

## RECENZJA ROZRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Dawida Hernika

pt. „MIKROBIOLOGICZNA SYNTEZA ZWIĄZKÓW ZAPACHOWYCH I ICH  
POCHODNYCH O AKTYWNOŚCIACH BIOLOGICZNYCH”

wykonanej

w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy  
na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

pod kierunkiem Prof. UPWr dr hab. Filipa Boratyńskiego,

oraz na Politechnice Mediolańskiej

pod kierunkiem Prof. Marii Elisabetta'y Brenna.

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 1 września 2023 roku.

### 1. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Dawida Hernika jest oparta na zestawie czterech oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w latach 2021-2023. Doktorant jest pierwszym i korespondencyjnym autorem we wszystkich czterech pracach wchodzących w skład dzieła. Funkcję autora korespondencyjnego Doktorant współdzielił z głównym promotorem – Prof. Filipem Boratyńskim. Sumaryczny współczynnik IF publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi  $> 21$ , a liczba punktów ministerialnych to 520.

Rozprawa doktorska została skonstruowana zgodnie z nowoprzyjętym systemem, gdzie wspomniane publikacje stanowią jej zasadniczą część. Całość manuskryptu została opatrzona zwięzłym i rzeczowym wprowadzeniem, skrótowym opisem stosowanych materiałów i metod, oraz najważniejszych wyników wraz z kluczowymi elementami graficznymi (wykresy i tabele). Bardziej szczegółowe informacje można odnaleźć w załączonych publikacjach. W osobnych rozdziałach

wyszczególniono cele pracy, a także podsumowanie i wnioski wynikające z rezultatów przeprowadzonych badań. Niezbędną dla wykonania recenzji dokumentację uzupełniają oświadczenia Doktoranta i głównego promotora, bardzo szczegółowo określające udział mgr inż. Hernika w pracach eksperymentalnych i redagowaniu manuskryptów. Zawarte w końcowym rozdziale ósmym zestawienie dorobku naukowego Doktoranta pozwala zorientować się w Jego pozostałych dokonaniach naukowych, w tym - licznych wystąpieniach konferencyjnych, zgłoszeniach patentowych, przyznanej patencie, oraz uczestnictwie w projekcie UPWR 2.0. Reasumując strukturę rozprawy, stwierdzam, że **konstrukcja pracy jest klarowna i logiczna, a dokumentacja kompletna**. Pragnę podkreślić, iż, w mojej ocenie, praca jest przygotowana niezwykle starannie, napisana bardzo przystępnym językiem naukowym, a całość pracy jest spójna i dobrze zorganizowana.

Zapoznanie się z rzeczonymi artykułami naukowymi, jak również z załączonymi oświadczeniami Doktoranta i głównego promotora, pozwala stwierdzić, że wkład Doktoranta w przeprowadzenie badań prezentowanych w rozprawie jest kluczowy i wiodący. Tym samym, można uznać przedstawioną rozprawę doktorską za **autorskie dzieło mgr inż. Dawida Hernika**.

## **2. Przedmiot rozprawy, znaczenie dla rozwoju biotechnologii, oraz zastosowane podejście metodyczne**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy biotechnologicznej produkcji wysoko cennych związków zapachowych z wykorzystaniem bardzo szerokiego zestawu szczepów bakterii i grzybów, przy zastosowaniu rozmaitych strategii hodowlanych, oraz badania biologicznych aktywności wybranych produktów biotransformacji. Badania prowadzone przez mgr inż. Dawida Hernika skupiają się wokół dwóch grup związków zapachowych: (i) związków z ugrupowaniem laktonowym, tu specyficznie – whisky laktonu (P1, P2), oraz (ii) arylopropenów i ich pochodnych, ze szczególnym naciskiem na piperonal oraz (nieoczekiwanie) hydroksyketony (P3, P4). Bezspornie, tematyka podjęta przez Doktoranta stanowi istotny obszar współczesnej biotechnologii. Opracowanie wydajnego procesu biotechnologicznej produkcji (czy to syntezy czy biokonwersji, jak w tym przypadku) wysoko cennych związków zapachowych, stanowi wartościowe osiągnięcie o wysokim potencjalnie aplikacyjnym. Wiadome jest, że takie procesy funkcjonują w praktyce przemysłowej, przynosząc korzyści zarówno finansowe, jak i wynikające z ograniczenia negatywnego wpływu na środowisko, jakie towarzyszy procesom tradycyjnej syntezy chemicznej. Związki zapachowe pochodzenia biotechnologicznego są oznaczane jako „naturalne”, i, jako takie, cieszą się lepszą percepcją konsumenta niż te „syntetyczne”. Co więcej, biotechnologiczne „aromaty” osiągają wielokrotnie wyższe ceny rynkowe, powodując, że, przy osiągnięciu odpowiedniej wydajności, procesy ich wytwarzania okazują się być bardziej opłacalne (na przykładzie gamma-dekalaktonu z oleju rącznika). Obecna podaż naturalnych aromatów na globalnym rynku nie wysyca ciągle wzrastającego popytu, stąd poszukiwanie alternatywnych metod ich produkcji na drodze mikrobiologicznej stanowi istotne badawcze i aplikacyjne zagadnienie.

Za główny cel swoich prac Doktorant przyjął opracowanie procesów biotechnologicznej biokonwersji wybranych substratów do wartościowych związków zapachowych. W swojej pracy, mgr inż. Hernik wyróżnił dziesięć celów szczegółowych (zaprezentowanych na str. 16 dysertacji), które następnie konsekwentnie realizował w szeregu prac eksperymentalnych, stosując rozmaite podejścia metodyczne. Wśród nich, znaczną część stanowiły metody hodowlane dostosowane do licznych bakterii i grzybów o różnej przynależności taksonomicznej, zarówno w podłożach stałych, jak i płynnych, w różnej skali. Bardzo wysoko oceniam samodzielne (zgodnie z oświadczeniem na str. 52) skonstruowanie i zaprogramowanie prototypowego bioreaktora do kontrolowanej hodowli bakterii w podłożach stałych. W mojej ocenie – jest to jedno z donioślejszych osiągnięć Pana mgr inż. Hernika w toku realizacji pracy doktorskiej, świadczące o Jego kreatywności i wysokim potencjale jako eksperymentatora. Inne podejścia metodyczne stosowane przez Doktoranta to cały szereg technik analitycznych (chromatograficznych i spektrometrycznych), włączając w to rozmaite metody przygotowania próbek. O wszechstronności warsztatu eksperymentalnego, jaki Doktorant opanował w trakcie realizacji pracy doktorskiej, świadczą techniki stosowane celem oznaczenia aktywności biologicznej wybranych związków zapachowych – w tym testy aktywności fungistatycznej czy antyoksydacyjnej.

Zastosowane podejścia eksperymentalne w sposób adekwatny odnosiły się do stawianych celów szczegółowych. Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera wyniki dobrze zaplanowanych eksperymentów, o szerokim zakresie metodycznym.

### **3. Kluczowe osiągnięcia i wnioski uzyskane w toku realizacji pracy**

Do kluczowych osiągnięć naukowych przedstawionych w rozprawie w mojej opinii należą:

- skonstruowanie i zaprogramowanie przystępnego cenowo bioreaktora do hodowli w podłożu stałym z możliwością kontroli wilgotności substratu, temperatury, i zapewnieniem wymiany gazowej;
- wykazanie przydatności odpadów przemysłu olejarskiego, w szczególności makuchu lnianego, jako substratu w mikrobiologicznym utlenieniu dioli do optycznie czynnych izomerów whisky laktonu;
- wykazanie bardzo wysokiego potencjału szczepów z gatunku *Rhodococcus erythropolis* oraz *Trametes hirsuta* jako biokatalizatorów reakcji biotransformacji, odpowiednio, dioli do laktonów (i hydroksyketonów), oraz izosafrolu do piperonalu;
- podobnie - wykazanie przydatności określonych szczepów z rodzaju *Dietzia* sp. i *Rhodococcus* sp. w procesie biotransformacji arylopropanowych dioli do hydroksyketonów, oraz braku takiej przydatności innych szczepów spośród ponad pięćdziesięciu testowanych;
- opracowanie trzyetapowej metody stereoselektywnej syntezy wartościowego whisky laktonu, obejmującej etap mikrobiologicznej oksydacji w podłożu płynnym;
- opracowanie procesu mikrobiologicznej transformacji izosafrolu do piperonalu z wykorzystaniem całych komórek grzybów z gatunku *Trametes hirsuta* (który stanowi przedmiot

zgłoszenia patentowego);

- powiązanie właściwości strukturalnych wybranych związków arylopropenowych (arylopropenów, ich pochodnych dioli i hydroksyketonów) z ich właściwościami biologicznymi; a w tym zakresie - m.in. wykazanie, że obecność grup hydroksylowych przyczynia się do zwiększenia aktywności fungistatycznej, czy też, że arylopropeny bez ugrupowań hydroksylowych czy ketonowych wykazują wyższą aktywność przeciwutleniającą, lub też, że obecność dodatkowych podstawników w pierścieniu aromatycznym arylopropenów wpływa pozytywnie na ich aktywność fungistatyczną.

Wyniki uzyskane w toku prac eksperymentalnych, po trafnej interpretacji i przedyskutowaniu z dostępnymi danymi literaturowymi, pozwoliły na sformułowanie jedenastu finalnych stwierdzeń i wniosków, zaprezentowanych na str. 41 i 42 dokumentu. Postawione wnioski są uzasadnione i poparte przedstawionymi danymi eksperymentalnymi.

#### 4. Komentarze

Z racji, iż przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi zbiór oryginalnych artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, pozwolę sobie na zadanie Doktorantowi kilku pytań z prośbą o wyrażenie swojej opinii w trakcie publicznej obrony:

1. W kontekście stwierdzeń zawartych na stronie 11., na temat wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych arylopropenów względem patogenów żywności (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* i *Leuconostoc mesenteroides*) jestem ciekawa opinii Pana mgr inż. Dawida Hernika na temat zasadności stosowania rozmaitych olejków eterycznych jako bakterio- i fungi- statyków / -cydów względem patogenów żywności. Związki te mają silne właściwości aromatyzujące. Czy zatem produkty żywnościowe, lub środowisko ich wytwarzania, jest odpowiednim obszarem ich zastosowania? Uprzejmie proszę o wyrażenie swojej opinii, ewentualnie poparcie przykładem, jeśli jest dostępny.
2. W odniesieniu do definicji Biotransformacji zawartej na stronie 13., gdzie wskazano, że „biotransformacje to przemiany ksenobiotycznego substratu, zachodzące z udziałem biokatalizatorów”, chciałam prosić Doktoranta o wyjaśnienie, czy w biotransformacjach substrat zawsze musi być ksenobiotyczny? Ponadto, czy Doktorant mógłby spróbować zdefiniować biotransformację w kontekście zysku energetycznego / pozyskania składników budulcowych dla komórki, która taką biotransformację prowadzi?
3. Chciałam poprosić mgr inż. Dawida Hernika o doprecyzowanie, czy też ewentualne skorygowanie, definicji hodowli wgłębnych podanej na str. 13., w szczególności w odniesieniu do „zamkniętego bioreaktora zawierającego podłoże fermentacyjne i wysokie stężenie tlenu”.
4. Jestem pod wrażeniem szerokiego zestawu szczepów drobnoustrojów testowanych w pracy doktorskiej pod kątem ich potencjału w zakresie prowadzenia biotransformacji. Wykaz nazw

gatunkowych i rodzajowych zaprezentowany na str. 17. jest imponujący, i wskazuje na wysokie zróżnicowanie taksonomiczne badanych szczepów. Chciałam zapytać Doktoranta, czy wśród zestawu tych szczepów znalazły się takie, które miały szczególne wymagania w odniesieniu do warunków hodowli / składników medium hodowlanego? A może było obserwowane zróżnicowanie w tempie wzrostu przy zastosowaniu standardowych warunków hodowli?

5. W tym samym kontekście - jaki był klucz doboru mikroorganizmów do poszczególnych reakcji biotransformacji? Czy selekcji dokonywano na podstawie danych literaturowych, czy jakichś własnych uprzednich badań? Na jakiej zasadzie podejmowana była decyzja o testowaniu danego szczepu pod kątem aktywności względem konkretnego substratu?
6. Dlaczego, zgodnie ze stwierdzeniem zawartym w dysertacji, hodowle w podłożu stałym wykorzystujące aktywność utleniającą mikroorganizmów nie są powszechnie znane / stosowane? Czy produkcja kwasu cytrynowego przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* sp. może stanowić jeden z przykładów takich procesów?
7. Jedną z ciekawych obserwacji w prezentowanej pracy była zależność pomiędzy ilością i rodzajem produkowanych whisky laktonów a rodzajem podłoża zastosowanego w hodowli. Czy w opinii Doktoranta przyczyną tego stanu rzeczy jest indukcja syntezy innych enzymów, przez wzgląd na dostępność innych składników pokarmowych? Czy może samo medium przyczynia się do kształtowania warunków fizyko-chemicznych powodując nieenzymatyczne przejścia?
8. Interesują mnie też stwierdzenia poczynione przy omówieniu zagadnień związanych ze zwiększaniem skali procesu biosyntezy whisky laktonu: 1) z czego może wynikać niższa szybkość biotransformacji diolu 1a w większej skali, w porównaniu do tej reakcji prowadzonej w mniejszej skali? 2) dlaczego reakcje biotransformacji prowadzone w podłożu płynnym przebiegały szybciej niż te prowadzone w podłożu stałym? 3) dlaczego tylko w hodowlach wgłębnych można było otrzymać enancjomerycznie czyste laktony? Prosiłabym o wyrażenie swoich przypuszczeń.
9. Chciałam poprosić Doktoranta o zaproponowanie podejścia badawczego, które umożliwiłoby jednoznacznie określić przebieg reakcji biotransformacji dioli 1 do whisky laktonu prowadzonej przez całe komórki bakteryjne.
10. Czy w opinii Doktoranta znana, wysoka aktywność lakaz w komórkach grzybów *Trametes versicolor* i *T. hirsuta* może mieć związek z ich rzadką (jak pokazały prezentowane wyniki) aktywnością wobec izosafrolu?
11. Czy otrzymane hydroksyketony pochodne arylopropenów wykazują jakieś udokumentowane już właściwości zapachowe, czy inne uytylitarne? Czy ich wartość rynkowa może być porównywalna z aldehydami pochodnymi arylopropenów?

## 5. Posumowanie

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr inż. Dawida Hernika na uwagę zasługuje szeroki zakres przeprowadzonych prac eksperymentalnych. Wysoko oceniam kompleksowość przeprowadzonych

badań – od selekcji biokatalizatora, poprzez dobór warunków biokatalizy, czy skonstruowanie bioreaktora według własnego projektu, do uzyskania docelowego związku chemicznego, aż po charakterystykę jego właściwości biologicznych. W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska stanowi merytorycznie wartościowy wkład do światowej wiedzy i techniki w zakresie biotechnologicznej produkcji związków zapachowych i bioaktywnych. Szczególnie wartościowe wydają się opracowane procesy biotechnologicznej konwersji izosafrolu do piperonalu i stereoselektywnej syntezy whisky laktonów. Na podkreślenie zasługuje także wykazanie wysokiego potencjału wybranych szczepów bakterii i grzybów (*Rhodococcus* i *Trametes*) w procesach biotechnologicznej produkcji związków zapachowych, czy też nowo zdobyta wiedza na temat właściwości biologicznych uprzednio nie testowanych w tym zakresie dioli i hydroksyketonów.

## 6. Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Dawida Hernika spełnia warunki określone w art. 187 ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2023, poz. 742ze zm.). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Biotechnologia UP we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Dawida Hernika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną zaprezentowanych badań, oraz doskonałe wymierne skutki pracy naukowej Pana mgr inż. Dawida Hernika wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Poznań, 25-09-2023

