



Opole 03 listopada 2023r.

prof. dr hab. Jacek Lipok

## OCENA

Pracy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Gach

pt. „Aktywność biologiczna ftalidów i ich metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego”

zrealizowanej w Katerze Chemii Żywności i Biokatalizy

Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,

pod kierunkiem

prof. dr hab. Teresy Olejniczak

przy wsparciu

dr Stefano Serra

Substancje występujące w naturze są źródłem inspiracji naukowych dociekań kolejnych pokoleń badaczy. Szczególne znaczenie w tej sferze przypisuje się poszukiwaniu naturalnych połączeń chemicznych wykazujących użyteczną aktywność biologiczną oraz ulepszaniu metod ich pozyskiwania. Metody badawcze stosowane we współczesnej chemii i biotechnologii pozwalają na modyfikowanie struktur naturalnych związków chemicznych, poprzez komplementarne wykorzystanie syntezy chemicznej i procesów biokatalitycznych. Uzyskane w ten sposób substancje spełniają jeden z najbardziej istotnych warunków aktywności biologicznej – posiadają precyzyjnie określoną konfigurację przestrzenną. Sukces działań łączących metodologię nauk chemicznych z metodami stosowanymi w biotechnologii zależy od wielu czynników, wśród których chciałbym podkreślić doświadczenie członków zespołu w prowadzeniu interdyscyplinarnych prac badawczych.

W przypadku ocenianej rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Gach warunek ten został w pełni spełniony, a Doktorantka znakomicie wykorzystała dotychczasowe doświadczenia zespołu Pani prof. Teresy Olejniczak i twórczo rozwinęła jedną z realizowanych tam, interesujących koncepcji badawczych. Mam nadzieję, że czytelnicy tej opinii uznają przywilej Recenzenta do jej wyrażenia, jako że miałem zaszczyt i przyjemność przygotowania recenzji dysertacji Pana dra Jakuba Pannka, który kilka lat wcześniej zgłębiał

problematykę mikrobiologicznej syntezy chiralnych ftalidów o aktywności fungistatycznej, także pod opieką Pani prof. Teresy Olejniczak.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Gach została przygotowana w oparciu o cykl trzech, spośród sześciu publikacji naukowych Autorki indeksowanych w bazach Scopus i WoS, z afiliacją Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Wspomniane prace tworzą:

#### PUBLIKACJA I (P1)

**Gach, J.;** Olejniczak, T.; Krężel, P.; Boratyński, F. Microbial Synthesis and Evaluation of Fungistatic Activity of 3-Butyl-3-Hydroxyphthalide, the Mammalian Metabolite of 3-n-Butylidene-phthalide. *IJMS* **2021**, 22, 7600. (IF = 6,208, 140 pkt MEIN)

#### PUBLIKACJA II (P2)

**Gach, J.;** Grzelczyk, J.; Strzała, T.; Boratyński, F.; Olejniczak, T. Microbial Metabolites of 3-n-Butylphthalide as Monoamine Oxidase A Inhibitors. *IJMS* **2023**, 24, 10605. (IF = 5,6, 140 pkt MEIN)

#### PUBLIKACJA III (P3)

**Gach, J.;** Olejniczak, T.; Pannek, J.; Boratyński, F. Fungistatic Effect of Phthalide Lactones on *Rhodotorula mucilaginosa*. *Molecules* **2023**, 28, 5423. (IF = 4,927, 140 pkt. MEIN)

Warto zauważyć, że wszystkie prace opublikowano w otwartym dostępie do treści i załączonych wyników (OA), w czasopiśmie o uznanej wartości, którym przypisuje się rzetelny tryb recenzji. Podana kolejność prac jest zgodna z sekwencją wyodrębnionych przez Autorkę celów prowadzonych badań bazujących na sformułowanych hipotezach i odpowiada kolejności dołączonych publikacji.

Zgodnie z przyjętymi zasadami, dysertacja przygotowana w ten sposób składa się z co najmniej dwóch komplementarnych części: omówienia problematyki, a także wiodących wyników badań oraz pełnych tekstów publikacji stanowiących podstawę postępowania awansowego. Oceniana praca doktorska spełnia te warunki, co znalazło odzwierciedlenie w jej kompozycji. Rozprawa została przygotowana jako liczące 57 numerowanych stron omówienie uzyskanych wyników w nawiązaniu do sformułowanych celów badań, któremu towarzyszy prezentacja dorobku i aktywności naukowej Doktorantki oraz teksty 3 publikacji, dla których w każdym przypadku zachowano oryginalny format druku źródłowego czasopisma. Można więc uznać, że konstrukcja formalna rozprawy jest właściwa dla tego typu opracowań. Potwierdza to także układ i kolejność wyodrębnionych części opracowania, które stanowią: strona tytułowa, zwyczajowe podziękowania, spis treści, wskazanie publikacji wchodzących w skład rozprawy, streszczenia w języku polskim oraz w języku angielskim, zarys problematyki badań, cele i hipotezy badawcze, opis metodologii, wyniki wraz z

dyskusją, podsumowanie połączone z wnioskami, wykaz cytowanej literatury, oświadczenia dotyczące wkładu Doktorantki w przygotowanie publikacji, pełne teksty publikacji uzupełnione o dane (supplementary materials) dotyczące przede wszystkim identyfikacji struktur substratów i produktów biotransformacji oraz wykaz osiągnięć naukowych Pani mgr inż. Joanny Gach.

Odnosząc się do kwestii merytorycznych, najistotniejszych dla niniejszego postępowania awansowego chciałbym docenić to, że polskojęzyczny tekst podrozdziałów merytorycznych nie jest „prostym tłumaczeniem” fragmentów publikacji. Tekst ten stanowi autonomiczną część opracowania i dobrze uzasadnia przyjętą koncepcję prezentacji wyników, sankcjonując tym samym kolejność załączonych prac w odniesieniu do ich wiodącej tematyki. Wspomniana „autonomia” wymaga, by informacje zawarte w tej części opracowania były jednoznaczne, stąd też prośba Recenzenta o odniesienie się Autorki do następujących zagadnień:

1. Już we „Wprowadzeniu” (str. 11) znalazła się informacja o tym, że 3-n-butyloftalid oraz jego nienasycony odpowiednik 3-n-butylydenoftalid, zostały zatwierdzone jako środki aromatyzujące żywność przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). W świetle wyników badań aktywności biologicznej prezentowanych w tej pracy interesujące jest, czy znane są dopuszczalne stężenia tych substancji w żywności i zakres ich stosowania?
2. Jeden z celów pracy sformułowano jako: „...testy metabolitów otrzymanych w biotransformacji pod kątem właściwości przeciwdepresyjnych”. Zdaniem Recenzenta jest on nadmiernie ogólny i w tym brzmieniu wymagający zgody Komisji Bioetycznej, a przez to nieadekwatny do rzeczywistych prac przeprowadzonych przez Doktorantkę. Czy mógłbym zatem prosić o sformułowanie właściwego celu badań w oparciu o stosowną hipotezę?
3. Omawiając substraty użyte w doświadczeniach Autorka wskazuje, że są one efektem prowadzonych wcześniej syntez chemicznych, w tym także przez Pana dra Jakuba Pannka. Recenzent nie znalazł jednak stwierdzenia, które wykluczałoby Panią Joannę, jako osobę, która również zajmowała się syntezą chemiczną wymienionych w tym opracowaniu substratów procesów biotransformacji. Byłbym wdzięczny za wyjaśnienie tej kwestii.
4. W opisie metodologicznym brakuje odniesienia do informacji o „...inkubacji 3-n-butyloftalidu (2) wraz z ludzkimi mezosomami wątrobowymi (HLM)...” podanej na str. 27 dysertacji. Rozumiem, że to zwykłe przeoczenie?
5. Omawiając wyniki predykcji wybranych parametrów farmakokinetycznych (str.39-41), w tabeli 4 Autorka podaje struktury stosownych metabolitów procesów biotransformacji zw.

3 i 4 oraz zw.7 – estru metyloвого zw.3. Substancje te zawierają jedno centrum chiralne, zatem każda występuje w formie określonego stereoizomeru. Tymczasem kwestia ta jest pomijana. Czy oznacza to, że w przypadku aktywności biologicznej tych konkretnych pochodnych laktonów ftalidowych, jest to kwestia bez znaczenia? Czy raczej ograniczenia zastosowanego oprogramowania sprawiły, że zagadnienie to nie zostało wyartykułowane?

Jak w każdej dysertacji, również i w niniejszej pracy można znaleźć niedostatki redakcyjne; najczęściej o charakterze interpunkcyjnym, albo tzw. „literówek”. Uważam jednak, że potknięcia te mają marginalne znaczenie dla przekazu istoty prezentowanych treści, wobec czego nie będę ich przytaczał.

Niezależnie od sformułowanej wcześniej prośby Recenzenta dotyczącej odniesienia się do wspomnianych zagadnień, chciałbym podkreślić godne pochwały umiejętności Autorki w zakresie projektowania i przeprowadzenia procesów biotransformacji z użyciem tak szerokiego zestawu mikroorganizmów, w różnych podłożach i w różnej skali. To właśnie produkty przemian zachodzących w trakcie tychże procesów, wyodrębnione i oczyszczone przez Panią Joannę, stały się przedmiotem wszystkich kolejnych prac badawczych. Biorąc pod uwagę wymagany nakład i intensywność prac związanych z pozyskaniem produktów biotransformacji 3-n-butyloftalidu i 3-n-butyldenofalidu, efekty tych działań – sześć publikacji w czasopismach z listy JCR, przygotowanych z aktywnym udziałem Doktorantki oraz dziesięć zgłoszeń patentowych (w tej liczbie sześć przyznanych praw ochrony), zasługuje na uznanie. Chciałbym także podkreślić precyzję pomiarów i interpretacji ich wyników w zakresie ustalania struktur substratów i produktów analizowanych procesów. Dopuszczając udział pozostałych współautorów publikacji w interpretacji szczegółowych danych spektroskopowych, uzyskanych w wyniku pomiarów metodą magnetycznego rezonansu jądrowego, z wykorzystaniem technik  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR oraz ich wariantów korelacyjnych ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC), doceniam umiejętności Doktorantki związane z syntetycznym omówieniem tych złożonych w interpretacji wyników. W podobny sposób odnoszę się do interpretacji i omówienia przez Autorkę wyników pomiarów, przeprowadzonych z wykorzystaniem spektrometrii mas w różnych wariantach jonizacji matrycy. Dopiero uważna lektura publikacji (wraz z dołączonymi zestawami danych eksperymentalnych) będących podstawą niniejszej dysertacji, pozwala na docenienie w pełni osiągnięć Pani mgr inż. Joanny Gach, jako badaczki. Tym bardziej będę rad, jeżeli rozwieje moje wątpliwości dotyczące dwóch zagadnień omówionych w tekstach wspomnianych publikacji:

1. Informacje zawarte w publikacji P1 wskazują, że wartości kąta skręcalności optycznej  $[\alpha]^{25}$  (w świetle lampy sodowej) produktu biotransformacji: 3-n-butylo-3-hydroksyftalidu, w

zależności od szczepu grzyba nie były identyczne, a mieściły się w przedziale od -3,6 do -0,5. Co może być powodem tychże różnic, przy założeniu identycznej struktury produktu? Czy znana jest konfiguracja R/S enancjomeru będącego produktem biotransformacji?

2. Co stało się powodem zmiany numeracji atomów węgla w pierścieniu laktonu na rys. 4 (Fig. 4) str. 5 of 15 w publikacji P2 oraz w publikacji P3? Wprowadzono numery 3a i 7a w odniesieniu do atomów, które w pracy P1 mają numery odpowiednio 12 i 13.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej uważam, że Autorka zrealizowała zaplanowane działania naukowe. Dlatego też mam nadzieję, że komentarze i prośby o wyjaśnienie niektórych zagadnień, które nie rzutują na **moją jednoznacznie pozytywną ocenę dysertacji**, staną się przyczynkiem dyskusji naukowej w trakcie finalnego etapu postępowania awansowego.

Uznając oryginalność i wartość merytoryczną ocenianej rozprawy, jako spełniające formalne i zwyczajowe wymagania stawiane dysertacjom doktorskim stwierdzam, że niniejsza rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 187, ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2023. poz. 742 ze zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Gach, do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ponadto, chciałbym docenić wartość problematyki badawczej, jakość uzyskanych wyników i aktywne zaangażowanie Doktorantki w tok prac, włączonych w realizację projektów naukowych. Efektem wspomnianego zaangażowania jest dorobek liczący 6 publikacji z listy filadelfijskiej cytowanych już (bez autocytowań) 23 razy, a także 6 przyznanych współautorskich patentów oraz 4 zgłoszenia patentowe. Na uwagę zasługuje także aktywność konferencyjna Pani Joanny, której rezultatem formalnym jest 17 współautorskich komunikatów, w większości w formie plakatu oraz dwie monografie pokonferencyjne. Warto również zwrócić uwagę na blisko roczny staż zagraniczny Doktorantki, który odbyła w Politechnice Mediolańskiej, zajmując się redukcją wiązania podwójnego nienasyconych laktonów oraz hydratami kwasów tłuszczowych.

Podkreślając naukową i aplikacyjną wartość dysertacji, aktywność Autorki w sferze ochrony patentowej wyników Jej pracy oraz samodzielność badawczą, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Gach w sposób, zwyczajowo przyjęty przez Radę.