



**Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**  
Katedra Biotechnologii I i Mikrobiologii Żywności  
ul. Wojska Polskiego 48  
60-637 Poznań  
tel. +48 61 848 70 01  
e-mail: rektorat@up.poznan.pl

Poznań, dn. 1.09.2023 r.

**Prof. dr hab. Paweł Cyplik**

### **Recenzja**

#### **rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Gach pt.: „Aktywność biologiczna ftalidów i ich metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego”**

Podstawą wykonania niniejszej recenzji było pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, prof. dr hab. Zbigniewa Lazara, o powierzeniu mi funkcji Recenzenta zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny z dnia 1 września 2023 r.

Oceny dokonałem według obowiązujących uregulowań prawnych, to jest Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (DZ.U. 2023 poz. 742 ze zm) oraz warunków określonych w § 5 oraz § 8 ustęp 4 i 5 „Trybu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora” wprowadzonego uchwałą nr 31/2023 Senatu Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 26 maja 2023 roku.

Praca doktorska mgr inż. Joanny Gach została wykonana w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod opieką merytoryczną prof dr hab. Teresy Olejniczak, pełniącej funkcję promotora w przewodzie doktorskim oraz dr Stefano Sarry będącego promotorem pomocniczym. Badania prowadzone były w ramach projektów pn. „UPWR 2.0: międzynarodowy i interdyscyplinarny program rozwoju Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu”, oraz programu „Innowacyjny doktorat”. W zespole kierowanym przez prof. Teresę Olejniczak od wielu lat prowadzone są z sukcesem badania w różnych obszarach biotransformacji mikrobiologicznej, a oceniana praca wpisuje się właśnie w ten nurt badań.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl trzech recenzowanych artykułów naukowych opatrzonych tytułem „Aktywność biologiczna ftalidów i ich metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego”.

W jej skład wchodzi:

1. 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)
2. 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)
3. 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)

Na cykl składają się prace opublikowane w latach 2021-2023. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR). Łączna liczba punktów obliczona wg daty opublikowania prac wynosi 420 pkt. MEiN, a sumaryczny IF jest równy 16,735. Powyższe dane naukometryczne oceniam jako bardzo wysokie. Przedstawione prace są opracowaniami zbiorowymi, w których mgr inż. Joanna Gach jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym. Wkład Doktorantki w oryginalne prace twórcze polegał na współtworzeniu i opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu wyników oraz ich interpretacji, a także wizualizacji danych i napisaniu manuskryptów. Zadeklarowany w oświadczeniach udział Doktorantki w powstaniu załączonych publikacji jest istotnie znaczący i wiodący.

W oryginalnych pracach badawczych ujętych w monotematycznym cyklu zawarto szczegółowy opis metodyki badań, sposobu prowadzenia eksperymentów, otrzymanych wyników badań wraz z ich omówieniem prezentowanym w oparciu o czytelne tabele i rysunki, a także krytycznym komentarzem na tle światowej literatury przedmiotu oraz wniosków. Publikacje zawierają bardzo rozbudowany materiał uzupełniający w postaci tabel i wykresów, a także dodatkowych opisów, które zostały zamieszczone w suplementach odpowiednio do każdej publikacji.

Przedstawiona do recenzji rozprawa, zawiera także opracowanie liczące 57 stron maszynopisu, stanowiące przejrzystą syntezę załączonych publikacji. Obejmuje ono streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cel pracy i hipotezy, materiały i metody badań; wyniki i dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz spis literatury (77 pozycji), oświadczenia o wkładzie w publikacjach oraz dorobek naukowy.

Dobór bibliografii jest odpowiedni i obejmuje najważniejsze pozycje literatury przedmiotu. Podsumowując, od strony formalnej praca jest starannie przygotowana i nie budzi moich zastrzeżeń.

Tematyka pracy przekazanej mi do recenzji wpisuje się w aktualną tematykę badań z zakresu dyscypliny biotechnologia. Dotyczy ona ftalidów, które są związkami kształtującymi charakterystyczny zapach roślin z rodziny selerowatych i niektóre z nich znalazły zastosowanie jako środki aromatyzujące żywność. Jednakże ich znaczenie jest znacznie szersze. Znane są ich właściwości farmakologiczne poprawiające kondycję chorych po udarze niedokrwiennym mózgu czy działaniu przeciwwzapalnym w chorobach Alzheimer'a, Parkinsona i innych chorobach neurologicznych. Ponadto w literaturze naukowej można znaleźć doniesienia o ich aktywności przeciwdepresyjnej. Ftalidy są związkami znanymi także ze swych właściwości fungistatycznych wykazujących aktywność przede wszystkim przeciw grzybom strzępkowym.

Pierwszy rozdział pracy to liczące cztery strony wprowadzenie omawiające istniejący stan wiedzy w zakresie ogólnej charakterystyki ftalidów jako związków bioaktywnych. Takiej wielkości wprowadzenie jest często spotykane w pracach doktorskich składających się z cyklu publikacji, jednak moim zdaniem Wprowadzenie takie jest zbyt krótkie. Wprawdzie część ta napisana jest w sposób kompetentny i informatywny, jednak zagadnienia w nim opisane powinny być szerzej zaprezentowane czytelnikowi. W tym miejscu spodziewałbym się raczej dłuższego rozdziału lub też dodatkowej publikacji mającej charakter pracy przeglądowej.

Cel pracy oraz hipotezy badawcze zostały jasno sprecyzowane i są adekwatne do przeprowadzonych badań przedstawionych zarówno w następnych rozdziałach jak i zamieszczonych publikacjach.

Materiały i metody zostały bardzo szczegółowo opisane i przedstawione w zamieszczonych publikacjach. Nie mam szczególnych uwag do tej części pracy.

Wyniki i dyskusja. Wchodząca w skład rozprawy doktorskiej pierwsza praca oznaczona jako Publikacja I dotyczyła zbadania przydatności biokatalizatorów w postaci całych komórek mikroorganizmów do otrzymywania 3-butylo-3-hydroksyftalidu, który jest metabolitem powstającym podczas metabolizmu 3-n-butyliidenoftalidu u ssaków. Transformacje zostały wykonane przy użyciu 10 szczepów grzybów, z których pięć skutecznie wytwarzało 3-butylo-3-hydroksyftalid. Doktorantka zaproponowała mechanizm tworzenia produktu poprzez addycję cząsteczki wody do wiązania podwójnego 3-n-butyliidenoftalidu. Dodatkowo wszystkie otrzymane ftalidy przebadano w stosunku do

klinicznych szczepów *Candida albicans* metodą mikrorozcieńczeń. Dwa ftalidy wykazały minimalne stężenie hamujące, wymagane do zahamowania wzrostu 50% organizmów, poniżej 50 µg/ml.

Osiągnięciem doktorantki jest potwierdzenie użyteczności biotransformacji katalizowanej mikrobiologicznie do otrzymania ssaczego metabolitu 3-n-butyloftalidu. Doktorantka wykazała również, że transformacje mikrobiologiczne mogą skutecznie wytworzyć docelowy związek i można je wykorzystać do lepszego zrozumienia metabolizmu laktonu ftalidowego. Co ciekawe, doktorantka nie stwierdziła bezpośredniej korelacji pomiędzy lipofilowością a aktywnością fungistatyczną badanych związków.

Druga praca (Publikacja II) dotyczyła uzyskania produktów utleniania 3-n-butyloftalidu i zbadania pod kątem ich aktywności wobec monoaminoooksydazy A (MAO-A). W tej pracy również jako biokatalizatory użyto grzybów strzępkowych, co doprowadziło do otrzymania metabolitów (3-n-butylo-10-hydroksyftalidu, kwasu 3-n-butyloftalido-11-owego i 3-n-butylo-11-hydroksyftalidu) hamujących aktywność monoamonoooksydazy A.

W trzeciej pracy (Publikacja III) doktorantka badała efekt fungistatyczny laktonów ftalidowych wobec *Rhodotorula mucilaginosa*. W pracy autorka przebadła siedem wybranych laktonów pod kątem aktywności fungistatycznej i udowodniła, że laktony ftalidowe ograniczają wzrost komórek *R. mucilaginosa*. Dodatkowo wykazała, że Lakton 1 wykazał działanie synergistyczne z flukonazolem, co spowodowało zmniejszenie ilości tego leku potrzebnej do hamowania grzybów.

Podsumowując, w mojej opinii praca jest bardzo wartościowa. Widać w niej dobry plan badawczy i konsekwentną realizację eksperymentów. Silną stroną jest dobra prezentacja wyników i ich szerokie omówienie. Świadczy to o dojrzałości naukowej Autorki i o jej dobrym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym. Wyniki badań noszą znamiona oryginalności i nowości naukowej.

Lektura przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Gach obok bardzo pozytywnej oceny nasuwa pewne uwagi, do których chciałbym, aby odniosła się podczas publicznej obrony:

1. Obecność w środowisku substancji przeciwdrobnoustrojowych (np. antybiotyków) spotyka się z wytwarzaniem przez mikroorganizmy systemów odpornościowych. Takim zjawiskiem jest antybiotykooporność. Doktorantka stwierdziła, że uzyskane w trzeciej publikacji wyniki dotyczące uzyskania dużych wartości IC50 i IC90 dla badanych związków oraz brak ich istotnego wpływu na zawartość ergosterolu mogą być związane z opornością *R. mucilaginosa* IHEM 18459 na flukonazol. Czy

podobne mechanizmy obronne mogą wytworzyć się w odpowiedzi na obecność ftalidów i ich metabolitów? Na czy one mogą polegać?

2. Inhibitory MAO blokują rozpad neuroprzekaźników w mózgu. Podnoszą w ten sposób stężenie dopaminy, serotoniny i noradrenaliny. Dzięki temu pozytywnie wpływają na aktywność psychomotoryczną, koncentrację, nastrój oraz jakość snu. Są to jednak niestety leki które należy stosować ostrożnie, ze względu na dużą liczbę interakcji oraz działań niepożądanych. Doktorantka opisuje, że podczas biotransformacji 3-n-butyloftalidu doszło do bioaktywacji – uzyskane metabolity miały silniejsze właściwości przeciwdepresyjne niż prekursor. To jest bardzo interesujące odkrycie. Według predykcji bioinformatycznych były jednak zdecydowanie bardziej od niego toksyczne. Zatem, czy metabolity 3-n-butyloftalidu zdaniem doktorantki także mogą mieć takie działanie? Jak spożywanie roślin selerowatych może wpływać na nasze zdrowie?
3. W celu sprawdzenia możliwości wykorzystania ftalidu jako środka konserwującego żywność Doktorantka przeprowadziła badania używając matryc spożywczych. Doktorantka stwierdziła, że ftalid wykazał niższą aktywność, niż z użyciem standardowych testów *in vitro*, co jej zdaniem związane było najprawdopodobniej z nierównomierną dystrybucją fungistatyku w produkcie. A może doszło do silnego związania tego związku z matrycą, a tym samym ograniczeniem jego biodostępności dla mikroorganizmów?
4. Występowanie grzybicy zwiększyło się znacznie w ostatnich dziesięcioleciach. Najczęściej spotykane patogenne gatunki drożdżaków to *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans*, lecz zakażenia powierzchniowe i/lub inwazyjne mogą być również wywoływane przez gatunki „nonalbicans” takie jak *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, a także z rodzajów *Trichosporon* czy *Saccharomyces*. W tej grupie wymieniane są, jednak rzadziej grzyby z rodzaju *Rhodotorulla*. Dlaczego zatem Autorka badała aktywność fungistatyczną otrzymanych związków wobec drożdży *Rhodotorula mucilaginosa*, a nie wobec innych ?.

## **Wniosek końcowy**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w dyscyplinie biotechnologia. Jej przedmiot stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe świadczące o doskonałym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym mgr inż. Joanny Gach. Rzeczowe określenie problemu badawczego, sprecyzowanie metodologii badań oraz doskonała ich organizacja pozwoliła na uzyskanie wielu oryginalnych wyników naukowych zarówno o charakterze poznawczym jak i aplikacyjnym. Rozprawa opiera się na dobrze dobranym materiale źródłowym związanym z tematyką pracy. Wszystkie prace wchodzące w skład cyklu są na wysokim poziomie naukowym, co pozwoliło na ich opublikowanie w bardzo dobrych czasopismach naukowych o uznanej renomie w dyscyplinie biotechnologia. Ponadto, mgr Joanna Gach wykazała się wiedzą teoretyczną oraz umiejętnościami pracy samodzielnej oraz w zespołach badawczych w tym międzynarodowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca odpowiada wymaganiom stianym rozprawom doktorskim określonym w art.187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. -Prawo o szkolnictwie wyższymi i nauce (DZ.U. 2023 poz. 742 ze zm).

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy i zawarte w niej elementy nowości naukowej oraz szeroki zakres wykonanych eksperymentów i umiejętności logicznej interpretacji wyników oraz właściwego wnioskowania, a także duże znaczenie poznawcze i praktyczne uzyskanych wyników oraz fakt ich opublikowania w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym stawiam wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Gach.

