

RECENZJA

osiągnięcia naukowego pt.: „Identyfikacja genów uczestniczących w regulacji metabolizmu i fermentacji ksylozy u termotolerancyjnych drożdży *Ogataea polymorpha* oraz konstruowanie wydajnych producentów etanolu z tej pentozy” stanowiącego podstawę wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz istotnej aktywności naukową realizowanej w więcej niż jednej uczelni (instytucji naukowej) i dorobku naukowo-badawczego, organizacyjnego i dydaktycznego

Doświadczenie naukowe oraz przebieg pracy zawodowej

Pani dr Justyna Magdalena Ruchała otrzymała tytuł magistra biologii w 2011 roku na podstawie przygotowanej pracy magisterskiej pt.: „Zawartość antyoksydantów w powietrzu wydychanym w kolejnych fazach cyklu miesięcznego kobiet” na Uniwersytecie Rzeszowskim. W roku 2015 uzyskała stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, na podstawie rozprawy doktorskiej, pt.: „Konstruowanie szczepów drożdży *Hansenula polymorpha* z ulepszonymi charakterystykami alkoholowej fermentacji ksylozy”, która została przedłożona i obroniona na Uniwersytecie Rzeszowskim, a promotorem pracy był prof. dr hab. Andriy Sybirnyy. W kolejnych latach Pani dr Justyna Ruchała podjęła pracę w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski - URz, jako asystent (lata 2015 -2016) a następnie jako adiunkt (2016-2018). W latach 2018-2019 Kandydatka pracowała w Zakładzie Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biotechnologiczny, URz jako adiunkt; lata 2019-2021 to praca na pozycji adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii i Gentyki Molekularnej, Instytut Biologii i Biotechnologii, Kolegium Nauk Przyrodniczych, URz; obecnie Pani dr Justyna Ruchała pracuje na stanowisku adiunkta w Katedrze Biologii, także w Instytucie Biologii i Biotechnologii, Kolegium Nauk Przyrodniczych, URz. Na uwagę zasługuje doświadczenie w zakresie doskonalenia zawodowego w formie odbytych licznych staży naukowych. I tak, Kandydatka odbyła liczne krótko i długoterminowe staże naukowe w takich uniwersytetach, jak: Uniwersytet w Lund, Szwecja; Instytut Biologii Komórki Narodowej Akademii Nauk Ukrainy, Lwów, Ukraina; Królewski Uniwersytet im. Króla Mongkuta, Bangkok, Tajlandia; Uniwersytet w Liege, Belgia; Uniwersytet Zasobów Naturalnych i Nauk Przyrodniczych, Wiedeń, Austria.

Podsumowując, doświadczenie naukowe oraz przebieg pracy zawodowej Pani dr Justyny Magdaleny Ruchały, wskazuje że Kandydatka wykazuje się wysoką aktywnością zawodową oraz posiada bogate doświadczenie naukowe realizowane w obrębie Uniwersytetu Rzeszowskiego; co ważne, odbyła szereg zagranicznych staży naukowych, które stanowią niezbędny element doskonalenia zawodowego każdego pracownika nauki w zakresie budowania warsztatu badawczego.



Ogólna ocena dorobku naukowego

W skład osiągnięć naukowych Pani dr Justyny Ruchały wchodzi 31 opracowań naukowych, w tym 22 to publikacje, które ukazały się w prestiżowych czasopismach naukowych będących na liście *Journal Citation Reports* (JRC) oraz 6 rozdziałów w monografiach, które zostały wydane przez uznane wydawnictwa naukowe, np. *Springer* (2 pozycje) oraz przez wydawnictwa lokalne (4 pozycje); ponadto, Kandydatka jest współautorem 3 patentów krajowych. Sumaryczny 'Impact Factor - IF' zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 103,476; indeks h=6, całkowita liczba cytowań wynosi 95, z wykluczeniem autocytowań. Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z rokiem publikacji) = 1660. Uwzględniając wartości parametryczną osiągnięcia naukowego na przestrzeni 2011-2021 lat, dorobek naukowy Habilitantki jest dobry, nie tylko biorąc pod uwagę same wskaźniki bibliometryczne, ale także udział prac naukowych, które ukazały się w uznanych czasopismach naukowych.

Ocena osiągnięcia naukowego stanowiące monotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem: „Identyfikacja genów uczestniczących w regulacji metabolizmu i fermentacji ksylozy u termotolerancyjnych drożdży *Ogataea polymorpha* oraz konstruowanie wydajnych producentów etanolu z tej pentozy”

W zakres przedstawionego osiągnięcia naukowego wchodzi cykl sześciu powiązanych tematycznie publikacji naukowych, które ukazały się w uznanych czasopismach naukowych uwzględnionych w basie JCR. Cztery prace, to opracowania o charakterze doświadczalnym oraz dwie to prace przeglądowe.

Zestawie prac zgodnie z wykazem Habilitantki:

- <i>Microbial Cell Factories</i> (2017 rok)	- IF - 3,83	MNiSW - 35 pkt,	cytowanie = 18;
- <i>FEMS Yeast Research</i> (2021 rok)	- IF - 2,79	MNiSW - 100 pkt,	cytowanie = 0;
- <i>FEMS Yeast Research</i> (2018 rok)	- IF - 2,45	MNiSW - 30 pkt,	cytowanie = 3;
- <i>Biotechnology for Biofuels</i> (2018)	- IF - 5,45	MNiSW - 45 pkt,	cytowanie = 11;
- <i>Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology</i> (2020)	- IF - 3,34	MNiSW - 100 pkt,	cytowanie = 14;
- <i>FEMS Microbiology Reviews</i> (2020)	- IF - 16,40	MNiSW - 200 pkt,	cytowanie = 0;

Podsumowując, zaprezentowane osiągnięcie naukowe w ocenie parametrycznej: sumaryczny IF - 34,29, w tym uwzględniając rok publikacji; ilość punktów MNiSW – 510, uwzględniając lata 2017 i powyżej; łączna ilość cytowani – 46. Dorobek naukowy „osiągnięcia” pod względem wskaźników bibliometrycznych nie budzi zastrzeżeń.

Przedłożone do oceny sześć publikacji to opracowania wieloautorskie, w których Habilitantka posiada znaczący udział w realizacji zadań badawczych. Publikacja w czasopiśmie *Microbial Cell Factories* opublikowana w roku 2017 to opracowanie pod tytułem: *Transcriptional activator Cat8 is involved in regulation of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast Ogataea (Hansenula) polymorpha*, autorstwa: Ruchala, J., Kurylenko, O.O., Soontorngun, N.,



Dmytruk, K.V., Sibirny, A.A. - Habilitantka jest pierwszym autorem; publikacja: *FEMS Yeast Research*, pt.: *The role of Mig1, Mig2, Tup1 and Hap4 transcription factors in regulation of xylose and glucose fermentation in the thermotolerant yeast Ogataea polymorpha*, autorstwa Kurylenko, O., Ruchala, J., Kruk, B., Vasylyshyn, R., Szczepaniak, J., Dmytruk, K., Sibirny, A. - Habilitantka jest na prawach pierwszego autora; publikacja *FEMS Yeast Research* 2018, pt., *Autophagy-related gene ATG13 is involved in control of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant methylotrophic yeast Ogataea polymorpha*, autorstwa: Dmytruk, K.V., Ruchala, J., Grabek-Lejko, D., Puchalski, C., Bulbota, N.V., Sibirny, A.A. - Habilitantka jest drugim autorem; publikacja: *Biotechnology for Biofuels*, 2018, pt.: *Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast, Ogataea (Hansenula) polymorpha*, autorstwa: Kurylenko, O.O., Ruchala, J., Vasylyshyn, R.V., Stasyk, O.V., Dmytruk, O.V., Dmytruk, K.V., Sibirny, A.A. - Habilitantka jest na prawach pierwszego autora; publikacja *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2020, pt.: *Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in Saccharomyces cerevisiae and selected species of non-conventional yeasts (Scheffersomyces stipitis, Ogataea polymorpha)*, autorstwa: Ruchala, J., Kurylenko, O.O., Dmytruk, K.V., Sibirny, A.A. - Habilitantka jest pierwszym autorem; publikacja *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, pt.: *Pentose metabolism and conversion to biofuels and high-value chemicals in yeasts*, autorstwa: Ruchala, J., Sibirny, A.A. - Habilitantka jest pierwszym autorem.

Na bazie dostarczonych oświadczeń Habilitantki oraz załączonych deklaracji współautorów stwierdzam, że Pani dr Justyna Ruchała bardzo aktywnie uczestniczyła w realizacji wszystkich prac badawczych wchodzących w zakres prezentowanego osiągnięcia; należy podkreślić, że Habilitanta brała udział w badaniach na wszystkich etapach realizacji prac naukowych począwszy od opracowania koncepcji badań, planowania metodyki i wykonania doświadczeń w zakresie analiz genetycznych, jak i szeroko pojętej biochemii, enzymologii i inżynierii metabolicznej; ponadto działania Habilitantki to także analiza interpretacja i opracowanie danych, a skończywszy na przygotowaniu manuskryptów i pilotowaniu procesu recenzji i publikacji. Jednoznacznie stwierdzam, że Habilitantka posiada znaczący udział w realizacji prac badawczych w szerokim zakresie logistyczno-naukowym.

Osiągnięcie naukowe w formie sześciu monotematycznych prac naukowych dotyczy tematyki badawczej wpisującej się w problematykę zapotrzebowania na bio-energię dla dynamicznie rozwijającej się cywilizacji na całym globie. Obecnie zasadnicza część energii pozyskiwana jest z tzw. zasobów kopalnych, ale w ostatnich latach ogromną uwagę zwraca się na nowe źródła, jakimi są tzw. odnawialne źródła energii, które w wielu przypadkach nie tylko stanowią alternatywę dla ograniczonych ilości zasobów kopalnych, ale co najważniejsze są odpowiedzią na pogłębiający się kryzys klimatyczny i negatywny wpływ emisji CO₂. Jednym z takich alternatywnych ekologicznych źródeł energii są bio-palia, z bio-etanolem na czele, który jest rozpatrywany jako tzw. etanol paliwowy, będący suplementem do paliwa dla sektora transportowego. Obecnie, bio-etanol jest szeroko stosowany w wielu krajach a produkcja tego paliwa odbywa się na drodze fermentacji glukozy, pozyskiwanej z takich źródeł jak kukurydza,



trzcina cukrowa, buraki cukrowe, czy z wielu innych źródeł roślinnych; bio-etanol pozyskiwany z tzw. konwencjonalnych źródeł określany jest jako etanol 1G czyli pierwszej generacji; jednakże, istnieje drugie źródło, a mianowicie ogromne zasoby w formie celulozy/ligninocelulozy, które mogą być źródłem bio-etanolu drugiej generacji - 2G. Obecnie zasoby ligninocelulozy są wykorzystywane jedynie na skalę eksperymentalną z racji na wysokie koszty produkcji bio-etanolu 2G, co jest nieopłacalne na skalę przemysłową. Ligninoceluloza, pod względem produkcji bio-etanolu może być źródłem dwóch użytecznych cukrów, glukozy i ksylozy; fermentacja glukozy jest obecnie dobrze opanowana technologicznie i wydajna na skalę przemysłową, ale ksyloza stanowi ogromne wyzwanie biotechnologiczne. Zatem, opracowanie wydajnej konwersji ksylozy do bio-etanolu 2G przez mikroorganizmy jest kluczem do opracowania opłacalnej technologii na skalę przemysłową. Zaprezentowane publikacje naukowe Habilitantki bezpośrednio wpisują się w tematykę dotyczącą poznania zjawisk biologicznych rządzących metabolizmem ksylozy w kontekście pozyskania bio-etanolu 2G, wykorzystując termotolerancyjne drożdże *O. polymorpha*. Należy podkreślić, iż Habilitanta zbudowała spójną koncepcję projektu naukowego na bazie wielu przesłanek, w kierunku badań metabolizmu ksylozy, a następnie skutecznie wcieliła w życie założenia naukowe, stosując szeroki zakres technik, poczynając od klasycznych podejść jak indukcja i selekcja mutantów, implementacja metod inżynierii metabolicznej oraz zastosowanie ukierunkowanych technik w zakresie biologii molekularnej do modyfikacji szlaków metabolicznych - obecnie podejście, które święci triumfy jako tzw. biologia syntetyczna. Należy podkreślić, że działania Habilitantki, to doskonały przykład mariażu badań podstawowych z badaniami aplikacyjnymi, tj. wykorzystując zdobycze technologiczne w zakresie biologii molekularnej w połączeniu z inżynierią metaboliczną i klasycznymi metodami selekcji, Habilitantka określiła nieznanne elementy metaboliczne uczestniczące w przetwarzaniu ksylozy, a w konsekwencji otrzymała ulepszone szczepy drożdżowe do produkcji bio-etanolu 2G z ksylozy.

Pierwsza praca w cyklu, to opracowanie, które ukazało się na łamach czasopisma *Microbial Cell Factories* w 2017 rok. Celem pracy było zbadanie roli czynnika transkrypcyjnego Cat8 w kontekście metabolizmu ksylozy w celu optymalizacji produkcji etanolu. Wykorzystując informacje na bazie układu homologicznego, tj. *S. cerevisiae*, Habilitanta opracowała hipotezę badawczą zakładając, że Cat8 podobnie jak u drożdży piekarniczych, może być także zaangażowany w metabolizm etanolu u *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, wykorzystywanego modelu badawczego przez Autorkę. Już na wstępie należy podkreślić, iż Habilitanta wybrała drogę eksperymentalną, na bazie budowanie koncepcji naukowej i jej weryfikacji, tzw. *'hypothesis-driven research'*, która należy do działań ryzykownych, aczkolwiek mogących przynieść ciekawe wyniki, tzw. *'high-risk/high-gain research'*. Habilitantka, wykorzystując klasyczne techniki genetyczne otrzymała szereg mutantów drożdży *O. polymorpha* (wykorzystując tzw. szczep dziki, oraz szczep drożdży zakwalifikowany jako tzw. *'best ethanol producer'*), z delecją genu CAT8 oraz przeprowadziła homologiczną nadekspresję białka Cat8 w komórkach *O. polymorpha*. Przyjęte założenia okazały się prawidłowe, ponieważ brak białka Cat8, nie zaburza produkcji etanolu z glukozy, a co najważniejsze zwiększa efektywność fermentacji alkoholowej ksylozy ponad dwukrotnie. Nadekspresja białka Cat8 w komórkach *O.*



polymorpha, niezależnie od użytego szczepu, obniża efektywność produkcji etanolu z ksylozy, co jednoznacznie wskazuje, że białko to może być ciekawym celem w optymalizacji metabolizmu drożdży do produkcji bio-etanolu 2G. Co ważne, Autorka przeanalizowała dodatkowo szereg parametrów metabolicznych badanych szczepów, min. aktywność enzymatyczną enzymów zaangażowanych w metabolizm ksylozy jak i etanolu, co pozwoliło Jej na zaproponowanie modelu metabolicznego, który związany jest z wykorzystaniem ksylozy jako tzw. źródła węgla. Podsumowując, prace badawcze Habilitantki wraz z zespołem stanowią istotny wkład poznawczy w poznanie kluczowych elementów metabolicznych fermentacji ksylozy do etanolu i stoją na drodze opracowania efektywnego układu metabolicznego do produkcji bio-etanolu 2G. Należy zaznaczyć że Habilitantka posiada kluczowy wkład w w/w badania; z jednej strony wyrazem tego jest Jej uznanie jako pierwszej Autorki, a co więcej z przedstawionych informacji wyłania się obraz Habilitantki charakteryzującej się wysokim zaangażowaniem w realizację większości zadań badawczych oraz osoby, która doskonale opanowała warsztat badawczy w zakresie technik genetycznych i biochemicznych.

Druga praca włączona jako osiągnięcie naukowe to opracowanie, które zostało opublikowane w czasopiśmie *FEMS Yeast Research* w 2021 roku. Prezentowana praca to konsekwentna kontynuacja badań Habilitantki w celu przybliżenia szlaków metabolicznych zarządzających fermentacją ksylozy do etanolu u drożdży *O. polymorpha*. Prace badawcze skupiły się na poznaniu roli białek Mig1, Mig2, Tup1 and Hap4, które są klasyfikowane jako czynniki transkrypcyjne biorące udział w licznych szlakach związanych z metabolizmem cukrów. Przeprowadzone prace badawcze zostały wykonane na dwóch modelach eksperymentalnych, tj. wykorzystano mutanty drożdżowe z delecją poszczególnych genów; oraz szczepy drożdżowe prowadzące homologiczną ekspresję białek Mig1, Mig2, Tup1 and Hap4 z wykorzystaniem konstruktorów genetycznych na bazie wektora prGAP. W zakres prac weszła, po pierwsze walidacja otrzymanych narzędzi analitycznych w formie szczepów drożdżowych, co jest elementem kluczowym; a zasadniczy element pracy to cross-walidacja metaboliczna tzw. mutantów delecyjnych w stosunku do komórek prowadzących wydajną syntezę białek Mig1, Mig2, Tup1 and Hap4, zwracając uwagę na wykorzystanie glukozy i ksylozy w kontekście syntezy etanolu. W konsekwencji wykazano, że usunięcie genu MIG1 nie miało znaczącego wpływu na produkcję etanolu z ksylozy czy z glukozy; usunięcie zarówno MIG1 jak i MIG2 zmniejszyło ilość etanolu wytwarzanego z wykorzystaniem obydwu cukrów. Delecja genów HAP4-A i TUP1 spowodowała zwiększenie produkcji etanolu z ksylozy. Z drugiej zaś strony, nadekspresja genów HAP4-A i TUP1 zmniejszyła wytwarzanie etanolu podczas fermentacji ksylozy. Tak więc HAP4-A i TUP1 są zaangażowane w represję metabolizmu fermentacji ksylozy w drożdżach *O. polymorpha*, a ich usunięcie może stanowić ciekawą strategię poprawy produkcji etanolu z ksylozy. Zaangażowanie Habilitantki w realizację prac badawczych jest istotnie, nie tylko jako wykonawca szeregu analiz eksperymentalnych, ale co ważne w opracowaniu koncepcji, analizie wyników i przygotowaniu manuskryptu; szczególną uwagę należy zwrócić na zaprezentowany model metaboliczny (Rycina 12) z uwzględnieniem roli badanych genów, który stanowi ważny wkład poznawczy w budowanie wyobrażenia na temat szlaków metabolicznych związanych z utylizacją ksylozy i produkcją bio-etanolu 2G.



Trzecia publikacja, to konsekwentne działania, grupy badawczej w której Autorka aktywnie uczestniczy, w kierunku poznania szlaków metabolicznych, które otworzyłyby drogę do efektywnej konwersji ksylozy do etanolu z wykorzystaniem drożdży *O. polymorpha*. Już na wstępie należy podkreślić, że Autorzy publikacji wybrali odmienną drogę eksperymentalną, w porównaniu do publikacji #1 czy #2; a mianowicie zastosowali ukierunkowaną mutagenezę i poszukiwanie mutantów drożdżowych o wydajnej produkcji etanolu z ksylozy, w przeciwieństwie do wcześniejszych prac mających charakter 'rational design'. Kluczem do sukcesu było wykorzystanie kasety genetycznej pL2 w celu indukcji mutacji w genomie *O. polymorpha* oraz metody selekcji mutantów na bazie oporności drożdży na 3-BrPA; podejście to okazało się skuteczne, ponieważ uzyskano mutanta drożdżowego, który charakteryzował się 50% zwiększoną produkcją etanolu z ksylozy. Dalsze analizy pozwoliły na identyfikację genu, który został zmodyfikowany za pośrednictwem kasety pL2 – ATG13; w zakres dalszych prac weszła analiza/walidacja roli białka Atg13, które powiązane jest z procesem autofagii. W ramach tych prac Habilitantka odegrała istotną rolę w pracy całego zespołu, ponieważ wykonała mutanta z delecją genu *atg13Δ* w *Scheffersomyces stipitis*, w drożdżach które metabolizują ksylozę do etanolu (niestety brak Atg13 w drożdżach *S. stipitis*, nie przyczynia się do zwiększonej produkcji etanolu, co sugeruje, że rola białka Atg13 nie jest uniwersalna). Ponadto Habilitantka wykonała szereg kluczowych analiz związanych z analizami fermentacji, a w połączeniu z innymi analizami enzymatycznymi, pozwoliło to na zbudowanie koncepcji opisującej rolę białka Atg13, wskazując że może ono wpływać na aktywację ekspresji enzymów zaangażowanych w katabolizm ksylozy i fermentację alkoholową u drożdży *O. polymorpha*, jak na przykład białek Pdc1 czy Das1. Rezultaty prac zespołu ukazały się w uznanym czasopiśmie *FEMS Yeast Research* w 2018 rok, a kompetencje naukowe Habilitantki były silnym wsparciem w realizacji wszystkich zadań badawczych.

Publikacja czwarta, która ukazała się w *Biotechnology for Biofuels* w 2018 to dalsza eksploracja problemu badawczego jakim jest poznanie metabolizmu ksylozy w ujęciu biotechnologicznych i optymalizacją produkcji etanolu 2G. Problem badawczy jaki został podjęty w w/w publikacji to rola peroksysomów i enzymów związanych z tym kompartmentem w metabolizmie ksylozy, kwestia które nie była dotychczas badania w ujęciu biotechnologicznym. Autorzy, na wstępie wykonali meta-analizę proponując cele analityczne, które mogą odgrywać istotną rolę w metabolizmie ksylozy, a wynikiem tego jest opracowany szlak metaboliczny zaprezentowany na rycinie #1, stanowiący ciekawe opracowanie będące jednocześnie hipotezą badawczą. Pierwsze założenie koncepcyjne powiązania peroksysomów z metabolizmem ksylozy zostały potwierdzone przez usunięcie genu PEX3, którego produkt białkowy jest odpowiedzialny za biogenezę tych organelli; badania te wskazały, że drożdże *O. polymorpha* nie są w stanie prowadzić fermentacji ksylozy bez sprawnych peroksysomów. W dalszej kolejności Habilitantka wraz grupą badawczą skupiła się na enzymach powiązanych z peroksysomami. I tak, zwrócono uwagę na takie białka: Tal2, peroksysomalna transladolaza i jej cytoplazmatyczny odpowiednik Tal1, Tkl1 – cytozolowa transketolaza oraz jej odpowiednik w peroksysomach Das1. Habilitantka, wykorzystując kompetencje w zakresie inżynierii genetycznej oraz analiz metabolicznych i używając szereg mutantów drożdżowych, czy to z delecją poszczególnych



genów, czy to w formie ich nadekspresji, wskazała że fermentacja ksylozy do etanolu jest uzależniona od białek peroksysomalnych; co ważne, wydajna jednoczesna synteza białek Das1 i Tal2 wzmacnia efekt metaboliczny w formie efektywnej fermentacji ksylozy do etanolu, co umożliwiło uzyskanie szczepu drożdżowego o ponadprzeciętnych parametrach w syntezie etanolu. Ponownie, pragnę podkreślić, że udział Habilitantki jest kluczowy w realizacji wszystkich zadań w projekcie (co znalazło swoje uznanie w formie autorstwa 'na prawach pierwszego Autora'), poczynając od prac koncepcyjnych, poprzez badania eksperymentalne, a skończywszy na opracowaniu manuskryptu; uzyskane informacje nie tylko rozszerzają wiedzę na temat metabolizmu ksylozy i powiązania tego procesu z peroksysomami ale także przynoszą wymierne rezultaty w formie uzyskanego szczepu drożdży o użytecznych walorach biotechnologicznych.

Kolejny projekt naukowy w którym Habilitanta brała udział to opracowanie w formie publikacji przeglądowej (publikacja w *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* – 2020r) opisującej obecny stan wiedzy na temat organizmów, które można wykorzystać do bio-konwersji ksylozy do etanolu. Autorzy zwrócili uwagę na trzy organizmy; pierwszy, *Saccharomyces cerevisiae*, drożdże które stanowią podstawowy organizm wykorzystywany do produkcji etanolu z glukozy; jednakże, Autorzy opisali alternatywne możliwości w zakresie modyfikacji genetycznych *S. cerevisiae* w kierunku utylizacji ksylozy cukru, który nie jest metabolizowany przez *S. cerevisiae*; opisane drogi modyfikacji to doskonały przykład obecnych działań w zakresie tzw. biologii syntetycznej, dzięki której można 'dostrajać' metabolizm danego organizmu do oczekiwań biotechnologicznych. Ponadto, w opracowaniu poświęcono bardzo dużo uwagi na temat drożdży *Ogataea polymorpha*, zasadniczego modelu badawczego eksplorowanego przez Autorów pracy, ze szczególnym uwzględnieniem własnych osiągnięć naukowych, co stanowi doskonały przykład opracowania eksperckiego wykorzystując wypracowane kompetencje naukowe. Habilitantka, wykorzystując posiadaną wiedzę oraz doświadczenie naukowe w tematyce drożdży fermentujących ksylozę, opisała wykorzystanie drożdży *Scheffersomyces stipitis* jako organizmu, który prowadzić konwersję ksylozy do etanolu, klasyfikowanego jako tzw. 'konwencjonalny' organizm. Habilitantka scharakteryzowała *S. stipitis* pod względem metabolicznym, genetycznym zwracając szczególną uwagę na aspekt fermentacji ksylozy; opisała Ona zalety jak i wady *S. stipitis*, budując pełny obraz metabolizmu ksylozy (jak przedstawiono na rycinie #1) z uwzględnieniem kluczowych enzymów zaangażowanych a ten proces; w Jej opracowaniu nie zabrakło aspektu biotechnologicznego oraz szczegółowego opisu prac badawczych skierowanych na otrzymanie dedykowanych szczepów drożdżowych o zwiększonej produkcji etanolu z ksylozy, jednocześnie o wyższej tolerancji na wysokie stężenia etanolu. Należy zwrócić uwagę, że Autorka nie tylko wykorzystywała informacje z ogólnie dostępnych zasobów literaturowych, a co ważne czerpała dane z własnych doświadczeń i kompetencji, co pozwala Jej na krytyczne i jednocześnie wysoce merytoryczne podejście w przedstawionej narracji naukowej. Co ważne udział Habilitantki jest wiodący, ponieważ nie tylko opracowała część publikacji, ale uczestniczyła w budowie koncepcji naukowej jak i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

Ostatnia publikacja w zaprezentowanym cyklu, to opracowanie, które wpisuje się w zakres prac przeglądowych, ale mające znacznie inny wymiar pod względem, tematyki,



organizacji pracy Habilitantki jak i Jej zaangażowania. Opracowanie to ukazało się w doskonałym periodyku naukowym, *FEMS Microbiology Reviews*, w 2020 roku jako dwuautorska praca, w której Habilitantka gra główną rolę. Publikacja ta, w przeciwieństwie do poprzedniej pracy przeglądowej mającej charakter metodyczny, stanowi kompendium wiedzy na temat drożdżowych szlaków metabolicznych związanych z przekształcaniem pentoz, jak: ksyloza, L-arabinozy, oraz ryboza 2-deoksyryboza, D-arabinoza oraz likoza. W szczególności, opracowanie posiada dwa nurty: pierwszy to opis głównych szlaków metabolicznych zarządzających przemianami wybranych pentoz, oraz regulacja tych szlaków na poziomie metabolicznym i genetycznym; drugi nurt to biotechnologiczny wgląd w grupę tzw. nie-kanonicznych drożdży, które są zdolne syntetyzować substancje z grupy biopaliw lub przemysłowo ważne cukry. W pierwszej części Habilitantka zwróciła uwagę na metabolizm takich cukrów jak D-ryboza, 2-Deoxy-D-ryboza, czy D-ksyloza, wyczerpująco charakteryzując tzw. biologię tych cukrów. Druga część to opis mikroorganizmów, które zaangażowane są w biokonwersję pentoz, jak na przykład ksylozy do etanolu, zaczynając dość niestandardowo od drożdży *S. cerevisiae*, które normalnie nie posiadają zdolności fermentacji ksylozy do etanolu, ale Autorka wyczerpująco opisuje możliwości inżynierii metabolicznej, które prowadzą do otrzymania unikalnych szczepów *S. cerevisiae* konwertujących ten cukier. Jednakże, ogromną część uwagi Autorka poświęciła na charakterystykę wielu gatunków drożdży, które są w stanie prowadzić fermentację ksylozy, jak *Scheffersomyces stipitis*, *Scheffersomyces shehatae*, *Pachysolen tannophilus*, *Spathaspora passalidarum*, *Kluyveromyces marxianus*, a skończywszy na doskonale znanym i eksplorowanym gatunku *Ogataea polymorpha*; Autorce nie umknęły także inne gatunki, jak *Candida intermedia*, *Candida tenuis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Komagataella phaffii*, oraz *Yarrowia lipolytica*; opisano szeroko pojętą biologię tych drożdży, ze szczególną uwagą w zakresie biotechnologii, dostarczając czytelnikowi ogromną ilość szczegółowych informacji na temat bioprocessów, które nie tylko prowadzą do syntezy etanolu ale także innych komponentów o znaczeniu biotechnologicznym jak: kwas mlekowy, isobutanol, ksylitol, lipidy i kwasy tłuszczowe czy rybozy. Z jednej strony, praca zawiera bogactwo informacji, dając czytelnikowi pełny przegląd stanu wiedzy (czego emanacją jest zawarcie ponad 600 pozycji literaturowych), a co ważne Habilitantka przedstawiła swoją wizję rozwoju prac badawczych w tematyce biotransformacji, ksylozy czy hydrolizatów ligninocelulozy oraz możliwości inżynierii metabolicznej do konstrukcji nowych szczepów drożdżowych o ulepszonych parametrach biotechnologicznych; praca ta stanowi nieocenioną wartość dodaną i ogromny wkład w kształtowanie kierunków naukowych. Należy podkreślić, że rola Habilitantki w realizacji tego naukowego przedsięwzięcia jest wiodąca, mimo że nie jest autorem korespondencyjnym, była zaangażowana nie tylko w realizację zadań merytorycznych, ale także większą część 'logistyczną' co jednoznacznie wskazuje na pozycję lidera.

Podsumowując, osiągnięcie naukowe Pani dr Justyny Ruchały to sześć publikacji wykazujących się spójną tematyką naukową w zakresie regulacji metabolizmu cukrów w ujęciu biotechnologicznym; w zakres osiągnięcia weszły cztery opracowania eksperymentalne, w których Habilitantka badała zjawiska metaboliczne dotyczące metabolizmu ksylozy w dwóch aspektach; pierwszy, to prace mające powiązanie z naukami podstawowymi, co pozwoliło na



wpracowanie koncepcji naukowej a następnie na walidację założeń z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej i zdobycie nowej wiedzy; drugi, bezpośrednio powiązany z pierwszym, to aspekt aplikacyjny, tj. zdobyta wiedza pozwoliła na opracowanie innowacyjnych narzędzi biotechnologicznych w formie szczepów drożdżowych o ponad przeciętnych właściwościach w biokonwersji ksylozy do etanolu. Działania Habilitantki to doskonały przykład powiązania nauk podstawowych z aspektem aplikacyjnym, którego emanacją jest eksplozywny rozwój biologii syntetycznej, w której Habilitantka doskonale się porusza i odnosi sukcesy. Osiągnięcia naukowe Habilitantki wnoszą ważki wkład w obecne oczekiwania społeczeństwa, którego funkcjonowanie oparte jest na zaawansowanej wiedzy w dziedzinie 'nano-bio-technologii', a BIO-konwersja zasobów odnawialnych i produkcja BIO-paliwa jest kluczem do zrównoważonego rozwoju społeczeństw zorientowanych na działania proekologiczne. Pani dr Justyna Ruchała to osoba o wysokich kompetencjach naukowych, po pierwsze z doskonale opanowanym warsztatem badawczym oraz z wiedzą naukową, czego wymiernym rezultatem są zaprezentowane dwie prace przeglądowe; co ważne, Habilitantka posiada jasno sprecyzowaną wizję naukową, którą planuje konsekwentnie rozwijać, rozszerzając obecne badania o nowe nie eksplorowane aspekty utylizacji ligninocelulozy.

Ocena istotnej aktywności naukową realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Pani dr Justyna Ruchała wykazuje się aktywnością naukową realizowaną w licznych ośrodkach naukowych poza macierzystą uczelnią, tj. Uniwersytetem Rzeszowskim. Habilitantka odbyła krótko i długoterminowe staże naukowe w takich uniwersytetach, jak: Uniwersytet w Lund, Szwecja pod kierownictwem prof. Jure Piskur, gdzie przebywała 6 miesięcy jako stypendystka w programie Visby. W dalszej kolejności Habilitantka współpracowała z prof. Diethard Mattanovich, Uniwersytet Zasobów Naturalnych i Nauk Przyrodniczych, Wiedeń, Austria, prowadząc badania naukowe w tematyce biosyntezy antybiotyku rezoflawiny, ramach współpracy finansowanej z projektu NAWA. Ponadto, Habilitantka odbyła staż w Królewskim Uniwersytecie im. Króla Mongkuta, Bangkok, Tajlandia; oraz w Uniwersytecie w Liege, Belgia. Na szczególną uwagę zasługuje długoterminowa współpraca z dr hab. Konstyanty Dmutruk i dr Olena Kurylenko z Instytutu Biologii Komórki, Narodowej Akademii Nauk Ukrainy, Lwów; w ramach tej współpracy, Habilitantka zrealizowała szereg prac badawczych będąc w Instytucie, jak i w formie współpracy, a owocem tych działań są publikacje naukowe (część z nich wchodzi w zakres osiągnięcia) wskazując, że Pani dr Justyna Ruchała aktywnie prowadziła współpracę bilateralną. Ponadto, Habilitantka współpracowała z prof. Aleksander Rapoport z Uniwersytetu Łotewskiego w Rydze, Łotwa, wykonując badania na temat biosyntezy glutationu z wykorzystaniem drożdży jako głównych producentów. Co należy podkreślić, rozpoznawalność Habilitantki na polu naukowym podkreśla fakt uczestnictwa w programie COST – YEAST4BIO – „*Non-conventional yeast for the production of bioproducts*” w zakresie wykorzystania biotechnologicznego drożdży, co plasuje Habilitantkę w międzynarodowej sieci naukowej. Stwierdzam, że Habilitantka wykazuje się aktywnością naukową w zakresie realizacji wielu projektów badawczych w interdyscyplinarnych i międzynarodowych grupach badawczych poza



macierzystym ośrodkiem badawczym, czego rezultatem są nie tylko pobyty w zagranicznych ośrodkach, a aktywność ta posiada wymierny udokumentowany efekt w formie publikacji. Stwierdzam, że Habilitantka wykazała się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej, i aktywność ta nie budzi zastrzeżeń.

Ocena dodatkowej aktywności naukowej, działalności organizacyjnej i dydaktycznej

Dodatkowa aktywność naukowa. Aktywność naukowa Pani dr Justyny Ruchały oscyluje w okół wykorzystania biotechnologicznego drożdży oraz bakterii w celu eksploracji nowych dróg otrzymywania bio-produktów ważnych w przemyśle energetycznym, medycznym, kosmetycznym i spożywczym. Efekt tych działań, to dorobek naukowy w formie różnorodnych opracowań, tj. prac badawczych, rozdziałów w monografiach oraz patentów. I tak, Habilitantka jest autorką sześciu, wieloautorskich, rozdziałów w monografiach, w tym w tak uznanych wydawnictwach jak Springer, oraz 16 publikacji, które ujęte są w bazie danych JCR; prace te ukazały się w uznanych czasopismach naukowy, jak na przykład *Biotechnology Journal* czy *Trends in Biotechnology*. Sumaryczny IF prac stanowiących tzw. dodatkową aktywność naukową wynosi 69.

Zasadnicza część aktywności naukowej Habilitantki to badania naukowe w zakresie utylizacji/fermentacji ksylozy i glukozy przez szczepy drożdżowe w celu produkcji etanolu, a przede wszystkim otrzymanie nowych szczepów drożdżowych wykorzystując techniki biologii molekularnej; na przykład, Habilitantka prowadziła badania w celu uzyskania drożdży *Ogataea polymorpha* z nadekspresją genów kodujących białka transporterów cukrów; uczestniczyła w badaniach nad rolą enzymów peroksysomalnych w fermentacji ksylozy przez drożdże *S. cerevisiae*, oraz brała udział w pracach ukierunkowanych na otrzymanie nowych szczepów drożdży *S. stipitis* wykorzystując ukierunkowaną mutagenezę, co zaowocowało identyfikacją genu HEM25, zaangażowanego w proces fermentacji ksylozy i glukozy. Co ważne, prace te nie tylko miały wymiar naukowy, ale także działania Habilitantki zakończyły się udziałem w zgłoszeniu patentowym, związanym z innowacyjną metodą pozytywnej selekcji mutantów *Ogataea polymorpha* jako wydajnych producentów etanolu. Ponadto, Habilitantka zaangażowała się w badania skierowane na otrzymanie wyższych alkoholi, jak isobutanol oraz syntezę i konwersję glicerolu do etanolu. Zainteresowania naukowe Habilitantki nie tylko oscylują w tematyce biopaliw, ale także, Jej uwaga była skierowane na biotechnologiczny aspekt biosyntezy ryboflawiny wykorzystując drożdże *Candida famata*. Habilitantka wykorzystując swoje kompetencje naukowe w zakresie technik biologii molekularnej przeprowadziła 'molekularną optymalizację' drożdży *C. famata*, znacząco zwiększając biosyntezę ryboflawiny. Co ważne, wskazała że drożdże te mogą wykorzystywać serwatkę, uboczny produkt w przemyśle mleczarskim, do wydajnej produkcji ryboflawiny, a ta innowacyjna idea znalazła swoje zakończenie w formie zgłoszenia patentowego, o dużym potencjale do wdrożenia. Prace w zakresie biotechnologicznego pozyskania ryboflawiny zostały rozszerzone przez Habilitantkę, na optymalizację biosyntezy antybiotyku flawinowego, aminoryboflawiny; na podkreślenie zasługuje fakt, że projekt ten to doskonały przykład prac w tematyce biologii syntetycznej,



ponieważ Habilitantka 'skonstruowała' szczep drożdżowy na bazie *Pichia pastoris*, który pierwotnie nie syntetyzuje antybiotyku, zaś po zabiegach genetycznych *P. pastoris* wytwarza aktywną biologicznie aminoryboflawinę przeciwko patogennym bakteriom. Zainteresowania Habilitantki także oscylowały w temacie pozyskania glutationu, ważnego peptydu z punktu widzenia przemysłu medycznego, spożywczego czy kosmetycznego, wykorzystując zoptymalizowane drożdże *Ogataea polymorpha*. Podsumowując, Pana dr Justyna Ruchała uczestniczyła w szeregu projektach badawczych, które wpisują się w działania o charakterze biotechnologicznym pozyskiwania wielu bio-produktów, a na podkreślenie zasługuje Jej konsekwencja w działaniach naukowych, wykorzystując doskonale opanowany warsztat badawczy; ponadto, prowadząc szeroka współpracę, jest Ona postrzegana jako kompetentny partner naukowy realizując liczne projekty we współpracy w polskich i zagranicznymi ośrodkami naukowymi.

Działalność organizacyjna i dydaktyczna. Pani dr Justyna Ruchała aktywnie uczestniczy w życiu naukowym, udzielając się na różnych polach nauki; po pierwsze wykonała szereg recenzji prac naukowych, do takich czasopism jak *Current Genetics* czy *Microbial Cell Factories*, a ponadto jest redaktorem pomocniczym specjalnego wydania w czasopiśmie *Fermentation*; recenzowała szereg wniosków grantowych w ramach programu naukowego z Narodowej Fundacji Badań Ukrainy. Habilitantka brała udział w realizacji dziewięciu projektów naukowych jako wykonawca, finansowanych z różnych agend, jak NCN; a co ważne, była kierownikiem dwóch projektów naukowych finansowanych przez Podkarpackie Centrum Innowacji. Ponadto, brała aktywny udział jako prelegent w wielu konferencjach naukowych, oraz w trzech uczestniczyła w roli organizatora, jako członek komitetu naukowego czy organizacyjnego i jako przewodniczący sekretariatu konferencji (w Rzeszowie i we Lwowie). W latach wcześniejszych, Habilitantka pełniła funkcję kierownika Zakładu Mikrobiologii i Biotechnologii, Zakładu Mikrobiologii i Genetyki Molekularnej, jednostek, które obecnie zostały włączone do Katedry Biologii, w czasie reformy nauki polskiej.

W zakresie działalności dydaktycznej, Habilitantka jako pracownik Uniwersytetu Rzeszowskiego realizuje statutowe obowiązki nauczyciela akademickiego, prowadząc ćwiczenia laboratoryjne oraz szereg wykładów, jak: mikrobiologia, podstawy biotechnologii, biologia molekularna, nowoczesne techniki inżynierii genetycznej, technologie mikrobiologiczne, inżynieria genetyczna drobnoustrojów, mikrobiologia żywności i agrobiotechnologia; na uwagę zasługuje mnogość zajęć, na różnych kierunkach studiów, co wskazuje na duże zaangażowanie dydaktyczne; ponadto, Habilitantka była promotorem prac licencjackich, inżynierskich i magisterskich; w ramach działalności dydaktycznej Habilitantka jest członkiem Zespołu Programowego na kierunku Biologia, co wskazuje na zaufanie jakie posiada w zakresie aktywności dydaktycznej. Jedną z ciekawych aktywności na pograniczu nauki i dydaktyki jest udział Habilitantki w zajęciach *Art&Science*, czego rezultatem jest między innymi zgłoszenie patentowe w zakresie opracowania materiału plastyczno-artystycznego na bazie barwnika z bakterii *Serratia marcescens*.

Podsumowując, stwierdzam, że dodatkowa działalność naukowa, organizacyjna i dydaktyczna Pani dr Justyny Ruchały nie budzi zastrzeżeń. Habilitantka jest z zaangażowaniem



działa na polu współpracy naukowej, aktywnie uczestniczy w realizacji szeregu projektów naukowych, oraz pozyskuje fundusze na prowadzenie prac badawczych i wykazuje aktywność w zakresie działalności organizacyjnej; ponadto, jest aktywna na polu dydaktycznym kształcąc nowe kadry naukowe.

Wniosek końcowy

Oceniając osiągnięcie naukowe stanowiące monotematyczny cykl publikacji pod tytułem: „Identyfikacja genów uczestniczących w regulacji metabolizmu i fermentacji ksylozy u termotolerancyjnych drożdży *Ogataea polymorpha* oraz konstruowanie wydajnych producentów etanolu z tej pentozy” oraz odnosząc się do aktywności naukowej realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej, wraz z opinią na temat dodatkowej aktywności naukowej, organizacyjnej i dydaktycznej Pani dr Justyny Ruchały, stwierdzam że Habilitantka wykazała się istotną aktywnością we wszystkich ocenianych aspektach, a zrealizowane prace badawcze mające swoje odzwierciedlenie w licznych publikacjach naukowych wnosząc znaczący wkład poznawczy w dyscyplinie nauk biologicznych. W związku z powyższym stwierdzam, że z zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2020 roku (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 ze zm.) Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, osiągnięcie Pani dr Justyny Ruchały odpowiada wymaganiom określonym w art. 219 ust. 1 pkt 1, 2 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2020 roku (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 ze zm.). Popieram wniosek Pani dr Justyny Ruchały z dnia 07.09.2021, o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Lublin 2022-03-21

Prof. dr hab. Marek Tchórzewski

