



Prof. dr hab. Maciej Szaleniec

maciej.szaleniec@ikifp.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „Synteza i biotransformacje wybranych związków flawonoidowych”
Pana mgr inż. Mateusza Łuznego

Praca doktorska mgr. inż. Mateusza Łuznego została wykonana w Katedrze Chemii na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Tomasza Janeczko, prof. UPWr i promotor pomocniczej dr inż. Ewy Kozłowskiej. Celem recenzowanej rozprawy była „synteza nowych, oraz występujących w niewielkich ilościach w roślinach leczniczych, związków flawonoidowych” wykorzystując do tego celu proces biotransformacji prowadzony przy pomocy niekonwencjonalnych szczepów drożdży oraz entomopatogennych grzybów strzępkowych. Poza tym zdecydowanie aplikacyjnym celem doktorant postawił sobie również cel poznawczy, tj. charakterystykę zdolności katalitycznych badanych mikroorganizmów.

Informacje o pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr. inż. Mateusza Łuznego stanowi cykl 4 prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR wraz z 45 stronicowym omówieniem. Część omawiająca cykl publikacyjny składa się ze streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępnego rozdziału poświęconego flawonoidom, oraz bardzo zwięźle zarysowanym celom pracy i metodyce wykorzystywanej przez doktoranta w swoich badaniach. Na następnych 17 stronach czytelnik znajdzie omówienie wyników wraz z ich dyskusją zakończone jednostronicowym podsumowaniem całości pracy. Część wstępu zakończona jest listą cytowanej literatury składającej się z 84 pozycji. W kolejnej części pracy odnajdujemy oświadczenia współautorów wykazujące dominujący wkład autorski doktoranta w opublikowanych pracach (70-80%), który w przypadku 3 publikacji opublikowanych w wydawnictwie MDPI znajduje swoje dodatkowe potwierdzenie dzięki sekcji CREDIT na końcach tych publikacji. Prace zostały opublikowane w czasopismach otwartego dostępu wydawnictwa MDPI tj. Molecules, Catalysts, International Journal of Molecular Sciences (odpowiednio Q2, Q2, Q1/Q2) oraz w Journal of Agricultural and Food Chemistry wydawnictwa ACS (Q1, dostęp ograniczony). Na prace składają się też materiały uzupełniające do publikacji, które zawierają przede wszystkim widma NMR, MS, chromatogramy oraz tabele podsumowujące konwersję w czasie poszczególnych związków. Całość pracy zakończona jest podsumowaniem dorobku doktoranta na który składa się 5 publikacji z listy JCR, 19 przyznanych już polskich patentów, 38 zgłoszeń patentowych, 5 komunikatów konferencyjnych oraz lista projektów badawczych, w których doktorant brał udział. Całość rozprawy liczy 266 stron.

Ocena merytoryczna rozprawy

Na wstępie należy zaznaczyć, że praca pana mgr. inż. Łuznego wpisuje się w bardzo popularny trend modyfikacji flawonoidów metodami biologicznymi. Krótka kwerenda w Web of Science bazująca na kluczowych słowach ‘biotransformation’ i ‘flavonoids’ zwraca 540 publikacji (w tym 54 prace przeglądowe). Przy czym od początku naszego wieku zainteresowanie tym tematem znacząco rośnie,



(na przełomie wieków ukazywało się około 4-7 prac rocznie, obecnie między 40 do 60). Zastosowanie etnomopatogennych grzybów strzępkowych oraz nietypowych drożdży do biotransformacji nie jest już jednak tak rozpowszechnione (np. szczepy *Beauveria* występują tylko w 10 pracach z 540 zaś *Yarrowia lipolytica* była stosowana, oprócz prac doktoranta, jeszcze tylko przez grupę badaczy z Meksyku). Podsumowując, należy stwierdzić, że praca przedstawia badania w popularnej dziedzinie, ale zastosowane mikroorganizmy nie są dobrze poznane. **Nie ma wątpliwości więc, że praca ma charakter oryginalny i eksploruje dotychczas niezbadane obszary przestrzeni biotransformacyjnej, umożliwiającą modyfikację ważnych z punktu widzenia ich aktywności biologicznej związków flawonoidowych.**

Zasadniczo pracę można podzielić na dwie części, 1) poświęcono regioselektywnej hydrogenacji chalkonów (P1, P2) oraz 2) biotransformacji metoksyflawonów (P3 i P4). Celem pierwszej części jest chemo-enzymatyczna synteza nowych związków o potencjalnym zastosowaniu jako słodzików, gdzie etapem biokatalitycznym jest uwodornienie wiązania podwójnego pomiędzy atomami C2 i C3. Z kolei w drugiej części motywem przewodnim jest zwiększenie biodostępności flawononów (również syntezowanych chemicznie) oraz modyfikacja ich właściwości biologicznych dzięki reakcjom katalizowanym przez enzymy występujące w biotransformujących szczepach (tj. poprzez demetylację grup metoksy, bezpośrednią hydroksylację w aromatycznym pierścieniu A lub B oraz 4-O-metyloglikozylację grup OH).

Zasadniczo wszystkie publikacje zbudowane są w oparciu o podobny schemat konstrukcyjny: synteza substratów metodami chemii organicznej, przesiewowe testy biotransformacji badanych substratów z zastosowaniem wybranej grupy mikroorganizmów z zastosowaniem detekcji metodami TLC, GC, HPLC lub UHPLC, identyfikację powstałych produktów z zastosowaniem przede wszystkim spektroskopii NMR z niewielką pomocą widm masowych (^1H - i ^{13}C -NMR, HMBC, HMQC, COSY) oraz zwiększenie skali syntezy do skali preparatywnej dla wybranych substratów/szczepów w celu wykazania przydatności metody do syntezy interesujących produktów. Prace te generalnie wpisują się w metodykę opracowaną przez grupy prof. Tomasza Janeczko i Prof. Edyty Kostrzewy-Susłow i nie wykraczają co do schematu poza standardowy zestaw instrumentarium stosowane w grupie. W niektórych przypadkach publikacje podają bardziej szczegółowe przebiegi biotransformacji w czasie (tj. nie tylko dla 3-4 wybranych punktów czasowych) na podstawie czego czytelnik może dowiedzieć się o kinetyce procesu biotransformacji. Na tej podstawie można m.in. zastanawiać się, czy wykorzystywane szczepy angażują w biotransformację enzymy konstytutywne czy też ekspresji ulegają dopiero biokatalizatory w wyniku indukcji pod wpływem obecności badanych substratów. W pracy postawiono szereg hipotez dotyczących enzymów zaangażowanych w modyfikację badanych związków (odpowiednio enereduktazy ze szczepów drożdżowych w P1 i P2, np. Old Yellow Enzymes, oraz monooksygenazy cytochromowe P450 katalizujące hydroksylację i glikozylotransferazy katalizujące 4-O-metyloglikozylację w P3 i P4). Hipotezy te są jednak bardzo ostrożne, bazujące jedynie na doniesieniach literaturowych, a więc nieoparte żadnymi dodatkowymi badaniami ze strony doktoranta. W pracach brak również badań biologicznych konfrontujących cel praktyczny (a więc uzyskanie słodzików, czy też związków o zwiększonej biodostępności) z weryfikowalną eksperymentalnie rzeczywistością.

Zdecydowanie mocną stroną pracy jest niezwykle drobiazgowa analiza powstających produktów biotransformacji bardzo licznych substratów (18 związków powstałych w wyniku syntezy chemicznej było biotransformowanych do 7 dihydrochalkonów i 21 pochodnych metoksyflawononów). Na szczególną uwagę zasługuje, będące niejako znakiem rozpoznawczym grupy z Uniwersytetu



Przyrodniczego, **analiza strukturalna oparta o dwuwymiarowe metody NMR**. W kilku przypadkach analiza ta musiała zostać wspomóżona przez modelowanie widm ^{13}C NMR i analizę fragmentacji MS, ale w większości przypadków wystarczała do jednoznacznej identyfikacji struktury powstających związków. Osobiście jestem pod wrażeniem, chociaż zastanawia mnie tak niewielkie wykorzystanie chromatografii LC-MS. Pomimo, że takie badania były wykonywane w każdej pracy, bardzo rzadko można znaleźć w samych publikacjach informacje o masie kwasi-molekularnej otrzymywanych związków i ich charakterystycznej fragmentacji. W moim odczuciu analiza masowa związków uwiarygodniłaby identyfikację otrzymywanych produktów w oczach czytelników, przede wszystkich tych mniej biegłych w analizie NMR (t.j. takich jak recenzent), szczególnie w przypadku prostych demetylacji czy hydrogenacji. Co prawda samo widmo MS nie jest w stanie odpowiedzieć na pytanie, który podstawnik uległ demetylacji, ale możliwe jest to już w przypadku połączenia tej informacji z czasem retencji. Mając dostęp do szerokiej bazy związków flawonoidowych w grupie (oraz efektywnych metod syntezy) w przypadkach wątpliwych zastosowanie analizy LC-MS dla standardu (kombinacji czasu retencji i widma MS wraz ze stosunkami intensywności jonów potomnych) jednoznacznie pozwala potwierdzić tożsamość danego związku. Oczywiście moja uwaga ma charakter zdecydowanie subiektywny, gdyż wynika z metodologii stosowanej w badaniach mojego własnego zespołu (tj. w pierwszej kolejności opieranie się na widmie MS, a dopiero w drugiej na analizie NMR). **W każdym razie należy zdecydowanie stwierdzić, iż w pracy doktorskiej mgr inż. Łużny przedstawił kawał solidnej roboty z dziedziny biotechnologii aplikacyjnej.**

Na uwagę zasługuje również bardzo duża ilość zgłoszeń patentowych zabezpieczających prawa majątkowe do poczynionych odkryć. Należą się tu szczególne pochwały ze względu na potrzebną dyscyplinę ograniczającą aktywność publikacyjną i konferencyjną przed złożeniem zgłoszenia do UP. Tymczasem mamy tutaj bardzo dużo zgłoszeń (i sporo udzielonych już patentów) i jednocześnie pracę doktorską z cyklu publikacji. **Jest to wyczyn bardzo trudny do osiągnięcia i tutaj należą się doktorantowi wyrazy uznania.** W temacie tym mam też jednak uwagę krytyczną. Co prawda same zgłoszenia patentowe nie stanowią części pracy, są jednak wymieniane jako wynik badań w omówieniu (np. na stronie 25). Analiza listy przyznanych patentów i samych wniosków (strony 54 i 55) wykazuje, że zastosowaną metodę „jedna reakcja - jedno zgłoszenie” (np. „Sposób wytwarzania 2'-hydroksyflawonu”). W efekcie tego podejścia utrzymanie ochrony np. na biotransformacje za pomocą *Y. lipolytica* będzie bardzo drogie, same zaś poszczególne patenty są bardzo słabe (pojedynczy przykład realizacji, zastrzeżenia tylko konkretnych warunków tj. szczep, temperatura 20-30°C, stosunek substratu do hodowli (v/v), i czas biotransformacji). Gdyby więc chodziło o uzyskanie silnych patentów o zastosowaniu komercyjnym (a więc ochronie łatwiej do rozszerzenia poza granicę Polski w przypadku praktycznego zastosowania do produkcji np. słodzików czy suplementów diety) należałoby składać mniej liczne patenty z przykładami syntezy różnych związków, szerokim wachlarzem przykładów zabezpieczających szerokie zakresy warunków biotransformacji. Tymczasem obawiam się, że doktorant musiał podporządkować się polityce jednostki dyktowanej przez wytyczne ewaluacyjne, wg. której każdy przyznany patent nagradzany jest osobną ilością punktów. Zjawisko to, żartobliwie nazywane „punktozą” lub „patentozą”, na pewno nie zasługuje na pochwałę. Trudno oczywiście obarczać za jego stosowanie samego doktoranta (gdyż decyzyję co do sposobu kształtowania zgłoszeń podejmują najczęściej centra transferu technologii).



Czytając pracę nasunęło mi się też kilka spostrzeżeń o charakterze polemicznym. Prosiłbym więc doktoranta o odpowiedź na intrygujące mnie kwestie:

Na stronie 27 omówienia zastosowano radarowy wykres postępu biotransformacji w funkcji stężenia związku. **Jaki był powód zastosowania tak nietypowego wykresu?** Standardowo przedstawia się takie postępy w na wykresie konwersji od czasu co umożliwiła śledzenie przybliżonego kształtu krzywych reakcji, podanie średniej szybkości konwersji dla początkowych krzywych (jeżeli miały charakter hiperboliczny).

Znacznie lepszy jest wykres 3 w Catalysts, na stronie 7, który pokazuje szybkość konwersji w funkcji ilości podstawników metoksylowych. Niestety nie wiemy jak często próbowano kolby bo na wykresie brak jest punktów a pokazano tylko linie, wyraźnie jednak widać dwie szybkości konwersji (do około 3 h i później). W pracy na stronie 27 doktorant skonstruował „wraz ze wzrostem liczby grup metoksylowych wydajność procesu malała”. **Wydaje się, że przedstawione dane uprawniają do bardziej ilościowej analizy.**

Na stronie 28 znajdujemy odniesienie do badań potencjału przeciwnowotworowego 2'-hydroksychalkonu. Nie jest jasne czy metoksylowanie prowadzi do zwiększenia czy zmniejszenia efektu oraz co doktorant rozumie przez „silniejsze działanie” w stosunku do linii nowotworowych. **Zachęcałbym tutaj do precyzyjnej i ilościowej odpowiedzi w oparciu o LD50 lub inny wskaźnik letalności stosowany w cytowanych pracach.**

W przypadku biotransformacji metoksyflawonów doktorant postuluje kaskadowy charakter glikozylacji. Dowodem na to ma być pojawianie się w mieszaninie związków fenolowych (produktów O-demetylacji) a następnie powstawanie pochodnych glikozylowanych. Jakkolwiek jest to sensowne przypuszczenie wydaje się, że można by łatwo udowodnić tę hipotezę, poprzez poddanie biotransformacji izolowanego przecież produktu demetylacji. Należałoby oczekiwać, że wychodząc z takiego substratu od razu pojawiłby się w mieszaninie pochodne z podstawnikiem cukrowym, co potwierdziłoby postawioną hipotezę. **Bardzo proszę o komentarz lub wynik odpowiedniego eksperymentu.**

Opis półpreparatywnej metody biotransformacji furfurylo- i tionylo-chalkonów wykazuje, że zastosowano stężenie 0.2 g/L (Molecules, strona 7). **Co było powodem wyboru takiego stężenia?** Czy limitem była rozpuszczalność związków, ich toksyczność dla komórek czy niecałkowita transformacja na poziomie 72-76%? Czy dłuższa transformacja powyżej 24 h dałaby wyższe wydajności i czy reżim okresowy z zasilaniem nie zwiększyłby wydajności, jeżeli problemem była toksyczność względem substratu?

W konkluzjach pracy w Molecules na podstawie przebiegu biotransformacji postawiono hipotezę, że ene-reduktazy zaangażowane w hydrogenację wiązania podwójnego ulegają indukcji pod wpływem



substratu. **Czy w jakikolwiek sposób potwierdzono tę hipotezę, np. przez rtPCR?** Szybka kwerenda w BLAST wykazuje, że *Yarrowia lipolytica* CLIB122 posiada co najmniej trzy geny o wysokim podobieństwie do OYL z *Saccharomyces pastorianus*, możliwe więc byłoby zaprojektowanie odpowiednich primerów do śledzenia ich ekspresji genów w czasie transformacji metodą qPCR. Podobny obraz mamy przy hydroksylacji 5,6,4'-trimetoksyflawononu w pracy P4 (strona 215 pracy) gdzie aż prosi się o potwierdzenie hipotezy przez identyfikację RNA kodującego cytochromy P450.

W publikacji P2 pozycje R5 i R6 zawsze były podstawione podstawnikiem metoksylowym. **Dlaczego nie zsyntetyzowano związków selektywnie podstawionych w R5 lub R6?** – dałoby to dodatkową informację o wpływie tych pozycji na szybkość transformacji i selektywność.

Niekiedy doktorant wydaje się zbyt dalekosiężnie wnioskować na podstawie obserwacji tempa biotransformacji. Np. w pracy P2 dyskutowane jest powinowactwo poszczególnych enzymów do danych substratów (strona 5). Tymczasem biorąc pod uwagę prawdopodobny fakt indukcji enzymów i kompletny brak informacji o poziomie ich ekspresji, szybkość konwersji jest zależna od zbyt wielu czynników aby wyciągać takie wnioski (mamy bowiem możliwość zróżnicowanej regulacji ekspresji pomiędzy szczepami, różnego poziomu produkcji enzymów, oczywiście różne ich powinowactwa do konkretnych substratu ale też i różną maksymalną szybkości konwersji danych związków w zależności od danego enzymu). **Proszę o ustosunkowanie się do mojej uwagi.**

Bardzo ciekawym aspektem jest również w jaki sposób pozycja grup metoksylowych w chalkonach wpływa na smak tych związków. Czy w tym aspekcie były czynione jakieś badania i doktorant może się na ten temat wypowiedzieć?

Na stronie 7 przy konwersji 100 mg 4-metoksyflawonony przez KCh J1.5 wyizolowano tylko 36.5 mg produktu. **Czy powodem tak niskiej konwersji była nieudana ekstrakcja?** W tabeli 4 konwersja do produktu 14 wynosiła 100% już po 3 dniach.

Na 8 stronie P3 omawiane są produkty transformacji przez *B. caledonica* KCh J3.4 ,ale z powodu braku możliwości izolacji nie można było wykonać analizy NMR. Tymczasem doktorant miał dostęp do UHPLC z potrójnym kwadrupolem – **czy ilości produktów były zbyt małe (poniżej mg/L) aby dokonać przynajmniej analizy ich masy i fragmentacji?**

W pracy P3 na drugiej stronie napisano, że izokwercytyna jest 18 razy bardziej biodostępna niż kwercytyna w modelu szczurzym i znacząco bardziej niż w modelu ludzkim. **Czy oznacza to, że model szczurzy jest nieadekwatny do badań wchłaniania u człowieka?**

W materiałach dodatkowych publikowane są często widma MS wykonane dla różnej energii kolizyjnej (CE) w wyniku czego jon prekursorowi rozpada się na różne jony potomne. Brakuje w pracy jednak analizy tych fragmentacji, które by potwierdzały zgodność z analizą NMR. **Bardzo proszę o przeprowadzenie takiej analizy dla przykładowego związku w czasie obrony.**

Doktorant w konkluzji P4 suponuje, że osiągnięte modyfikacje flawonoidów promuje ich zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym jako aktywnych związków w preparatach promujących



zdrowie (luźne tłumaczenie). Brak w pracy uzasadnienia dla takiego stwierdzenia, gdyż nie przedstawiono badań biologicznych potwierdzających taką tezę. Nie zastosowano nawet dość łatwego sposobu oceny absorpcji, dystrybucji, metabolizmu i wydalania (ADME) otrzymanych związków (w pracy zauważono, że zwiększenie polarności wcale nie musi przekładać się na większą biodostępność związków w docelowych tkankach czy też wolniejszy metabolizm i wydalanie). Tymczasem takie analizy są dość łatwe i dostępne za darmo – chociażby na serwerze Swiss Institute of Bioinformatics (<http://www.swissadme.ch>) dostarczając zarówno istotnych informacji o rozpuszczalności, penetracji bariery BBB czy adsorpcji w jelicie. Proponuję, aby doktorant dokonał weryfikacji swoich hipotez w oparciu o taką analizę.

Drobne uwagi nie wymagające komentarza ze strony doktoranta:

- na schematach w omówieniu biotransformacji (np. schemat 12, 13 itd.) bardzo przydatne byłby % wykazujące wydajność biotransformacji najlepszych szczepów (w publikacjach pełnią tę rolę tabele)
- Fig. 3 w P3 jest błędna, gdyż pokazuje transformacje 2-metoksyflawonu.
- Fig. S89 na 198 stronie pracy – indeks powinien być 3' a nie 5' przy oznaczeniu pozycji glukopiranozydu
- W pracy P3 w sekcji LC-MS (oraz innych sekcjach LC-MS) brakuje informacji, że jest to QQQ a nie kwadupol, jaki jest tryb jonizacji (po fazie sądząc ESI), tryb rejestracji widm (product ion scan albo po prostu scan2)
- Na stronie 3882 publikacji P4, ostatni paragraf lewej kolumny opisuje transformacje przez KCh J1.5 (związek 6, izolowana wydajność 40%). Konfrontacja z tabelą 1 wskazuje raczej na *I. fumosorsea* KCh J2 gdyż dla KCh J1.5 była to wydajność 17%. Błąd w tekście lub w tabeli.
- Fig S34 MS 3'-hydroksyflawonu wydaje się analizą przede wszystkim szumu a nie fragmentacji związku – patrz na intensywności oraz zupełny brak konsystencji z widmami dla pochodnych

Podsumowanie

Pomimo moich uwag, które mają charakter polemiczny, chciałbym wyrazić moje uznanie dla ogromu pracy włożonego przez doktoranta w wykonanie badań i przygotowanie rozprawy doktorskiej i podkreślić wysokie znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników dla chemo-biotechnologicznej syntezy ważnych związków biologicznie aktywnych. Jednoznacznie stwierdzam, że pan mgr inż. Mateusz Łużny spełnia ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne. Wnoszę o dopuszczenie doktoranta do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Prof. dr hab. Maciej Szaleniec