



Politechnika Łódzka

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

Łódź, dn. 26.09.2023 r.

Dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach, prof. uczelni
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul Stefanowskiego 2/22
90-537 Łódź

Recenzja rozprawy doktorskiej
Mgr inż. Dawida Hernika

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

wykonanej w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. Filipa Boratyńskiego, prof. UPWr oraz prof. Marii Elisabetty Brenny zrealizowanej w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych rolniczych, w dyscyplinie naukowej biotechnologia.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Biotechnologia prof. dr hab. Zbigniewa Lazara oraz Uchwała nr 3/22023 podjęta przez Radę Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w dniu 1 września 2023 r.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl czterech oryginalnych publikacji naukowych, opublikowanych w 2020 i 2023 roku w zagranicznych czasopismach naukowych ujętych w zbiorach *Journal Citation Report (JCR)*. W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

1. **Hernik D.**, Pannek J., Szczepańska E., Olejniczak T., Boratyński F. Bacterial whole cells synthesis of whisky lactones in a solid-state fermentation bioreactor prototype. *Catalysts*, 2021, 11, 320. (IF = 4,501; 100 pkt MEiN)
2. **Hernik D.**, Gatti F., Brenna E., Szczepańska E., Olejniczak T., Boratyński F. Stereoselective synthesis of whisky lactone isomers catalyzed by bacteria in the genus *Rhodococcus*. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14, 1117835. (IF = 6,064; 140 pkt MEiN)
3. **Hernik D.**, Szczepańska E., Brenna E., Patejuk K., Olejniczak T., Strzała T., Boratyński F. *Trametes hirsuta* as an attractive biocatalyst for the preparative scale biotransformation of isosafrole into piperonal. *Molecules*, 2023, 28, 3643. (IF = 4,927; 140 pkt MEiN)

4. **Hernik D.**, Szczepańska E., Ghezzi M. C., Brenna E., Włoch A., Pruchnik H., Mularczyk M., Marycz K., Olejniczak T., Boratyński F. Chemo-enzymatic synthesis and biological activity evaluation of propenylbenzene derivatives. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14, 1223123

Zasadność podjętej tematyki

W przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym czy agrochemicznym biokataliza z wykorzystaniem enzymów i oraz całych komórek stanowi atrakcyjne podejście wykorzystywane do syntezy wysokowartościowych składników aktywnych, kluczowych półproduktów, czy dodatków do żywności. Z kolei w ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie naturalnymi dodatkami do żywności otrzymywanymi z zastosowaniem metod biotechnologicznych, w tym takimi, które poprawiają cechy sensoryczne produktu. Wszystkie produkty naturalne zawdzięczają swoje istnienie skomplikowanej maszynerii enzymatycznej działającej wewnątrz organizmów. Ze względu na unikalne właściwości enzymów takie jak wysoka regio-, chemo- i stereoselektywność, transformacje z użyciem różnych biokatalizatorów zostały wykorzystane w wielu gałęziach przemysłu, szczególnie w reakcjach, w których podejścia chemiczne są trudne lub obecnie niedostępne. Szczególnie istotne w tym aspekcie jest enzymatyczne utlenianie, w tym alkoholi. Bioprocessy uważane za bezpieczną metodę transformacji oksydacyjnych, mogą w szczególności zastąpić obecnie stosowane metody utleniania chemicznego, które stwarzają zagrożenie dla środowiska. Bioutlenianie charakteryzuje się bowiem względnie łagodnymi warunkami reakcji, a dodatkowo wyjątkową selektywnością.

W tym kontekście postawiony w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej mgr inż. Dawida Hernika cel badań w postaci opracowania opartej na biotransformacjach syntezy związków z ugrupowaniem laktonowym oraz arylopropenów i ich tlenowych pochodnych oraz określenie zdolności katalitycznych wyselekcjonowanych szczepów bakterii i grzybów wpisuje się doskonale w aktualny nurt poszukiwań biotechnologicznych syntez związków zapachowych. Dodatkowo ocena określonych aktywności biologicznych wybranych związków wskazuje na interdyscyplinarny charakter pracy. Praca została wykonana w zespole kierowanym przez dr hab. Filipa Boratyńskiego, prof. UPWr, który z sukcesem prowadzi unikatowe badania związane z otrzymywaniem na drodze biotransformacji bioaktywnych związków. Tak więc cel badań, cele szczegółowe i zasadności prowadzonych badań nie budzą jakichkolwiek zastrzeżeń.

Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Dawida Hernika jest oparta na cyklu czterech oryginalnych artykułów naukowych wraz z komentarzem. Rozprawa liczy 174 strony i jest skonstruowana zgodnie z systemem, gdzie publikacje stanowią jej zasadniczą część. Komentarz omawiający cykl czterech publikacji obejmuje łącznie 50 stron maszynopisu, nie wliczając załączonych oświadczeń Doktoranta oraz publikacji będących podstawą ubiegania się o stopień doktora. Ta część dysertacji zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wstępny rozdział poświęcony badanym związkom zapachowym, wyraźnie zaznaczony cel pracy z celami szczegółowymi, a także metodykę wykorzystywaną

przez Doktoranta w swoich badaniach. W kolejnej Części Pan mgr inż. Dawid Hernik zamieścił omówienie wyników wraz z ich dyskusją oraz podsumowaniem całości pracy. Wykaz cytowanej literatury zawiera 100 pozycji, przy czym w większości (53 pozycje) to piśmiennictwo opublikowane przed rokiem 2010.

Ostatnią część stanowi przedstawienie dorobku naukowego Doktoranta wskazujące, że oprócz aktywności publikacyjnej Pan mgr inż. Dawid Hernik aktywnie bierze udział w konferencjach naukowych oraz jest autorem patentu i zgłoszeń patentowych.

Artykuły będące podstawą ubiegania się o stopień doktora zostały opublikowane w czasopismach otwartego dostępu tj. *Catalysts*, *Molecules* (odpowiednio Q1 i Q2) oraz *Frontiers in Microbiology* (Q1). Do artykułów załączono też materiały uzupełniające, które zawierają przede wszystkim chromatogramy, widma NMR i IR. Całkowity współczynnik wpływu *Impact Factor* dla cyklu publikacji będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora wynosi 21.328 i odpowiada 520 punktom według kryteriów MEiN. Doktorant we wszystkich pracach jest pierwszym autorem i jednocześnie, wraz z dr hab. Filipem Boratyńskim, autorem korespondencyjnym. Na podstawie załączonych oświadczeń można wnioskować o dominującym wkładzie autorskim Doktoranta w opublikowanych pracach, co znajduje potwierdzenie dzięki sekcji „Author Contributions” przedstawionych artykułów. Doktorant w oświadczeniach przedstawił, że Jego wkład w powstanie artykułów polegał na udziale w planowaniu eksperymentów oraz ich prowadzeniu, analizie danych, przygotowaniu i edycji manuskryptu. Tym samym, można uznać przedstawioną rozprawę doktorską za autorskie dzieło mgr inż. Dawida Hernika.

Ocena merytoryczna i uwagi do rozprawy

Praca Pana mgr. inż. Dawida Hernika wpisuje się w coraz bardziej popularny trend otrzymywania substancji chemicznych na drodze biotransformacji. Jednak zastosowanie biotransformacji do otrzymania związków zapachowych w postaci chiralnych laktonów oraz arylopropenów i ich tlenowych pochodnych na drodze bioutlenienia jest obszarem słabo poznanym. Nie ma więc wątpliwości więc, że praca ma charakter oryginalny.

We wstępie wprowadzającym w problematykę pracy doktorskiej Doktorant nakreślił ogólną charakterystykę związków zapachowych oraz bardziej szczegółowo związków będących przedmiotem rozprawy doktorskiej, a więc whisky laktonu, aerangis laktonu, piperonalu, izosafrolu, anetolu i izoeugenolu. Dalej znajduje się zwięzły opis zalet i wad biotransformacji, charakterystyka prowadzenia hodowli wglębnych oraz na podłożu stałym, a także przykłady opisanych w literaturze metod z wykorzystaniem szlaków biokatalitycznych, które prowadzą do biosyntezy badanych przez Doktoranta związków zapachowych. Ta część pracy doktorskiej stanowi bardzo dobrą merytoryczną podbudowę do dalszych części dysertacji. W kolejnej części pracy znajduje się streszczenie artykułów stanowiących cykl pracy doktorskiej, które stanowi dobry punkt wyjścia do szczegółowej lektury artykułów.

Pracę eksperymentalną Pana mgr inż. Dawida Hernika można podzielić na dwie części. Pierwsza z nich poświęcona jest stereoselektywnej syntezie enancjomerów whisky laktonu

(P1 i P2), a druga biotransformacji arylopropenów i ich tlenowych pochodnych (P3 i P4). Niewątpliwie związki chemiczne stanowiące przedmiot prac stanowią niezwykle pożądane w przemyśle substancje zapachowe, stąd poszukiwanie biotechnologicznych metod ich produkcji stanowi istotne badawczo i aplikacyjne zagadnienie. Publikacje zbudowane są w oparciu o screening i selekcję szczepów bakterii lub grzybów (z zastosowaniem detekcji TLC, GC, GC-MS, NMR, IR), a także zwiększenie skali syntezy dla wybranych szczepów w celu wykazania przydatności metody do syntezy interesujących produktów. Publikacje te poruszają interesujące zagadnienia zarówno z praktycznego, jak i naukowego punktu widzenia, jakim jest zbadanie zdolności katalitycznych badanych szczepów bakterii oraz grzybów. Przy tym zdecydowanie mocną stroną pracy jest przebadanie imponującej liczby szczepów bakterii (22) oraz grzybów (23, nie wliczając szczepów pozyskanych przez bezpośrednio z różnych środowisk naturalnych). W pracy P4 zawarto także wyniki badań opartych na testach aktywności biologicznej zsyntetyzowanych związków bądź ich prekursorów.

W pracy P1 Doktorant opracował także niskokosztowy bioreaktor z fazą stałą, z wykorzystaniem którego otrzymał enancjomerycznie wzbogacone izomery *trans*-(+)-(4*S*,5*R*), *cis*-(-)-(4*S*,5*S*) i *cis*-(+)-(4*R*,5*R*) whisky laktonu. Na uwagę zasługuje też fakt wykorzystania surowców odpadowych w tym procesie oraz wykazanie najwyższej konwersji i stereoselektywności przy zastosowaniu do biotransformacji makucha lnianego. Mimo że otrzymane produkty charakteryzowały się niską czystością optyczną, to otrzymane wyniki dały podwaliny do dalszych badań (P2), w których Doktorant wykorzystał wyselekcjonowane w pracy P1 szczepy *Rhodococcus erythropolis* DSM44534, *R. erythropolis* PCM2150 i hodowle wglębne do otrzymania czystych optycznie *trans*-(+)-(4*S*,5*R*), *trans*-(-)-(4*R*,5*S*) i *cis*-(+)-(4*R*,5*R*) whisky laktonów. Ciekawa jest także ocena możliwości zastosowania *R. erythropolis* DSM44534 w formie proszków acetonowych w celu otrzymania enancjomerycznie wzbogaconego *cis*-(-)-(4*S*,5*S*) izomeru whisky laktonu.

W artykule P3 Pan Hernik ocenił potencjał 23 szczepów grzybów oraz 22 szczepów bakterii pod kątem transformacji izosafrolu do piperonalu. Mimo toksyczności substratu udało się zidentyfikować szczepy z gatunku *Trametes hirsuta*, które wykazywały pożądaną aktywność. **W tym miejscu nasuwa się pytanie czy istnieją dane literaturowe wskazujące dlaczego szczepy z gatunku *Trametes hirsuta* wykazują aktywność enzymatyczną wobec izosafrolu mimo wysokiej toksyczności tego związku? Czy Doktorant może także wskazać jakie mechanizmy odpowiedzialne są za wysoką toksyczność izosafrolu?**

Bardzo ciekawy i szeroki zakres badań Doktorant przedstawił w pracy P4, która powstała po obyciu stażu w ramach projektu POWER 3.5 w Politechnice Mediolańskiej. We współpracy z zespołem profesor Marii Elisabetty Brenny opracowano dwuetapową chemoenzymatyczną metodę otrzymywania tlenowych pochodnych wybranych arylopropenów oraz wyselekcjonowano cztery szczepy baterijne (*Dietzia sp.* DSM44016, *R. erythropolis* DSM44534, *R. erythropolis* PCM2150 i *R. ruber* PCM2166) efektywnie utleniające diole oznaczone w dysertacji jako 6b-9b do hydroksyketonów 6c-9c. Co więcej, zwiększenie skali procesu prowadziło do wysokich wydajności izolowania. Otrzymane związki (diole 6b-10b i hydroksyketony 6c-9c) oraz substraty (arylopropeny 6a-10a) zbadano pod kątem różnych

aktywności biologicznych, w tym przeciwdrobnoustrojowych, przeciwutleniających, hemolitycznych, przeciwnowotworowych oraz wpływu na płynność błon komórkowych. W kontekście oceny aktywności biologicznych chciałabym jednak zwrócić uwagę na formułowanie niekiedy zbyt dalekosiężnych wniosków nieopartych do końca odpowiednimi danymi eksperymentalnymi. Przykładowo na stronie 39 Doktorant pisze, iż związek 8b znacząco zwiększył potencjał proliferacyjny komórek HepG2. Tymczasem z załączonego Rysunku 12 wynika, że związek 8b w sposób istotny statystycznie zwiększył przeżywalność komórek wyłącznie przy zastosowaniu jednego (50 mg/ml) z testowanych stężeń. Na tym samym wykresie widzimy, że przy stężeniu 200 mg/ml efekt ten nie jest zauważalny. **Moje pytanie dotyczy też użytego wyżej sformułowania „znacząco zwiększył potencjał...”. Czy chodzi tu o znamienność statystyczną czy też o siłę działania związku 8b w stosunku do kontroli rozpuszczalnika?** Podobnie, sformułowanie „Arylopropeny 6a i 7a silnie zmniejszały żywotność komórek HepG2” nie ma odzwierciedlenia w danych zawartych na Rysunku 12 (w tym przypadku nie zaobserwowano żadnej istotności statystycznej). Natomiast fragment mówiący, iż „Proliferacja komórek MG63 była różnie modulowana przez związki, w zależności od dawki. Związki 6c, 8b i 10b hamowały proliferację tej linii komórkowej jednak przy stężeniach 50 µg/ml związek 10b znacząco zwiększał żywotność komórek..... Opisane wyżej dane zostały zebrane poniżej w formie wykresów (Rysunek 12)” nie jest zgodny z zamieszczonym rysunkiem – Rysunek 12 nie zawiera bowiem danych na temat związków 6c, 8b i 10b w aspekcie ich wpływu na komórki MG63. Sugerowałabym także, aby w przyszłości nie używać terminu aktywność proliferacyjna przy zastosowaniu testów opartych na resazuryinie. Resazuryina jest bowiem barwnym wskaźnikiem środowiska redoks i odzwierciedla aktywność metaboliczną, a więc pośrednio liczbę żywych komórek lub ich przeżywalność. Natomiast testy mierzące stopień proliferacji komórek oparte są przede wszystkim na analizach tempa syntezy DNA, które bezpośrednio związane są z podziałami komórek. **Prosiłabym także o komentarz na czym ma polegać hepatoprotekcyjne i promujące przebudowę kości działanie badanych związków (końcowa konkluzja w pracy P4)?**

Podsumowując, nakreślone na początku cele pracy, które stanowią złożone problemy badawcze zostały zrealizowane w sposób skrupulatny i przemyślany. Wyniki uzyskane w toku prac eksperymentalnych pozwoliły na poprawne sformułowanie jedenastu wniosków, które zostały poparte przedstawionymi danymi eksperymentalnymi. Nie oznacza to jednak, że tematyka badawcza została w tym obszarze wyczerpana. Wręcz przeciwnie - otwiera nowe pola do dyskusji, a otrzymane wyniki stanowią punkt wyjścia do dalszych badań. **Dlatego prosiłabym Doktoranta o kilka zdań na temat możliwości podjęcia kolejnych kroków badawczych w oparciu o uzyskane dotychczas wyniki, a także skazania potencjalnych ograniczeń w przedstawionych badaniach.**

W pracy nie znajduję poważniejszych błędów edytorskich czy też niedociągnięć. Można zwrócić jedynie uwagę na błędne stosowanie terminu „dawka”, który powinien być stosowany w odniesieniu do badań *in vivo* (dawka to ilość substancji chemicznej, która podana, pobrana lub wchłonięta do organizmu w określony sposób – powoduje efekty biologiczne, a jej wielkość określa się w jednostkach wagowych w przeliczeniu na masę i na

dobę, np. mg/kg m.c./24 h). W przypadku badań z wykorzystaniem hodowli komórkowych posługujemy się terminem „stężenie”.

Ponadto przyjęte jest, iż skróty pojawiające się w tekście należy rozwinąć, gdy pojawiają się po raz pierwszy. Tymczasem w przedstawionym komentarzu Doktorant nie zawsze stosował się do tej reguły. Niektóre skróty nie zostały natomiast w ogóle rozwinięte. Pan Hernik nie ustrzegł się też kilku błędów edytorskich (np., „tempach” zamiast „tempeh”, chemoenzymatycznych, z raki, HepG-2), które nie wpływają jednak na pozytywną ocenę całej pracy.

Podsumowanie

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Dawida Hernika stanowi zbiór czterech oryginalnych artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, a więc praca Doktoranta została już wcześniej wysoko oceniona i zweryfikowana przez co najmniej dwóch recenzentów czasopism. Również w mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska stanowi merytorycznie wartościowy i nowatorski wkład do światowej wiedzy na temat możliwości wykorzystania biotransformacji do syntezy związków z ugrupowaniem laktonowym oraz arylopropenów i ich tlenowych pochodnych. Rozprawa obejmuje bogaty materiał, który wymagał przeprowadzenia szeroko zakrojonych badań. Stwierdzam więc z całym przekonaniem, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszelkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr inż. Dawida Hernika do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc po uwagę wysoki poziom niniejszej rozprawy doktorskiej i jej znaczenie aplikacyjne, jak również aktywność publikacyjną i patentową Doktoranta, zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Dawida Hernika stosownym wyróżnieniem przyjętym w Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu.

