



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

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra inż. Dawida Hernika
zatytułowanej**

*„Mikrobiologiczna synteza związków zapachowych i ich pochodnych o
aktywnościach biologicznych”*

Zastosowanie biokatalizatorów do otrzymywania pożądaných produktów reakcji chemicznych jest ważnym i aktualnym kierunkiem badań, pozwalającym na znaczne ograniczenie stosowania toksycznych reagentów i prowadzenie procesów chemicznych zgodnie z zasadami zielonej chemii, a więc ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływania na środowisko. Wykorzystanie narzędzi biologicznych, całych komórek czy preparatów enzymatycznych w reakcjach biokonwersji substratów prochiralnych czy zawierających jedno lub więcej centrów stereogenicznych pozwala na otrzymywanie izomerów o zdefiniowanej konfiguracji, co często jest niemożliwe lub mało efektywne w przypadku innego podejścia syntetycznego. Przedstawiona mi do zaopiniowania praca wpisuje się w ten obszar biotechnologii, gdyż obejmuje swoim zakresem badania nad poszukiwaniem biokatalitycznych metod syntez cennych produktów, również takich o zdefiniowanej aktywności biologicznej. Efektem pracy naukowej Pana mgra inż. Dawida Hernika jest składający się na niniejszą dysertację, cykl powiązanych tematycznie publikacji oznaczonych symbolami od P1 do P4, dla których sumaryczny IF wynosi 21,328, a liczba punktów, zgodnie z punktacją MNiSW wynosi 520. Są to artykuły opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: „Catalysts”, „Frontiers in Microbiology” i „Molecules”. Szczegółowe oświadczenia dotyczące poszczególnych artykułów pozwalają ocenić, że wkład Pana Hernika był w każdym przypadku znaczący i obejmował



Politechnika
Wrocławska

wykonywanie kluczowych eksperymentów biokonwersji, analizę wyników, ocenę aktywności biologicznej otrzymywanych produktów oraz przygotowanie manuskryptów, o czym dodatkowo świadczy fakt, że Pan mgr inż. Hernik jest pierwszym autorem artykułów oraz autorem korespondencyjnym.

Oryginalność naukowa

Podjęte przez Pana mgra inż. Dawida Hernika badania oraz uzyskane wyniki stanowią znaczący wkład w rozwój dyscypliny. Autor opracował nowe, biokatalityczne metody syntezy związków o podwyższonej wartości oraz dla niektórych z nich określił zależności między strukturą a ich aktywnością biologiczną. Wyniki tych badań są udokumentowane w recenzowanych artykułach o zasięgu międzynarodowym oraz są przedmiotem zgłoszeń patentowych.

Opinia o dysertacji

Dokument zawiera typowe paragrafy: 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 Pana mgra inż. Dawida Hernika. Tekst jest napisany w sposób zwięzły i rzeczowy, co ułatwia odbiór i śledzenie toku rozumowania Autora.

Jak było powyżej, na rozprawę składa się cykl artykułów naukowych o zasięgu międzynarodowym, w których to pracach Pan mgr inż. Dawid Hernik ma znaczący udział, co świadczy o Jego dużej wiedzy w obszarze prowadzonych badań oraz o umiejętności planowania i realizowania założonych celów naukowych, a także umiejętności modyfikowania stosowanych metod w zależności od uzyskiwanych wyników eksperymentów.

Cykl prac otwiera publikacja **P1** dotycząca utleniania doili (*anty*-3-metylooktano-1,4-diolu 1a i *syn*-3-metylooktano-1,4-diolu 1b) z wykorzystaniem układów enzymatycznych bakterii należących do rodzajów: *Dietzia*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Rhodococcus* i *Streptomyces* pochodzących z kolekcji Polskiej Akademii Nauk (PCM) oraz z German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). Całokomórkowe biokatalizatory były namnażane na produktach ubocznych przemysłu olejarskiego. Autor zastosował technikę biotransformacji na podłożu stałym w prototypowym reaktorze, co pozwoliło na zwiększenie skali procesu z 10 mg stosowanego substratu do 100 mg. Badania przesiewowe



prorowadzone w mniejszej skali pozwoliły wytypować biokatalizator i warunki procesu dla eksperymentów prowadzonych w bioreaktorze. Biotransformacje diolu oznaczonego jako 1a prowadzone w zwiększonej skali, katalizowane przez *Rhodococcus erythropolis* PCM2150 i *Gordonia rubripertincta* pozwoliły na otrzymanie enancjomerycznie wzbogaconych izomerów trans-(+)-(4S,5R) (2a) (ee = 35-64%, wydajność izolowana = 15-45%) i cis-(-)-(4S,5S) (2c) (ee = 25-66%, wydajność izolowana = 14-42%) whisky laktonu. Natomiast w wyniku bioutlenienia diolu oznaczonego jako 1b przez *Rhodococcus erythropolis* DSM44534 i *Gordonia rubripertincta* powstały enancjomerycznie wzbogacone izomery trans-(+)-(4S,5R) (2a) (ee = 66-80%, wydajność izolowana = 17-68%) i cis-(+)-(4R,5R) (2d) (ee = 66%, wydajność izolowana = 62%) whisky laktonu. Dalszym celem badań było podniesienie enancjoselektywności utleniania racemicznych dioli oznaczonych w pracy jako 1a i 1b i ten etap badań i uzyskane wyniki są opisane w artykule **P2**. Autor w tym przypadku zastosował inne podejście badawcze wykorzystując biokatalizator – bakterie - w hodowli typu SmF (wglębnej) na podłożach dostosowanych do potrzeb mikroorganizmów, dodatkowo wzbogacając eksperymenty o wykorzystanie proszków acetonowych. W tym przypadku badania przesiewowe (w skali z użyciem 1mg substratu) pozwoliły wnioskować, że enancjomerycznie czyste lub wysoce wzbogacone trans- i cis-whisky laktony powstawały w biotransformacjach katalizowanych przez mikroorganizmy z rodzaju *Dietzia* sp., oraz *Rhodococcus* sp. Kolejne biokonwersje w powiększonej 10 krotnie skali (10 mg substratu) pozwoliły na wytypowanie bakterii *R. erythropolis* DSM44534 i *R. erythropolis* PCM2150 jako najefektywniejszych. Zastosowanie tych mikroorganizmów pozwoliło po 48 godz. reakcji z diolem oznaczonym jako 1a, otrzymać od 25 do 82% enancjomeru trans-(-)-(4R,5S) (2b) (ee = 99%), oraz od 18 do 75% enancjomeru cis-(+)-(4R,5R) (2d) (ee = 99%). W przypadku diolu 1b i *R. erythropolis* DSM44534 powstawał enancjomer cis-(+)-(4R,5R) (2d) (ee = 99%), a przy zastosowaniu *R. erythropolis* PCM2150 po 24 godz. powstawały enancjomery trans-(-)-(4R,5S) (2b) (31%) oraz cis-(+)-(4R,5R) (2d) (69%) whisky laktonu. Również w tym przypadku kolejnym etapem było zwiększenie skali i wykorzystanie 100 mg substratu na jednym cykl biokonwersji. W przypadku substratu 1a i *R. erythropolis* DSM44534 po 144 godz. powstawały enancjomery trans-(-)-(4R,5S) (2b) (ee = 99%, wydajność = 22%) oraz cis-(+)-(4R,5R) (2d) (ee = 99%, wydajność = 8%) whisky laktonu. Natomiast konwersja diolu 1b z udziałem *R. erythropolis* PCM2150 po 42 godz. Owocowała powstaniem izomerów: trans-(+)-(4S,5R) (2a) (ee = 97%, wydajność 14%) oraz optycznie czystego cis-(+)-(4R,5R) (2d) (ee = 99%, wydajność = 60%) whisky laktonu. W przypadku



Politechnika
Wroclawska

R. erythropolis DSM44534 po 42 godz. produktem był enancjomerycznie wzbogacony trans-(+)-(4S,5R) (2a) (ee = 90%, wydajność 28%) oraz cis-(+)-(4R,5R) (2d) (ee = 99%, wydajność = 40%) whisky lakton. Przeprowadzone według opisanych metod biokonwersje dioli nie pozwoliły na otrzymanie cis-(-)-(4S,5S) (2c) whisky laktonu, dlatego Autor zmienił podejście i wykorzystał biokatalizator w postaci proszku acetonowego i finalnie tylko *R. erythropolis* DSM44534 katalizował reakcję utleniania diolu 1b do enancjomerycznie wzbogaconego izomeru cis-(-)-(4S,5S) (2c) whisky laktonu (ee = 86%). Kolejne artykuły składające się na dysertację dotyczą mikrobiologicznych transformacji związków z pierścieniem aromatycznym w strukturze. Praca **P3** dotyczy badań nad otrzymywaniem piperonalu z izosafrolu. Testy przesiewowe obejmowały 23 szczepy grzybów oraz 22 szczepy bakterii i ich celem było określenie aktywności tych biokatalizatorów wobec izosafrolu (oznaczonego jako 6a), występującego w formie mieszaniny diastereoizomerów (E/Z) w stosunku 8:2. Większość wykorzystanych drobnoustrojów nie była aktywna wobec ksenobiotyku. Analiza ekstraktów z hodowli *Trametes versicolor* AM536, *T. hirsuta* d28 i *Mortierella isabelina* AM212 po 7 i 14 dniach pokazała, że podczas biotransformacji powstawały niewielkie ilości (8-14%) piperonalu. Natomiast w biotransformacjach z *Piptoporus betulinus* AM40 i *Laetiporus sulphurens* AM515 jako jedyny produkt powstawał diol oznaczony w pracy jako 6b. Ta ostatnia obserwacja otworzyła inny obszar badań - biokonwersje pochodnych arylopropanowch w postaci dioli - w pracy oznaczonych jako 6b-10b, opisane w artykule P4 - o czym będzie w dalszej części opinii. Wyniki dotyczące syntezy piperonalu (artykuł **P3**) były nadal niezadowolające, co skłoniło Autora do modyfikacji metod hodowli biokatalizatora - *Trametes versicolor* AM536, co jednak nie przyniosło oczekiwanych rezultatów. Kolejne etapy badań prowadzone były z kolejnymi biokatalizatorami - grzybami pozyskanymi od dr Katarzyny Patejuk z Katedry Ochrony Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu i potwierdziły, że większość z nich nie przekształca izosafrolu. Tylko *Trametes hirsuta* (Th2_2 i d28), których aktywność pozwoliła na wyizolowanie odpowiednio 38% i 43% piperonalu po 14 dniach biotransformacji. Biotransformacje w zwiększonej skali (200 mg substratu) po 11 dniach zaowocowały wyizolowaniem piperonalu z wydajnością 62% (0,124 g) i 50,5% (0,101 g) odpowiednio dla szczepów Th2_2 i d28. Ten etap pracy jest przedmiotem dwóch zgłoszeń patentowych: P.444274 i P.444273. Kolejna publikacja z cyklu to praca **P4**, w której opisane są badania nad biotransformacjami dioli z pierścieniem aromatycznym w strukturze - oznaczone jako 6b-10b w pracy, które były syntezowane drogą chemoenzymatyczną. Celem



mikrobiologicznego utleniania substratów – dioli 6b-10b, było otrzymanie aromatycznych aldehydów – związków zapachowych. Jednak produktami były głównie hydroksyketony 6c-9c. Biotransformacje przesiewowe obejmowały testowanie 22 szczepów bakterii z rodzajów: *Bacillus*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia* i *Streptomyces* oraz ponad 30 grzybów z rodzajów *Absidia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium oxysporum*, *Fusicoccum*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicilium*, *Phanerochaete*, *Rhizopus*, *Spicaria* i *Trichoderma*. Głównymi produktami były hydroksyketony 6c-10c oraz niewielkie ilości diketonów i izomeryczne formy hydroksyketonów. Najlepszymi biokatalizatorami były bakterie z rodzaju *Dietzia* sp. DSM44016 oraz gatunki *R. erythropolis* PCM2150, *R. erythropolis* DSM44534 i *R. ruber* PCM2166. Najwięcej produktu oznaczonego w pracy jako 6c (85%) powstawało w biotransformacji z *Dietzia* sp. DSM44016, natomiast hydroksyketony 7c i 8c najwydajniej syntezował *R. ruber* PCM2166, a dużą ilość produktu 9c (77–79%) powstawała z udziałem *R. erythropolis* DSM44534 i *R. ruber* PCM2166. Biokonwersje w zwiększonej skali trwały 11 dni z dodatkiem 0,2 g dioli oznaczonych w pracy jako 6a-9a. Hydroksyketon 6c powstawał z udziałem *Dietzia* sp. DSM44016 (0,125 g, wydajność = 62,5%), natomiast w przypadku związku 7c, użycie *R. ruber* PCM2166 pozwoliło otrzymać 0,081 g (wydajność = 40,5%). I kolejno, z udziałem *R. erythropolis* DSM44534 Autor uzyskał 0,115 g hydroksyketonu 8c (wydajność = 57,5%), a reakcja z *R. erythropolis* PCM2150 pozwoliła na otrzymanie produktu 9c (0,119 g, wydajność = 59,5%). W dalszych etapach Pan mgr inż. Hernik podjął próbę ewaluacji aktywności biologicznej arylopropenów 6a-10a, dioli 6b-10b i hydroksyketonów 6c-9c. I tak aktywność fungistatyczna była oznaczona wobec 4 szczepów drożdży z gatunku *Candida albicans*: 636/20, 595/20, 38, i ATTC90028 i wyrażona w postaci wartości MIC50, następnie stosując metodę DPPH można było określić właściwości przeciwutleniające badanych związków i kolejno oznaczona została ich toksyczność w badaniach z erytrocytami oraz aktywność antyproliferacyjna wobec różnych linii komórkowych.

Podsumowując, pracę Pana mgra inż. Hernika oceniam bardzo wysoko, Autor zrealizował postawione cele badawcze umiejętnie planując i modyfikując prowadzone eksperymenty. Na podkreślenie zasługuje fakt zastosowania nietypowych metod biokonwersji – np. w eksperymentach dotyczących powiększania skali w procesach prowadzonych na podłożach stałych. Dobrze napisany tekst pozwala na łatwe prześledzenie toku rozumowania Autora przy planowaniu poszczególnych etapów badań oraz dostarcza



wszystkich niezbędnych informacji pozwalających na ocenę jakości eksperymentów. Na uwagę zasługuje też część analityczna pracy, dowodząca dużych umiejętności i dobrego warsztatu autora w obszarze różnych technik analitycznych stosowanych do ewaluacji wyników i definiowania struktur uzyskiwanych produktów biokonwersji.

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

1. W tekście są słowa w języku angielskim np. str. 33: „*Serratia* and *Streptomyces*”
2. Str. 35”z rodzaju *Candida albicans*” – raczej z gatunku
3. Str. 35 Rys. 10 – żaden z chiralnych związków nie ma zaznaczonego centrum chiralności ani konfiguracji absolutnej – dotyczy produktów biokonwersji czyli np. hydroksyketonów.
4. Proszę o głos w dyskusji na temat wyników biokonwersji izosafrolu do piperonalu z użyciem gatunków *Trametes hirsuta* (Th2_2 i d28), których aktywność w małej skali zaowocowała syntezą piperonalu z wydajnością odpowiednio 38% i 43% (po 14 dniach), natomiast i to jest bardzo ciekawe, zwiększenie skali (200 mg substratu), po 11 dniach, pozwoliło na poprawienie tej efektywności do 62% (0,124 g) i 50,5% (0,101 g) odpowiednio dla szczepów Th2_2 i d28. Te wyniki są bardzo interesujące, ponieważ są raczej nietypowe dla procesów biokatalitycznych, zwłaszcza w tak wstępnej fazie badań, zazwyczaj wydajność spada podczas prób powiększania skali.
5. Proszę o głos w dyskusji na temat tego, jakie były przesłanki wyboru opisanych w pracy rodzajów sprawdzanej aktywności biologicznej, szczególnie pytanie dotyczy badań nad aktywnością wobec erytrocytów (hemoliza i płynność krwinek czerwonych) oraz nad aktywnością antyproliferacyjną.

Konkludując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U 2023 r., poz. 742 z późn. zm.) i niniejszym występuję z wnioskiem do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgr inż. Dawida Hernika do dalszych etapów postępowania.

Wnioskuje także o wyróżnienie przedstawionej mi do zaopiniowania rozprawy doktorskiej.