



Politechnika  
Wroclawska

23.08.2021

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 Pana mgra inż. Mateusza Łuźnego  
zatytułowanej  
„SYNTEZA I BIOTRANSFORMACJE WYBRANYCH ZWIĄZKÓW  
FLAWONOIDOWYCH”**

Badania nad wykorzystaniem biotransformacji w syntezie związków o wysokiej wartości użytkowej to obszar biotechnologii który, mimo dość długiej historii, rozwija się nadal bardzo intensywnie, dostarczając nowych rozwiązań, alternatywnych do klasycznych syntez organicznych. W dobie wzrastającej świadomości społecznej dotyczącej konieczności dbania o otaczające nas środowisko, rośnie też znaczenie biokatalizy jako ważnego obszaru „zielonej chemii”. Zespoły badawcze, w tym także naukowcy Uniwersytetu Przyrodniczego, kierują swe wysiłki w stronę poszukiwań dróg syntezy nowych związków chemicznych, bądź modyfikacji już poznanych, w tym takich o spodziewanej aktywności biologicznej lub też opracowują procedury, których celem jest skuteczne zastąpienie istniejących chemicznych procesów przemysłowych. Biotransformacje są szczególnie ważne tam, gdzie synteza organiczna zawodzi lub jest mało efektywna, zatem w procesach, w których do otrzymania zdefiniowanego produktu, reakcja musi być enancjo- czy też regioselektywna. Wygodnym narzędziem badawczym, które pozwala na osiągnięcie tych celów są biokatalizatory grzybowe, zarówno drożdże jak i pleśnie.



Politechnika  
Wroclawska

Organizmy te mają bardzo elastyczny metabolizm, a co za tym idzie systemy enzymatyczne, których aktywność można, poprzez właściwie dobrane warunki biotransformacji, dopasować do planowanych procesów biokatalitycznych. Wymaga to jednak doświadczenia i wiedzy z zakresu biochemii, fizjologii grzybów, sposobów ich hodowli czy też technik izolacji, a zatem nie jest to zadanie trywialne. Innym wyzwaniem w obszarze biotransformacji jest podnoszenie skali procesów, które często kończy się niepowodzeniem. Naukowcy z wrocławskiego Uniwersytetu Przyrodniczego mają ogromny wkład w rozwój tej tematyki badawczej, czego dowodem jest również przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra inż. Mateusza Łuźnego.

Praca ta jest poświęcona syntezie nowych związków flawonoidowych oraz takich, które występujących w niskich stężeniach w roślinach leczniczych. Cel ten został osiągnięty poprzez dwuetapowe działania: syntezę chemiczną substratów (zgodnie ze znanymi procedurami chemicznymi) oraz biokatalityczne modyfikacje tychże. Oznacza to również, że praca obejmuje określenie aktywności wybranych grzybów (drożdży oraz entomopatogennych grzybów strzępkowych) wobec tych związków oraz opracowanie efektywnych procedur biokonwersji. Podjęta tematyka badawcza jest ważna, choćby dlatego, że związki flawonoidowe o udokumentowanej aktywności prozdrowotnej, często charakteryzują się niską biodostępnością, stąd też potrzeba ich modyfikacji oraz dlatego, że poprzez modyfikacje można zmienić właściwości tych związków w kierunku podniesienia ich użyteczności. Pan mgr inż. Mateusz Łuźny zaplanował i zrealizował cele naukowe, które wpisują się w dwa nurty badawcze. Jeden to biokatalityczna redukcja wiązania podwójnego pomiędzy atomem węgla C2 a C3 chalkonów, z wykorzystaniem drożdży z kolekcji własnej Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego – miało to prowadzić do produktów, które zachowałyby cechy biologiczne chalkonów, a jednocześnie ich smak byłby słodki. Drugi nurt to wykorzystanie systemów enzymatycznych entomopatogennych grzybów strzępkowych, w tym takich o znanej zdolności do 4-O-metyloglikozytacji hydroksyflawonów, w reakcjach, których celem była biokonwersja metoksyflawonów do związków o lepszej rozpuszczalności, a co za tym idzie biodostępności.



Politechnika  
Wrocławska

Efekty aktywności naukowej Pana mgra inż. Łuźnego obejmują 18 zsyntezowanych chemicznie substratów do procesów biotransformacji - 18 związków flawonoidowych; biokatalityczne uwodornienie 10 chalkonów z udziałem drożdży i otrzymanie 7 dihydrochalkonów oraz biotransformacje 8 metoksyflawonów z wykorzystaniem entomopatogennych grzybów strzępkowych, prowadzące ostatecznie do 21 produktów, z których 8 posiadało grupę hydroksylową w strukturze, a 13 związków to były pochodne 4-O-metyloglukopiranozyłowe. Na podkreślenie zasługuje fakt, że struktury wszystkich związków są bardzo dobrze scharakteryzowane za pośrednictwem metod chromatograficznych i spektroskopowych. Przedstawiona mi do oceny praca jest bardzo spójna i stanowi dobrze udokumentowaną logiczną całość, napisaną w oparciu o cykl powiązanych tematycznie publikacji (P1-P4), w których mgr inż. Mateusz Łuźny jest współautorem o dominującym wkładzie (70 do 80%, zależnie od artykułu), co zostało potwierdzone odpowiednimi oświadczeniami pozostałych Autorów publikacji. Oznacza to, że omawiana praca naukowa została już wysoko oceniona i zweryfikowana przez niezależnych specjalistów, recenzujących wspomniane artykuły naukowe. Na podkreślenie zasługuje fakt, że całkowity współczynnik IF dla publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi: 15,328, a suma punktów według czasopism punktowanych MEiN to 480 (wartości IF zgodne z rokiem opublikowania, a punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki obliczona w oparciu o dane dostępne w dniu: 05.06.2021r). Istotne jest także to, że we wszystkich wspomnianych artykułach, mgr inż. Mateusz Łuźny jest autorem korespondencyjnym.

Dysertacja, która stanowi wprowadzenie do tematyki badawczej i jest komentarzem do dołączonych manuskryptów, została napisana w sposób przejrzysty, zwięzły i łatwy w odbiorze. Zawiera paragrafy zwykle występujące w tego typu rozprawach: 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. Łuźnego.



Politechnika  
Wroclawska

Dokument opisuje racjonalną i logiczną ścieżkę planowania eksperymentów naukowych, która została zrealizowana przez Eksperymentatora i doprowadziła do wartościowych wyników. Najważniejsze osiągnięcia Pana mgr inż. Mateusza Łużnego to opracowanie efektywnych procedur biokatalitycznych dla konwersji chalkonów, metoksychalkonów oraz metoksyflawonów. I tak w przypadku uwodornienia chalkonów, jeśli zachodziło, to produktem biotransformacji był jeden związek, a najaktywniejszym biokatalizatorem był szczep *Yarrowia lipolytica* KCh 71. Aktywność redukcyjna tych drożdży wobec 3-(2''-furylo)-1-(2'-hydroksyfenylo)-prop-2-en-1-onu oraz 3-(2''-tiofeno)-1-(2'-hydroksyfenylo)-prop-2-en-1-onu pozwoliła otrzymać odpowiednie produkty ze stopniem konwersji sięgającym 99%, i co istotne w przypadku pierwszego z substratów 50-cio % stopień konwersji był obserwowany już po 1 godzinie trwania biotransformacji. Wykorzystany szczep wykazywał wysoką aktywność również wobec metoksychalkonów, które Autor poddawał biotransformacji stosując różne stężenia substratów. I tak monometoksychalkony (2'-hydroksy-2''-, 3''- i 4''- metoksychalkony) były efektywnie redukowane do odpowiednich dihydrochalkonów przy zastosowaniu substratu w stężeniu 0,5g/1L podłoża już po godzinie inkubacji. Przy podwyższaniu stężenia substratu do 1g/1L pożywki, konwersja powyżej 40% była osiągana po trzech godzinach transformacji. Wyniki tej części badań pozwoliły na sformułowanie wniosków, że najwydajniej przekształcanymi związkami były chalkony zawierające pojedyncze grupy metoksylove w pierścieniu B, a jeden z nich 2'-hydroksy-2''-metoksychalkon nawet w stężeniu zwiększonym do 5 g substratu na 1 L pożywki, był przekształcany z wydajnością do 50% po 24 godzinach, co oznacza, że w tym przypadku podnoszenie skali procesu było skuteczne. Kolejnymi znaczącymi osiągnięciami Autora dysertacji są opracowane efektywne procedury biokonwersji metoksyflawonów z udziałem grzybów entomopatogennych, jednak w tym przypadku, zależnie od biokatalizatora, biotransformacja prowadziła do powstania więcej niż jednego związku. I tak, gdy

substratem był np. 2'-metoksyflawon produktami były 4 pochodne: 2'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawon; 8-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawon; 5'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawon i 3-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawon, a biokatalizatorem był szczep *Isaria fumosorosea* KCh J2. Natomiast zastosowanie szczepu *Beauveria bassiana* KCh J1, prowadziło do powstania jednego produktu – odpowiednio 2'-hydroksyflawonu. W tym ostatnim przypadku wysoki stopień konwersji (do 43%) mgr inż. Łużny otrzymał także dla procedury przeprowadzonej w skali półpreparatywnej. Bardzo ważnym osiągnięciem zaprezentowanym w dysertacji są wyniki biokonwersji 3'-metoksyflawonu w reakcjach katalizowanych przez *B. bassiana* KCh J1.5, J2.1, J3.2, BBT, *Isaria farinosa* KCh KW1.1, gdzie produkty - odpowiednio: 4'-hydroksyflawon i 4'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawon, powstawały z wydajnością 100%. Biotransformacje dimetoksy- i trimetoksyflawonów (pierścień B) prowadziły do powstawania mieszaniny produktów, w tym pochodnych hydroksylowych lub glukopiranozylowych – zależnie od biokatalizatora. I tak dla 2',5'-dimetoksyflawonu w reakcji z wykorzystaniem szczepu *Isaria farinosa* KCh KW1.1, *B. bassiana* KCh J1.5 powstawały 3 produkty: 5'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawon; 2'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-5'-metoksyflawon oraz 4'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-2',5'-dimetoksyflawon. Zastosowanie *B. bassiana* KCh J1 pozwoliło na podniesieni skali procesu i wyizolowanie 5'-hydroksy-2'-metoksyflawonu i 4'-hydroksy-2',5'-dimetoksyflawonu. Ciekawą obserwacją dokonaną przez Autora dysertacji było to, że w przypadku 3',4',5'-trimetoksyflawonu wyizolowane produkty to metyloglukopiranozylowe pochodne wyjściowego trimetoksyflawonu. Ponad 90-cio % konwersję substratu Autor uzyskał z wykorzystaniem *B. bassiana* KCh J1.5. Ostatni etap pracy obejmował biotransformacje flawonów z grupami metoksyłowymi usytuowanymi zarówno w pierścieniu A jak i A i B. W przypadku tych substratów biotransformacje były mniej efektywne, dodatkowo żaden z badanych mikroorganizmów nie katalizował reakcji O-demetylacji grup metoksyłowych obecnych w pierścieniu A. Dobrym rezultatem zakończyła się trzydniowa biotransformacja 5,7-dimetoksyflawonu w kulturze szczepu *B. bassiana* KCh J1.5, gdzie głównym produktem był 3'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawon, wyizolowany z wydajnością 40%. Wszystkie wyniki badań są dobrze udokumentowane z zastosowaniem chromatograficznych i spektroskopowych metod analitycznych, o czym było wcześniej.





Politechnika  
Wrocławska

Wartość przeprowadzonych przez mgra inż. Mateusza Łuźnego badań jest potwierdzona również poprzez 19 uzyskanych patentów oraz 30 zgłoszeń patentowych powiązanych z cyklem publikacji P1-P4. Reasumując, przedstawioną mi do oceny dysertację oceniam bardzo wysoko. Dokument stanowi logiczną całość, a wszystkie kolejne kroki badawcze mają swoje uzasadnienie i są dobrze udokumentowane.

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

1. „*Szczep niekonwencjonalny*” – Autor wielokrotnie używa tego sformułowania wobec drożdży – proszę o wyjaśnienie czego ta „niekonwencjonalność” dotyczy, ponieważ opisywane w dysertacji drożdże są znane ze swojej użyteczności w biotechnologii
2. „*Wiązanie między węglami*” Autor w wielu miejscach tekstu posługuje się takim określeniem, pomijając słowo „atom”, zatem w dokumencie pisanym: „wiązananie między atomami węgla” byłoby zgodne z kanonem chemii organicznej
3. W tekście występują też skróty myślowe – w opinii Recenzentki – zbyt duże np. Autor pisze „...*Co więcej, floretyna (dihydrochalkon) jest aktywnym inhibitorem tyrozynazy grzybowej, co ma wpływ m.in. na proces melanogenezy .....*”, – w takim brzmieniu, zdanie jest niejasne i sugeruje, że melanogeneza zachodzi u grzybów
4. Autor na str. 13. pisze: „...*Zastosowanie większej liczby innych dihydrochalkonów jako słodzików poszerzyłoby obecną, „zdrowszą” alternatywę ...*” Czy jakieś związki z tej grupy są już stosowane jako słodziki?
5. Autor na str. 14 używa określenia: „*badania prospektywne*”, w odniesieniu do wyników badań, które już są potwierdzone nie tylko eksperymentalne, ale poprzez badania populacyjne, natomiast zastosowane określenie odnosi się do zdarzeń przyszłych, które nie znalazły do danego momentu potwierdzenia, a które przewiduje się na podstawie wiedzy obecnej.



Politechnika  
Wroclawska

6. *Beauveria bassiana* BBT – brak wyjaśnienia skrótu nazwy kolekcji
7. Na str. 33 Autor opisuje wyniki biotransformacji 2',5'-dimetoksyflawonu z wykorzystaniem szczepów *Beauveria bassiana* KCh J1.5 (skala laboratoryjna) i J1 (skala półpreparatywna), produkty to odpowiednio metyloglukopiranozylowe pochodne i hydroksylowe pochodne dimetoksyflawonu, czy istnieją jakieś przesłanki pozwalające wyjaśnić tak różną aktywność wykorzystanych szczepów wobec tego samego substratu?
8. W dysertacji znajdują się podpisane oświadczenia współautorów publikacji, potwierdzające dominujący udział mgra inż. Mateusza Łuznego w badaniach, ale nie ma informacji na temat tego, jaka część przeprowadzonych badań bezpośrednio jest wynikiem aktywności naukowej Autora niniejszej dysertacji. Proszę o krótki komentarz uzupełniający.

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej Pana mgra inż. Mateusza Łuznego i dlatego *występuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o wyróżnienie niniejszej rozprawy.*

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 2021, poz. 478) i niniejszym występuję z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgra inż. Mateusza Łuznego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Ewa Żyngiel-Droł*