



Politechnika
Wrocławska

Politechnika Wrocławska
Wydział Chemiczny

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
tel./fax 71 320 24 27

dr hab. Irena Maliszewska, prof. PWr
irena.helena.maliszewska@pwr.edu.pl
tel. 71 320 4027 lub 71 320 3256

Wrocław, dnia 14.03.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. „Biokataliza alkoholi terpenowych do nowych związków aktywnych biologicznie”
wykonana przez Pana mgr Mateusza Kutylę w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu
Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Promotor: dr hab. Mariusz Trytek, prof. UMCS

Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego

Terpeny to duża klasa związków, które występują w różnych częściach roślin jako składniki olejków eterycznych, żywic i soków mlecznych, ale są też metabolitami komórek bakterii, grzybów i owadów. Terpeny to aromatyczne substancje chemiczne, które są odpowiedzialne za powstawanie różnorodnych zapachów, np. roślin, owoców, przypraw, ale mogą również pełnić rolę atraktantów lub repelentów. Od wielu lat związki te cieszą się dużym zainteresowaniem nie tylko chemików i biologów, ale również lekarzy. Już w starożytności wykorzystywano je w celach leczniczych (głównie jako zioła) i najczęściej stosowano w leczeniu zaburzeń układu nerwowego (głównie nieprawidłowych stanów emocjonalnych).

Dzięki międzydiscyplinarnym badaniom prowadzonym w wielu ośrodkach naukowych udowodniono, że terpeny wykazują różnorakie właściwości biologiczne. Związki te mogą pokonywać barierę krew-mózg i wpływać na funkcjonowanie centralnego układu nerwowego. Składniki wielu olejków eterycznych wykazują właściwości przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, żółciopędne, a nawet przeciwnowotworowe.

Terpeny znalazły zastosowanie w wielu gałęziach przemysłowych. Nie wyobrażamy sobie współczesnego przemysłu perfumeryjno-kosmetycznego i spożywczego bez tej klasy związków. Modyfikacja ich struktury za pomocą metod biokatalitycznych to jeden z dynamicznie rozwijających się kierunków badań w dziedzinie biotechnologii. Badania te koncentrują się na dążeniu do otrzymania związków o określonej charakterystyce fizykochemicznej i cechach użytkowych. Oczekuje się również, aby procesy modyfikacji terpenów były przyjazne dla człowieka i środowiska naturalnego.

Tematyka pracy doktorskiej Pana mgr Mateusza Kutyla dotycząca możliwości modyfikacji struktury alkoholi terpenowych z wykorzystaniem nowoczesnych i zrównoważonych metod biokatalitycznych bardzo dokładnie wpisuje się w zasygnalizowany powyżej obszar badań.

Pan magister Mateusz Kutyla jest współautorem 5 artykułów w czasopismach międzynarodowych: *Animals* (IF=4,208), *Molecules* (IF=3,231), *Insects* (IF=3,141), *BioEnergy Research* (IF=3,852) i *Current Pharmaceutical Biotechnology* (IF=2,829). Sumaryczny współczynnik oddziaływania wynosi 17,251. Doktorant w trzech publikacjach jest pierwszym autorem. Ponadto Pan magister Mateusz Kutyla jest współautorem 3 rozdziałów w monografiach oraz 2 patentów. Autor dysertacji otrzymał nagrodę zespołową JM Rektora Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie za patenty, które dotyczą sposobu otrzymywania biokatalizatorów grzybowych (grzybnia *Chrysosporium pannorum* A-1, wykorzystywana w eksperymentach prowadzonych przez Doktoranta jest jednym z takich biokatalizatorów). Autor dysertacji w latach 2018-2022 uczestniczył w 9 konferencjach krajowych i zagranicznych.

Aktywność naukowa Pana magistra Mateusza Kutyla przełożyła się na uzyskanie w latach 2019, 2020 i 2022 finansowania swoich badań w postaci grantów indywidualnych dla młodych pracowników i doktorantów Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS.

Na uwagę zwraca również aktywność dydaktyczna Autora dysertacji, gdyż w latach 2017-2022 prowadził aż pięć różnych kursów dla studentów kierunku Biotechnologia. Warta podkreślenia jest również działalność organizacyjna i popularyzatorska oraz aktywny udział w wielu szkoleniach, które dotyczyły zarówno dydaktyki, jak i nowoczesnych metod analitycznych. W trakcie realizacji dysertacji Autor odbył staż naukowy w Zakładzie Biologii Środowiskowej i Apidologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Zgodnie z literaturą przedmiotu recenzowana praca doktorska ma elementy nowości naukowej.

Formalna ocena pracy

Zamysł kompozycyjny rozprawy jest tradycyjny; obejmuje ona 186 stron i jest to praca z zachowaniem właściwej proporcji części opisującej badania własne w stosunku do całej rozprawy. Bibliografia liczy 267 pozycji światowej literatury. Źródła literaturowe obejmujące głównie lata 2000-2022 stanowią merytorycznie uzasadnioną dokumentację działań naukowo-badawczych podjętych przez Doktoranta.

W części teoretycznej pracy Autor w sposób wyczerpujący i kompetentny charakteryzuje terpeny i podejmuje dyskusję dotyczącą metod syntezy tej grupy związków. Omówione zostały również szlaki biosyntezy terpenów oraz scharakteryzowana została biologiczna rola tych struktur. Następnie Autor wprowadza czytelnika w problem biokatalizy i biokatalizatorów i szczegółowo traktuje problem biokatalizy alkoholi terpenowych. Duża część została poświęcona opisowi zastosowania takich biokatalizatorów jak lipazy pochodzenia drobnoustrojowego i roślinnego oraz biokatalizatory biomimetyczne.

Kolejna część dysertacji traktuje o właściwościach terapeutycznych monoterpenu. Szczególne zainteresowanie zostało skupione na właściwościach przeciwdrobnoustrojowych α - i β -pinenu. Warto podkreślić, że część literaturowa dowodzi bardzo dobrej znajomości omawianych zagadnień przez Autora.

W tym miejscu chciałabym jednak zwrócić uwagę na wielokrotne używanie przez Autora sformułowania „antymikrobiologiczna aktywność” i proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do poprawności tego określenia.

Cel pracy jest sformułowany na stronie 46 rozprawy i obejmuje zarówno opracowanie biokatalizacyjnych metod transformacji alkoholi terpenowych do nowych związków, ale także określenie aktywności biologicznej wyizolowanych i oczyszczonych produktów takich biotransformacji. Stosownie do tak ustawionego wektora naukowego część doświadczalna zawiera opis stosowanej metodyki i procedur badawczych.

W opisie stosowanej metodyki pojawiło się kilka niezręcznych określeń (nieścisłości), które nie mają wpływu na obraz dysertacji, ale z obowiązku recenzenta zwracam na nie uwagę. Podłoże nazywane przez Autora stałym bulionem tryptozowo-sojowym (TSB) zawierające w składzie agar-agar powinno być określane jako agar-tryptozowo-sojowy (strona 50).

Na stronie 67 przedstawionej dysertacji pojawia się określenie „absorbancja krążków traktowanych terpenem” i „absorbancja krążków nietraktowanych żadnymi związkami”. Proszę o wyjaśnienie parametru „absorbancja krążków”?

Autor podaje (strona 54), że inokulum grzybów do zaszczepiania podłoży płynnych stanowiły standaryzowane zawiesiny konidiów w jałowej wodzie z dodatkiem Tweenu 80, które uzyskiwano poprzez zdrapywanie przerośniętych grzybni z powierzchni podłoża stałego. W inokulum przygotowanym według tej procedury musiały być obecne duże fragmenty grzybni. Czy te fragmenty grzybni były usuwane?

W części badań własnych Doktorant podjął się dobrze zaplanowanych zadań wieloetapowych, zaawansowanych metodycznie. Poniżej prezentuję szczegółowe kierunki badań, zrealizowane przez Pana magistra Mateusza Kutylę.

Pierwszym kierunkiem badań była ocena aktywności lipolitycznej szczepu *Chrysosporium pannorum* A-1, opracowanie składu podłoża (w tym ocena wpływu induktorów) oraz dobranie parametrów fizyko-chemicznych hodowli zwiększających biosyntezę enzymu. W tej części została również oceniona stabilność temperaturowa zewnątrzkomórkowej lipazy oraz opracowano wydajną metodę oczyszczania białek z płynu pohodowlanego.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne niejasności w tej części dysertacji i oczekuję ustosunkowania się w trakcie publicznej obrony do moich pytań (*stricte* o charakterze dyskusyjnym):

Co mogło wpłynąć (poza sugerowanym brakiem źródła węgla) na drastyczny spadek ilości biomasy *C. pannorum* A-1 po 5 dniach hodowli? (Tabela 13).

Dlaczego jedną z technik zateżniania płynu pohodowlanego było użycie wyparki próżniowej, wiedząc, że badany enzym nie jest stabilny w podwyższonej temperaturze?

Dlaczego do wytrącania białek nie użyto metody wysalania za pomocą siarczanu amonu?

Kolejny kierunek badań to wybór formy katalizatora do estryfikacji alkoholi terpenowych. W tej części dysertacji Autor ocenił aktywność estryfikacyjną preparatów, którymi były wytrącone z płynu pohodowlanego i liofilizowane białka oraz grzybnie badanego mikroorganizmu, uzyskiwane w różnych warunkach hodowlanych. Okazało się preparat liofilizowanych białek wykazywał znikomą aktywność biokatalityczną. Wydajnym biokatalizatorem estryfikacji cytronellolu do octanu cytronellolu była grzybnia uzyskiwana na podłożu wzbogaconym oliwą z oliwek i CaCO₃. Analiza sproszkowanych grzybni za pomocą techniki FTIR-ATR miała na celu powiązanie aktywności katalitycznej z obecnością charakterystycznych grup funkcyjnych w strukturze biokatalizatora. Problem ten został

starannie przedyskutowany w rozdziale piątym dysertacji. Technika mikroskopii SEM i analiza EDS wykazała różnice w stężeniach makroelementów obecnych w biokatalizatorach grzybowych uzyskiwanych w różnych warunkach hodowlanych.

Autor wykazał, że zastosowanie grzybni jako biokatalizatora jest nie tylko bardzo wydajne, ale również uzasadnione ekonomicznie, gdyż przeprowadzona kalkulacja kosztów operacyjnych uzyskiwania 1 grama grzybni została oszacowana na nie więcej niż 3,1 PLN.

W dalszej części dysertacji aktywność biokatalityczna grzybni oraz warunki prowadzenia wydajnej biotransformacji zostały starannie scharakteryzowane.

Kolejny kierunek badań dotyczył katalizy biomimetycznej cytronellolu, alkoholu perylowego i myrtenolu przy użyciu dziewięciu komercyjnie dostępnych porfiryn oraz trzech pochodnych protoporfiryny IX. Okazało się, że biomimetycznej transformacji ulegał jedynie myrtenol. Autor dysertacji przeprowadził dobór porfiryny do fotokatalitycznej konwersji myrtenolu i w dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentach udowodnił, że najwyższą aktywnością konwersji myrtenolu do nowego/nieznanego produktu wykazywała 5, 10, 15, 20-tetrafenyloporfiryne (H₂TTP). Przeprowadzone analizy 1D i 2D NMR wykazały, że nieznanym/nowym produktem jest tlenek myrtenalu. W kolejnej części Autor dysertacji przeprowadził optymalizację układu fotokatalitycznego utleniania myrtenolu przy użyciu wcześniej wybranej tetrafenyloporfiryny i dzięki zastosowaniu wielu technik analitycznych wykazał, że biotransformacja myrtenolu do tlenku myrtenalu może obejmować dwa różne szlaki reakcji: „bezpośrednie utlenianie myrtenolu tlenem singletowym oraz pozyskiwanie elektronu z myrtenolu przez wzbudzony dikation tetrafenyloporfiryny, a następnie generowanie i późniejszą rekombinację rodnikowych związków pośrednich”, co było zgodne z wcześniejszymi obserwacjami Pana dr hab. Mariusza Trytka, Promotora recenzowanej pracy doktorskiej, dotyczącymi biotransformacji α -pinenu i opublikowanymi w roku 2011.

Ostatni kierunek prowadzonych badań obejmował analizę właściwości przeciwnowotworowych i przeciwdrobnoustrojowych 43 produktów biokatalizy (wstępnie oczyszczonych za pomocą cieczonej chromatografii kolumnowej) i 7 alkoholowych prekursorów. Aktywność proapoptotyczna została wykazana wobec komórek glejaka wielopostaciowego i dotyczyła ona cytronellolu, alkoholu perylowego, myrtenolu oraz ich estrów. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej produktów biokatalizy i ich prekursorów wykazały, że niektóre z tych związków hamują rozwój mikroorganizmów prokariotycznych reprezentowanych przez bakterie *S. aureus* i *P. aeruginosa* oraz wpływają na wzrost mikroorganizmów eukariotycznych, takich jak *C. albicans*, *P. chrysogenum* i *A. niger*.

Proszę o porównanie aktywności przeciwdrobnoustrojowych badanych alkoholi terpenowych z danymi uzyskanymi przez innych autorów.

Bardzo dobrze opracowanym rozdziałem recenzowanej dysertacji jest blisko dwudziestostronicowa dyskusja uzyskanych wyników. Doktorant prezentuje osiągnięte rezultaty na tle wyników opublikowanych przez innych autorów, co umożliwiło jednoznaczne wykazanie elementów nowości naukowej przygotowanej dysertacji.

W tym rozdziale znajdujemy również informacje o podjętej współpracy naukowej. Analiza spektrometryczna mas mieszaniny białek obecnych w płynie po inkubacji grzybnicy szczepu *Chrysosporium pannorum* A-1 była przeprowadzona w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas IBB PAN w Warszawie, a wykorzystywane w eksperymentach pochodne protoporfiryny IX zostały zsyntezowane we współpracy z Instytutem Chemii Organicznej PAN w Warszawie. Podane informacje nie pozwalają ocenić jaka była rola Autora dysertacji w tej części eksperymentów. Czy Autor osobiście brał udział w analizie białek i syntezie pochodnych protoporfiryny IX ?

Biorąc pod uwagę różnorodność technik wykorzystywanych przez Doktoranta, proszę również o odpowiedź na pytanie: Które analizy były wykonywane przez Doktoranta, a które analizy przeprowadzili inni specjaliści?

Interdyscyplinarny charakter biotechnologii zawsze wymaga współpracy ekspertów reprezentujących rozmaite dyscypliny naukowe, a umiejętność nawiązywania kontaktów naukowych i wspólne prowadzenie badań to podstawowe cechy, którymi powinien charakteryzować się każdy uczony, ale zawsze konieczne jest jednoznaczne pokazanie, które analizy zostały wykonane samodzielnie, a które we współpracy ze specjalistami. Czy analiza SEM-EDS była wykonana samodzielnie przez Doktoranta?

Jestem przekonana, że ważną sprawą są podziękowania dla wszystkich Osób, które pomagały w zaplanowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów, pomagały w analizie danych, służyły wsparciem merytorycznym lub życzliwą pomocą na każdym etapie przygotowywania dysertacji, ale takich podziękowań zabrakło mi w ocenianej rozprawie doktorskiej.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska:

- ✓ prezentuje bardzo dobrą ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta ubiegającego się o nadanie stopnia doktora w Dyscyplinie Naukowej Nauki Biologiczne,
- ✓ pokazuje, że Doktorant posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej wymaganej od osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora,

- ✓ jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego dotyczącego biokatalizy alkoholi terpenowych do nowych związków aktywnych biologicznie.

Porównując cel i założenia pracy z podsumowaniem jej wyników, mogę z przekonaniem stwierdzić, że program badań został całkowicie zrealizowany. Chciałabym podkreślić, że Doktorant posiada cenną wiedzę z zakresu biokatalizy alkoholi terpenowych. Opanował podstawy prowadzenia i optymalizacji procesów biosyntezy/biotransformacji i uzyskał kompetencje instrumentalne, umożliwiające prawidłowy dobór metod badawczych, wykonanie pomiarów i interpretację wyników.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana magistra Mateusza Kutuły stanowi obraz bardzo dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych badań naukowych. Praca w pełni spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2022r. poz. 574 z późniejszymi zmianami) dotyczące rozpraw doktorskich i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pana magistra Mateusza Kutuły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę zakres badań, nowość i znaczenie uzyskanych wyników dla celów praktycznych, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Jolanta Maliszewska