

Prof. dr hab. Zdzisław Targoński
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii
i Żywności Człowieka
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 29.07.2021 r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Bartłomieja Zieniuka

**pt. "Enzymatyczna synteza i badanie aktywności biologicznej estrów związków
fenolowych jako dodatków do żywności"**

wykonanej w Katedrze Chemii, Instytutu Nauk o Żywności,
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
pod kierunkiem **Promotora** prof. dr hab. Ewy Białeckiej-Floriańczyk
i **Promotora** pomocniczego dr inż. Agaty Fabiszewskiej

Opracowanie recenzji rozprawy doktorskiej dokonano na zlecenie Rady Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia SGGW w Warszawie z dnia 18.06. 2021 r.

Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej

Dodatki do żywności pełnią w niej wiele ważnych i często koniecznych funkcji. Do nich należą związki wykazujące m.in. właściwości antymikrobiologiczne i przeciwutleniające. W tej grupie związków jedną z najliczniejszych i najróżnorodniejszych grup stanowią metabolity wtórne roślin, w szczególności związki fenolowe. To sprawia, że wiele ekstraktów roślinnych jest bogatych w związki fenolowe, które stwarzają możliwości dla rozwoju naturalnych konserwantów w żywności, zastępujących konserwanty syntetyczne. Mechanizmy działania przeciwbakteryjnego związków fenolowych nie są jeszcze w pełni poznane, ale już wykazano ich wpływ na przepuszczalność błon komórkowych mikroorganizmów. Ponadto, dochodzi do tworzenia wiązań wodorowych z enzymami lub modyfikacji sztywności ściany komórkowej z utratą jej integralności z powodu różnych interakcji z błoną komórkową. Te oddziaływania mogą wywołać nieodwracalne uszkodzenia błony cytoplazmatycznej i koagulację białek, co może prowadzić do zahamowania aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych i lizy komórek.

Jedną z właściwości związków fenolowych, która ma wpływ na te zachowania jest ich lipofilność. Jednocześnie należy zwrócić uwagę na fakt, że polifenole wykazują bardzo różne działanie przeciwbakteryjne w stosunku do szczepów mikroorganizmów, które są reprezentatywne dla bakterii chorobotwórczych przenoszonych przez żywność i psujących środki spożywcze. Ten sam polifenol może być skuteczny w przypadku jednego szczepu i nieskuteczny w przypadku innych. Dlatego też, pomimo występowania w świecie roślinnym bardzo dużej ilości związków fenolowych konieczne jest poszukiwanie nowych, w tym ich pochodnych, które w lepszym stopniu spełniałyby oczekiwania stawiane konserwantom żywności, a jednocześnie pełniłyby rolę antyoksydantów.

Oceniana rozprawa doktorska podejmuje tę tematykę w ramach której modyfikowane są wybrane związki fenolowe na drodze ich estryfikacji, wykorzystując do tego celu lipazy, a następnie ocenia ich właściwości lipofilne, przeciwdrobnoustrojowe i przeciwutleniające. Lipazy to biokatalizatory przemysłowe, które biorą udział w reakcjach zachodzących zarówno w środowisku wodnym, jak i niewodnym. Ponadto, są dobrze znane ze swojej niezwyklej zdolności do przeprowadzania szerokiej gamy transformacji chemo-, regio- i enancjoselektywnych. Dlatego wybór estryfikacji związków fenolowych metodą enzymatyczną należy ocenić jako wysoce uzasadniony. Najnowsze badania wykazały, że mieszaniny kwasów fenolowych (obecne w ekstraktach roślinnych) mają szereg działań prozdrowotnych przeciwko szerokiej gamie stanów chorobotwórczych, w tym nowotworom, infekcjom bakteryjnym, chorobom sercowo-naczyniowym, zapalnym i neurodegeneracyjnym. Biorąc pod uwagę powyższe względy uważam, że tematyka podjęta przez Doktoranta jest uzasadniona, tak pod względem naukowym jak i aplikacyjnym. W opinii Recenzenta warto byłoby do badań włączyć związki fenolowe naturalnego pochodzenia, występujące w surowcach roślinnych i produktach żywnościowych, z grupy pochodnych kwasu benzooesowego czy cynamonowego, takie jak np. kwas syringowy czy ferulowy.

Formalna ocena pracy

Rozprawa doktorska mgr inż. Bartłomieja Zieniuka jest cyklem prac naukowych pod wspólnym tytułem "Enzymatyczna synteza i badanie aktywności biologicznej estrów związków fenolowych jako dodatków do żywności" w skład którego wchodzi 6 oryginalnych prac twórczych. Czasopisma naukowe w których opublikowano 5 prac mają impact factor od 1,863 do 4,082. Prace te opublikowane zostały w 2020 i 2021 r., ich sumaryczny IF wynosi 12,917, a łączna punktacja wg MEiN wynosi 355 pkt. Te dane

bibliometryczne należy uznać za wysoce zadawalające, a opublikowanie tych prac w specjalistycznych czasopismach z zakresu biotechnologii i technologii żywności utwierdza w tej ocenie. Skład autorów tych publikacji jest zmienny i wynosi od 3 autorów (2 prace), poprzez 4-ech (3 prace) do 6-ciu (1 praca). Doktorant jest we wszystkich pracach pierwszym i korespondencyjnym autorem, a jego udział w tych pracach został wyceniony od 65% do 80%. Zarówno promotor jak i promotor pomocniczy są współautorami każdej z prac. Pozostali współautorzy w oświadczeniach deklarują udział własny w pracach od 5% do 10%. Powyższe dane, jak i szczegółowa analiza oświadczeń współautorów prac, jednoznacznie wskazują na wiodącą rolę Doktoranta w przygotowaniu koncepcji badań wraz z promotorami , opracowaniu metodyki badań, ich realizacji, przygotowaniu manuskryptów do druku. Teksty publikacji zostały dołączone do opracowania jakie stanowi rozprawa doktorska.

Całość pracy doktorskiej przedstawiona jest na 143 stronach i zawiera m.in. oświadczenie promotora o spełnieniu przez rozprawę doktorską warunków do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego oraz oświadczenie autora rozprawy dotyczącej samodzielności jej napisania i nie ubiegania się o uzyskanie stopnia naukowego na wyższej uczelni. W kolejnych częściach pracy doktorskiej Autor przedstawił cel pracy i hipotezy badawczej, przegląd piśmiennictwa, opisał najważniejsze materiały i metody badawcze, omówił kluczowe wyniki badań oraz poddał je dyskusji. Tę część kończy podsumowanie i wnioski oraz spis piśmiennictwa . Uzupełnieniem jest prezentacja oświadczeń współautorów pracy i informacja o dorobku naukowym, na który szczególnie warto zwrócić uwagę. Na ten bogaty i wartościowy dorobek składa się 17 recenzowanych prac naukowych, opublikowanych w większości w renomowanych czasopismach naukowych, w tym w 10 pracach doktorant jest pierwszym autorem. Ponadto na dorobek doktoranta składają się 3 monografie, 7 komunikatów na sesje naukowe, 2 zgłoszenia patentowe i 3 inne prace. Te osiągnięcia zasługują na szczególne wyróżnienie, tym bardziej, że zostały wypracowane w ciągu ostatnich czterech lat, co świadczy o sprawności naukowej, umiejętności współpracy i pracowitości Doktoranta.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wprowadzeniem do cyklu publikacji, na którym oparta jest rozprawa doktorska jest przegląd piśmiennictwa, w którym w ograniczonym zakresie opisano problematykę psucia się żywności w kontekście jej zapobiegania, z wykorzystaniem konserwantów i

przeciwutleniaczy. Następnie Doktorant syntetycznie omówił występowanie i biologiczną aktywność związków fenolowych oraz scharakteryzował enzymy lipolityczne, ze szczególnym uwzględnieniem ich właściwości katalitycznych. Przegląd piśmiennictwa kończy podrozdział opisujący możliwości wykorzystania, głównie lipaz do otrzymania wybranych cennych pochodnych związków fenolowych.

Przegląd piśmiennictwa został oparty o aktualne i ważne publikacje dotyczące tematyki zawartej w eksperymentalnej części pracy. Zakres przeglądu jak i dobór treści w poszczególnych podrozdziałach jest trafny i stanowi wartościowe wprowadzenie do eksperymentalnej części pracy.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorant scharakteryzował użyte w pracy materiały oraz w sposób niekiedy skrótowy, przedstawił metodykę wykonania poszczególnych eksperymentów. Zwraca uwagę umiejętność prowadzenia eksperymentów o charakterze chemicznym, fizykochemicznym, mikrobiologicznym, biochemicznym i biotechnologicznym. Dobór metod analitycznych był prawidłowy, pozwalający na właściwe scharakteryzowanie przebiegu procesów enzymatycznych i mikrobiologicznych.

Pierwsza publikacja cyklu, stanowiącego rozprawę doktorską, jest rodzajem wstępu do badań, a jej celem było porównanie wpływu 20 różnych rozpuszczalników na aktywność immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica* (CALB). Lipazę inkubowano w wybranym rozpuszczalniku organicznym, a następnie oceniano jej aktywność hydrolityczną w stosunku do laurynianu p-nitrofenylu, który był rozpuszczony w heptanie. W drugiej wersji, lipazę nie inkubowano z rozpuszczalnikiem, ale od razu dokonywano oznaczenia aktywności zastępując heptan jednym z rozpuszczalników. Wyniki oznaczeń aktywności były wysoce zróżnicowane. W pierwszej serii najwyższe aktywności uzyskano z wykorzystaniem *tert*-butanolu, a w drugiej izooktanu. Ponadto omówiono wpływ rozpuszczalników na procesy solwatacji mający wpływ na etapy katalizy, denaturację białka oraz zmiany jego konformacji i skorelowano aktywność hydrolityczną CALB ze współczynnikiem podziału ($\log P$) użytego rozpuszczalnika. Na podstawie tej pracy do dalszych badań wytypowano izooktan, eter *tert*-butylo-metylowy oraz mieszaninę tych związków w stosunku 7:3.

W kolejnej pracy Doktorant postanowił uzyskać własny preparat o aktywności lipolitycznej, który stanowiła zliofilizowana biomasa *Yarrowia lipolytica* KKP 379 i otrzymany w wyniku jej hodowli zliofilizowany supernatant. Preparaty te porównano z lipazą B z *Candida antarctica* w syntezie 3-fenylpropanianu etylu. Użycie liofilizowanej biomasy w/w szczepu drożdży pozwoliło na uzyskanie wysokiej wydajności estrów, a wyniki były porównywalne

z danymi uzyskanymi dla preparatu CALB, podczas gdy liofilizowany supernatant wykazywał słabszą aktywność lipazy (22,17 U/g) w porównaniu z liofilizowaną biomasą (46,13 U/g), co skutkowało niższą konwersją kwasu 3-fenylpropionowego do jego estru etylowego. Dane te świadczą, o ograniczonej zdolności wydzielania lipaz do podłoża hodowlanego przez badany szczep drożdżowy. Pozostaje do wyjaśnienia kwestia, czy lipazą związaną z biomasą była lipazą wewnątrzkomórkową, jak pisze Autor, czy lipazą związaną ze ścianą komórkową. Ponadto, w pracy oceniono właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwutleniające zsyntetyzowanego estru.

Kolejne dwie prace dotyczyły prób wykorzystania liofilizowanej biomasy badanych szczepów drożdży do syntezy innych estrów, w szczególności estrów kwasów fenolowych. Estryfikacji 1-butanolem poddano pięć kwasów fenolowych. Już po dwugodzinnej inkubacji 98% kwasu 3-fenylpropanowego uległo estryfikacji, zaś w przypadku kwasu fenyllooctowego i jego hydroksylowej pochodnej stopień estryfikacji butanolem był szczątkowy. Interesujące, jest szczególnie to, że wykorzystując w estryfikacji lipazę B z *C. antarctica* 93% przereagowanie uzyskano dla kwasu fenyllooctowego, zaś dla kwasu 3-fenylpropanowego po 24 godzinnej reakcji wynosiło tylko ok. 75%. Spośród badanych związków największą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywały estry butylowe kwasów 3-(4-hydroksyfenyl)propanowego i 4-hydroksyfenyllooctowego. Estryfikacja spowodowała zwiększenie rozpuszczalności badanych związków w środowisku lipidowym i miała wpływ na aktywność przeciwutleniającą estrów tych kwasów, które taką aktywność wykazywały.

W kolejnym etapie pracy poszukiwano pośród 4-ech szczepów *Y. lipolytica* nadproducenta enzymów lipolitycznych. Najlepszym okazał się szczep *Y. lipolytica* W29, który w hodowli bioreaktorowej z wykorzystaniem odpadowego oleju rybiego jako źródła węgla i induktora lipaz, wytwarzał zarówno więcej biomasy jak i lipaz. Otrzymana biomasa została wykorzystana w syntezie estrów wybranych związków fenolowych tj. octanu 2-fenyletanolu, tyrozolu (2-(4-hydroksyfenyl)etanol) i 3-fenyl-1-propanolu oraz estrów etylowych kwasu fenyllooctowego, 4-hydroksyfenyllooctowego, 3-fenylpropanowego i 3-(4-hydroksyfenyl)propanowego). Lipaza *Y. lipolytica* W29 katalizowała estryfikację kwasu 3-fenylpropanowego (konwersja 95% po 24 h), jednocześnie podobnie jak *Y. lipolytica* KKP 379 nie katalizowała efektywnie estryfikacji kwasu fenyllooctowego, zaś w przypadku transestryfikacji alkoholi aromatycznych octanem winylu stopień konwersji był różnicowy i wynosił 27%–63% po 24 godzinach. Zsyntetyzowane estry w stosunku do wyjściowych związków wykazywały zróżnicowane aktywności antybakteryjne i antyoksydacyjne.

Zróznicowana budowa chemiczna związków fenolowych i ich pochodnych stwarzają możliwości pozyskania związków o różniących się właściwościami. Doktorant badał wpływ podstawnika i jego położenia w pierścieniu aromatycznym alkoholi fenolowych na aktywność przeciwutleniającą po estryfikacji kwasem heksanowym, z wykorzystaniem unieruchomionej lipazy B *Candida antarctica*. Stwierdzono, że aktywność przeciwutleniająca estrów kwasu heksanowego była zależna od obecności i pozycji grupy hydroksylowej w pierścieniu aromatycznym. Najwyższe aktywności stwierdzono dla alkoholu wanililowego, heksanianu wanililu i BHT. Obecność tych dwóch ostatnich związków wydłużała czas indukcji oksydacyjnej oleju rzepakowego i słonecznikowego.

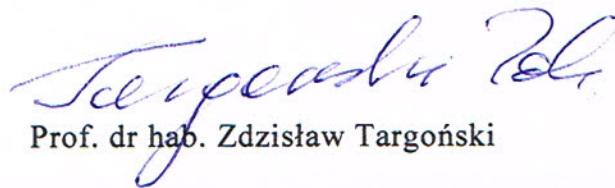
W pracy, kończącej cykl publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oceniono skuteczność przeciwdrobnoustrojową pięciu estrów (etylowego, butylowego, heksylowego, oktylowego i decylowego) kwasu 4-hydroksyfenylopropanowego wobec *L. monocytogenes* PCM 2191. Szkoda, że w nawiązaniu do poprzedniej pracy nie oceniono ich aktywności antyoksydacyjnej, gdyż byłoby interesujące ocenić, jak długość łańcucha w kwasie organicznym wpływa na tę właściwość. Wyniki tych badań wykazały potencjalne zastosowanie estrów alkilowych kwasu 4-hydroksyfenylopropanowego w hamowaniu wzrostu *L. monocytogenes*, w tym 4-hydroksyfenylopropanian oktylu okazał się obiecującym środkiem bakteriostatycznym, ale wymagającym dalszych badań.

Uwagi końcowe

W podsumowaniu stwierdzam, że podstawowe założenia pracy, dobór materiału doświadczalnego jak i zakres prowadzonych badań nie budzą istotnych zastrzeżeń i znajdują pełne uzasadnienie w dokumentacji pracy. Sposób przeprowadzania doświadczeń świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta i Jego bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym. W pracy zamieszczono bogaty i wartościowy materiał faktograficzny opublikowany w renomowanych czasopismach naukowych.

Biorąc pod uwagę wartość naukową pracy, zawarte w niej elementy nowości naukowej, bardzo dobre przygotowanie warsztatowe i merytoryczne Doktoranta stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymaganiom jakie są stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora w dyscyplinie "technologia żywności i żywienia" i wnoszę o dopuszczenie jej do

publicznej obrony. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Targoński Zdzisław', written in a cursive style.

Prof. dr hab. Zdzisław Targoński