



Prof. dr hab. inż. Ewa Żymańczyk-Duda,  
Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wroclawska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 29  
50-370 Wrocław  
email: [ewa.zymanczyk-duda@pwr.edu.pl](mailto:ewa.zymanczyk-duda@pwr.edu.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Krawczyk-Łebek**  
**z tytułu**  
**z tytułu**  
*„Synteza i biotransformacje flawonoidów*  
*z grupą metylową”*

Związki flawonoidowe to metabolity roślinne, wśród których są takie o znaczącym wpływie pro-zdrowotnym dla człowieka. Ich bioaktywność wskazuje na możliwość zastosowania w terapii między innymi nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych, sercowo-naczyniowych czy cukrzycy. Jest to przyczyną nie tylko ciągłego wzrostu zainteresowania i rozwoju tematyki badawczej związanej z pozyskiwaniem i modyfikacjami chemicznymi tych cząsteczek, ale także powoduje ciągły wzrost zapotrzebowania ze strony zarówno przemysłu spożywczego jak i farmaceutycznego. Nic zatem dziwnego, że ponad 23 tys. artykułów naukowych w ostatniej dekadzie jest poświęconych biologicznej aktywności flawonoidów, szczególnie tych o możliwym zastosowaniu przeciwnowotworowym. Badania wskazują, że obecność tych związków w codziennej diecie wyraźnie wpływa na wiele procesów obniżających ryzyko zachorowania poprzez to, że hamują między innymi procesy zapalne, metastatyczne, obniżają także aktywność kinaz białkowych oraz wymiatają wolne rodniki tlenowe. Jednak zastosowanie związków flawonoidowych jako farmaceutyków nie jest tak powszechne jak można by oczekiwać, co wiąże się z ograniczeniami w ich pozyskiwaniu z materiału roślinnego oraz z ich niską biodostępnością. Naukowcy z Uniwersytetu Przyrodniczego z sukcesami rozwijają tematykę badawczą poświęconą pozyskiwaniu nowych związków flawonoidowych, podnoszeniu ich biodostępności oraz oznaczaniu ich aktywności biologicznej powiązanej ściśle ze strukturą i konfiguracją





przestrzenną tych cząsteczek. Zależność bioaktywności od struktury bardzo często jest przeszkodą w opracowaniu chemicznych metod syntezy, gdzie bardzo trudno, lub czasami jest to wręcz niemożliwe, uzyskać związek o zdefiniowanej konfiguracji. Stąd też, by ten cel zrealizować, wykorzystuje się biokatalizatory, w tym komórki drobnoustrojów i ich bioróżnorodny system enzymatyczny. Zaletą stosowania cało-komórkowych biokatalizatorów jest ich responsywność na zmieniane warunki zewnętrzne, w przypadku biotransformacji, są to warunki prowadzenia procesu. Pozwala to między innymi na ukierunkowanie reakcji celem pozyskania pożądaných produktów biokonwersji. Jednak nie jest to zadanie trywialne, ponieważ trzeba najpierw dobrze poznać fizjologię organizmu wykorzystywanego jako biokatalizator, a w przypadku grzybów jest to szczególnie trudne ze względu na wspomnianą elastyczność metaboliczną, ale także ze względu na ich skomplikowane cykle rozwojowe, których stadia charakteryzują się odmiennymi aktywnościami układu enzymatycznego. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Agnieszko Krawczyk-Łebek, wykonana pod opieką Pani prof. dr hab. inż. Edyty Kostrzewy-Susłowej oraz Pani dr inż. Moniki Dymarskiej, jest dowodem na to, że biokatalizatory grzybowe są skutecznym narzędziem biotechnologicznym umożliwiającym modyfikację związków flawonoidowych i pozyskiwanie nowych struktur, badanych następnie pod kątem ich biodostępności i profilu aktywności biologicznej. Efektem pracy naukowej Pani mgr Krawczyk-Łebek jest składający się na niniejszą dysertację, cykl powiązanych tematycznie publikacji oznaczonych symbolami od P1 do P5, dla których sumaryczny IF wynosi 27,212, a liczba punktów, zgodnie z punktacją MNiSW wynosi 660. Są to artykuły opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: „*Catalysts*” oraz „*International Journal of Molecular Sciences*”. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt wysokiego udziału własnego doktorantki w tych badaniach, wynoszącego od 60% do 70%, co zostało potwierdzone odpowiednimi oświadczeniami współautorów oraz pozytywna ocena jej aktywności naukowej potwierdzona przez recenzentów, którzy zarekomendowali te artykuły naukowe do opublikowania. Cykl prac otwiera publikacja P1 dotycząca biokonwersji 2'-hydroksy-5'-metylochalkonu (opatrzonego przez autorkę w rozprawie numerem 3a) oraz 6-metyloflawanonu (o numerze 4a w tekście). Kolejny artykuł oznaczony jako P2 dotyczy biokonwersji 2'-hydroksy-2-metylochalkonu (o numerze 3b w tekście rozprawy), natomiast P3 opisuje biotransformacje 2'-metyloflawanonu (struktura 4b) oraz 2'-metyloflawonu (5b). Kolejne biokonwersje 2'-hydroksy-4-metylochalkonu (3c) i 4'-metyloflawonu (5c) oraz 4'-metyloflawanonu (4c) są opisane odpowiednio w pracach P4 i





P5. Istotnym elementem dwóch ostatnich artykułów jest wzbogacenie ich o wyniki symulacji komputerowych wykonanych dla opisywanych związków i pozwalających na ocenę właściwości chemicznych, farmakokinetyki, biodostępności i aktywności biologicznych otrzymanych pochodnych. Pani mgr Krawczyk-Łebek wykorzystywała szczepy grzybów entomopatogennych takich jak *Beauveria bassiana* KCH J1.5, *Isaria fumosorosea* KCH J2 lub *Isaria farinosa* KCH J2.6 jako biokatalizatory w wyżej wymienionych biotransformacjach mikrobiologicznych. Ostatecznie wymiernym efektem działań naukowych młodej badaczki polegających na biotransformacji 8 substratów flawonoidowych (chalkonów, flawanonów i flawonów) z podstawnikiem metylovym, jest otrzymanie 32 produktów biokonwersji, w tym 29 nowych i są to kolejno: 2 glikozydy chalkonów, 7 glikozydów dihydrochalkonów, 14 glikozydów flawanonów, 1 pochodna glikozydowa kwasu benzoowego i 5 glikozydów flawonów. Struktury zostały scharakteryzowane metodami chromatograficznymi i spektroskopowymi – co jest udokumentowane w sposób nie budzący żadnych wątpliwości.

Ważnym etapem eksperymentów było także opracowanie skutecznych procedur podniesienia skali procesów do półpreparatywnej. Daje to możliwość oczyszczenia i izolacji związków w ilościach wystarczających do dalszych oznaczeń aktywności, co Autorka zapowiada w swojej rozprawie.

Przedstawiona mi do zaopiniowania dysertacja jest przewodnikiem i komentarzem do dołączonych manuskryptów. Została ona napisana w sposób logiczny, zwięzły i łatwy w odbiorze. Zawiera typowe paragrafy czyli: wykaz publikacji, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusja, podsumowanie, indeks źródeł literaturowych, oświadczenia współautorów, oraz zestawienie dorobku naukowego Pani mgr inż. Krawczyk-Łebek. Tekst dokumentu prowadzi czytelnika przez kolejne etapy pracy eksperymentalnej tworzącej logiczny ciąg przyczynowo skutkowy. I tak Autorka zaczyna od syntezy substratów w tym 1. chalkonów (2'-hydroksy-5'-metylochalkonu; 2'-hydroksy-2-metylochalkonu; 2'-hydroksy-4-metylochalkonu – odpowiednio 3a, b, c); 2. flawanonów (6-metyloflawanonu, 2'-metyloflawanonu i 4'-metyloflawanonu - 4a, b, c); 3. falwonów ( 2'-metyloflawonu i 4'-metyloflawonu - 5b, c). Następnie prowadzi biotransformacje w małej skali (10 mg substratu w DMSO na 100 mL kultury biokatalizatora, stężenie substratu wynosiło 0,42 mM) i oznacza czas biotransformacji pozwalający na osiągnięcie maksymalnego stopnia konwersji wyjściowego związku. Wyniki tych badań pozwalają na zaplanowanie kolejnych eksperymentów ukierunkowanych na podniesienie





skali do półpreparatywnej. Pani mgr inż. Krawczyk-Łebek osiąga ten cel stosując ostatecznie 500 mL hodowli biokatalizatora i 50 mg substratu w 2 mL DMSO. Każdorazowo biotransformacje są kilkudniowe i trwają 9-10 dni. Ostatecznie Doktorantka skutecznie wyizolowała produkty biokatalizy i to pozwoliło na weryfikację ich struktury i jej prawidłowe określenie, a tym samym umożliwiło skorzystanie z narzędzi internetowych - programów SwissADME i Way2Drug Pass Online, które na podstawie struktury związku chemicznego pozwalają obliczyć przewidywane właściwości farmakokinetyczne i fizykochemiczne oraz potencjalną aktywność biologiczną badanych pochodnych flawonoidów.

Pani mgr Krawczyk-Łebek potwierdziła postawione tezy badawcze, wskazując, że aparat enzymatyczny grzybów strzępkowych: *Isaria fumosorosea* KCH J2, *Isaria farinosa* KCH J2.6 i *Beauveria bassiana* KCH J1.5 może być wykorzystywany w następujących biokonwersjach: 1. reakcji przyłączenia jednostki 4-*O*-metyloglukopiranozy do atomu węgla pierścienia aromatycznego oraz heterocyklicznego pierścienia C flawonoidów z grupą metylową; 2. do redukcji wiązania podwójnego chalkonów pomiędzy atomami węgla C- $\alpha$  i C- $\beta$ ; 3. do hydroksylacji układu flawonoidu; 4. do utlenienia podstawnika metylowego do grupy hydroksymetylowej. Wykazała także, że efektywność biotransformacji jak i jej regioselektywność zależą od lokalizacji podstawnika metylowego w strukturze związku flawonoidowego, co Doktorantka zaobserwowała szczególnie wyraźnie w przypadku *B. bassiana* KCH J1.5, który nie był aktywny wobec układu flawonu z grupą metylową przyłączoną w pozycjach C-2' oraz C-4'. Natomiast *I. fumosorosea* KCH J2 i *I. farinosa* KCH J2.6 katalizowały reakcję utlenienia grupy metylowej 4'-metyloflawanonu i 4'-metyloflawanonu do grupy karboksylowej. Szczep *B. bassiana* KCH J1.5 okazał się skutecznym biokatalizatorem reakcji glikozylacji 4'-metyloflawanonu do 4'-metyleno-*O*- $\beta$ -D-(4''-*O*-metyloglukopiranozylo)-flawanonu, wydajność tej reakcji była najwyższa i wynosiła 52,0%. Grzyb strzępkowy *I. fumosorosea* KCH J2 z kolei wykazał najwyższą efektywność glikozylacji 6-metyloflawanonu do 6-metylo-4-*O*- $\beta$ -D-(4''-*O*-metyloglukopiranozylo)-flawanonu i wynosiła ona 23,3%. Monitorowanie przebiegu biokonwersji pozwoliło postulować, że transformacja grupy metylowej metyloflawanonu i metyloflawanonu przez mycelia *B. bassiana* KCH J1.5, *I. fumosorosea* KCH J2 i *I. farinosa* KCH J2.6 przebiega dwuetapowo i zaczyna się od hydroksylacji grupy metylowej, a kolejnym etapem jest glikozylacja.







Podczas lektury pracy doktorskiej nasunęły mi się pewne uwagi i pytania, niektóre z nich wymieniam poniżej.

Drobne uwagi dotyczące tekstu:

1. Na str. 14 Autorka pisze:

„*Zmetylowane flawonoidy...*” – raczej po prostu „*metylowane*”

2. Na str. 15 Autorka pisze:

„...*szeroka gama stawonogów...*” – raczej „*wiele*” czy też „*różne*” stawonogi

Pytania i uwagi do dyskusji:

1. W pracy nie ma informacji o standaryzacji inokulum zarówno w przypadku biotransformacji prowadzonych na małą jak i półpreparatywną skalę. Nie ma ich także w artykułach wcześniejszych, na które powołuje się Autorka opisując metody pasażowania i hodowli grzybów. W tekście Pani mgr inż. Krawczyk-Łebek pisze ogólnie o przenoszeniu drobnoustrojów i jeśli jest to przeniesienie z podłoża stałego to warto byłoby opisać czy grzyby były pobierane po prostu eżą czy też był zastosowany jakiś roztwór detergentu pozwalający na zebranie zarodników? Jeśli tak to czy szacowana była ich liczba?

Natomiast, gdy Autorka pobiera materiał biologiczny z hodowli płynnej to podaje pobraną objętość kultury, co znowu nie informuje nas o inokulum, chociażby o jego gęstości czy liczbie komórek. Jest to istotne jeśli zamierzeniem jest podnoszenie skali procesu i dalsze rozwijanie tej technologii.

2. Kolejna uwaga też jest związana z procesem inokulacji w eksperymentach w skali półpreparatywniej. Autorka pisze, że dodawała 1mL kultury do 500mL podłoża. Czy były jakieś etapy przejściowe – stopniowego zwiększania objętości hodowli grzybów? Pytanie wynika z faktu, że często zarówno grzyby jak i bakterie by ich populacja się prawidłowo zwiększała, wymagają faz adaptacyjnych i stopniowego przenoszenia do większych objętości. Dotyczy to zarówno zakładania hodowli ciągłych jak i okresowych (jak w niniejszej pracy).

3. Niniejsza uwaga wiąże się z pytaniem o to czy badana była tolerancja wykorzystywanych grzybów na wzrastające stężenie substratów i DMSO, by sprawdzić jaka jest ewentualna górna granica dla badanych biotransformacji oraz czy badana była żywotność biokatalizatora po zakończonym procesie biokonwersji, w kontekście ewentualnego ponownego zastosowania mycelium?





Politechnika  
Wroclawska

4. W pracy nad biokonwersjami związków flawonoidowych pojawiają się problemy badawcze, które w przypadku dalszego powiększania skali mogą stanowić poważną przeszkodę. Są to między innymi rozpuszczalność substratów czy izolacja produktów. Autorka w swojej pracy stosuje rozwiązania powyższych trudności podając związki flawonoidowych w DMSO do kultury biokatalizatora czy stosując preparatywną chromatografię cienkowarstwową. Rozwiązania te jednak nie będą skuteczne w większej skali. Bardzo proszę o głos w dyskusji w tej sprawie i może jakąś propozycję własną lub też opartą o istniejące rozwiązania.

4. Autorka wspomina też o planowanych badaniach biologicznych – bardzo proszę o rozszerzenie tego tematu . Co to będą za badania, czy może już zostały zapoczątkowane?

Powyższe uwagi nie obniżają mojej wysokiej oceny pracy naukowej Pani mgr inż. Agnieszki Krawczyk-Łebek.

Konkludując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2020 *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2020, poz. 85) i niniejszym występuję z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Łebek-Krawczyk do dalszych etapów postępowania.

*Wnioskuje także o wyróżnienie przedstawionej mi do zaopiniowania rozprawy doktorskiej.*

Ewa  
Zygmunt  
Krawczyk

