



Politechnika Łódzka

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

Łódź, dn. 27.03.2023 r.

Dr hab. inż. Aneta Białkowska, prof. uczelni
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul. Stefanowskiego 2/22, 90-537 Łódź
aneta.bialkowska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Mateusza Kutyla pt. „Biokataliza alkoholi terpenowych do nowych związków aktywnych biologicznie”, wykonanej w Instytucie Nauk Biologicznych na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem promotora dr hab. Mariusza Trytka, prof. UMCS

Podstawa formalna

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z dnia 27 stycznia 2023 roku.

Wybór i znaczenie tematu

Podjęta w pracy doktorskiej mgr inż. Mateusza Kutyla problematyka badawcza dotycząca opracowania metod biotransformacji alkoholi terpenowych do nowych związków o potencjalnie zwiększonej aktywności biologicznej daje nadzieję na poszerzenie puli wartościowych produktów znajdujących szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Alkohole te należą do grupy związków organicznych - terpenów, które posiadają interesujące właściwości smakowo-zapachowe, a także lecznicze. Najbardziej zróżnicowaną grupą terpenów są monoterpény, dla których wskazuje się działanie przeciwnowotworowe, chemoprewencyjne, przeciwzapalne, antydrobnoustrojowe, czy immunomodulacyjne. Ich poszukiwanie staje się zatem w pełni uzasadnione. Najbardziej wydajnymi producentami terpenów są rośliny zielone, głównie kwitnące. Niestety, te najcenniejsze z technologicznego punktu widzenia terpeny są produkowane w małych ilościach, co biorąc pod uwagę aspekty ekonomiczne, znacznie ogranicza możliwości ich wykorzystania na skalę przemysłową. Dobrą alternatywą dla pozyskiwania tego rodzaju związków organicznych są metody biotechnologiczne, które wykorzystują selektywne i bezpieczne dla środowiska katalizatory biologiczne. Terpeny otrzymywane przy użyciu biokatalizatorów charakteryzują się przede wszystkim wyższą

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
90-537 Łódź, ul. Stefanowskiego 2/22, budynek A2
tel. 42 631-34-42, w5i51@adm.p.lodz.pl, www.binoz.p.lodz.pl
Adres do korespondencji:
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116



czystością i bardziej intensywnym zapachem. Są to jednak wciąż badania, które mają bardziej charakter podstawowy niż aplikacyjny. Powodów jest kilka, a jednym z nich jest niestabilność stosowanych biokatalizatorów w warunkach wymaganych dla efektywnej biotransformacji terpenów. Dlatego też wciąż poszukiwani są nowi mikrobiologiczni producenci, stanowiący źródło wydajnych i stabilnych biokatalizatorów. Biorąc pod uwagę warunki procesowe dobrymi kandydatami stają się ekstremofile, szczególnie te adaptowane do działania w niskich temperaturach. Ten nurt badawczy został zaprezentowany w pracy Pana Kutyla.

Badania Doktoranta mają charakter wielowątkowy i obejmują enzymatyczną, mikrobiologiczną oraz biomimetyczną katalizę zmierzającą do opracowania wydajnej metody biotransformacji alkoholi terpenowych. Ta ostatnia, w związku z hydrofobowością i hamującym wpływem niektórych terpenów na wzrost i fizjologię mikroorganizmów stanowi cenną perspektywę dla kontrolowanego i selektywnego przekształcania związków organicznych. Dla każdego rodzaju katalizy Pan Kutyła zoptymalizował czynniki wpływające na aktywność badanych katalizatorów oraz na wydajność reakcji biotransformacji.

Trafność wyboru tematu badawczego i jego praktyczne znaczenie potwierdził poprzez badania aktywności biologicznej pochodnych alkoholi terpenowych na ludzkich komórkach glejaka oraz w testach przeciwdrobnoustrojowych.

Ocena pracy pod względem wymagań formalnych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Mateusza Kutyla ma klasyczną dla tego rodzaju dokumentów strukturę i liczy 168 stron. Składa się z sześciu głównych rozdziałów (wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja i wnioski), wzbogaconych streszczeniem w języku polskim i angielskim. Istotnym elementem pracy jest bibliografia, zawierająca 267 pozycji literaturowych, uporządkowana alfabetycznie, umieszczona na 12 stronach tekstu. W pracy znajduje się ponadto 60 rysunków i 30 tabel, a ich spisy Autor umieścił na końcu pracy, za bibliografią.

Od strony edytorskiej praca jest dobrze przygotowana. Pojawiają się jedynie nieliczne błędy literowe, ale one nie zakłócają odbioru pracy i nie wpływają na wartość naukową rozprawy.

Stwierdzam, że praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim.

Ocena pracy pod względem wymagań merytorycznych

Tytuł pracy koresponduje z wyznaczonym celem i treścią niniejszej rozprawy doktorskiej.

W streszczeniu rozprawy Pan mgr inż. Mateusz Kutyła przedstawił informacje o przeprowadzonych doświadczeniach i uzyskanych wynikach. Lektura tej części wskazuje na szeroki zakres wykonanych prac, a po jej przeczytaniu zwiększa się zainteresowanie dalszymi częściami rozprawy.

Kolejny rozdział zatytułowany „Wstęp” liczy 33 strony i został opracowany w sposób prawidłowy i dojrzały, w oparciu o ważne i aktualne publikacje. Doktorant zaproponował w nim trzy zasadnicze podrozdziały. W pierwszym wyszczególnił różne grupy terpenów oraz metody ich biosyntezy w komórkach roślinnych. Właściwie opisał rolę biologiczną pierwotnych i wtórnych terpenów, zwracając uwagę na strukturalną różnorodność docelowych związków. W drugim podrozdziale, zdefiniował termin „biokataliza” oraz wskazał zalety i wady stosowania katalizatorów biologicznych. Za niefortunne uważam jednak stosowanie zamiennie terminów „biokataliza”

i „fermentacja”. Pierwszy jest znacznie szerszy i odnosi się do procesów biologicznych zachodzących zarówno w warunkach beztlenowych, jak i tlenowych, drugi natomiast najczęściej używany jest w odniesieniu do procesów zachodzących tylko w warunkach beztlenowych. Na str. 24 Doktorant opisał fizyczne i chemiczne metody immobilizacji enzymów. Dla tych ostatnich wskazał, że białko wiąże się z nośnikiem za pomocą wiązań kowalencyjnych. Niestety z opisu Autora tak nie wynika. Wskazuje on jako wiązania kowalencyjne np. oddziaływania hydrofobowe, czy siły van der Waalsa, co nie jest właściwe. W opinii recenzenta ważne jest również odpowiednie rozgraniczenie terminów: „wiązania chemiczne” a „oddziaływania międzycząsteczkowe”. I tak np. niefortunne jest sformułowanie „oddziaływanie kowalencyjne, czy jonowe”.

Istotną częścią podrozdziału „Biokataliza” jest wskazanie roli lipaz i ich producentów w syntezie estrów terpenowych. Do tej części „Wstępu” należy również podrozdział 1.2.2.2 zatytułowany „Biokataliza w układzie biomimetycznym”, w którym Doktorant opisał katalizatory naśladujące kluczowe cechy białek enzymatycznych i ich wykorzystanie w przekształcaniu związków terpenowych. W kontekście tego opisu duże wątpliwości budzi trafność użycia terminu „biokataliza” w tytule tego podrozdziału. Uprzejmie proszę o przedyskutowanie tej kwestii przez Doktoranta. Interesujący z aplikacyjnego punktu widzenia związków terpenowych jest ostatni podrozdział, zatytułowany „Aktywność terapeutyczna monoterpenu”. Został on opracowany przez Autora w sposób przemyślany i pokazuje bogaty potencjał, głównie terapeutyczny, kilku wyselekcjonowanych terpenów, takich jak α -pinen, β -pinen, limonen, cytronellol, geraniol, myrtenol i alkohol perylowy.

W kilku miejscach w tej części rozprawy znajdują się drobne pomyłki i niejasne sformułowania, np.

1. na str. 22 Autor podaje, że obecność błony komórkowej oddziela enzymy od środowiska biokatalizy przez co zwiększa się ich stabilność. Uprzejmie proszę o dokładniejsze wyjaśnienie tego zjawiska.
2. na str. 22 pojawia się informacja, iż tu cytując w przypadku biokatalizy z użyciem całych komórek bardzo dużą uwagę zwraca się na możliwość wydajnej ekspresji heterologicznej i aktywność specyficznego enzymu w komórkach bakteryjnych i drożdżowych. Proszę o doprecyzowanie co Autor miał na myśli.
3. na str. 23 pojawia się określenie „szlak biosyntetyczny”, lepiej byłoby użyć terminu szlak biosyntezy
4. na str. 27 Doktorant używa terminu „białko jednomerowe”. W mojej opinii bardziej właściwe byłoby określenie białko monomeryczne.

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej, należy podkreślić, że do jej przygotowania Doktorant wykorzystał bogatą literaturę źródłową. Opracowanie to, napisane poprawnym językiem, szeroko ujmuje przedmiotową problematykę badawczą i potwierdza bardzo dobre przygotowanie do podjętego zadania.

Cel nadrzędny pracy został jasno sformułowany, podobnie jak cele pośrednie.

Rozdział 3 pracy pt. „Materiały i metody” zawiera szczegółowe informacje na temat licznych, stosowanych przez Doktoranta metod badawczych i analitycznych, a poprzedzony jest zestawieniem stosowanych odczynników chemicznych, listą wykorzystywanych mikroorganizmów i opisem podłoży mikrobiologicznych stosowanych do ich przechowywania i hodowli. Czytając tę część rozprawy nasuwa mi się tylko jedno pytanie do Doktoranta, a mianowicie czy stosowany do oznaczania ilościowej aktywności lipaz substrat – tributeryna, został właściwie wytypowany. Jeśli tak, to proszę o argumentację tego wyboru, jeśli nie, proszę podać przykłady innych substratów, dedykowanych oznaczeniu badanej przez Doktoranta aktywności.

Rezultaty przeprowadzonych badań zostały wnikliwie omówione w kolejnym, liczącym 44 strony rozdziale zatytułowanym „Opis wyników badań”. Należy podkreślić, że prace badawcze zostały zaplanowane bardzo konsekwentnie i logicznie. Realizację swoich badań Doktorant rozpoczął od wyboru szczepu o potencjalnie największej aktywności lipolitycznej w testach płytkowych, a także wyboru podłoża do wydajnej hodowli wglębnej wytypowanego producenta docelowej aktywności. Wykonał wstępną charakterystykę supernatantu jako źródła enzymów lipolitycznych pod kątem jego wrażliwości na temperaturę, pH oraz stężenie induktora w podłożu. W kolejnym etapie Doktorant dokonał wyboru formy biokatalizatora (spośród liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 oraz wytraconych z supernatantu i zliofilizowanych preparatów białek) dla uzyskania najbardziej wydajnej estryfikacji alkoholi terpenowych. Na tej podstawie wytypował obiecujący biokatalizator w formie liofilizowanej grzybni *Chrysosporium pannorum* A-1.

Interesujące wyniki Pan Kutyla pozyskał w badaniach z użyciem skaningowej mikroskopii elektronowej sprzężonej z systemem EDS. Wskazują one, że skład podłoża determinuje morfologię strzępek grzybów nitkowatych, wpływając tym samym na wydajność estryfikacji. Następnie Doktorant przeprowadził optymalizację reakcji estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego z użyciem wytypowanego, na podstawie wcześniejszych badań, biokatalizatora. W tym miejscu chciałabym dopytać Doktoranta, dlaczego ostatecznie proces optymalizacji prowadził w temperaturze 30°C.

Na aktywność biokatalizatora w reakcji estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego istotny wpływ miała inkubacja grzybni, przed jej liofilizacją, w buforach o różnym pH. 3-godzinna inkubacja biomasy, zwłaszcza w buforach o zasadowym pH, prowadziła do znacznego spadku konwersji molowej substratów. W tym miejscu Autor słusznie zauważył i później potwierdził badaniami, że ma to związek z elucją białka z biomasy. Po inkubacji grzybni w buforze o pH 9,2, w którym stężenia białka było najwyższe, oznaczył za pomocą elektroforezy SDS-PAGE profil tych biocząsteczek, przypisując im, na podstawie markerów wielkości, przybliżone masy cząsteczkowe. Analiza mieszaniny białkowej z wykorzystaniem spektrometrii mas, wykonana w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii MAS IBB PAN w Warszawie, nie wykazała podobieństwa sekwencji uwolnionych białek do sekwencji białek zdeponowanych w dostępnych bazach danych. Zgadzam się z Doktorantem, że może to świadczyć o unikatowości biokatalizatora i zachęcałabym Autora pracy do dalszych badań nad poznaniem właściwości i struktury oczyszczonego enzymu.

W kolejnym etapie badań Doktorant zbadał specyficzność substratową biokatalizatora. Wykazał, że na wydajność estryfikacji alkoholi terpenowych przy użyciu liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 istotny wpływ ma struktura przestrzenna reagentów. I tak, wysoką wydajność estryfikacji uzyskano dla alkoholi pierwszorzędowych, takich jak cytronellol, geraniol i nerol, w przypadku drugo- i trzeciorzędowych nie uzyskano produktu. Co więcej, Doktorant zaobserwował, że wydajność reakcji zwiększa się wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego.

Za warte podkreślenia, w kontekście prowadzonych badań, uważam zbadanie wpływu molekularnego bioimprintingu na specyficzność substratową liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1. Autor niniejszej dysertacji zauważył, że taka strategia prowadzi do zwiększenia aktywności jedynie wobec alkoholu pierwszorzędowego – cytronellolu i przy wykorzystaniu takich czynników imprintujących jak kwas laurynowy i kaprylowy, w środowisku rozpuszczalników apolarnych. Dużym ograniczeniem w tego rodzaju badaniach była z pewnością forma biokatalizatora. W literaturze molekularny bioimprinting jest opisywany głównie dla wolnych enzymów.

Z aplikacyjnego punktu widzenia za cenne uważam zbadanie przez Doktoranta stabilności operacyjnej grzybni *C. pannorum* A-1. Wykazał On, że biokatalizator zachowuje do 80% swojej początkowej aktywności po pięciu 24-godzinnych cyklach katalitycznych oraz 70% po dwóch kolejnych. Ponadto udowodnił, że najlepszymi warunkami do przechowywania grzybni, bez znacznej utraty aktywności estryfikacyjnej, jest zamrożenie zliofilizowanej biomasy w temperaturze -20°C .

W niniejszej rozprawie doktorskiej zaprezentowana została alternatywna dla biokatalizy metoda otrzymywania pochodnych terpenów, czyli kataliza biomimetyczna. Wymaga ona obecności tlenu cząsteczkowego, światła oraz mimetyków enzymów – porfiryn. Na podkreślenie zasługuje wykorzystana do badań szeroka gama tego rodzaju katalizatorów, 9 było komercyjnych, a 3 to pochodne protoporfiryny IX, które zostały zsyntetyzowane we współpracy z Instytutem Chemii Organicznej PAN w Warszawie. W trakcie tych badań Doktorant wytypował najbardziej wydajny mimetyczny katalizator fotoutleniania myrtenolu, czyli 5,10,15,20 – tetrafenyloporfiryne (H_2TPP) oraz dobrał najbardziej optymalne warunki prowadzenia katalizy. Za wartościowe naukowo uważam badania Doktoranta dotyczące wyjaśnienia dokładnego mechanizmu mimetycznego utleniania myrtenolu do tlenku myrtenalu, który zakłada bezpośrednie utlenienie substratu tlenem singletowym oraz pozyskiwanie elektronu z myrtenolu przez wzbudzony dikation H_2TPP , a następnie generowanie i późniejszą rekombinację rodnikowych związków pośrednich. Zaintrygowana tymi badaniami, chciałabym zapytać Doktoranta czy są słabe strony tego rodzaju katalizy, a jeśli tak, to jakie. Uprzejmie proszę również o ocenę opłacalności tego procesu w porównaniu z biokatalizą, zwłaszcza w skali przemysłowej.

Ostatnia część pracy dotyczy badania aktywności biologicznej produktów biotransformacji alkoholi terpenowych, w tym oceny ich aktywności antynowotworowej wobec komórek glejaka ludzkiego oraz aktywności antimikrobiologicznej. Spośród 50 badanych związków Autor wytypował te, które wykazywały aktywność apoptotyczną wobec komórek glejaka w IV stadium rozwoju, nie odnotował natomiast żadnej aktywności biologicznej w przypadku komórek w III stadium. W przypadku badań nad aktywnością przeciwdrobnoustrojową Doktorant wykazał, że najbardziej wrażliwy na terpeny i ich pochodne jest szczep *Staphylococcus aureus*. Badania te uważam za bardzo istotne z aplikacyjnego punktu widzenia. Mają one jednak, w mojej opinii, charakter badań wstępnych i wymagają dogłębniejszej analizy mechanizmu działania tych związków. Szczerze zachęcałabym Doktoranta do kontynuowania tego rodzaju badań.

W kilku miejscach w tej części rozprawy znajdują się drobne pomyłki i niejasne sformułowania, np.

- na stronie 72 powinno zostać podane, że największy przyrost biomasy obserwowano na podłożach BM2, a nie jak podano BM1
- na rysunku 13 brak jest podpisu osi OX (str. 74)
- na rysunku 14 pojawia się „aktywność wyjściowa”, proszę o doprecyzowanie co kryje się pod tym pojęciem (str. 74)
- na str. 77 pojawia się zdanie o niezbyt dobrym brzmieniu „W celu doboru biokatalizatora do biokatalitycznej estryfikacji alkoholi terpenowych...”, słowo bioakatalitycznej można było pominąć
- na stronie 77 pojawia się termin aktywność specyficzna enzymu w odniesieniu do jego aktywności w przeliczeniu na 1 mg białka. W enzymologii częściej określa się ją jako aktywność właściwą enzymu
- w pracy Doktorant używa określenia psychrotroficzne grzyby nitkowate, stosuje się raczej termin psychrotrofowe mikroorganizmy

- niefortunne jest także stosowanie terminu „aktywność resztkowa”.

Podsumowując część pracy „Opis wyników badań” stwierdzam, że zakres wykonywanych badań był ambitny i szeroki. Uzyskane w trakcie ich realizacji wyniki potwierdzają, że Doktorant zrealizował postawione na wstępie cele. Wyniki Jego badań są cenne i stanowią ważne uzupełnienie zgromadzonej dotychczas wiedzy na temat potencjału biotechnologicznego psychrotrofowych szczepów.

Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż Autor pracy umiejętnie skonfrontował wyniki swoich badań z wynikami innych autorów literatury światowej z danego zakresu badawczego. To potwierdza dojrzałość naukową Pana Mateusza Kutyły.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz otrzymanych wyników, Doktorant sformułował 16 wniosków, w większości prawidłowo, za wyjątkiem wniosku 15, który w opinii recenzenta pozostaje na zbyt dużym stopniu uogólnienia. Świadczą one o realizacji wyznaczonego celu badań.

Podsumowaniem dotychczasowej pracy naukowej mgr inż. Mateusza Kutyły jest współautorstwo w pięciu publikacjach naukowych, z czego w trzech jest pierwszym autorem (wszystkie ze współczynnikiem wpływu Impact Factor), współautorstwo w trzech rozdziałach w monografiach i w dwóch udzielonych patentach oraz udział w 13 komunikatach konferencyjnych, co może świadczyć o Jego dojrzałości naukowej oraz o zarówno naukowym, jak i aplikacyjnym charakterze prezentowanych w rozprawie badań.

Rozprawa doktorska jest podstawą do dyskusji naukowej, a pytania przedstawione poniżej wynikają z czystej ciekawości recenzenta:

1. Czy wyliczony przez Doktoranta koszt uzyskania 1 grama biokatalizatora w formie grzybni uwzględnił proces liofilizacji? Czy można byłoby zastąpić ten proces innym, mniej kosztownym?
2. Czy w opinii Autora niniejszej dysertacji, czystość uzyskanych produktów biotransformacji (ok. 94%) była wystarczająca dla badania ich aktywności biologicznej na liniach komórkowych?
3. Czy badana była stabilność produktów otrzymanych z wykorzystaniem biokatalizy i katalizy mimetycznej? Jeśli tak, to proszę o podanie warunków ich przechowywania.

Posumowanie

W recenzowanej rozprawie doktorskiej mgr inż. Mateusza Kutyły na uwagę zasługuje szeroki zakres przeprowadzonych badań. Wysoko oceniam wielokierunkowość podejść i mnogość zastosowanych technik, co skutkuje kompleksowym i rzetelnym podejściem do badanego problemu. Uważam, iż przedstawiona rozprawa doktorska wraz z towarzyszącymi jej publikacjami stanowi merytorycznie wartościowy i nowatorski wkład do światowej wiedzy naukowej z zakresu biotechnologii zimnolubnych grzybów mikroskopowych, stanowiąc zarazem rzetelną podstawę do kontynuowania badań w tej tematyce i w obszarach pokrewnych. Wszelkie uwagi, komentarze wskazane przeze mnie w recenzji nie stanowią w swej istocie zarzutów o poważnym charakterze merytorycznym, a mają przede wszystkim wspomóc dalszy rozwój naukowy Doktoranta, zachęcić do dyskusji i dalszej wymiany spostrzeżeń.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Mateusza Kutyły pt. „Biokataliza alkoholi terpenowych do nowych związków aktywnych biologicznie” wykonana pod kierunkiem prof. UMCS dr hab. Mariusza Trytka spełnia wymagania stawiane przez art.

13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.), jest bowiem samodzielnym i bardzo wartościowym dorobkiem naukowym, wnosi do nauki wiele elementów poznawczych i ma znaczenie dla praktyki. W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Mateusza Kutęły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę fakt, że wyniki są oryginalne, wartościowe pod względem poznawczym oraz potencjalnie aplikacyjnym uważam, że całość rozprawy zasługuje na wyróżnienie, o które wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

dr hab. inż. Aneta Białkowska, prof. uczelni

Aneta Białkowska

