

# **AUTOREFERAT**

**Dr Justyna Magdalena Ruchała**

Katedra Biologii

Instytut Biologii i Biotechnologii

Kolegium Nauk Przyrodniczych

Uniwersytet Rzeszowski

---

Rzeszów 2021

1. Imię i nazwisko: **Justyna Magdalena Ruchała**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej:

2011	mgr biologii; Uniwersytet Rzeszowski; praca magisterska pt.: „Zawartość antyoksydantów w powietrzu wydychanym w kolejnych fazach cyklu miesięcznego kobiety”; promotor: prof. dr hab. Grzegorz Bartosz
2015	doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biologia; rozprawa doktorska pt.: „Konstruowanie szczepów drożdży <i>Hansenula polymorpha</i> z ulepszonymi charakterystykami alkoholowej fermentacji ksylozy”; promotor: prof. dr hab. Andriy Sybirnyy

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2015 – 2016	Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, stanowisko: asystent
2016 – 2018	Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, stanowisko: adiunkt
2018 – 2019	Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski, stanowisko: adiunkt
2019 – 2021	Zakład Mikrobiologii i Genetyki Molekularnej, Instytut Biologii i Biotechnologii, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, stanowisko: adiunkt
2021 – obecnie	Katedra Biologii, Instytut Biologii i Biotechnologii, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, stanowisko: adiunkt

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 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce stanowi cykl 6 powiązanych tematycznie ze sobą publikacji naukowych, dotyczących fermentacji i metabolizmu pentoz u drożdży niekonwencjonalnych *Ogataea polymorpha*. Prace te zostały opublikowane w latach 2017-2021. Publikacje te powstały dzięki współpracy naukowej z jednostki naukowymi z zagranicy.

Łączna wartość współczynnika oddziaływania prac, które składają się na osiągnięcie to **34,291**. Łączna wartość punktów MEiN składających się na osiągnięcie to **510** (zgodne z rokiem publikacji).

**A.) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

**Identyfikacja genów uczestniczących w regulacji metabolizmu i fermentacji ksylozy u termotolerancyjnych drożdży *Ogataea polymorpha* oraz konstruowanie wydajnych producentów etanolu z tej pentozy**

**B.) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (wg kolejności omawiania):**

**P1. Ruchala J**, Kurylenko OO, Soontorngun N, Dmytruk KV, Sibirny AA. Transcriptional activator Cat8 is involved in regulation of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. Microb Cell Fact. 2017; 16(1):36. doi: 10.1186/s12934-017-0652-6. (**IF<sub>2017</sub> 3,831; MEiN<sub>2017</sub>= 35**).

**P2.** Kurylenko O#, **Ruchala J#**, Kruk B., Vasylyshyn R, Szczepaniak J, Dmytruk K, Sibirny A. The role of Mig1, Mig2, Tup1 and Hap4 transcription factors in regulation of xylose and glucose fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. FEMS Yeast Res. 2021; 21(4): foab029. doi: 10.1093/femsyr/foab029. (**IF<sub>2019</sub> 2,796; MEiN<sub>2020</sub>= 100**).

# równorzędni autorzy

**P3.** Dmytruk KV, **Ruchala J**, Grabek-Lejko D, Puchalski C, Bulbotka NV, Sibirny AA. Autophagy-related gene *ATG13* is involved in control of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. FEMS Yeast Res. 2018; 18(2): foy010. doi: 10.1093/femsyr/foy010. (IF<sub>2018</sub> **2,458**; MEiN<sub>2017</sub>= **30**).

**P4.** Kurylenko OO#, **Ruchala J**#, Vasylyshyn RV, Stasyk OV, Dmytruk OV, Dmytruk KV, Sibirny AA. Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. Biotechnol Biofuels. 2018; 11:197. doi: 10.1186/s13068-018-1203-z. (IF<sub>2018</sub> **5,452**; MEiN<sub>2017</sub>= **45**).

# równorzędni autorzy

**P5.** **Ruchala J**, Kurylenko OO, Dmytruk KV, Sibirny AA. Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). J Ind Microbiol Biotechnol. 2020; 47(1):109-132. doi: 10.1007/s10295-019-02242-x. (IF<sub>2020</sub> **3,346**; MEiN<sub>2020</sub>= **100**).

**P6.** **Ruchala J**, Sibirny AA. Pentose metabolism and conversion to biofuels and high-value chemicals in yeasts. FEMS Microbiol Rev. 2020:fuaa069. doi: 10.1093/femsre/fuaa069. (IF<sub>2019</sub> **16,408**; MEiN<sub>2020</sub>= **200**).

### **C.) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich zastosowań aplikacyjnych:**

#### **Wprowadzenie**

Globalne zapotrzebowanie na energię i problemy środowiskowe zintensyfikowały w ostatnim czasie na całym świecie prace badawcze na rzecz produkcji biopaliw ze źródeł odnawialnych. Tym bardziej, że sektor transportu, który w 2017 roku zużył 31,8% wyprodukowanej ropy (https://www.iea.org/weo/weo2018/secure/), odpowiadał za 41,5% globalnej

emisji CO<sub>2</sub> w 2016 roku (<https://www.iea.org/statistics/co2emissions/>). Dodatkowym elementem stymulującym tę gałąź nauki są problemy geopolityczne związane z chęcią uniezależnienia się energetycznego od światowych dostawców ropy. W rezultacie tego liczba krajów stosujących politykę energii odnawialnej w sektorze transportu wzrosła z 56 w 2012 r. do 66 w 2015 r. (Sawin et al., 2016). Powyższe problemy przyczyniają się do wykładniczego wzrostu produkcji etanolu na świecie w ciągu ostatniej dekady, sięgającego 120 miliardów litrów w 2018 roku, z czego 100 miliardów litrów to bioetanol (znany jako etanol paliwowy) (<https://knect365.com/energy/article/c07f7fba-48fa-464f-9f21-12f913fc67f7/world-ethanol-production-to-expand-steadily-in-2019>).

Bioetanol jest odnawialnym płynnym paliwem transportowym szeroko stosowanym głównie w Stanach Zjednoczonych i Brazylii, który w przyszłości może stać się dominującym odnawialnym biopaliwem w sektorze transportu. Większość etanolu jest obecnie wytwarzana z kukurydzy (USA) lub trzciny cukrowej (Brazylia), ale przyszłe dostawy mogą pochodzić z cukrów celulozowych i hemicelulozowych znajdujących się w biomacie roślin zielonych i pozostałościach rolniczych lub przemysłu drzewnego (Jansen et al., 2017). Bioetanol można mieszać z benzyną lub stosować jako czysty alkohol w dedykowanych silnikach, wykorzystując wyższą liczbę oktanową i wyższą temperaturę parowania. Ponadto jest uważany za doskonałe paliwo do zaawansowanych pojazdów hybrydowych typu *flex-fuel* (Lopes et al., 2016). Obecnie do produkcji bioetanolu na skalę przemysłową wykorzystywane są głównie konwencjonalne surowce, takie jak glukoza (pochodząca ze skrobi kukurydzianej) i sacharoza (z trzciny cukrowej lub buraków cukrowych) i jest znany jako etanol pierwszej generacji (1G). Istnieje jednak wiele kontrowersji wokół wykorzystywania tego typu surowców, m.in. etycznych, gdyż mogą one być wykorzystywane do produkcji żywności i pasz dla zwierząt, a przy tym ich zasoby są wyczerpywalne. Z tych właśnie powodów możliwości produkowania etanolu z niejadalnych, odnawialnych surowców, jakim jest lignoceluloza, zwanego etanolem drugiej generacji (2G), są szczególnie interesującym aspektem badawczym. Obecnie ograniczona ilość etanolu 2G jest produkowana w kilku pilotażowych i demonstracyjnych zakładach na całym świecie, jednak ze względu na wyższe koszty produkcji etanolu na dużą skalę z materiałów lignocelulozowych nie jest to jeszcze opłacalne. Lignoceluloza zawiera około 25% ligniny oraz 75%

polisacharydów, celulozy (homopolimer glukozy) oraz hemiceluloz (heteropolimer, który zawiera głównie pentozy, tj. ksylozę i L-arabinozę) (Baig, 2020).

Pod względem zawartości, ksyloza ma największy procentowy udział w lignocelulozie po glukozie, dlatego wydajna konwersja ksylozy przez mikroorganizmy jest istotnym warunkiem wstępnym dla rozwoju ekonomicznie opłacalnej technologii produkcji etanolu drugiej generacji (wytwarzanego głównie z lignocelulozy) (Rosalen-Calderon, et al., 2019). Szczepy typu dzikiego metylotroficznych termotolerancyjnych drożdży *Ogataea polymorpha* dobrze rosną na ksylozie i fermentują ją w warunkach umiarkowanego napowietrzenia, ale ilość nagromadzonego przez nie etanolu w czasie fermentacji jest 200 razy niższa niż z glukozy. Przyczyny tego zjawiska nie są dobrze znane, dlatego metody genetyki molekularnej mogą pomóc lepiej zrozumieć i udoskonalić ten proces. Nie bez znaczenia jest także fakt, że znana jest już sekwencja genomu tego gatunku (<http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.home.html>). Dlatego *O. polymorpha* jest obecnie uważany za obiecujący organizm, który może w przyszłości zostać wykorzystywany do produkcji etanolu z ksylozy. Dodatkowo drożdże *O. polymorpha* będąc termotolerancyjnym organizmem, są zdolne do procesu jednoczesnego scukrzania i fermentacji (z ang.: *simultaneous saccharification and fermentation*, SSF) co istotnie obniża koszty konwersji lignocelulozy do etanolu (Olofsson et al., 2007; Abdel Banat et al., 2010).

Drożdże *O. polymorpha* to gatunek o kilku unikalnych cechach:

- ◆ są to najbardziej termotolerancyjne drożdże z możliwością wzrostu w temp. 50°C, czego nie mogą osiągnąć drożdże mezofilne, takie jak *Saccharomyces cerevisiae*, w tym także naturalnie fermentujące ksylozę *Scheffersomyces stipitis*, *Pachysolen tannophilus* itp. (**P6**), (Ishchuk et al., 2009)
- ◆ rosną na ksylozie oraz fermentują ten cukier (Ryabova et al., 2003) i przekształcają glicerol do etanolu (Suwannarangsee et al., 2010)
- ◆ niska wydajność produkcji etanolu przez dzikie szczepy może być ulepszona przy użyciu współcześnie używanych technik inżynierii metabolicznej (Kata et al., 2016; **P1**)

Jak zaznaczono powyżej, mimo prawie identycznego obfitego wzrostu *O. polymorpha* tak na glukozie, jak i na ksylozie, poziom etanolu wytwarzanego z ksylozy przez dziki szczep jest aż 200 razy niższy niż z glukozy. Przyczyny tego zjawiska nie były dostatecznie zbadane do czasu rozpoczęcia badań zgłoszonych jako osiągnięcie naukowe. Swoje zainteresowania w tej tematyce rozwijałam już podczas przygotowywania mojej pracy doktorskiej. Praca naukowa w tej dziedzinie przyczyniła się do rozpoznania wielu wąskich miejsc (z ang.: *bottlenecks*) w procesie przekształcenia ksylozy do etanolu, co w konsekwencji pozwoliło obecnie na skonstruowanie szczepów *O. polymorpha* produkujących 40-50 razy więcej etanolu z ksylozy w porównaniu ze szczepem dzikim. W toku mojej pracy doktorskiej skonstruowałam szczepy ze zwiększoną 25-30-krotnie produkcją etanolu z ksylozy w porównaniu ze szczepem dzikim. W tym celu przeprowadzona została inżynieria białkowa pierwszego enzymu katabolizmu ksylozy, reduktazy ksylozy (XR, EC 1.1.1.21) oraz nadeksprimowano 3 geny pierwszych etapów metabolizmu tego cukru *XYL1m*, *XYL2*, *XYL3* a także po raz pierwszy wykorzystano pozytywną selekcję producentów etanolu poszukując mutantów opornych do inhibitora glikolizy 3-bromopirogronianu (Kurylenko et al., 2014). Dodatkowo w tym celu przeprowadzono delecję genu *CAT8* kodującego czynnik transkrypcji. Jednak wydajność skonstruowanych podczas wykonywania mojej pracy doktorskiej szczepów była zbyt niska, a wiedza na temat czynników ograniczających efektywną produkcję etanolu z surowców odnawialnych wciąż niewystarczająca.

Podsumowując zatem, bezpośrednimi przesłankami, które skłoniły mnie do podjęcia badań były:

- ◆ zbyt powolny metabolizm pentoz (ksyloza, L-arabinoza), w tym ich przekształcanie do etanolu (fermentacja alkoholowa)
- ◆ brak wiedzy na temat możliwej roli peroksysomów oraz autofagii w metabolizmie i fermentacji ksylozy
- ◆ niedostatecznie wydajny transport pentoz do wnętrza komórki
- ◆ występowanie tak zwanej represji katabolicznej wywoływanej przez glukozę, co ogranicza możliwości jednoczesnego przekształcania mieszaniny cukrów oraz faworyzowanie metabolizmu glukozy w pierwszej kolejności

- ◆ niedostateczna wiedza na temat roli czynników transkrypcyjnych w procesie fermentacji alkoholowej

oraz wiele innych.

Wymienione wyżej aspekty skłoniły mnie do badania następujących problemów, które zostały ujęte jako osiągnięcie naukowe:

- ◆ wyjaśnienia roli czynników transkrypcyjnych w metabolizmie ksylozy
- ◆ zbadania roli autofagii w alkoholowej fermentacji ksylozy
- ◆ wyjaśnienia roli peroksysomów oraz enzymów persoksysomalnych w metabolizmie ksylozy u drożdży metylotroficznych
- ◆ konstruowania szczepów o znacznie bardziej wydajnej fermentacji alkoholowej ksylozy w podwyższonej temperaturze.

Moje badania zgłoszone jako osiągnięcie naukowe pozwoliły na znalezienie nowych wąskich miejsc powodujących ograniczenia w szlaku konwersji ksylozy do etanolu, a z drugiej strony, skonstruowałam mutanty z coraz to większą zdolnością do przekształcenia ksylozy do etanolu w podwyższonej temperaturze (45°C). Dzięki moim pracom po raz pierwszy udowodniona została rola czynników transkrypcyjnych (Cat8, Hap4-A, Mig1) w alkoholowej fermentacji ksylozy (**P1**; **P2**). Dodatkowo zaobserwowałam po raz pierwszy rolę peroksysomów w fermentacji ksylozy (ale nie glukozy) oraz znaczenie enzymów peroksysomalnych (transketolaza, inna nazwa, syntaza dihydroksyacetonu, EC 2.2.1.3 oraz transaldolaza, EC 2.2.1.2) w tym procesie (**P4**; **P5**). Ponadto udało się udowodnić ważną rolę autofagii, zwłaszcza genu *ATG13*, w alkoholowej fermentacji ksylozy (**P3**).

W procesie konstruowania wydajnych producentów etanolu z ksylozy wykorzystywałam nowoczesne metody inżynierii metabolicznej oraz oryginalne sposoby klasycznej selekcji. Wśród metod inżynierii metabolicznej, skutecznie wykorzystywałam metody delekcji oraz nadekspresji genów kodujących czynniki transkrypcji *CAT8*, *HAP4-A*, *MIG1* (**P1**; **P2**), delekcji i nadekspresji genów kodujących peroksysomalne transketolazę *DAS1* i transaldolazę *TAL2*, a także cytozolowych transketolazy *TKL1* i transaldolazy *TAL1* (**P4**; **P5**). Dzięki konstruowaniu zrekombinowanych fluorescencyjnych białek oraz mikroskopii fluorescencyjnej udowodniłam peroksysomalną lokalizację transaldolazy Tal2 (**P4**). Dodatkowo przy pomocy inżynierii białkowej zmodyfikowałam transporter heksoz *O. polymorpha* Hxt1 w taki sposób, że może on aktywnie transportować

ksylozę do komórki i jego aktywność nie jest hamowana przez glukozę (Vasylyshyn et al., 2020). Rolę czynnika transkrypcji Cat8 zaczęłam badać jeszcze podczas wykonania mojej pracy doktorskiej, którą obroniłam w 2015 r., jednak właśnie w niniejszym osiągnięciu naukowym zbadalam rolę tego czynnika znacznie bardziej szczegółowo. Zwłaszcza uzyskane zostały szczepy z nadekspresją genu *CAT8* i zbadano wpływ takiej nadekspresji na alkoholową fermentację ksylozy; delecje oraz nadekspresje tego genu zostały potwierdzone z pomocą qRT-PCR; dodatkowo zostały oznaczone właściwe aktywności enzymów metabolizmu ksylozy u transformantów i akumulację produktów ubocznych, w tym ksylitolu (**P1**). Kontynuując ten kierunek badań zwróciłam uwagę na szereg innych czynników transkrypcji uczestniczących w regulacji katabolizmu źródeł węgla u drożdży i zbadalam rolę aktywatorów transkrypcji Hap4-A i Hap4-B oraz represorów transkrypcji Tup1, Mig1 oraz Mig2 w regulacji alkoholowej fermentacji ksylozy u drożdży *O. polymorpha* (**P2**). Po raz pierwszy udało się udowodnić ważną rolę autofagii, zwłaszcza genu *ATG13* (**P3**) a także peroksysomów, peroksysomalnych i cytozolowych transketolaz i transaldolaz (**P4**) w regulacji alkoholowej fermentacji ksylozy.

Na podstawie analizy literatury w dziedzinie fermentacji alkoholowej ksylozy, włącznie z moimi własnymi wynikami, postawiłam hipotezę, iż możliwe jest dalsze ulepszenie charakterystyk alkoholowej fermentacji ksylozy u *O. polymorpha* poprzez selekcję mutantów zdolnych do wzrostu na innej pentozie, L-arabinozie, jako jedynym źródle węgla i energii (**P6**). Hipoteza ta została już potwierdzona przez wstępne dane eksperymentalne i będzie weryfikowana w dalszej pracy naukowej. Ta nowa metoda selekcji pozwoliła na uzyskanie mutantów gromadzących 20 g etanolu/L z ksylozy w temperaturze 45°C, co 50 krotnie przewyższa stężenie etanolu produkowanego z ksylozy przez szczep dziki *O. polymorpha* (0,4 g/L).

Przewodnim celem badawczym zbioru sześciu artykułów przedstawionych jako osiągnięcie naukowe było poznanie czynników wpływających na metabolizm ksylozy u niekonwencjonalnych termotolerancyjnych drożdży *O. polymorpha* w celu zwiększenia wydajności produkcji etanolu.

Podsumowując, opisane prace badawcze zgłoszone jako osiągnięcie naukowe pozwoliły na identyfikację dotąd nieznanych genów uczestniczących

w metabolizmie i fermentacji ksylozy oraz wykorzystaniu uzyskanych danych tych podstawowych badań do konstruowania ulepszonych producentów etanolu z ksylozy u termotolerancyjnych drożdży *O. polymorpha*.

**Poniżej przedstawiam szczegółowy opis sześciu prac wchodzących w cykl artykułów stanowiących osiągnięcie naukowe:**

**Publikacja nr 1 (P1):**

**Ruchala J**, Kurylenko OO, Soontorngun N, Dmytruk KV, Sibirny AA. Transcriptional activator Cat8 is involved in regulation of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Microb Cell Fact.* 2017; 16(1):36. doi: 10.1186/s12934-017-0652-6. (IF<sub>2017</sub> **3,831**; MEiN<sub>2017</sub>= **35**).

Badania prowadzone w ramach publikacji numer 1 wykonywałam w ramach współpracy z zagranicznymi ośrodkami naukowymi – Instytutem Biologii Komórki Narodowej Akademii Nauk Ukrainy we Lwowie (Ukraina) oraz Królewskim Uniwersytetem im. Króla Mongkuta w Bangkoku (Tajlandia). Ponadto finansowane były dzięki wsparciu m.in. dwóch projektów naukowych (*Research and Training Grant*, Europejska Federacja Towarzystw Mikrobiologicznych FEMS, nr projektu: FEMS-RG-2015-0096 – kierownik projektu oraz Opus, Narodowego Centrum Nauki, nr projektu: 2012/05/B/NZ1/01657 – wykonawca projektu). Część badań wykonywana była przeze mnie podczas moich staży naukowych w Królewskim Uniwersytecie im. Króla Mongkuta w Bangkoku, Tajlandia (1 miesiąc), a także Instytucie Biologii Komórki NAN Ukrainy we Lwowie (3 miesiące). Celem było zbadania roli czynnika transkrypcyjnego *CAT8* u niekonwencjonalnych drożdży *O. polymorpha* w metabolizmie i alkoholowej fermentacji glukozy oraz ksylozy. Gen *CAT8* koduje aktywator transkrypcji klastra palca cynkowego niezbędny do ekspresji genów zaangażowanych w glukoneogenezę, oddychanie, cykl gliksalowy i metabolizm etanolu. Opisane funkcje czynnika transkrypcyjnego Cat8 (kodowanego przez gen *CAT8*) w aktywacji wielu procesów metabolicznych u *S. cerevisiae*, głównie glukoneogenezie i utylizacji etanolu, doprowadziły mnie do wysunięcia hipotezy, że może być on również zaangażowany w regulację metabolizmu ksylozy u *O. polymorpha*. Jednym z powodów, dla których

wybrano właśnie *CAT8* spośród wielu genów kodujących czynniki transkrypcyjne zaangażowane w metabolizm węgla były badania, w myśl których *knock-out* genu *CAT8* prowadzi do aktywowania fermentacji alkoholowej glukozy u *S. cerevisiae* (Watanabe et al. 2010) i u niekonwencjonalnych drożdży *Pichia guilliermondii* (Qi et al., 2014). W ramach niniejszej pracy wyizolowałam mutanty delecyjne genu *CAT8* w tle genetycznym szczepu dzikiego i dotychczas najlepszego producenta etanolu otrzymanego w toku wcześniejszych badań (BEP = *Best Ethanol Producer*). Delecja genu *CAT8* u *O. polymorpha* nie spowodowała żadnych istotnych zmian w produkcji etanolu z glukozy, natomiast zaobserwowano dwukrotny wzrost fermentacji alkoholowej ksylozy u szczepu dzikiego i 25% wzrost produkcji etanolu u szczepu BEP. Przyczyny tej różnicy nie są do końca zrozumiałe, jednak ważną różnicą między glukozą a ksylozą jest zaangażowanie enzymów glukoneogenezy w wytwarzanie heksoz podczas wzrostu na ksylozie, ale nie na glukozie. Dlatego bardzo prawdopodobne jest, że hamowanie glukoneogenezy u mutantów *cat8Δ* przekierowuje więcej substratu węglowego z ksylozy w kierunku katabolizmu i fermentacji, natomiast podczas wzrostu na glukozie glukoneogeneza (a więc także możliwe jej hamowanie u mutantów *cat8Δ*) nie odgrywa większej roli. Dodatkowo uważam, że delecja u mutantów *cat8Δ* przekierowuje metabolizm ksylozy z oddychania komórkowego (cyklu Krebsa oraz fosforylacji oksydacyjnej) na fermentację, co także prowadzi do zwiększenia produkcji etanolu. Dziwnym jest, że u mutantów *cat8Δ* drożdży *S. cerevisiae* i *P. guilliermondii* zaobserwowano nieznaczne zwiększenie produkcji etanolu z glukozy (Watanabe et al. 2010; Qi et al., 2014). Należy również podkreślić, że oddychanie komórkowe mutantów *cat8Δ* na ksylozie było uszkodzone w większym stopniu niż na glukozie jako substracie. Przyczyną wzrostu produkcji etanolu z ksylozy przez delecyjne szczepy *cat8Δ* może być zaobserwowana przeze mnie aktywacja ksylulokinazy, dehydrogenazy alkoholowej i epimerazy rybulozofosforanowej (EC 5.1.3.1), które mogą być czynnikami ograniczającymi podczas fermentacji alkoholowej ksylozy. Ciekawe natomiast, że nadekspresja genu *CAT8* znacząco obniżała produkcję etanolu z ksylozy.

**Podsumowując, w tej pracy po raz pierwszy u drożdży naturalnie zdolnych do metabolizmu i fermentacji ksylozy na przykładzie**

***O. polymorpha*, zidentyfikowany został czynnik transkrypcji, biorący specyficznym udział w regulacji fermentacji alkoholowej tej pentozy.**

**Najważniejsze osiągnięcia publikacji nr 1:**

- ◆ skonstruowałam delecyjne mutanty genu *CAT8* w genetycznym tle szczepu dzikiego oraz najlepszego dotychczas wyizolowanego producenta etanolu
- ◆ skonstruowałam szczepy z nadekspresją genu *CAT8*
- ◆ zbadalam fizjologiczne (wzrost, oddychanie, fermentacje), genetyczne (ekspresję szeregu genów) i biochemiczne (aktywności właściwe enzymów metabolizmu ksylozy) charakterystyki mutantów z delecją i nadekspresją genu *CAT8*
- ◆ udowodniłam specyficzną rolę aktywatora transkrypcji *Cat8* w alkoholowej fermentacji ksylozy u metylotroficznych, naturalnie metabolizujących ksylozę drożdży *O. polymorpha*.

**Publikacja nr 2 (P2):**

Kurylenko O#, **Ruchala J#**, Kruk B., Vasylyshyn R, Szczepaniak J, Dmytruk K, Sibirny A. The role of Mig1, Mig2, Tup1 and Hap4 transcription factors in regulation of xylose and glucose fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. FEMS Yeast Res. 2021; 21(4): foab029. doi: 10.1093/femsyr/foab029. (IF<sub>2019</sub> **2,796**; MEiN<sub>2020</sub> = **100**).

# równorzędni autorzy

Badania prowadzone w publikacji nr 2 prowadziłam również w Instytucie Biologii Komórki Narodowej Akademii Nauk Ukrainy we Lwowie (Ukraina), co podkreślone jest również afiliacją tej jednostki przy moim nazwisku. Badania w ramach tej publikacji prowadzone były dzięki finansowaniu grantu Narodowego Centrum Nauki – Opus, nr projektu: 2016/21/B/NZ1/00280, którego byłam wykonawcą.

W poprzedniej publikacji udowodniłam istotną rolę czynnika transkrypcyjnego *Cat8* w fermentacji alkoholowej ksylozy u *O. polymorpha*, co skłoniło mnie do dalszych badań w tej dziedzinie. Istnieje ponad 100 regulatorów transkrypcji (aktywatorów i represorów) zidentyfikowanych u drożdży, głównie

u *S. cerevisiae* (Turcotte et al., 2010). Zdecydowałam się zatem na zbadanie czynników transkrypcyjnych, które przypuszczalnie mogą być zaangażowane w metabolizm cukrów u *O. polymorpha*. Obejmują one opisane wcześniej przez naszą grupę dwa ortologi aktywatora transkrypcji u *S. cerevisiae* Hap4 – Hap4-A oraz Hap4-B (Sybirna et al., 2005, 2010) oraz represory transkrypcji Mig1, Mig2 i Tup1 (Stasyk et al., 2007). Głównym celem niniejszej pracy było przeanalizowanie roli genów *MIG1*, *MIG2*, *TUP1* i *HAP4* *O. polymorpha* pod kątem ich możliwości regulacji metabolizmu oraz fermentacji ksylozy i glukozy. Poszukiwania w genomowej bazie danych drożdży *O. polymorpha* ujawniło obecność dwóch przypuszczalnych ortologów represora transkrypcji *S. cerevisiae* Mig1 kodujących białko palca cynkowego C2H2 (Stasyk et al. 2007). Stwierdzono, że u *O. polymorpha* Mig1, Mig2 oraz Tup1 praktycznie nie biorą udziału w represji katabolicznej zlokalizowanej w peroksysomach oksydazy alkoholowej (Oliveira et al., 2003; Stasyk et al. 2007). Jednocześnie niedobór Tup1 prowadzi do całkowitego defektu makropeksofagii indukowanej przez glukozę lub etanol, w przeciwieństwie do Mig1 i Mig2, które tylko częściowo uczestniczą w peksofagii (Leao-Helder et al., 2004; Stasyk et al. 2007).

Badania przeze mnie prowadzone w ramach niniejszej publikacji zawierały konstruowanie szczepów z nadekspresją genów wymienionych czynników transkrypcji, gdyż wcześniej skonstruowane były tylko mutanty delecyjne. Badania uzyskanych wcześniej i w toku niniejszej pracy szczepów pozwoliły na udowodnienie roli wyżej wymienionych czynników transkrypcyjnych w metabolizmie ksylozy i glukozy u naturalnie fermentujących ksylozę drożdży *O. polymorpha*, co jest pierwszym takim doniesieniem w literaturze naukowej. Porównałam wpływ delecji i nadekspresji genów *MIG1*, *MIG2*, *TUP1*, *HAP4-A* i *HAP4-B* *O. polymorpha* na metabolizm i fermentację glukozy i ksylozy. Otrzymane wyniki sugerują, że rola Mig1 nie jest kluczowa dla regulacji metabolizmu glukozy w *O. polymorpha*, jednak jednoczesna delecja *MIG1* i *MIG2* spowodowała istotne zmniejszenie utylizacji glukozy i produkcji etanolu z glukozy. Również u podwójnego mutantu *mig1Δ mig2Δ* zaobserwowałam spadek produkcji etanolu z ksylozy, jednak w mniejszym stopniu niż z glukozy. Ponadto w pracy udowodniono, że poziom ekspresji *HAP4-A* jest bardziej istotny dla metabolizmu i fermentacji ksylozy niż glukozy. Zaobserwowałam, że delecja

genu *HAP4-A* zwiększyła, a jego nadekspresja zmniejszyła produkcję etanolu z ksylozy. Delecja genu *TUP1* spowodowała aktywację alkoholowej fermentacji ksylozy, ale co ciekawe zmniejszyła produkcję etanolu na podłożu z glukozą. Niemniej jednak wysoki poziom ekspresji *TUP1* negatywnie wpłynął zarówno na fermentację glukozy, jak i ksylozy. Podsumowując, udowodniona została rozbieżność roli Mig1, Hap4-A i Tup1 w regulacji metabolizmu oraz fermentacji glukozy i ksylozy u drożdży *O. polymorpha*. Ważnym podkreślenia jest fakt, że w toku pracy nad powyższą publikacją po raz pierwszy udowodniona została rola aktywatora transkrypcji Tup1 w negatywnej regulacji metabolizmu oraz fermentacji ksylozy u *O. polymorpha*, chociaż mechanizm tego działania wciąż pozostaje nieznany, a jego zgłębienie wymaga dalszych badań.

### Najważniejsze osiągnięcia publikacji nr 2

- ◆ udowodniłam, iż poziom ekspresji genu *Hap4-A* jest bardziej istotny dla metabolizmu i fermentacji ksylozy niż glukozy
- ◆ udowodniłam kluczową rolę Mig1 w regulacji metabolizmu glukozy u *O. polymorpha*
- ◆ udowodniłam rolę aktywatora transkrypcji Tup1 jako negatywnego regulatora metabolizmu i fermentacji u *O. polymorpha*
- ◆ zaproponowałam nowe sposoby konstruowania ulepszonych producentów etanolu z ksylozy poprzez delecje genów czynników transkrypcyjnych *HAP4-A* oraz *TUP1*.

### Publikacja nr 3 (P3):

Dmytruk KV, **Ruchala J**, Grabek-Lejko D, Puchalski C, Bulbotka NV, Sibirny AA. Autophagy-related gene *ATG13* is involved in control of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. FEMS Yeast Res. 2018; 18(2):foy010. doi: 10.1093/femsyr/foy010. (IF<sub>2018</sub> 2,458; MEiN<sub>2017</sub>= 30).

Badania prowadzone w ramach publikacji numer 3 wykonywałam wykorzystując metody inżynierii genetycznej w ramach współpracy z zagranicznym ośrodkiem naukowym – Instytutem Biologii Komórki Narodowej Akademii Nauk Ukrainy

we Lwowie (Ukraina). Badania prowadzone były w ramach grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, Opus, nr projektu: 2016/21/B/NZ1/00280, którego byłam wykonawcą.

W wyniku mutagenезy insercyjnej i selekcji dzikiego szczepu drożdży *O. polymorpha* na podłożu z 3-bromopirogronianem (3-BrPA) wyizolowano szczep (# 63), który charakteryzował się 50% zwiększeniem produkcji etanolu z ksylozy w porównaniu do szczepu dzikiego NCYC495 leu1-1, ale nie z glukozy. Sekwencjonowanie regionów flankujących ujawniło, że kasetta insercyjna zmieniła sekwencję ORF genu homologicznego do genu *ATG13* *S. cerevisiae*. Gen ten koduje podjednostkę regulatorową kompleksu sygnałowego Atg1-Atg13, stymulując aktywność kinazy Atg1, która jest wymagana do tworzenia pęcherzyków podczas autofagii i szlaku kierowania z cytoplazmy do wakuoli. Wykazano przy tym, że kasetta insercyjna została wbudowana w gen *ATG13* w pozycji +1272 pz od początkowego kodonu ATG. Gen *ATG13* u drożdży *S. cerevisiae* bierze udział w inicjacji autofagii, a mutant *atg13Δ* wykazywał defekty autofagii (Alers et al., 2014).

Zdecydowano się także na skonstruowanie delecyjnego szczepu genu *ATG13*. Co ciekawe okazało się, że szczep ten zdolny jest do produkcji zwiększonych ilości etanolu z ksylozy, podobnie jak mutant insercyjny, nie wpływając przy tym na alkoholową fermentację glukozy. Analiza poziomu ekspresji wybranych genów związanych z metabolizmem ksylozy wykazała, iż delecja genu *ATG13* znacząco zwiększa ekspresję genów *PDC1*, a zwłaszcza *DAS1* i *AOX1*, co sugeruje możliwy udział Atg13 w negatywnej regulacji ekspresji *PDC1*, *DAS1* i *AOX1*. Zbadałam również właściwą aktywność enzymów początkowych reakcji szlaku metabolizmu ksylozy - reduktazy ksylozy (XR, EC 1.1.1.21), dehydrogenazy ksylitolu (XDH, EC 1.1.1.9) oraz dehydrogenazy alkoholowej (ADH, EC 1.1.1.1) u szczepu insercyjnego oraz delecyjnego *atg13Δ*. Aktywność XR była nieznacznie obniżona, podczas gdy aktywność XDH i ADH wykazywała niewielki wzrost w porównaniu do szczepu typu dzikiego. Uzyskane wyniki mogą wyjaśniać przyczyny wzrostu produkcji etanolu w czasie alkoholowej fermentacji ksylozy przez szczepy #63 i *atg13Δ*, ponieważ w naszych poprzednich pracach nadekspresja *XYL2*, *PDC1*, *ADH1* i *DAS1* w tle szczepu typu dzikiego

doprowadziła do zwiększonej produkcji etanolu z różnych substratów (Kurylenko et al., 2014, 2016).

**Podsumowując uzyskane dane po raz pierwszy pozwoliły udowodnić potencjalne biotechnologiczne znaczenie autofagii, a zwłaszcza genu *ATG13*.**

**Najważniejsze osiągnięcia publikacji nr 3:**

- ◆ wykazałam i opisałam nową funkcję *Atg13* z *O. polymorpha* jako negatywnego regulatora alkoholowej fermentacji ksylozy
- ◆ po raz pierwszy zbadałam funkcję genu *ATG13* w autofagii u *O. polymorpha*
- ◆ wykazałam, że delecja genu *ATG13* *O. polymorpha*, podobnie do insercji w tym genie, prowadzi do zwiększonej produkcji etanolu z ksylozy, a jednocześnie odpowiada za derepresję kilku genów zaangażowanych w katabolizm ksylozy i fermentację alkoholową

**Publikacja nr 4 (P4):**

Kurylenko OO#, **Ruchala J#**, Vasylyshyn RV, Stasyk OV, Dmytruk OV, Dmytruk KV, Sibirny AA. Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Biotechnol Biofuels*. 2018; 11:197. doi: 10.1186/s13068-018-1203-z. (IF<sub>2018</sub> **5,452**; MEiN<sub>2017</sub>= **45**).

# równorzędni autorzy

Badania prowadzone w ramach publikacji numer 4 wykonywałam we współpracy z zagranicznym ośrodkiem naukowym – Instytutem Biologii Komórki Narodowej Akademii Nauk Ukrainy we Lwowie (Ukraina). W ramach grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki – Opus, nr projektu: 2016/21/B/NZ1/00280, którego byłam wykonawcą.

Głównym zadaniem badawczym postawionym w publikacji numer 4 było wyjaśnienie roli peroksysomów oraz kilku enzymów peroksysomalnych podczas

alkoholowej fermentacji ksylozy u metylotroficznych drożdży. Peroksysomy są organellami, które zazwyczaj zawierają enzymy wytwarzające nadtlenek wodoru oraz katalazę. Większość peroksysomów u różnych organizmów zawiera enzymy uczestniczące w  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych. Peroksysomy u grzybów i roślin również zawierają niektóre enzymy cyklu kwasu glioksylanowego. Jednak peroksysomy są metabolicznie wszechstronnymi organellami zawierającymi enzymy katalizujące liczne reakcje kataboliczne i niektóre reakcje biosyntezy, na przykład biosyntezy penicyliny. U drożdży peroksysomy biorą udział w katabolizmie wielu źródeł węgla i azotu, takich jak metanol, n-alkany, puryny, D-aminokwasy, metyloamina, etyloamina, kwas pipekolowy, sarkozyna, glikolan i spermidyna. Badania wykazały, że niektóre enzymy glikolityczne u *Cryptococcus neoformans* i *Ustilago maydis* charakteryzują się podwójną lokalizacją zarówno w cytozolu, jak i peroksysomach. Co ważne, defekty w peroksysomalnej lokalizacji białek glikolitycznych lub niedostateczna biogeneza peroksysomów upośledzały wzrost tych organizmów na glukozie. *Candida albicans* i gatunki pokrewne charakteryzują się ponadto cytozolową i peroksysomalną lokalizacją enzymów oksydacyjnej części szlaku pentozofosforanowego, a mianowicie dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (EC 1.1.1.49) i dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej (EC 1.1.1.43) (Sibirny, 2016). Na początku zbadalam zdolność do wzrostu i fermentacji ksylozy u mutantów z defektem biogenezy peroksysomów w wyniku delecji genu *PEX3* u *O. polymorpha* i dla porównania u niemetylotroficznego gatunku *Scheffersomyces stipitis*. Okazało się, że mutanty *pex3Δ O. polymorpha* wykazują zaburzenia fermentacji ksylozy (jednak wzrost na tej pentozie był normalny), natomiast mutant *pex3Δ S. stipitis* normalnie fermentował tę pentozę. W pracy tej wysunęłam hipotezę o ważnej roli peroksysomów oraz peroksysomalnych enzymów szlaku pentozofosforanowego w alkoholowej fermentacji ksylozy. W genomowej bazie danych drożdży *O. polymorpha* znaleziono gen oznaczony (przez nas) jako *TAL2*, który zawiera sekwencję sygnałową PTS1 i koduje peroksysomalną transaldolazę (Tal2). Udowodniłam, że białko to znajduje się w peroksysomach podczas hodowali na glukozie, ksylozie lub metanolu jako źródłach węgla. Zaobserwowano również w toku badań, że zarówno peroksysomalna transketolaza, jak i transaldolaza nie są niezbędne do wzrostu na ksylozie jako jedynym źródle węgla i energii,

w przeciwieństwie do ich cytozolowych odpowiedników, Tkl1 i Tal1, ale są wymagane do fermentacji ksylozy do etanolu. Natomiast *knock-out* genów kodujących cytozolową transketolazę *TKL1* i transaldolazę *TAL1* spowodował całkowite zahamowanie wzrostu na ksylozie, jednocześnie tylko częściowo hamując fermentację tego cukru. Należy zatem stwierdzić, że peroksysosomalna transaldolaza nie bierze udziału w metabolizmie metanolu u *O. polymorpha*, natomiast rola peroksysosomalnej transketolazy w metabolizmie metanolu u drożdży metylotroficznych została opisana wiele lat temu (Veenhuis et al., 1983; Rußmayer et al., 2015). Udowodniłam również, że nadekspresja *DAS1* i/lub *TAL2* zwiększała produkcję etanolu z ksylozy (podobnie jak efekt nadekspresji *TKL1* i *TAL1*). Dodatkowo doprowadziłam do jednoczesnej nadekspresji genów *DAS1* i *TAL2* u dotychczasowego najlepszego producenta etanolu z ksylozy zawierającego delecję genu *CAT8* (*cat8Δ*) (**P1**); pozwoliło to uzyskać szczepy gromadzące około 16 g etanolu w litrze, co 40 razy przewyższa poziom etanolu syntetyzowany przez szczep dziki (0,4 g/L). Wartym podkreślenia jest że, nadekspresja *DAS1* i/lub *TAL2* wpływały na fermentację ksylozy, ale nie na fermentację glukozy. Można zatem przypuszczać, że nadekspresja genów *DAS1* i *TAL2* zwiększa produkcję pentozofosforanów i w taki sposób aktywuje metabolizm ksylozy u *O. polymorpha*. Wciąż jednak pozostają do wyjaśnienia specyficzne mechanizmy zaangażowania *Das1* i *Tal2* w regulację fermentacji ksylozy. Nie można wykluczyć, że peroksysomy są wymagane do fermentacji ksylozy do etanolu ze względu na lokalizację enzymów *Das1* i *Tal2* w tych organellach.

**Podsumowując, w pracy po raz pierwszy udowodniłam rolę peroksysomów i enzymów peroksysomalnych w fermentacji alkoholowej ksylozy.**

#### **Najważniejsze osiągnięcia publikacji nr 4:**

- ◆ udowodniłam, że fermentacja ksylozy do etanolu u metylotroficznych termotolerancyjnych drożdży *O. polymorpha*, zależy od funkcjonalnej peroksysomalnej transketolazy (*Das1*) i transaldolazy (*Tal2*), podczas gdy ich odpowiedniki cytozolowe (*Tkl1* i *Tal1*) są niezbędne do wzrostu na tej pentozie

- ◆ wykazałam, że defekt w biogenezie peroksysomów w wyniku mutacji *pex3Δ* u *O. polymorpha* silnie uszkadza alkoholową fermentację ksylozy nie wykazując żadnego wpływu na ten proces u niemetylotroficznego gatunku *S. stipitis*
- ◆ wykazałam, że delecja genów *DAS1* i *TAL2* kodujących odpowiednio peroksysomalne transketolazę i transaldolazę silnie ograniczały zdolność fermentacji alkoholowej ksylozy
- ◆ stwierdziłam, że alkoholowa fermentacja glukozy nie zależy od peroksysomalnych i cytozolowych transketolaz i transaldolaz
- ◆ pokazałam, że jednoczesna ekspresja peroksysomalnej transketolazy i transaldolazy we wcześniej wyizolowanym, zaawansowanym producencie etanolu z ksylozy dodatkowo zwiększyła akumulację etanolu do 16,1 g /L w temp. 45 ° C.

#### **Publikacja nr 5 (P5):**

**Ruchala J**, Kurylenko OO, Dmytruk KV, Sibirny AA. Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2020; 47(1):109-132. doi: 10.1007/s10295-019-02242-x. (IF<sub>2020</sub> **3,346**; MEiN<sub>2020</sub>= **100**).

Uzyskane w toku badań wyniki dotyczące konstruowania niekonwencjonalnych szczepów drożdży w celu produkcji etanolu paliwowego skłoniły mnie do napisania publikacji naukowej, która byłaby podsumowaniem aktualnego stanu wiedzy w tej tematyce. Praca ta powstała we współpracy z naukowcami z Instytutu Biologii Komórki Narodowej Akademii Nauk Ukrainy we Lwowie (Ukraina) oraz w ramach grantu, którego byłam wykonawcą finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki – Opus, nr projektu 2016/21/B/NZ1/00280, a także grantu Podkarpackiego Centrum Innowacji (PCI), nr projektu 06/UR/1/DG/PCI/2019, w którym byłam kierownikiem.

W tej przeglądowej pracy omówiono główne metody konstruowania ulepszonych producentów etanolu z ksylozy u konwencjonalnych drożdży *S. cerevisiae* (naturalnie niezdolnych do metabolizowania ksylozy) oraz niekonwencjonalnych

drożdży *S. stipitis* i *O. polymorpha* naturalnie zdolnych do metabolizmu i fermentacji ksylozy. Przegląd ilustruje sposoby konstruowania szczepów *S. cerevisiae* zdolnych do metabolizmu i fermentacji ksylozy oraz metody ulepszania tych zdolności głównie za pomocą inżynierii metabolicznej. Drożdże *S. stipitis* należą do jednych z najbardziej wydajnych naturalnych producentów etanolu z ksylozy i mogą być rozpatrywane jako „konwencjonalne” i najlepiej zbadane wśród wszystkich drożdży naturalnie zdolnych do fermentacji ksylozy. Podkreśla się, że najlepsze skonstruowane szczepy *S. cerevisiae* ustępują dzikim szczepom *S. stipitis* pod względem wydajności produkcji etanolu. Jednak *S. stipitis* wykazują inne wady, na przykład, niską odporność na etanol oraz inhibitory znajdujące się w hydrolizatach lignocelulozy. W niniejszej publikacji porównałam wyniki własnych badań eksperymentalnych prowadzonych na *O. polymorpha* z tymi uzyskanymi u *S. cerevisiae* i *S. stipitis*. W niniejszej publikacji podkreślam zalety własnego obiektu badań tj. *O. polymorpha*, w tym jego termotolerancji, dobrze opracowanych metod molekularnej genetyki, naturalnej zdolności do metabolizmu ksylozy, posiadania statusu GRAS, względnie wysokiej odporności na etanol. W artykule omówiłam również własne dane eksperymentalne uzyskane na wszystkich trzech gatunkach, w tym dane o roli czynnika transkrypcji Cat8 oraz peroksysomalnych i cytozolowych transketolaz Das1 i Tkl1 i transaldolaz Tal2 i Tal1 w fermentacji alkoholowej ksylozy u *O. polymorpha*. Opisałam również nowe metody pozytywnej selekcji mutantów *S. cerevisiae* produkujących podwyższone ilości etanolu oraz insercyjne mutanty *S. stipitis* ze zwiększoną produkcją etanolu z ksylozy i glukozy, zwłaszcza mutantą z uszkodzeniem genu *HEM25*. Artykuł kończy się konkluzją zawierającą propozycje, na jakie cechy drożdży trzeba zwrócić uwagę w celu uzyskania konkurencyjnych producentów etanolu z lignocelulozy, w tym ksylozy.

#### **Najważniejsze osiągnięcia publikacji nr 5:**

- ◆ podsumowałam najnowszą wiedzę w dziedzinie konstruowania najlepszych producentów etanolu z ksylozy, głównie drożdży *S. cerevisiae*, *S. stipitis* i *O. polymorpha*
- ◆ streściłam najważniejsze osiągnięcia własne, w tym zaproponowałam nowe kierunki badań w dziedzinie izolowania wydajnych producentów etanolu z ksylozy.

**Publikacja nr 6 (P6):**

**Ruchala J**, Sibirny AA. Pentose metabolism and conversion to biofuels and high-value chemicals in yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* 2020: fuaa069. doi: 10.1093/femsre/fuaa069. (IF<sub>2019</sub> 16,408; MEiN<sub>2020</sub>= 200).

Praca ta powstała we współpracy z naukowcami z Instytutu Biologii Komórki Narodowej Akademii Nauk Ukrainy we Lwowie (Ukraina) oraz w ramach grantu, którego byłam wykonawcą finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki – Opus, nr projektu 2020/37/B/NZ1/02232.

W niniejszej pracy przeglądowej dokonano podsumowania najnowszych informacji dotyczących szlaków metabolicznych, które zachodzą u drożdży podczas przekształcania wszystkich naturalnych pentoz, nie tylko ksylozy i L- arabinozy, które to często omawiane są w literaturze. W pracy opisano także zagadnienia związane z metabolizmem rybozy, 2-deoksyrybozy, D-arabinozy oraz liksozy.

Praca ta jest szczególnie ważna, ponieważ do chwili jej ukazania nie było opracowań naukowych, które na tyle szeroko obejmowałyby metabolizm wszystkich naturalnych pentoz. Przegląd dotyczy wielu gatunków drożdży, w tym *S. cerevisiae*, *S. stipitis*, *Scheffersomyces shehatae*, *Pachysolen tannophilus*, *Spathaspora passalidarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *O. polymorpha*, *Candida intermedia*, *Candida tenuis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *Komagataella phaffii*, z których większość naturalnie zdolna jest do metabolizmu ksylozy, natomiast trzy z nich (*S. cerevisiae*, *K. phaffii*, *Y. lipolytica*) naturalnie nie metabolizują tej pentozy, jednak nabyły one taką zdolność w wyniku inżynierii metabolicznej. Przegląd zawiera opis szlaków metabolizmu pentoz, genetyki poszczególnych gatunków, ich biotechnologicznego potencjału, nie tylko dotyczącego produkcji etanolu, ale także innych cennych substancji, na przykład, kwasu mlekowego, ksylitolu, izobutanolu, lipidów oraz kwasów tłuszczowych. Praca ta również podsumowuje badania w tematyce jednoczesnego metabolizmu glukozy, ksylozy oraz L- arabinozy oraz dotyczące sposobów hamowania lub całkowitego usuwania represji katabolicznej, która uniemożliwia jednoczesną utylizację glukozy i pentoz. Celem niniejszej pracy była również dyskusja na temat możliwego wykorzystania drożdży do przemysłowej produkcji rybozy – cukru ze znacznym

zapotrzebowaniem w różnych dziedzinach gospodarki, głównie w farmacji. Artykuł kończy podsumowanie obecnych danych uzyskanych dzięki analizie ponad 600 źródeł literatury, ale także wskazuje na możliwe kierunki rozwoju przyszłych badań. Kierunkami takimi mogą być opracowanie nowych metod selekcji szczepów z ulepszoną wydajnością syntezy etanolu oraz innych substancji z ksylozy oraz hydrolizatów lignocelulozy, zwiększenia odporności drożdży do inhibitorów znajdujących w tychże hydrolizatach, bardziej efektywnej jednoczesnej utylizacji glukozy oraz hydrolizatów pentoz, konstruowania szczepów drożdży zdolnych do hydrolizy polisacharydów lignocelulozy kolejno z fermentacją lub przekształceniem produktów hydrolizy do cennych produktów. W podsumowaniu zaproponowałam ponadto potencjalnym czytelnikom/badaczom zwrócenie szczególnej uwagi na rolę czynników transkrypcji w regulacji metabolizmu i fermentacji ksylozy oraz innych pentoz. Przegląd zawiera także kilka ważnych, dotąd nieopublikowanych własnych danych, zwłaszcza o nowej skutecznej metodzie pozytywnej selekcji ulepszonych producentów etanolu z ksylozy poprzez uzyskanie mutantów wykazujących obfity wzrost na innej pentozie - L-arabinozie.

### **Najważniejsze osiągnięcia publikacji nr 6:**

- ◆ zebrałam najnowszą wiedzę o metabolizmie pentoz, nie tylko ksylozy i L-arabinozy, ale również rybozy, 2-deoksyrybozy, D-arabinozy oraz liksozy
- ◆ szczegółowo opisałam możliwości konwersji pentoz do etanolu, innych cennych biotechnologicznie produktów (kwasu mlekowego, ksylitolu, izobutanolu, lipidów oraz kwasów tłuszczowych) oraz potencjał biotechnologiczny odpowiednich gatunków i szczepów drożdżowych

### **Podsumowanie osiągnięcia naukowego:**

Przedstawiony cykl prac prezentuje osiągnięcie naukowe pozwalające na poznanie mechanizmów związanych z regulacją metabolizmu cukrów znajdujących się w polimerach lignocelulozy (głównie ksylozy). Najważniejszym moim osiągnięciem bez wątpienia jest udowodnienie po raz pierwszy regulatorowej roli czynników transkrypcji w fermentacji alkoholowej ksylozy

u drożdży naturalnie metabolizujących ksylozę na przykładzie *O. polymorpha*, mianowicie aktywatorów transkrypcji Cat8 i Hap4-A i Hap4-B oraz represorów Tup1, Mig1 i Mig2. Znaczenie czynników transkrypcji w regulacji fermentacji alkoholowej, zwłaszcza u drożdży naturalnie zdolnych do metabolizmu pentoz dotychczas było przeoczone lub negowane, ale dzięki moim pracom kolejne grupy badawcze na świecie zwracają uwagę na to zjawisko (Wei et al., 2018; Martinez et al., 2019; Xie et al., 2020; Dzanaeva et al., 2021; Li et al., 2021). Moje wyniki w tej dziedzinie, będąc podstawowymi, zostały wykorzystane w celu konstruowania ulepszanego producenta etanolu z ksylozy poprzez delecję genu jednego z aktywatorów transkrypcji, *CAT8*, u ulepszanego, przy pomocy innych metod, producenta etanolu z ksylozy. Odkryłam również, że autofagia (degradacja materiału komórkowego zachodząca w wakuolach) bierze udział w regulacji fermentacji ksylozy. Na korzyść tego wniosku świadczą dane o zwiększeniu produkcji etanolu z ksylozy w wyniku insercji lub delecji genu *ATG13*, produkt którego, razem z produktem genu *ATG1* inicjuje autofagię. Prowadzone przeze mnie badania pozwoliły także na udowodnienie roli peroksysomów w alkoholowej fermentacji ksylozy u drożdży *O. polymorpha*. Udowodniłam ponadto, że fermentacja ksylozy do etanolu u metylotroficznych termotolerancyjnych drożdży *O. polymorpha* zależy od funkcjonalnej peroksysomalnej transketolazy (*Das1*) i transaldolazy (*Tal2*), podczas gdy ich odpowiedniki cytozolowe (*Tkl1* i *Tal1*) są niezbędne do wzrostu na tej pentozie. Wiedza ta pozwoliła na skonstruowanie szczepu charakteryzującego się zwiększoną akumulacją etanolu do 16,1 g/L w temp. 45°C (40-krotnie więcej w porównaniu ze szczepami typu dzikiego) w tle genetycznym wcześniej wyizolowanego szczepu poprzez jednoczesną nadekspresję peroksysomalnej transketolazy i transaldolazy. Warto zauważyć, że wymienione enzymy (transketolaza, transaldolaza) nie są zaangażowane w regulację fermentacji alkoholowej glukozy. Ważnym podkreślenia jest, że przy pomocy nowej pozytywnej metody selekcji polegającej na izolacji mutantów formujących kolonie na L-arabinozie, uzyskano szczepy gromadzące 20 g/L etanolu z ksylozy, co 50-krotnie przewyższa poziom etanolu u szczepu dzikiego. Wyniki te pozwalają na potencjalne praktyczne zastosowanie wyizolowanych przeze mnie szczepów i stanowią absolutny rekord w tak wysokiej temperaturze, gdyż są bliskie poziomowi uzyskanemu dla najlepszych szczepów drożdży mezofilnych

w temperaturze 30°C. Jeśli porównać akumulację etanolu z ksylozy przez skonstruowane w trakcie inżynierii metabolicznej szczepy innego gatunku drożdży termotolerancyjnych *Kluyveromyces marxianus*, to wykazują one maksymalną zdolność do produkcji etanolu w temperaturach 40 – 42°C, gdyż w temperaturze 45°C ich zdolność do produkcji etanolu zasadniczo spada. Dodatkowo wszystkie znane szczepy *K. marxianus* gromadzą wysokie stężenia niepożądanego ksylitolu, natomiast szczepy skonstruowane w toku wykonywania niniejszego osiągnięcia naukowego nie gromadzą widocznych ilości tego ubocznego produktu fermentacji alkoholowej (Zhang et al., 2015; Suzuki et al., 2019, **P1**). W zasadzie dotychczasowa selekcja ulepszonych producentów etanolu z ksylozy głównie polegała na inżynierii białkowej pierwszego lub drugiego enzymu katabolizmu ksylozy oraz na nadekspresji pierwszych trzech genów tego szlaku *XYL1*, *XYL2*, *XYL3*. Jako pierwsza wdrożyłam do praktyki selekcji ulepszonych szczepów drożdży niekonwencjonalnych delecję genów czynników transkrypcyjnych (na przykładzie *CAT8*) oraz nadekspresję genów kodujących peroksysomalne enzymy transketolazy i transaldolazy (**P1**; **P4**). Także po raz pierwszy wprowadziłam do praktyki izolowanie ulepszonych producentów poprzez selekcję mutantów opornych na czynnik przeciwnowotworowy 3-bromopirogronian oraz selekcję mutantów zdolnych do obfitego wzrostu na innej pentozie, L-arabinozie (**P6**). Przy tym wartym podkreślenia jest fakt, że praca została wykonana z użyciem nowoczesnych metod genetyki molekularnej oraz biochemii drobnoustrojów, w tym klonowania molekularnego, aktywacji (nadekspresji) lub inaktywacji (delecji) sklonowanych genów, wielokopijnej integracji wprowadzanych genów, analizy ich ekspresji, oznaczania właściwej aktywności enzymów oraz stężenia metabolitów, a także mikroskopii fluorescencyjnej.

### **Perspektywy badań**

W toku przyszłych prac planuję zidentyfikować nowe geny regulatorowe zaangażowane w fermentację alkoholową ksylozy u drożdży *O. polymorpha*, ponieważ dysponujemy już wstępnymi danymi na podstawie opracowanych przeze mnie nowych metod pozytywnej selekcji mutantów regulatorowych. Jedną z już wspomnianych metod polega na selekcji mutantów, które tworzą duże kolonie na L-arabinozie, natomiast druga – na selekcji mutantów

*O. polymorpha* opornych do hamowania wzrostu przez galaktozę (niemetabolizowany cukier przez *O. polymorpha*) na ksylozie. W przypadku pierwszej metody mutanty syntetyzują więcej etanolu z ksylozy, natomiast drugiej (mutanty odporne na galaktozę) nie są zdolne do fermentowania ksylozy w ogóle. Po zidentyfikowaniu odpowiednich genów planuję nadekspymować je oraz poddawać delecji w celu skonstruowania bardziej wydajnego termotolerancyjnego producenta etanolu z ksylozy, który gromadziłby blisko 30 g etanolu /L z tej pentozy w podwyższonej temperaturze 45°C (obecnie najlepsze moje szczepy gromadzą 20 g /L, podczas gdy szczep typu dzikiego wytwarza tylko 0,4 g etanolu/L). Szczególna uwaga zostanie zwrócona na konstruowanie szczepów *O. polymorpha*, które jednocześnie wykorzystują i fermentują glukozę i ksylozę. Cel ten zostanie osiągnięty dzięki modyfikacji genów odpowiedzialnych za transport cukrów u *O. polymorpha*, które powodują zwiększenie powinowactwa transporterów do ksylozy i zmniejszenie do glukozy. Kolejnym celem będą badania metabolizmu i fermentacji alkoholowej trzeciego pod względem ilości cukru w biosferze, po glukozie i ksylozie, tj. L-arabinozy. Odkryłam, że można wyselekcjonować mutanty *O. polymorpha*, które rosną na L- arabinozie i wytwarzają pewne ilości etanolu z tej pentozy, chociaż są one bardzo niskie (metoda otrzymywania takich mutantów pozwoliła na dokonanie zgłoszenia patentowego aktualnie rozpatrywanego (Urząd Patentowy RP), **P.435340**. Sposoby uzyskania drożdżowych producentów etanolu z ksylozy z termotolerancyjnych drożdży *Ogataea polymorpha*, data rejestracji 15.09.2020, podmiot zgłaszający Uniwersytet Rzeszowski, Podkarpackie Centrum Innowacji Sp. Z. O. O., Rzeszów, Polska – efekt realizacji projektu finansowanego przez Podkarpackie Centrum Innowacji, którego byłam kierownikiem, nr projektu 06/UR/1/DG/PCI/2019. Ponadto opracowuję nową strategię, dzięki której możliwe będzie wyizolowanie drożdży *O. polymorpha* zdolnych do efektywnej jednoczesnej fermentacji wszystkich głównych cukrów hydrolizatów lignocelulozy, glukozy, ksylozy i L-arabinozy w podwyższonych temperaturach. Będzie to ważny krok na drodze konstruowania nowoczesnego, wydajnego, termotolerancyjnego drożdżowego producenta bioetanolu drugiej generacji z odnawialnego surowca – lignocelulozy.

Wyniki badań prezentowane w cyklu habilitacyjnym były przedstawione na licznych konferencjach, tak krajowych, jak i zagranicznych, m.in.: w Gdańsku, Wrocławiu, Rzeszowie, Lwowie (Ukraina), Kijowie (Ukraina), Novej Goricy (Słowenia), Levico Terme (Włochy).

### **Bibliografia:**

1. Abdel-Banat BM, Hoshida H, Ano A, Nonklang S, Akada R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 85(4):861-7. doi: 10.1007/s00253-009-2248-5.
2. Alers S, Wesselborg S, Stork B. *ATG13*: just a companion, or an executor of the autophagic program? *Autophagy*. 2014;10(6):944-56. doi: 10.4161/auto.28987. Erratum in: *Autophagy*. 2014;10(8):1481.
3. Baig KS. Interaction of enzymes with lignocellulosic materials: causes, mechanism and influencing factors. *Bioresour Bioprocess*, 2020; 7( 21). doi: 10.1186/s40643-020-00310-0
4. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*. 2014;24(1):24-41. doi: 10.1038/cr.2013.168.
5. Ishchuk OP, Voronovsky AY, Abbas CA, Sibirny AA. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance. *Biotechnol Bioeng*. 2009; 104(5):911-9. doi: 10.1002/bit.22457.
6. Kiel JA, Komduur JA, van der Klei IJ, Veenhuis M. Macropexophagy in *Hansenula polymorpha*: facts and views. *FEBS Lett*. 2003;549(1-3):1-6. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00794-4.
7. Leão-Helder AN, Krikken AM, Lunenborg MG, Kiel JA, Veenhuis M, van der Klei IJ. *Hansenula polymorpha* Tup1p is important for peroxisome degradation. *FEMS Yeast Res*. 2004; 4(8):789-94. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.04.006.
8. Li B, Wang L, Wu YJ, Xia ZY, Yang BX, Tang YQ. Improving acetic acid and furfural resistance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains by regulating novel transcription factors revealed via comparative transcriptomic analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2021;87(10):e00158-21. doi: 10.1128/AEM.00158-21.
9. Lopes ML, Paulillo SC, Godoy A, Cherubin RA, Lorenzi MS, Giometti FH, Bernardino CD, Amorim Neto HB, Amorim HV. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Braz J Microbiol*. 2016;47(1):64-76. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.003.
10. Martinez R, Flores AD, Dufault ME, Wang X. The XylR variant (R121C and P363S) releases arabinose-induced catabolite repression on xylose fermentation and enhances coutilization of lignocellulosic sugar mixtures. *Biotechnol Bioeng*. 2019;116(12):3476-3481. doi: 10.1002/bit.27144.
11. Marz U. Yeasts, yeast extracts, autolysates and related products: the global market. BCC Research Report Code: CHM053B, 2014.

12. Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels*. 2008;1(1):7. doi: 10.1186/1754-6834-1-7.
13. Oliveira MA, Genu V, Salmazo APT, Dirce MC, Pereira I GAG. The transcription factor Snf1p is involved in a Tup1p-independent manner in the glucose regulation of the major methanol metabolism genes of *Hansenula polymorpha*. *Genet Mol Biol*. 2003; 26:521–28. doi.org/10.1590/S1415-47572003000400017.
14. Qi K, Zhong JJ, Xia XX. Triggering respirofermentative metabolism in the crabtree-negative yeast *Pichia guilliermondii* by disrupting the *CAT8* gene. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80(13):3879-87. doi: 10.1128/AEM.00854-14.
15. Rosales-Calderon O, Arantes V. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnol Biofuels*, 2019;12:240. doi:10.1186/s13068-019-1529-1
16. Rußmayer H, Buchetics M, Gruber C, Valli M, Grillitsch K, Modarres G, Guerrasio R, Klavins K, Neubauer S, Drexler H, Steiger M, Troyer C, Al Chalabi A, Krebichl G, Sonntag D, Zellnig G, Daum G, Graf AB, Altmann F, Koellensperger G, Hann S, Sauer M, Mattanovich D, Gasser B. Systems-level organization of yeast methylotrophic lifestyle. *BMC Biol*. 2015;13:80. doi: 10.1186/s12915-015-0186-5.
17. Ryabova OB, Chmil OM, Sibirny AA. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res*. 2003; 4(2):157-64. doi: 10.1016/S1567-1356(03)00146-6.
18. Sawin JL, Seyboth K, Sverrisson F, Adib R, Murdock HE, Musolino FAABBE, et al. *Renewables*. 2016 Global status report. 2016. ISBN: 978-3-9818107-0-7.
19. Sibirny AA. Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. *FEMS Yeast Res*. 2016;16(4):fow038. doi: 10.1093/femsyr/fow038
20. Stasyk OG, van Zutphen T, Ah Kang H, Stasyk OV, Veenhuis M, Sibirny AA. The role of *Hansenula polymorpha* *MIG1* homologues in catabolite repression and pexophagy. *FEMS Yeast Res*. 2007; 7(7):1103-13. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00286.x.
21. Suwannarangsee S, Oh DB, Seo JW, Kim CH, Rhee SK, Kang HA, Chulalaksananukul W, Kwon O. Characterization of alcohol dehydrogenase 1 of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 88(2):497-507. doi: 10.1007/s00253-010-2752-7.
22. Sybirna K, Guiard B, Li YF, Bao WG, Bolotin-Fukuhara M, Delahodde A. A new *Hansenula polymorpha* *HAP4* homologue which contains only the N-terminal conserved domain of the protein is fully functional in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2005; 47(3):172-81. doi: 10.1007/s00294-004-0556-y.
23. Sybirna K, Petryk N, Zhou YF, Sibirny A, Bolotin-Fukuhara M. A novel *Hansenula polymorpha* transcriptional factor HpHAP4-B, able to functionally replace the *S. cerevisiae* *HAP4* gene, contains an additional bZip motif. *Yeast*. 2010; 27(11):941-54. doi: 10.1002/yea.1802.

24. Turcotte B, Liang XB, Robert F, Soontorngun N. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res.* 2010; 10(1):2-13. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00555.x.
25. Ubiyvovk VM, Ananin VM, Malyshev AY, Kang HA, Sibirny AA. Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *BMC Biotechnol.* 2011;11:8. doi: 10.1186/1472-6750-11-8.
26. Veenhuis M, Douma A, Harder W, Osumi M. Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. *Arch Microbiol.* 1983;134(3):193-203. doi: 10.1007/BF00407757.
27. Watanabe T, Srichuwong S, Arakane M, Tamiya S, Yoshinaga M, Watanabe I, Yamamoto M, Ando A, Tokuyasu K, Nakamura T. Selection of stress-tolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash to ethanol. *Bioresour Technol.* 2010; 101(24):9710-4. doi: 10.1016/j.biortech.2010.07.079.
28. Wei S, Liu Y, Wu M, Ma T, Bai X, Hou J, Shen Y, Bao X. Disruption of the transcription factors *Thi2p* and *Nrm1p* alleviates the post-glucose effect on xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels.* 2018;11:112. doi: 10.1186/s13068-018-1112-1.
29. Xie CY, Yang BX, Song QR, Xia ZY, Gou M, Tang YQ. Different transcriptional responses of haploid and diploid *S. cerevisiae* strains to changes in cofactor preference of XR. *Microb Cell Fact.* 2020;19(1):211. doi: 10.1186/s12934-020-01474-2.

**Niniejsze osiągnięcie naukowe zrealizowałam nie tylko w macierzystej uczelni, ale także w ramach współprac naukowych:**

- ◆ Instytut Biologii Komórki Narodowej Akademii Nauk Ukrainy, Lwów, Ukraina

Część badań prezentowanych w ramach „osiągnięcia naukowego” wykonywane były podczas moich wielokrotnych pobytów w tej jednostce. Rezultatem tego są liczne publikacje naukowe wykonywane w ramach tej współpracy. Warto wspomnieć, że konstruowanie szczepów oraz oznaczenia metabolitów za pomocą HPLC w ramach publikacji **P2**. przeprowadzałam we współpracy z dr hab. Kostyantyn Dmytruk oraz dr Olena Kurylenko w Instytucie Biologii Komórki Narodowej Akademii Nauk Ukrainy we Lwowie podczas mojego pobytu w tej instytucji. Z tego też powodu publikację afiliuję adresem mojej macierzystej instytucji, tj. Uniwersytetu Rzeszowskiego, ale i Instytutu Biologii Komórki NAN Ukrainy we Lwowie. Co ciekawe z uwagi na moje wieloletnie zainteresowanie naukowe tematem metabolizmu pentoz oraz doświadczenie w tej dziedzinie,

moje liczne rozmowy z kolegami ze wspomnianego instytutu we Lwowie i dzięki wymianie poglądów w tej tematyce, powstała publikacja przeglądowa **P6**. Z wyżej wymienionych powodów oraz zważywszy na ścisłą wieloletnią współpracę, a także przedstawienie w publikacji rezultatów badań, również tych otrzymanych przeze mnie w toku mojego pobytu w Instytucie Biologii Komórki, we wspomnianym artykule również widnieje afiliacja wspomnianej jednostki. Pragnę przy tym podkreślić, że współpraca jest kontynuowana.

**W pracach zawarto wyniki uzyskane podczas realizacji następujących projektów badawczych:**

- ◆ Federacja Europejskich Stowarzyszeń Mikrobiologicznych, FEMS-RG-2015-0096.R1 (2016), tytuł: „Studying the role of *CAT8* transcriptional activator in the yeast xylose alcoholic fermentation” – kierownik projektu
- ◆ Narodowe Centrum Nauki, 2016/21/B/NZ1/00280 (2017 – 2020), tytuł: „Rola czynników transkrypcyjnych w regulacji metabolizmu oraz fermentacji glukozy i ksylozy u niekonwencjonalnych drożdży *Ogataea polymorpha*” – wykonawca, współautor projektu
- ◆ Narodowe Centrum Nauki, 2020/37/B/NZ1/02232 (2021 – 2024), tytuł: „Genetyczna kontrola metabolizmu oraz fermentacji alkoholowej pentoz (D-ksyloza, L-arabinoza) u termotolerancyjnych drożdży *Ogataea polymorpha*” – wykonawca, współautor projektu
- ◆ Podkarpackie Centrum Innowacji, 06/UR/1/DG/PCI/2019 (2020), tytuł: „Konstruowanie szczepów drożdży zdolnych do wydajnej wysokotemperaturowej fermentacji glukozy i ksylozy” – kierownik projektu
- ◆ Podkarpackie Centrum Innowacji, 13/UR/1/DG/PCI/2019 (2020), tytuł: „Uzyskanie preparatów ryboflawiny (witaminy B2) na serwatce przy pomocy drożdży *Candida famata*” – wykonawca projektu, współautor projektu
- ◆ Narodowe Centrum Nauki, 2018/29/B/NZ1/01497 (2019 – 2022), tytuł: „Mechanizmy regulatorowe zaangażowane w nadprodukcję ryboflawiny u flawinogennych drożdży *Candida famata*” – wykonawca, współautor projektu

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

### A.) Praca naukowa

Moje zainteresowania od początku mojej działalności akademickiej skupione są wokół biotechnologii drożdży niekonwencjonalnych, w swoich badaniach podejmowałam różne zagadnienia wokół tego tematu.

W swojej pracy naukowej wykorzystywałam metody klasycznej mikrobiologii, a także najnowsze techniki inżynierii genetycznej oraz biochemii. Moimi modelami badawczymi były drożdże, ze szczególnym uwzględnieniem drożdży konwencjonalnych (*S. cerevisiae*) oraz niekonwencjonalnych (*O. polymorpha*, *Komagataella phaffii*, *S. (Pichia) stipitis*), a także bakterie *Streptomyces davaonensis*. Badania te zaowocowały artykułami naukowymi, rozdziałami w monografiach, współpracą krajową oraz międzynarodową (szczegółowe osiągnięcia przedstawiono w **załączniku nr 4**).

Mój całkowity dorobek (punktacja zgodna z rokiem publikacji) obejmuje:

Sumaryczny <i>Impact Factor</i> (punkty MEiN)	Stanowiący „osiągnięcie naukowe”	Bez uwzględnienia artykułów stanowiących główne „osiągnięcie naukowe”	Z uwzględnieniem artykułów stanowiących główne „osiągnięcie naukowe”
<b>Całkowity</b>	34,291 (510)	69,185 (1150)	103,476 (1660)
<b>Przed uzyskaniem stopnia doktora</b>	0 (0)	4,221 (40)	4,221 (40)
<b>Po uzyskaniu stopnia doktora</b>	34,291 (510)	64,964 (1110)	99,255 (1620)

Mój dorobek można podzielić według następującej tematyki badań:

### **5.1. Konstruowanie aktywnych drożdżowych producentów biopaliw**

Moim głównym tematem badawczym jest konstruowanie aktywnych drożdżowych producentów biopaliw, czego potwierdzeniem są liczne publikacje naukowe, które nie znalazły się w osiągnięciu naukowym. Przy pomocy inżynierii białkowej oraz nadekspresji genów transporterów cukrów udało się skonstruować mutanty *O. polymorpha* zdolne do jednoczesnego metabolizmu i fermentacji ksylozy i glukozy (Vasylyshyn et al., 2020). Interesuje mnie również rola czynników transkrypcyjnych oraz genów regulatorowych związanych z alkoholową fermentacją cukrów u drożdży konwencjonalnych, byłam kierownikiem naukowym stażu doktorantki Królewskiego Uniwersytetu im. Króla Mongkuta (Bangkok, Tajlandia) Pani Pattanan Songdech prowadzącej badania w moim laboratorium o tematyce czynników transkrypcyjnych (Songdech et al., 2020). Uczestniczyłam w badaniach nad rolą peroksysomów, enzymów peroksysomalnych oraz czynników transkrypcyjnych Znf1, Sip4, Adr1, Tup1, and Hap4 w katabolizmie ksylozy u drożdży *S. cerevisiae* (Dzanaeva et al., 2020; 2021). Należy zaznaczyć, że prace te zostały rozpoczęte po moich publikacjach dotyczących roli czynnika transkrypcyjnego Cat8 i enzymów peroksysomalnych w fermentacji alkoholowej ksylozy u *O. polymorpha* (**P1, P4**). Brałam udział w badaniu insercyjnych mutantów u innego gatunku drożdży naturalnie fermentujących ksylozę, *S. stipitis*, co skutkowało identyfikacją genu *HEM25* uczestniczącym w regulacji alkoholowej fermentacji ksylozy oraz glukozy (Berezka et al., 2021). Jak wspomniano wcześniej byłam kierownikiem projektu naukowego finansowanego przez Podkarpackie Centrum Innowacji, dotyczącym dalszego udoskonalania obecnego producenta etanolu z ksylozy. W trakcie wykonania projektu została opracowana nowa metoda pozytywnej selekcji mutantów *O. polymorpha* produkujących zwiększone ilości etanolu z ksylozy i został złożony wniosek patentowy **P.435340**. Sposoby uzyskania drożdżowych producentów etanolu z ksylozy z termotolerancyjnych drożdży *Ogataea polymorpha* (patrz powyżej). Warto wspomnieć, że interesuje mnie również badanie syntezy wyższych alkoholi przez drożdże niekonwencjonalne. Zaobserwowałam, że wielojądrowe drożdże z gigantycznymi komórkami

*Magnusiomyces magnusii* wytwarzają duże ilości izobutanolu, około 20-30 razy więcej niż znane drożdże piekarnicze *S. cerevisiae* (Kurylenko et al., 2020). Byłam również zaangażowana w badanie syntezy glicerolu i jego biokonwersji do etanolu u drożdży (Kata et al., 2016; Semkiv et al, 2020).

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Dzanaeva L, Kruk B, **Ruchala J**, Sibirny A, Dmytruk K. The impact of transcription factors Znf1, Sip4, Adr1, Tup1, and Hap4 on xylose alcoholic fermentation in the engineered yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2021;25. doi: 10.1007/s10482-021-01607-6. **IF 2,271; MEiN: 70**
2. Berezka K, Semkiv M, Borbuliak M, Blomqvist J, Linder T, **Ruchala J**, Dmytruk K, Passoth V, Sibirny A. Insertional tagging of the *Scheffersomyces stipitis* gene *HEM25* involved in regulation of glucose and xylose alcoholic fermentation. *Cell Biol Int*. 2021; 45(3):507-517. doi: 10.1002/cbin.11284. **IF 3,612; MEiN: 70**
3. Vasylyshyn R, Kurylenko O, **Ruchala J**, Shevchuk N, Kuliesiene N, Khroustalyova G, Rapoport A, Daugelavicius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast. *Microb Cell Fact*. 2020; 19(1):96. doi: 10.21203/rs.2.22909/v1 . **IF 5,328; MEiN: 100**
4. Dzanaeva L, Kruk B, **Ruchala J**, Nielsen J, Sibirny A, Dmytruk K. The role of peroxisomes in xylose alcoholic fermentation in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int*. 2020; 44(8):1606-1615. doi: 10.1002/cbin.11353. **IF 3,612; MEiN: 70**
5. Dzanaeva L, Ruchala J, Sibirny A, Dmytruk K. The impact of transcriptional factors Znf1 and Sip4 on xylose alcoholic fermentation in recombinant strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytol Genet*. 2020; 54(5): 386-392. doi: 10.3103/S0095452720050035. **IF 0,579; MEiN: 20**
6. Kurylenko OO, **Ruchala J**, Dmytruk KV, Abbas CA, Sibirny AA. Multinuclear yeast *Magnusiomyces (Dipodascus, Endomyces) magnusii*

- is a promising isobutanol producer. *Biotechnol J.* 2020; 15(7):e1900490. doi: 10.1002/biot.201900490. **IF 4,677; MEiN: 100**
7. Semkiv MV, **Ruchala J**, Dmytruk KV, Sibirny AA. 100 Years Later, What Is New in Glycerol Bioproduction? *Trends Biotechnol.* 2020; 38(8):907-916. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.02.001. **IF 19,536; MEiN: 200**
  8. Songdech P, **Ruchala J**, Semkiv MV, Jensen LT, Sibirny A, Ratanakhanokchai K, Soontorngun N. Overexpression of transcription factor *ZNF1* of glycolysis improves bioethanol productivity under high glucose concentration and enhances acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J.* 2020; 15(7):e1900492. doi: 10.1002/biot.201900492. **IF 4,667; MEiN: 100**
  9. Kurylenko O, Semkiv M, **Ruchala J**, Hryniv O, Kshanovska B, Abbas C, Dmytruk K, Sibirny A. New approaches for improving the production of the 1st and 2nd generation ethanol by yeast. *Acta Biochim Pol.* 2016; 63(1):31-38. doi: 10.18388/abp.2015\_1156. **IF 1,159; MEiN: 15**
  10. Kata I, Semkiv MV, **Ruchala J**, Dmytruk KV, Sibirny AA. Overexpression of the genes *PDC1* and *ADH1* activates glycerol conversion to ethanol in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Yeast.* 2016; 33(8):471-8. doi: 10.1002/yea.3175. **IF 2,259; MEiN: 25**

Rozdziały w monografiach:

1. Dmytruk KV, Kurylenko OO, **Ruchala J**, Abbas CA, Sibirny AA. Genetic improvement of conventional and nonconventional yeasts for the production of first- and second-generation ethanol. In: Sibirny A. (eds) *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*. Springer, Cham. 2017. doi: 10.1007/978-3-319-58829-2\_1. **MEiN<sub>2017</sub>= 20**
2. Dmytruk K., Kurylenko O., **Ruchala J.**, Ishchuk O., Sibirny A. Development of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as efficient ethanol producer. In: Satyanarayana T, Kunze G (eds) *Yeast Diversity in Human Welfare*. Springer, Singapore. 2017. doi: 10.1007/978-981-10-2621-8\_11. **MEiN<sub>2017</sub>= 20**

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. Kurylenko OO, **Ruchala J**, Hryniv OB, Abbas CA, Dmytruk KV, Sibirny AA. Metabolic engineering and classical selection of the methylotrophic thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation. *Microb Cell Fact.* 2014; 13:122. doi: 10.1186/s12934-014-0122-3. **IF 4,221; MEiN: 40**

Rozdziały w monografiach:

1. Semkiv M, Kurylenko O, **Ruchala J**, Hryniv O, Kshanovska B, Dmytruk K, Sibirny A. Yeast alcoholic fermentation: achievements and challenges. In: Novikov V (eds) *Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology.* Lviv Politechnic National University, Lviv, Ukraine. 2015, 235-248, ISBN 978-617-607-824-1.
2. Semkiv MV, Kurylenko OO, **Ruchala J**, Hryniv OB, Dmytruk KV, Sibirny AA. Yeast metabolic engineering for construction of the advanced bioethanol producers from renewable feedstocks In: Sibirny A, Fedorovych D, Gonchar M, Grabek-Lejko D (eds) *Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds.* University of Rzeszow in corporation with Institute of Cell Biology National Academy of Sciences of Ukraine, Rzeszow. 2015, 333-341, ISBN 978-83-7667-203-8.
3. Kurylenko O, **Ruchala J**, Dmytruk K, Sibirny A. New targets for improvement of xylose alcoholic fermentation in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. In: Sibirny A, Fedorovych D, Gonchar M, Grabek-Lejko D (eds) *Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds.* University of Rzeszow in corporation with Institute of Cell Biology National Academy of Sciences of Ukraine, Rzeszow. 2015, 247-257, ISBN 978-83-7667-203-8.

## **5.2. Genetyczna kontrola produkcji ryboflawiny u flawinogennych drożdży *Candida famata***

Moje kolejne zainteresowanie naukowe dotyczy syntezy ryboflawiny (witaminy B<sub>2</sub>) u flawinogennych drożdży *C. famata*. W ramach tego cyklu badawczego udowodniłam ważną rolę ekskrecji ryboflawiny z komórek oraz biosyntezy

nukleotydów purynowych w nadprodukcji ryboflawiny. Dzięki tym obserwacjom udało mi się skonstruować wydajniejszych producentów witaminy B<sub>2</sub> (Tsyrułnyk et al., 2020; Dmytruk et al., 2020). Udowodnione zostało, że nadekspresja genu drożdży homologicznego do białka BCRP transportującego ryboflawinę z gruczołu mlekowego do mleka u ssaków, prowadzi do nadprodukcji ryboflawiny u drożdży *Candida famata* (Tsyrułnyk et al., 2020). Przy pomocy inżynierii białkowej produktów genów biosyntezy nukleotydów purynowych *de novo* *PRS3* oraz *ADE4* oraz ich nadekspresji udało się ulepszyć istniejącego stabilnego nadproducenta ryboflawiny, gdyż nukleotyd purynowy GTP jest prekursorem w biosyntezie witaminy B<sub>2</sub> (Dmytruk et al., 2020). Odkryłam również, że skonstruowany przez nas szczep *C. famata* wytwarza zwiększoną ilość ryboflawiny w pożywce z serwatką (produkt uboczny przemysłu mleczarskiego) i mam nadzieję, że to odkrycie zostanie wdrożone w praktykę, aby ten uboczny produkt (serwatka) mógł być przekształcany w cenny produkt (witaminę B<sub>2</sub>). Pomysł ten rozwijałam jako wykonawca projektu naukowego finansowanego przez Podkarpackie Centrum Innowacji (nr projektu: 13/UR/1/DG/PCI/2019), efektem którego dokonano zgłoszenia patentowego aktualnie rozpatrywanego (Urząd Patentowy RP), **P.435341**. Nowy szczep drożdży *Candida famata* zdolny do nadprodukcji ryboflawiny, zastosowanie szczepu drożdży *Candida famata* BCRP do wytwarzania ryboflawiny oraz sposób wytwarzania ryboflawiny” 15.09.2020 (data rejestracji), podmiot zgłaszający Uniwersytet Rzeszowski, Podkarpackie Centrum Innowacji Sp. Z.O.O, Rzeszów, Polska. Niedawno także prace nad ryboflawiną znalazły kontynuację w nowym wymiarze: skonstruowałam szczepy niekonwencjonalnych drożdży *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), które wytwarzają bakteryjny antybiotyk flawinowy - aminoryboflawinę. Jest to o tyle ważne, że jest to pierwszy taki przykład, kiedy skonstruowano drożdżowego producenta antybiotyków naturalnie syntetyzowanych przez bakterie. Aminoryboflawina wyizolowana z rekombinowanych drożdży okazała się aktywna przeciwko patogennym bakteriom *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes* (pracowałam nad tym w ramach projektu wymiany polsko-austriackiej na Uniwersytecie Zasobów Naturalnych i Nauk Przyrodniczych, BOKU we Wiedniu, Austria). Podsumowując, moje doświadczenia potwierdzają znaczenie fabryk

komórkowych różnych gatunków drożdży niekonwencjonalnych w produkcji biopaliw, glicerolu, witamin i antybiotyków.

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Tsyurulnyk AO, Andreieva YA, **Ruchala J**, Fayura LR, Dmytruk KV, Fedorovych DV, Sibirny AA. Expression of yeast homolog of the mammal *BCRP* gene coding for riboflavin efflux protein activates vitamin B2 production in the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Yeast*. 2020;37(9-10):467-473. doi: 10.1002/yea.3470. **IF 3,239; MEiN: 70**
2. Dmytruk KV, **Ruchala J**, Fedorovych DV, Ostapiv RD, Sibirny AA. Modulation of the purine pathway for riboflavin production in flavinogenic recombinant strain of the yeast *Candida famata*. *Biotechnol J*. 2020; 15(7):e1900468. doi: 10.1002/biot.201900468. **IF 4,677; MEiN: 100**

### **5.3. Produkcja glutationu przez drożdże**

Kolejny cykl publikacji dotyczy glutationu ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glicyna). Glutation jest głównym tiolem komórki eukariotycznej. Ten tripeptyd jest najważniejszym wewnątrzkomórkowym buforem redoks. Glutation bierze udział w detoksykacji metali ciężkich, ksenobiotyków, rodników tlenu, bierze udział w syntezie DNA oraz innych reakcjach. Glutation jest ważnym produktem biotechnologicznym używanym w medycynie jako lek, zwłaszcza w terapii szeregu nowotworów, jako krioprotektor i immunomodulator, a także w przemyśle spożywczym i kosmetycznym dla usunięcia szkodliwych procesów oksydacyjnych i wiązania toksycznych substancji (Ruchala et al., 2015). Szacowana roczna produkcja glutationu w skali światowej wynosi około 1000 ton na ogólną kwotę około 200 mln dolarów amerykańskich (Marz 2014). Drożdże, a w szczególności drożdże metylotroficzne *O. polymorpha* należą do najbardziej wydajnych producentów glutationu (Ubiyovk et al. 2011). Prowadziliśmy badania, w których wykazaliśmy, że wysuszone komórki szczepów *O. polymorpha* wytwarzających zwiększone ilości glutationu, zachowują dobrą żywotność podczas ich przechowywania. Skonstruowany szczep w ramach zwiększonej produkcji glutationu jest bardziej stabilny podczas przechowywania w stanie suchym niż szczep rodzicielski. Można to wytłumaczyć lepszą ochroną błon wewnątrzkomórkowych podczas odwodnienia komórek przez większe ilości

glutationu w tych komórkach. Specjalna procedura wstępnego uwodnienia suchych komórek w parze wodnej spowodowała odtworzenie prawie 100% odwodnionych komórek. Jednocześnie udowodniliśmy, że odwodnienie – rehydratacja komórek nie wpływa na ich zdolność do produkcji glutationu, co pozwala na stosowanie suchych, aktywnych preparatów *O. polymorpha* w procesach biotechnologicznych związanych z produkcją glutationu (Kurylenko et al., 2019).

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Kurylenko O, Rozenfelde L, Khroustalyova G, Vasylyshyn R, **Ruchala J**, Chang CR, Daugelavicius R, Sibirny A, Rapoport A. Anhydrobiosis in yeasts: Glutathione synthesis by yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha* cells after their dehydration-rehydration. *J Biotechnol.* 2019; 304:28-30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.08.005. **IF 3,503; MNiSW: 70**
2. Muter O, Khroustalyova G, Rimkus A, Kalderis D, **Ruchala J**, Sibirny A, Rapoport A. Evaluation of the enhanced resistance of *Ogataea (Hansenula) polymorpha* to benzalkonium chloride as a resource for bioremediation technologies. *Process Biochem.* 2019; 87:157-163. doi: 10.1016/j.procbio.2019.08.026. **IF 2,952; MNiSW: 70**
3. Kulikova-Borovikova D, Khroustalyova G, Chang CR, Daugelavicius R, Yurkiv M, **Ruchala J**, Sibirny A, Rapoport A. Anhydrobiosis in yeast: Glutathione overproduction improves resistance to dehydration of a recombinant *Ogataea (Hansenula) polymorpha* strain. *Process Biochem.* 2018; 71: 41-44. doi: 10.1016/j.procbio.2018.05.016. **IF 2,883; MNiSW: 30**

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

Rozdziały w monografiach:

1. **Ruchala J**, Kurylenko OO, Sibirny AA. Production of glutathione by yeasts and the role of this thiol in methylotrophic metabolism and xenobiotic detoxification. In: Sibirny A, Fedorovych D, Gonchar M, Grabek-Lejko D (eds) *Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds*. University of

Rzeszow in corporation with Institute of Cell Biology National Academy of Sciences of Ukraine, Rzeszow. 2015, 227-236, ISBN 978-83-7667-203-8.

## B.) Współpraca

### Współpraca międzynarodowa:

Oprócz aktywnego uczestnictwa w licznych konferencjach naukowych, realizuję także współpracę międzynarodową z kilkoma badaczami. Wynikiem tego jest realizacja pewnych zadań badawczych, a także wspólne publikacje naukowe oraz przedsięwzięcia. Prowadzę ścisłą współpracę naukową z **dr hab. Kostyantyn Dmytruk oraz dr Olena Kurylenko** (Instytut Biologii Komórki Narodowej Akademii Nauk Ukrainy, Lwów, Ukraina), rezultatem czego są liczne publikacje naukowe, o których mowa jest w autoreferacie. Ponadto przebywałam na 3- miesięcznym stażu realizując swój projekt naukowy w laboratorium dr hab. Kostyantyn Dmytruk finansowanym przez Federację Europejskich Stowarzyszeń Mikrobiologicznych (FEMS). Rezultatem tego pobytu jest ujęta w osiągnięciu naukowym publikacja naukowa Ruchala et al., 2017 (**P1**).

W ramach tematu konstruowania szczepów drożdży zdolnych do zwiększonej produkcji glutationu nawiązałam współpracę z **prof. Alexander Rapoport** (Uniwersytet Łotewski; Ryga, Łotwa) oraz **prof. Rimantas Daugelavičius** (Vytautas Magnus University; Kowno, Litwa). W ramach nawiązanej współpracy, oprócz publikacji naukowych, wraz z prof. Alexander Rapoport przygotowujemy jako zaproszeni edytorzy specjalne wydanie czasopisma *Fermentation (Impact Factor: 3,975; wydawnictwo MDPI)*.

Jeszcze w czasach studiów doktoranckich miałam przyjemność współpracować z **prof. Volkmar Passoth** (SLU Szwedzki Uniwersytet Rolniczy; Uppsala; Szwecja) oraz nieżyjącym już **prof. Jure Piskur** (Uniwersytet Lund; Lund; Szwecja). Dzięki projektowi Visby, nr projektu: 00577/2010, w roku 2013 przebywałam na 6- miesięcznym stażu naukowym w laboratorium prof. Jure Piskur realizując projekt badawczy o tytule „Disruption of genes of *Dekkera bruxellensis* yeast involved in pathways of amino acid biosynthesis”. Z kolei zainteresowania naukowe **prof. Volkmar Passoth** skierowane były

na fermentację alkoholową drożdży *P. stipitis*, a rezultatem naszej współpracy jest publikacja naukowa Berezka et al., 2021.

Z uwagi na szerzący się globalny problem antybiotykooporności, moje zainteresowania dotyczą także poszukiwania nowych skutecznych leków przeciwdrobnoustrojowych, które byłyby efektywne przeciwko wielu opornym na antybiotyki patogennym bakteriom. Według literatury naukowej, antybiotyk rozeoflawina - naturalny analog ryboflawiny (witamina B2) wytwarzany przez promieniowce *S. davaonensis* i *Streptomyces cinnabarinus* skutecznie hamuje wzrost bakterii Gram-dodatnich, takich jak *S. aureus* i *L. monocytogenes*, a jej chemiczne pochodne wykazują działanie przeciwnowotworowe. Jednak z uwagi na to, że produkuje on dość niskie ilości rozeoflawiny, zdecydowaliśmy się na ekspresję genów związanych z syntezą rozeoflawiny w jednym z najlepszych drożdżowych systemów ekspresyjnych tj. drożdżach *K. phaffii*. Z tego też powodu weszliśmy we współpracę z jedną z najlepszych grup badawczych zajmujących się tym gatunkiem w Europie, której kierownikiem jest **prof. Diethard Mattanovich** (Uniwersytet Zasobów Naturalnych i Nauk Przyrodniczych, BOKU; Wiedeń, Austria). Rezultatem tej współpracy jest projekt wymiany osobowej polsko-austriackiej finansowanej z polskiej strony przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (obecnie tą funkcję przejęła NAWA) o tytule: „Klonowanie genów zaangażowanych w proces biosyntezy antybiotyku rozeoflawiny pochodzących od naturalnych producentów tego związku *Streptomyces davawensis* do komórek drożdży *Candida famata* i *Pichia pastoris* nadproducentów ryboflawiny”, nr projektu: DWM.ZWB.183.218.2015. W ramach tego projektu dwukrotnie przebywałam w laboratorium prof. Diethard Mattanovich (1 miesiąc w 2016; 2 miesiące w 2017) realizując zadania. Rezultaty prezentowane były przeze mnie na konferencjach naukowych w tym podczas 8. Międzynarodowej Konferencji Weigłowskiej (2019); Łódź, Polska a także będąc zaproszonym wykładowcą podczas *35th International Specialised Symposium on Yeasts* (2019), Antalya, Turcja, a także w przygotowaniu jest wspólna publikacja naukowa.

Ponadto jestem również uczestnikiem międzynarodowego programu COST (*European Cooperation in Science and Technology*) o drożdżach YEAST4BIO. Tytuł programu to: „*Non-conventional yeasts for the production*

of *bioproducts*”, a więc dotyczy możliwego biotechnologicznego wykorzystania drożdży niekonwencjonalnych; jestem członkiem grupy WG4: *Bioproducts generation from the sugars platform by non- conventional yeasts*. Program ma na celu stworzenie sieci badaczy w całej Europie, w tym także znalezienie partnerów do składania unijnych projektów badawczych.

Byłam laureatem licznych stypendiów pozwalających na uczestnictwo w konferencjach naukowych organizowanych lub współfinansowanych przez FEMS, m.in.:

- ◆ *FEMS Meeting Grant* na uczestnictwo w the 8<sup>th</sup> Congress of European Microbiologist (FEMS 1019); Glasgow, Szkocja, 2019
- ◆ FEMS Meeting Grant na uczestnictwo w The 33<sup>rd</sup> International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33), Cork, Irlandia, 2017
- ◆ FEMS Meeting Grant na uczestnictwo w *The 6<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists* (FEMS 2015), Maastricht, Holandia, 2015

W 2018 byłam przewodniczącym sekretariatu międzynarodowej konferencji naukowej o drożdżach niekonwencjonalnych „*Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*” organizowanej w Rzeszowie, Polska; która zgromadziła 148 uczestników w tym 117 uczestników zagranicznych reprezentujących 36 krajów.

W 2020 byłam kierownikiem sekretariatu oraz członkiem komitetu naukowego Pierwszej Polskiej Konferencji Drożdżowej (która z uwagi na sytuację epidemiczną została przeniesiona na rok 2022), a także otrzymałam odpowiedni grant FEMS na organizację tej konferencji (*FEMS Meeting Organizer Grant*, numer decyzji: FEMS-GO-2019-569).

Dodatkowo od roku 2013 jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, a od 2021 jestem członkiem zarządu oddziału rzeszowskiego tego towarzystwa.

Recenzje wydawnicze dla czasopism naukowych:

Byłam recenzentem 5 publikacji w międzynarodowych czasopismach naukowych a także 7 projektów naukowych finansowanych przez Narodowa Fundacja Badań Ukrainy (*The National Research Foundation of Ukraine*, NRFU)

Recenzje artykułów dla czasopism JCR:

Recenzowałam artykuły naukowe dla *Microbial Cell Factories* (4) oraz *Current Genetics* (1).

Jestem zaproszonym redaktorem specjalnego numeru czasopisma „*Fermentation*” wydawnictwa MDPI (IF: 3,975).

**C.) Podsumowanie**

Mój dorobek naukowy obejmuje:

**22** prac oryginalnych i artykułów przeglądowych opublikowanych w czasopismach posiadających współczynnik wpływu *impact factor*

**6** prac oryginalnych i artykułów przeglądowych opublikowanych w monografiach  
**3** zgłoszenia patentowe

**56** doniesień konferencyjnych zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych (**54**) i krajowych (**2**), z których **13** to prezentacje ustne przedstawione na zaproszenie

Sumaryczny współczynnik wpływu *impact factor* według listy *Journal Citation Report* zgodny z rokiem publikacji: **103,476**

Sumaryczna punktacja MEiN wszystkich prac, zgodna z rokiem publikacji: **1660**  
Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: **125** (dane z dn. 02.09.2021 r.)

Liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) według bazy Web of Science: **95** (dane z dn. 02.09.2021 r.)

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **6** (02.09.2021 r.) oraz **7** według bazy Scopus (dane z dn. 11.06.2021 r.)

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę:

#### **A.) Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki**

Już od czasów przygotowywania pracy doktorskiej aktywnie włączam się w działalność dydaktyczną w ramach praktyk dydaktycznych. W Uniwersytecie Rzeszowskim, już jako pracownik, prowadzę ćwiczenia laboratoryjne oraz wykłady z przedmiotów takich jak: Mikrobiologia, kierunek Biologia, II rok, I stopnia; Podstawy biotechnologii, kierunek Biologia, III rok, I stopnia; Biologia molekularna, kierunek Biologia, I rok, II stopnia; Nowoczesne techniki inżynierii genetycznej, kierunek Biologia, I rok, II stopnia; Technologie mikrobiologiczne, kierunek Biotechnologia, II rok, I stopnia; Inżynieria genetyczna drobnoustrojów, kierunek Biotechnologia, III rok, I stopnia; Mikrobiologia żywności, kierunek Technologia Żywności i Żywienia Człowieka, I rok, I stopnia; Mikrobiologia, kierunek Rolnictwo, II rok, I stopnia; Agrobiotechnologia, kierunek Rolnictwo, I rok, II stopnia. Prowadziłam także zajęcia – zarówno wykłady, jak i zajęcia laboratoryjne dla studentów ERASMUS+ z przedmiotów *Genetic engineering* oraz *Molecular biology*.

Ponadto od 30 października 2019 r. jestem członkiem Zespołu Programowego kierunku Biologia na Uniwersytecie Rzeszowskim.

#### **B.) Opieka naukowa nad studentami**

Byłam promotorem 2 prac inżynierskich, 4 prac licencjackich (z czego 2 eksperymentalnych) oraz 9 prac magisterskich na kierunkach Technologia żywności i żywienia człowieka oraz Biologia. Obecnie jestem promotorem 5 studentów przygotowujących prace magisterskie, 1 studenta przygotowującego pracę licencjacką oraz 1 studenta przygotowującego pracę inżynierską na kierunkach Biologia oraz Biotechnologia.

#### **C.) Aktywność w kierunku podnoszenia kwalifikacji zawodowych**

W ramach podnoszenia kwalifikacji zawodowych w 2019 r. byłam uczestnikiem międzynarodowej letniej szkoły dla nauczycieli mikrobiologii organizowanej

przez Europejską Federację Towarzystw Mikrobiologicznych (FEMS) oraz Uniwersytet Rzeszowski.

#### **D.) Publikacje popularnonaukowe**

Byłam uczestnikiem czwartej edycji projektu Art & Science, organizowanego przez Instytut Nenckiego PAN oraz Uniwersytet Rzeszowski, a także Fundację Marcellego Nenckiego Wspierania Nauk Biologicznych oraz Nencki Art Collection, w ramach którego powstał artykuł popularnonaukowy oraz zgłoszenie patentowe:

1. Ruchala J. Microbial masterpieces – pigment production by microbes. In: Iskra-Paczkowska A, Wnuk M, Szewczyk A, Fabczak H (eds) 4th Art & Science Projects, The Art of the Origin of Life. University of Rzeszow and Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Science, 2021, 150- 156, ISBN 978-83-7996-845-9.
2. **P. 436255.** Ruchala J, Nikiel A, Wnuk M. Otrzymanie i zastosowanie wyrobu pigmentowego na bazie ekstraktu *Serratia marcescens* jako materiału plastyczno-artystycznego; 12.04.2020 (data rejestracji). Podmiot zgłaszający Uniwersytet Rzeszowski.
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

W latach 2018 – 2021 pełniłam funkcję kierownika zakładu (2018 – 2019, Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski; 2019 – 2021, Zakład Mikrobiologii i Genetyki Molekularnej, Instytut Biologii i Biotechnologii, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, funkcja: kierownik zakładu. Zakład został rozwiązany w związku z reorganizacją struktury Instytutu Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego w wyniku czego kilka zakładów połączono, rezultatem tego powstała Katedra Biologii.

*Justyna Ruchala*