octowego) hamuje wytwarzanie polimerów. Ponadto, w warunkach nielimitujących N, zaobserwowano produkcję PHA – czy Autorka zna wyjaśnienie tego zjawiska? Następnie, zbadano wpływ rożnych proporcji kwasu octowego oraz kwasu masłowego na skład kopolimerów. W końcowym etapie zbadano właściwości termiczne kopolimerów. Autorka szczegółowo opisuje różnice termiczne pomiędzy różnymi kopolimerami, szkoda, że nie wyjaśniła związku między Tg i Tm a właściwościami fizycznymi lub biodostępnością tego kopolimeru dla mikroorganizmów.

Artykuł 4, opublikowany w *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, opisuje optymalizację biosyntezy PHA przez trzy szczepy *Pseudomonas* sp. , w warunkach z ograniczeniem N i bez ograniczeń N oraz z zastosowaniem syntetycznych i odpadowych SMCFA. Dodatkowo zbadano ich wpływ na skład PHA. Najbardziej interesującym odkryciem było to, że strumień SMCFA z beztlenowej fermentacji mieszanych kultur drobnoustrojów z wykorzystaniem odpadów spożywczych, w warunkach z ograniczeniem azotu, jest odpowiednim, tanim substratem do produkcji PHA. Ta obserwacja została potwierdzona badaniami bioreaktorowymi, co jest bardzo istotne, gdyż zwiększanie skali eksperymentów bardzo często kończy się niepowodzeniem ze względu na zmienne warunki eksperymentu. Ponadto, przeanalizowano właściwości termiczne nowo zsyntetyzowanych kopolimerów.

W związku z tym artykułem chciałabym zapytać o wyniki badań bioreaktorowych (Ryc. 3). Wyraźnie widać, że po 32 godzinach hodowli miano PHA spada, co jest najprawdopodobniej związane

z wyczerpywaniem się C i N w podłożu oraz wykorzystywaniem przez bakterie materiału zapasowego. Dlaczego nie powtórzono eksperymentu z systemem zasilania, czyli dodając świeżą pożywkę po 24 godzinach hodowli? Ile razy powtórzono ten eksperyment, skoro nie dodano odchyleń standardowych na wykresie?

W związku z tym, że wszystkie artykuły, wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, zostały opublikowane w renomowanych, recenzowanych czasopismach, uzyskane wyniki i forma ich prezentacji zostały zaakceptowane przez wielu ekspertów w tej dziedzinie. Świadczy to o dużym znaczeniu badań i ich jakości. Pomimo powyższych uwag, chciałabym zadać jeszcze kilka pytań:

1) Dlaczego hodowano bakterie (*P. homiensis , Pseudomonas sp*.) przy prędkości 150 obr/min? Wyższa prędkość obrotowa wstrząsania poprawia stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) w medium, co skutkuje wyższą wydajnością.

2) Który z pomiędzy trzema badanymi gatunkami: *P. homiensis, Pseudomonas i Aeromonas* sp. ma największy potencjał aplikacyjny?

3) Myślę, że w rozprawie brakuje Dyskusji Ogólnej, podsumowujący odkrycia Doktorantki. Ponieważ wszystkie trzy oryginalne prace ukazały się niemal w tym samym czasie, również nie mogły być omawiane w artykułach.

4) Jaki poziom wydajności lub koncentracji PHA należy osiągnąć dla opłacalnej, przemysłowej produkcji?

Recenzowana praca doktorska mgr Karoliny Szacherskiej, wykonana jest z zachowaniem właściwej metodologii badań biologicznych, temat pracy jest wysoce istotny, a przy tym z dużym potencjałem aplikacyjnym. Moim zdaniem badania powinny być kontynuowane dla optymalizacji procesów na dużą skalę. Doktorantka wykorzystywała duży zakres metod w badaniach, świadczący o Jej kompetencjach naukowych.

Niniejszym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Karoliny Szacherskiej 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). Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Biologicznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom niniejszej rozprawy doktorskiej zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Szacherskiej stosownym wyróżnieniem przyjętym w Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie.

A. Mirończuk

Dr hab. Aleksandra M. Mirończuk, prof. UPWr

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
PRACOWNIA DLA ZRÓWNOWAŻONEGO BIOROZWOJU
ul. Kożuchowska, 51-631 Wrocław
www.upwr.edu.pl