



**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI  
POLITECHNIKA ŁÓDZKA**

**Dr inż. MIROSŁAWA SZCZĘSNA-ANTCZAK**

**Załącznik 3**

**Przedłożony Centralnej Komisji ds. Stopni i tytułów**

**AUTOREFERAT  
KOMÓRKI WYBRANYCH BAKTERII I PLEŚNI I ICH PRODUKTY  
W PROCESACH BOKATALIZY**

**ŁÓDŹ, 2019**

### 1. Imię i Nazwisko

Mirosława Halina Szczęsna-Antczak

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**Magister inżynier chemii**, na Wydziale Chemii Spożywczej, Politechniki Łódzkiej, w zakresie chemii i technologii spożywczej – 1977 rok.

Temat pracy magisterskiej wykonanej w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii „Próby otrzymywania krzyżówek drożdży piekarskich syntetyzujących biotynę”- promotor prof. dr hab. Józef Szopa.

**(dyplom z wyróżnieniem)**

**Doktor nauk technicznych**, w zakresie technologii chemicznej, Wydział Chemii Spożywczej i Biotechnologii, Politechniki Łódzkiej – 1998 rok.

Temat pracy doktorskiej „Immobilizacja bakterii *Bacillus subtilis* – producentów serynowej proteiny” – promotor prof. dr hab. Edward Galas.

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu.

1978 - 1991	Pracownik naukowo-techniczny; Instytut Biochemii Technicznej PŁ
1991 - 1998	Asystent; Instytut Biochemii Technicznej PŁ
2014-2015	część etatu finansowana z projektu Biomasa POIG 01.01.02-10-123/09
1998 - obecnie	Adiunkt; Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Biochemii Technicznej

### 4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U.2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz.U. z 2016 r. poz. 1311.):

#### A) tytuł osiągnięcia naukowego,

**KOMÓRKI WYBRANYCH BAKTERII I PLEŚNI I ICH PRODUKTY W PROCESACH BOKATALIZY**

**B) Lista publikacji naukowych, stanowiących podstawę do wniosku.** (Autor/autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa) – **chronologicznie**Liczba cytowań podana w następującej kolejności, wg: Scholar Google / **Web of Sci**

- H-1** **Szczęsna-Antczak M.**, Antczak T., Rzyńska M., J., Bielecki S., (2002), Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20, p.261-268, ISSN: 1381-1177.  
**MNiSW – 25** pkt. (A), **IF<sub>2002</sub> = 1,55**, (5 letni IF = 2,622) **Cit – 33 / 30**
- H-2** **Szczęsna-Antczak M.**, Antczak T., Bielecki S., (2004), Stability of extracellular proteinase productivity by *Bacillus subtilis* cells immobilized in PVA-cryogel, *Enzyme and Microbial Technology* 34, 168-176, ISSN: 0141-0229  
**MNiSW – 30** pkt. (A), **IF<sub>2004</sub> = 1,91**, (5 letni IF = 3,064) **Cit – 26 / 13**
- H-3** **Szczęsna-Antczak M.**, Antczak T., Rzyńska M., Modrzejewska Z., Patura J., Kalinowska H., Bielecki S. (2004), Stabilization of an intracellular *Mucor circinelloides* lipase for application in non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29, 163-171, ISSN: 1381-1177  
**MNiSW - 25** pkt. (A), **IF<sub>2004</sub> = 1,547**, (5 letni IF = 2,622) **Cit – 28 / 20**
- H-4** Antczak T., Patura J., **Szczęsna-Antczak M.**, Hiler D., Bielecki S. (2004), Sugar esters synthesis by a mycelium-bound *Mucor circinelloides* lipase in a micro-reactor equipped with a sensor to monitor the water activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29, 155-161, ISSN: 1381-1177.  
**MNiSW – 25** pkt. (A), **IF<sub>2004</sub> = 1,547**, (5 letni IF = 2,622) **Cit – 28 / 17**
- H-5** Głowacka A.E., Podstawka E., **Szczęsna-Antczak M.H.**, Kalinowska H., Antczak T. (2005), Kinetic and molecular properties of *Bacillus subtilis* IBTC-3 subtilisin. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 140, 321-331, ISSN: 1096-4959  
**MNiSW – 25** pkt., **IF<sub>2005</sub> = 1,404**, (5 letni IF = 1,853) **Cit – 9 / 8**
- H-6** **Szczęsna-Antczak M.**, Antczak T., Piotrowicz-Wasiak M., Rzyńska M., Binkowska N., Bielecki S.: (2006), Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1214-1222, ISSN: 0141-0229  
**MNiSW – 30** pkt., **IF<sub>2006</sub> = 2,050**, (5 letni IF = 3,064) **Cit – 49 / 43**
- H-7.** Głowacka A., **Szczęsna-Antczak M.**, Piotrowicz-Wasiak M., Antczak T, (2009), Endopeptidases of *Bacillus subtilis* IBTC-3 and *Bacillus alcalophilus* PB92 in synthesis of precursors of biologically active peptides, *Indian Journal of Biochemistry*

& *Biophysics*, 46, 213-220, ISSN: 0301-1208

**MNiSW – 15 pkt. (A), IF<sub>2008</sub> = 0,579, (5 letni IF = 0,997) Cit – 0**

**H-8. Szczęsna-Antczak M., Kubiak A., Antczak T., Bielecki S., (2009),** Enzymatic biodiesel synthesis - key factors affecting efficiency of the process, *Renewable Energy*, 34, 1185-1194. ISSN: 0960-1481

**MNiSW – 35 pkt., IF<sub>2009</sub> = 3,060, (5 letni IF = 4,068) Cit – 383 / 210**

**H-9. Szczęsna-Antczak M., Kaczorowska A., Kaczorowski W., Antczak T., (2014),** Biomodification and biodeterioration of carbon coatings by fungal strains, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 106-117, ISSN: 0964-8305

**MNiSW – 30 pkt., IF<sub>2014</sub> = 2,131, (5 letni IF = 2,377) Cit – 2 / 2**

**H-10. Szczęsna-Antczak M., Szeląg J., Stańczyk Ł. Borowska A., Antczak T., (2016),** Engineering of lipase-catalyzed transesterification reaction media using water and diethylamine. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(6), 253-264. ISSN: 1024-2422

**MNiSW (A) – 15 pkt., IF<sub>2016</sub> = 1,24, (5 letni IF = 0,742) Cit – 2 / 1**

**H-11. Struszczyk-Świta K., Stańczyk Ł., Szczęsna-Antczak M., Antczak T., (2017),** Scale-up of PUF-immobilized fungal chitosanase-lipase preparation production. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 47(9), 909-917, ISSN: 1082-6068

**MNiSW (A) – 15 pkt., IF<sub>2017</sub> = 1,361, (5 letni IF = 0,834) Cit – 2 / 2**

**H-12. Szczęsna-Antczak M., Struszczyk-Świta K., Rzycka M., Szeląg J., Stańczyk Ł., Antczak T., (2018),** Oil accumulation and *in situ* trans/esterification by lipolytic fungal biomass. *Bioresource Technology*, 265 (10), 110-118 ISSN: 0960-8524

**MNiSW (A) – 45 pkt., IF<sub>2018</sub> = 5,651, (5 letni IF = 6,102) Cit – 1**

**HP-1 Szczęsna-Antczak M., Antczak T., Bielecki S., (2015), Patent PL 218192,** Sposób wytwarzania in situ mieszaniny estrów wyższych kwasów tłuszczowych.

**MNiSW – 30 pkt.**

Wymienione publikacje dołączone zostały w załączniku 4 i cytowane są w tekście z literą 'H-' przed numerem odnośnika lub 'HP-' w przypadku patentu (np. [HP-1]). Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia współautorów pracy, określające indywidualny wkład w jej powstanie (Załącznik nr 6) .

**Impact Factor : 24,134 (publikacje ujęte w osiągnięciu naukowym)**

**MNiSW pkt: 345 (publikacje i patent ujęte w osiągnięciu naukowym)**

**Index Hirscha: 11**

**C) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego jest cykl 11 powiązanych tematycznie artykułów naukowych ([H-1]÷[H-7] i [H-9]÷[H-12]) i jednej pracy przeglądowej ([H-8]) opublikowanych w latach 2002 – 2018, w czasopiśmie z *Thomson Reuters Master Journal List* (tzw. listy filadelfijskiej) ujętych w zbiorach *Journal Citation Report* (JCR) a także 1 patentu przyznanego przez Urząd patentowy RP ([HP-1]). **Publikacje łączy tematyka wchodząca w zakres biotechnologii przemysłowej, obejmująca badania nad wykorzystaniem komórek drobnoustrojów i ich produktów w biokatalizie, (w procesach biokonwersji i biotransformacji). Głównym celem tych badań było otrzymywanie mikrobiologicznych biokatalizatorów i nadawanie im form przydatnych do wybranych aplikacji a także dobór warunków ich efektywnego użycia jako katalizatorów (w tym w mediach mikro-wodnych). Obiektem badań są komórki bakterii i pleśnie, będące źródłem różnych bioproduktów, a przede wszystkim enzymów o dużym znaczeniu aplikacyjnym, w tym hydrolaz (proteaz i lipaz) oraz oksydoreduktaz.** Informacje uzyskane z wykonanych badań i opisane w w/w publikacjach rozszerzają wiedzę na temat aplikacyjnego potencjału wybranych drobnoustrojów i enzymów (w tym w formie immobilizowanej) a także przysłużą się w opracowaniu i doskonaleniu procedur biotechnologicznych prowadzonych z ich użyciem.

**AUTOREFERAT****Wprowadzenie:**

Biotechnologia to interdyscyplinarna gałąź nauki, w której procesy i systemy biologiczne, organizmy żywe, komórki i ich komponenty wykorzystywane są do opracowywania nowych technologii. Biotechnologia przemysłowa (biała biotechnologia) to współcześnie rozwijana dziedzina badań zainicjowanych kiedyś w ramach mikrobiologii przemysłowej, które dotyczą – mówiąc bardzo ogólnie - wykorzystania drobnoustrojów i ich metabolitów do wytwarzania produktów przydatnych dla człowieka.

Tematyka przedstawionego osiągnięcia naukowego wchodzi w zakres białej biotechnologii i wpisuje się w strategiczny temat, sformułowany w dokumencie Krajowej Inteligentnej Specjalizacji KIS 3 (Biotechnologiczne i chemiczne procesy, bioprodukty i produkty chemii specjalistycznej oraz inżynierii środowiska), zatytułowany: *Rozwój procesów biotechnologicznych do wytwarzania innowacyjnych bioproduktów*, w tym szczególnie w tematykę opisaną w pkt.: 1.3: **„Rozwój nowych źródeł biokatalizatorów i unikalnych metabolitów, konstruowanie oraz modelowanie efektywnych narzędzi**

**biokatalitycznych dla procesów biosyntezy i biokonwersji, biorafinacji i biotransformacji** oraz dla potrzeb procesów stosowanych w ochronie środowiska”, a także w pkt. 1.2: „**Biomasa i odpady jako medium do produkcji nowych narzędzi dla potrzeb biotechnologii (w tym hodowle makro-i mikroalg, bakterii, grzybów i innych organizmów)**” i pkt. 1.6: „**Innowacyjne technologie otrzymywania biopaliw, białka paszowego i biokomponentów**” i in. W/w dokument Rady Ministrów o Krajowych Inteligentnych Specjalizacjach, określa priorytety gospodarcze w obszarze B+R+I, tzn., „te których rozwój zapewni tworzenie innowacyjnych rozwiązań społeczno-gospodarczych, zwiększenie wartości dodanej gospodarki i podniesienie jej konkurencyjności na rynkach zagranicznych”.

Zainteresowania moje, od momentu rozpoczęcia pracy naukowej, dotyczyły różnych aspektów praktycznego wykorzystania drobnoustrojów do wytworzenia interesujących bioproduktów, a prace badawcze, w których uczestniczyłam lub kierowałam nimi, polegały na rozwiązywaniu i wyjaśnianiu problemów naukowych i praktycznych z tym związanych. Pierwsze doświadczenia w tym zakresie zdobywałam uczestnicząc w badaniach nad biosyntezą enzymów litycznych przez szczepy promieniowców i wykorzystaniem preparatów tych enzymów do otrzymywania ekstraktów z drożdży piekarskich i paszowych, następnie nad biosyntezą enzymów proteolitycznych (pod kątem ich aplikacji w proszkach do prania), w tym nad optymalizacją i zwiększaniem skali procesu, pod kierunkiem prof. Edwarda Galasa. Moje zaangażowanie w te badania i wprowadzanie nowych metod badawczych (np. zastosowanie - we współpracy z dr inż. Romanem Błaszczkiem - nowej wówczas metody matematycznej losowej optymalizacji (*random optimisation*) warunków biosyntezy subtylizyny a także użycie unikatowej procedury mutagenizacji i selekcji szczepu *Bacillus* celem uzyskania asporogennych form tych bakterii, dały mi w efekcie możliwość podjęcia i opracowania dysertacji mej pracy doktorskiej, której celem było opracowanie warunków unieruchomienia aktywnych biologicznie komórek bakterii *Bacillus* i zastosowanie ich jako źródło proteinaz, m.in. do hydrolizy białek [1, 2, 3]. Doświadczenie, które zdobyłam w czasie badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej miałam okazję rozwijać dalej, po zatrudnieniu (w 1999 roku) na stanowisku adiunkta w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ.

\*\*\*

**Drobnoustroje, jako źródło rozmaitych bioproduktów, w tym enzymów i konstruowanie użytecznych form biokatalizatorów (przede wszystkim w oparciu o całe komórki mikroorganizmów)** – czyli tematyka autoreferatu - stały w centrum mego zainteresowania i tych zagadnień dotyczyły realizowane przeze mnie badania własne i te finansowane w ramach kolejnych projektów badawczych (w których występowałam w roli kierownika lub wykonawcy).

Od momentu uzyskania stopnia doktora, poza rozwinięciem badań nad zastosowaniem immobilizowanych komórek bakterii *Bacillus* do biosyntezy proteiny serynowej (wyniki

opublikowane w 2004 r w **H-2**), zaczęłam stosować ten enzym w reakcjach syntezy peptydów i aminoestrów (publikacje: **H-5 i H-7**) a także, równolegle, rozpoczęłam badania nad unieruchamianiem komórek pleśni będących źródłem lipaz (publikacje z lat 2002-2004 dotyczące immobilizacji lipaz w różnych nośnikach: **H-1, H-3, H-4**). W efekcie weszłam w tematykę enzymologii mikro-wodnej i aplikacji komórek drobnoustrojów do biokatalizy w środowiskach niekonwencjonalnych (wyrazem tego jest także moje współautorstwo materiałów przeglądowych [C-7, C-8] oraz monografii [M-3], cyt. Załącznik 5). Z tego też powodu zainteresowałam się możliwością wykorzystania drobnoustrojów do modyfikacji (na drodze biotransformacji) powłok węglowych – tematyka do tamtej pory całkowicie nieznana, na którą w 2002 roku zdobyłam fundusze z KBN. Kierowany przeze mnie projekt pt. „Modyfikacja struktury warstw węglowych metodami biotechnologicznymi” realizowany był we współpracy z zespołem prof. St. Mitury z Wydz. Mechanicznego PŁ (autor technologii wytwarzania tzw. nanokrystalicznych powłok węglowych z plazmy metanu). Interesujące efekty badań, w których do wprowadzania chemicznych zmian w powłokach węglowych (czyli jako narzędzie biotransformacji) wykorzystywałam różne drobnoustroje, w tym pleśnie rodzajów *Mucor*, *Aspergillus* i *Fusarium*, zostały opatentowane ([P-31]-[P-34], zał. 5) i opublikowane w monografii [M-10] oraz w publikacji spoza JRC [C-10] i podsumowane w obszernym artykule [**H-9**] (z uwagi na moje zaangażowanie w następne projekty, opublikowałam go w *International Biodeterioration & Biodegradation* dopiero w 2014 roku). Przez cały czas równolegle uczestniczyłam w badaniach związanych z biosyntezą wewnątrzkomórkowych lipaz przez pleśnie rodzaju *Mucor* oraz nad immobilizacją preparatów tych lipaz z przeznaczeniem ich do katalizy w środowisku mikro-wodnym. Zaprocentowało to uzyskaniem w 2007 roku finansowania z KBN na badania w kierowanym przeze mnie projekcie N N205 1448 33, pt. „Stabilne preparaty heterogennych biokatalizatorów zawierających naturalnie immobilizowane lipazy *Mucor* w alternatywnych procesach transestryfikacji”. Finalizacja badań zaowocowała przygotowaniem w 2009 roku pracy przeglądowej - bardzo brakującej wówczas „na rynku wydawniczym” i obecnie często cytowanej (status „*highly cited paper*” w bazie Web of Science) – dotyczącej kluczowych parametrów determinujących efektywność działania lipaz w syntezie biodiesla [**H-8**]. Inne, równie ważne i interesujące efekty badań z tego projektu, które będą szerzej omówione, zaprezentowane zostały w *Enzyme and Microbial Technology* [**H-6**] oraz publikacji [C-13] i konferencjach naukowych (zał. 5). Głównymi osiągnięciami praktycznymi projektu było opracowanie procedury wytwarzania immobilizowanych preparatów lipaz o wysokiej stabilności w mediach niewodnych i warunków ich użycia w syntezie etylowych i metylowych estrów (patenty [P-35] i [P-36]) oraz odkrycie możliwości jednoczesnego (tzn. podczas otrzymywania wewnątrzkomórkowych lipaz *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus*) wytworzenia znacznych ilości mikrobiologicznych lipidów (patenty [**HP-1**] i [P-38, P-39], zał.

5). Osiągnięcia te, a także zdobyte wraz z zespołem w IBT PŁ (kierowanym przez prof. dr hab. Tadeusza Antczaka) doświadczenie w zakresie umiejętności wykorzystania drobnoustrojowych biokatalizatorów w biotransformacjach i generalnie biokatalizie, spowodowały, że w 2010 roku uzyskaliśmy finansowanie z funduszy unijnych na badania, równoległe w ramach dwóch dużych projektów realizowanych w konsorcjach krajowych uczelni i instytutów badawczych. Były to: projekt o akronimie Biomasa nr POIG 01.01.02-10-123/09, pt. „Zastosowanie biomasy do wytwarzania materiałów polimerowych przyjaznych środowisku” oraz projekt: pt. „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” (akronim Biotransformacje, POIG 01.03.01-00-158/09). Moją rolą w pierwszym projekcie (obok prac organizacyjnych) był współnadzór merytoryczny oraz bezpośrednie zaangażowanie w badania związane z realizacją dwóch zadań: PZ. 2.2 - pt. „Enzymy do otrzymywania polioli z biomasy pochodzącej z roślin oleistych” i PZ. 3.2 - pt. „Otrzymywanie oligomerów (polioli) do syntezy biodegradowalnych materiałów” – zadanie wykonywane z udziałem IBWCH Łódź - partnerem z konsorcjum) oraz udział w badaniach w zadaniu PZ 2.1, pt. „Preparaty wieloenzymowe do ukierunkowanej degradacji biomasy roślinnej”. W projekcie Biotransformacje (koordynowanym przez prof. Pawła Kafarskiego z Politechniki Wrocławskiej) w zakresie moich kompetencji był udział w opracowaniu warunków wytwarzania preparatów lipaz i chitozanas, aktywnych i stabilnych w procesach, odpowiednio, syntezy przydatnych dla kosmetologii estrów (estryfikacja i transestryfikacja) oraz hydrolizy chitozanu do oligomerów – komponentów kosmetyków (zadanie 7). Efekty badań wykonanych w tych dwóch projektach POIG były zaprezentowane na szeregu konferencjach naukowych (za granicą i w kraju) a opracowane bio-technologie opatentowane ([P-1]-[P-3], [P-7]-[P-9], [P-11]-[P-17], załącznik 5). Wyniki badań wchodzące w tematykę osiągnięcia naukowego opublikowane zostały m.in. w publikacjach [H-10], [H-11] i [H-12] (publikacje przygotowane dopiero po zamknięciu cyklu patentowania). Moje obecne zainteresowania naukowe weszły głęboko w zagadnienia związane z biotechnologią przemysłową, a me dotychczasowe osiągnięcia o tematyce „**Komórki wybranych bakterii i pleśni i ich produkty w procesach biokatalizy**” omawiam szerzej poniżej.

- **Biosynteza proteiny serynowej przez immobilizowane bakterie *Bacillus* i jej zastosowanie w biokatalizie [H-2], H-5] i [H-7]**

Proteinaza serynowa (EC. 3.4.21.62) - enzym wytwarzany, m.in. przez bakterie rodzaju *Bacillus* - należy do produkowanych w największej skali i stosowanych do różnych celów, w tym jako szeroko obecnie używany, aktywny składnik proszków do prania. Jeszcze przed doktoratem moje zainteresowania naukowe w dużej części skoncentrowane były na opracowaniu (w oparciu o szczep rodzaju *Bacillus*, znajdujący się w kolekcji IBT PŁ)



technologii otrzymywania preparatu proteinaz w skali mikrotechnicznej oraz przemysłowej (w ramach Centralnego Programu Badawczo-Rozwojowego, CPBR 04.11, we współpracy z Polfą-Tarchomin oraz Zakładami Chemicznymi w Nowym Dworze Mazowieckim, w latach 1986-1991), a także na zbadaniu jego podstawowych właściwości katalitycznych i użytkowych w procesie prania. Tematyka mej dysertacji doktorskiej – zakończonej w 1998 roku - była niejako kontynuacją i rozszerzeniem tych zagadnień, dotyczyła bowiem opracowania immobilizowanych form bakterii *Bacillus subtilis* będących źródłem proteiny serynowej (jednego z proteolitycznych enzymów wytwarzanych przez te bakterie) i ich aplikacji w hydrolizie białek (lista monografii: [M-1]). Problem jaki wówczas postawiłam sobie do rozwiązania była immobilizacja żywych komórek bakterii w formie zapewniającej maksymalne ograniczenie uwalniania komórek-producenta z nośnika i jednocześnie umożliwiającej dyfuzję wielkocząsteczkowych substratów (białek) do/z biokatalizatora. Proponowane wówczas w literaturze metody adsorpcji komórek na porowatych matrycach nie zapewniały pierwszego z założonych parametrów biokatalizatora, dlatego opracowałam unikatowy sposób zamykania żywych bakterii w porowatej matrycy kriożelu alkoholu poli(winylowego) (cryoPVA) czyli ich pułapkowania. Wyniki badań z zakresu pracy doktorskiej opublikowałam w [A-1] i [A-2] (zał. 5, rozdział II A) (a poza bazą JRC w: [8], [C-1], [C-3], [C-4], patrz Zał. 5, rozdział II C.2); publikacje z bazy JRC wciąż znajdują odbiorców o czym świadczy wzrastająca liczba ich cytowań.

Po obronie pracy doktorskiej – z uwagi na bardzo dobre parametry opracowanego nośnika – zdecydowałam się sprawdzić stabilność immobilizowanych komórek bakterii *B. subtilis* IBTC-3 w procesie biosyntezy serynowej proteiny. Zainteresowałam się również badaniami nad oczyszczaniem proteiny serynowej i otrzymaniem preparatów tego enzymu oraz ich wykorzystaniem w mediach niewodnych do katalizy syntezy aminoestrów i peptydów (z zastosowaniem substratów z chemicznie zablokowanymi grupami funkcyjnymi). Podsumowania dużej części wyników z powyższych badań przedstawione zostały kolejno w publikacjach: **H-2** (2004) oraz w **H-5**, 2005 i **H-7**, 2009, które omawiam poniżej.

Jednym z głównych celów immobilizacji komórek drobnoustrojów jest poprawa ich stabilności, w tym parametru procesowego zwanego **stabilnością operacyjną**, który, wg [5,6], definiuje się najkrócej jako „ilość biokatalizatora, którą trzeba użyć do wytworzenia określonej porcji produktu w danym czasie”. W publikacji [**H-2**] wykazałam możliwość wielokrotnego używania immobilizowanych w kriożelu PVA komórek bakterii *Bacillus* do biosyntezy zewnątrzkomórkowej proteiny (subtylizyny) w szeregu kolejnych procesach z wymianą pożywki (*repeated batch*), co – dla porównania - było całkowicie niemożliwe w przypadku stosowania *wolnych* (nie immobilizowanych) komórek tych bakterii. W ramach badań opisanych w publikacji [**H-2**], wykonanych zgodnie z moją koncepcją, oceniłam zmiany zachodzące w biokatalizatorze podczas jego długotrwałej eksploatacji oraz przeanalizowałam jak

na te zmiany wpływa gęstość i forma poddawanych immobilizacji bakterii (spory lub komórki wegetatywne). Pomiaru stężenia komórek w nośniku dokonywałam określając CFU (dzięki opracowanej procedurze *rozpuszczenia* bardzo trwałej matrycy cryoPVA w celu uwolnienia z niej komórek) oraz stosując dwie całkiem nowe metody pośrednie: • pomiar stężenia kwasów nukleinowych w biokatalizatorze (metoda umożliwiła także śledzenie przekształcania się form wegetatywnych w przetrwalnikowe), oraz • densytometryczną analizę mikroskopowych obrazów preparatów biokatalizatora (pomiaru położenia mikrokolonii i ich gęstości w nośniku o formie sferycznej). Ustaliłam, że immobilizacja bakterii w ich wegetatywnej formie zapewnia najwyższą operacyjną stabilność biokatalizatora oraz wysoką efektywność biosyntezy proteiny serynowej w procesie z wymianą pożywki, [H-2]. Najwyższą wydajność subtylizyny uzyskać można maksymalizując początkowe stężenie bakterii w nośniku ( $>10^{10}$  CFU/g), co jednocześnie korzystnie zmniejsza dynamikę przyrostu bakterii wewnątrz żelu (wzrost mikrokolonii to powód degradacji zewnętrznych warstw nośnika). Ważne także było odkrycie efektu tzw. „aktywacji” immobilizowanych bakterii, tzn. zwiększenia wydajności biosyntezy serynowej proteiny (metabolit typu II wg podziału Gadena, [7]) po pierwszym cyklu hodowlanym. Interesujące i wcześniej nie opisane w literaturze, było też odkrycie metabolicznych zmian jakie zachodzą w immobilizowanych bakteriach *Bacillus* w trakcie ich długotrwałej eksploatacji. Polegały one, m.in. na systematycznym zwiększaniu się wydajności alkalicznej proteiny serynowej w stosunku do wydajności metaloproteiny – enzymu o obojętnym pH działania, wytwarzanego równolegle przez stosowane bakterie *Bacillus*, przy czym sekrecję tego enzymu komórki rozpoczynają wcześniej niż subtylizyny. Bardzo cenne i nie opisane nigdzie w literaturze było także odkrycie, że długotrwała eksploatacja biokatalizatora w warunkach procesu powoduje korzystne, fizjologiczne zmiany w immobilizowanych komórkach *Bacillus* polegające na zmniejszaniu się ich zdolności do tworzenia przetrwalnych form (obydwa efekty po raz pierwszy opisano i podjęto próby ich wyjaśnienia, w naszej publikacji w 2006 roku w *Enzyme and Microbial Technology*, H-2).

Oczyszczanie proteiny serynowej *B. subtilis* (subtylizyny, najefektywniej działającej w pH 10,2) oraz zastosowanie preparatu tego enzymu do biokatalizy w mediach niewodnych (obecnie precyzyjniej nazywanych mikro-wodnymi) to tematyka badań równolegle prowadzonych przeze mnie w tamtym okresie. Badania nad aplikacją proteaz serynowych w biokatalizie w mediach niewodnych, wchodziły w zakres doktoratu mgr inż. Agnieszki Głowackiej, której służyłam swym doświadczeniem i, w niektórych obszarach, pomysłami, m.in. w zakresie: (1) doboru warunków biosyntezy i oczyszczenia subtylizyny z *B. subtilis* IBTC-3, (2) wytworzenia immobilizowanych preparatów tego enzymu a także (3) w doborze warunków biokatalizy w syntezie wiązań peptydowych (dodatkowo pomogłam w interpretacji i dyskusji wyników z tych badań). Dlatego jestem współautorem publikacji w czasopiśmie: *Comp. Biochem. & Physiol*, part B [H-5] z 2005 roku oraz w *Ind. J. Biochem. & Biophys*, z 2009 r [H-7].

Publikacje powyższe zawierają następujące, istotne informacje:

- Opis opracowanej prostej i wydajnej metody oczyszczania do stanu homogenego serynowej proteiny z *Bacillus subtilis* IBTC-3 (szczep ulepszony wcześniej z mym udziałem na drodze selekcji dokonanej pod kątem maksymalnej wydajności biosyntezy subtylizyny), składającej się z filtracji żelowej (Sephadex G75) i chromatografii powinowactwa na modyfikowanej bacytracyną CNBr-Sepharose (etap, w którym usunięta została metaloproteinaza obecna obok subtylizyny). Masa cząsteczkowa homogenego enzymu wynosiła 27 kDa (SDS-PAGE) a punkt izoelektryczny 8,4 (chromatofocusing).
- Konkluzje z badań strukturalnych oczyszczonego enzymu (w formie liofilizowanej, tzn. takiej która była użyta do katalizy w mediach niewodnych) wykonanych we współpracy z dr Edytą Podstawką (obecnie profesor) z zespołu prof. Leonarda M. Proniewicza (Uniwersytet Jagielloński) z wykorzystaniem spektroskopii Ramana i w podczerwieni. Widma FT-RS i FT-IR wskazały na obecność  $\alpha$ -helikalnych oraz nieregularnych struktur w tym białku a analiza tych widm w obszarach amid I, II i III - fragmentów beta-łańcuchowych ( $\beta$ -sheet). Profil widma Ramana subtylizyny okazał się podobny do widm białek inhibitorowych: SSI ze *Streptomyces* i STI z soi.
- Opis efektów badań nad doбором warunków reakcji zapewniających wydajną syntezę peptydów i estrów aminokwasów z alkoholami alifatycznymi katalizowaną przez liofilizowany preparat proteiny serynowej z bakterii *B. subtilis* IBTC-3 oraz określeniem katalitycznych parametrów tego enzymu w porównaniu z handlowym preparatem alkalicznej peptydazy *Bacillus alcalophilus* (PB92).

Podsumowując tę część badań, wykazały one możliwość zastosowania oczyszczonego białka serynowej proteiny *Bacillus subtilis* IBTC-3 do enzymatycznej syntezy peptydów i estrów etylowych aminokwasów, odpowiednio w środowisku acetonitrylu i etanolu. Stałe kinetyczne reakcji hydrolizy oraz syntezy wybranych aminoestrów wskazały na większe powinowactwo subtylizyny IBTC-3 do pochodnych fenyloalaniny i argininy (NAc-Phe-OEt, Bz-Arg-OEt) niż do NAc-Tyr-OEt [H-5]. Dowiedziono poza tym, że enzym ten można z powodzeniem wykorzystać do efektywnej syntezy aminoestrów z NAc-Tyr i alkoholi alifatycznych o średniej długości łańcucha (izopropanol i 1-butan-ol) oraz do syntezy dipeptydów, w tym pochodnej kytorfiny (NAc-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>) – endogennego peptydu opioidowego. Warunkiem uzyskania dobrej wydajności jest dobór mieszaniny odpowiednich rozpuszczalników i stężenia wody, które zależy od formy użytego preparatu enzymu. W publikacji [H-7] pokazaliśmy jak zmiana jedynie formy preparatu tego samego enzymu zmienia profil zmian jego katalitycznej aktywności w funkcji stężenia wody w środowisku rozpuszczalnika organicznego. Są to informacje praktyczne, bardzo istotne dla każdego stosującego preparaty enzymatyczne w biokatalizie w środowisku *mikrowodnym*.

**INFORMACJE DODATKOWE:**

Szczep *Bacillus subtilis* IBTC-3 – źródło zewnątrzkomórkowych proteaz w omówionych powyżej badaniach – w 2009 roku udostępniony został do badań finansowanych przez UE w ramach projektu o akronimie Butanodiol (ERA NET) realizowanych w IBT w ramach konsorcjum międzynarodowego. Z funduszy tego projektu sfinansowano analizę genetyczną tego szczepu bakterii, w efekcie przeklasyfikowany on został na *Bacillus amyloliquefaciens* TUL308, na co wskazywała analiza fragmentów sekwencji genu 16S RNA oraz genu podjednostki B gyrazy DNA (cfs). Geny te zostały zdeponowane w bazie PDB pod numerami, odpowiednio JF412543 (dn. 11.02.2011) i JF412546 (21.02.2011), autorzy depozycji: Jędrzejczak-Krzepkowska M., Gromek, E., Białkowska, A., **Szczęsna-Antczak, M.** i Turkiewicz, M.

Szczep TUL308 wykorzystano, w opracowanej wcześniej przeze mnie formie immobilizowanej w kriożelu PVA, do wytwarzania 2,3-butanodiolu, czego efektem był przyznany w 2017 roku patent PL 227253 B1 pt. Sposób wytwarzania 2,3-butanodiolu (autorzy Białkowska A., Gromek E., Kalinowska H., Kubik C., Sikora B., **Szczęsna-Antczak M.**, Turkiewicz M., Jędrzejczak-Krzepkowska M. [P-6]) oraz publikacja z 2016 roku pt. Application of byproducts from food processing for production of 2,3-butanediol using *Bacillus amyloliquefaciens* TUL 308, (autorzy: Sikora et al.) w Preparative Biochemistry and Biotechnology, 46(6), pp 610-619. doi: 10.1080/10826068.2015.1085401). Selektant tego szczepu jest wciąż wykorzystywany do celów dydaktycznych w IBT – m.in. jako wydajne źródło zewnątrzkomórkowych proteaz.

- **Biokonwersje i biotransformacje twardych powłok węglowych przy pomocy mikroorganizmów [H-9]**

Przegląd literatury naukowej i patentowej (dokonany, gdy rozpoczynałam współpracę z zespołem prof. Stanisława Mitury z Wydz. Mechanicznego PŁ) wskazał, że całkowicie brakuje informacji na temat stabilności twardych powłok węglowych w warunkach narażenia ich na działanie fizjologicznie aktywnych mikroorganizmów i wytwarzanych przez nie metabolitów. Informacje te są istotne, z uwagi na wciąż rosnące zastosowanie wytwarzanych różnymi technikami powłok węglowych, m.in. w medycynie do zabezpieczania powierzchni implantów medycznych: endoprotez stawów, zastawek serca, protez czaszki i kończyn, wszczepów stomatologicznych, w elektrochemii i analityce biochemicznej (czujniki elektrod i detektorów cząstek elementarnych), a także w optyce - płytki z wizjerami podczerwieni, mikroelektronice i w produkcji komputerów (głowice dysków twardych) oraz do powlekania powierzchni różnych narzędzi tnących (ostrza skrawające, wirniki, koła zębate mikromechanizmów), jak też żyłek, plastikowych kart kredytowych i wielu innych [8,9,10]. Tak szerokie i różnorodne aplikacje powłok węglowych sprawiają, że istotne jest poznanie ich trwałości w różnych, jakże odmiennych, środowiskach ich użycia: w ustroju człowieka, w ekstremalnych warunkach temperaturowych, w środowiskach chemicznie agresywnych,

w tym również w środowisku sprzyjającym rozkładowi i korozji mikrobiologicznej (MIC). Właściwości powłok węglowych zależą od technologii ich wytwarzania i mogą one wykazywać doskonałe cechy, takie jak duża twardość, wytrzymałość na ścieranie, oporność elektryczna i chemiczna i, ważna z punktu widzenia ich zastosowań medycznych, biokompatybilność [10]. Wytwórcy i jednostki naukowe opracowujące nowe technologie nanoszenia powłok węglowych testują je zwykle pod względem cech mechanicznych i fizyko-chemicznych oraz prowadzone są, m.in. testy odporności na korozję chemiczną oraz biokompatybilności, tzn. oddziaływania z komórkami zwierzęcymi: płytkami krwi, komórkami makrofagów i fibroblastów oraz płynami ustrojowymi [11]. Z uwagi na coraz szersze wprowadzanie do praktyki medycznej technologii powłok węglowych (implanty, zastawki, narzędzia chirurgiczne) bada się też adhezję modelowych bakterii patogennych na tych powłokach (możliwy rozwój infekcji, dotyczy np. 2-3% pacjentów z zastawką serca). Całkowicie natomiast pomijany był problem/zjawisko możliwych chemicznych/strukturalnych zmian w tych powłokach powodowanych przez żywe komórki mikroorganizmów lub białka i metabolity wydzielane przez te komórki.

Badania nad oddziaływaniem mikroorganizmów i ich metabolitów na powłoki wytworzone z różnych form węgla rozpoczęłam już w roku 2001, pierwotnie, jedynie z zamiarem określenia trwałości twardych warstw węglowych w środowisku żywych drobnoustrojów (tzn. ich podatności na mikrobiologiczną korozję i biodeteriorację). Jednak po uzyskaniu pierwszych wyników wykonanych przeze mnie badań – zaskakujących i ciekawych [C-10, C-11], zał. 5 – zainteresowałam się wyjaśnieniem obserwowanych zjawisk (w ramach pracy doktorskiej mgr inż. Agaty Kaczorowskiej) a także możliwością wprowadzania zamierzonych, korzystnych zmian w chemicznej strukturze warstw węglowych, właśnie przy użyciu wybranych drobnoustrojów i ich metabolitów (czyli metodami biotechnologicznymi). Warstwy węglowe poddaje się różnym modyfikacjom w celu poprawy ich właściwości pod kątem żądanej aplikacji lub w celu rozszerzenia możliwości aplikacyjnych. Modyfikacje te wykonuje się najczęściej *in statu nascendi* – tzn. podczas wytwarzania powłok (np. wprowadzając wodór lub tlen w strumień plazmy poddawanego depozycji materiału węglowego) lub już po naniesieniu powłoki węglowej. Modyfikacje już wytworzonych warstw prowadzi można metodami *fizycznymi* (bardzo kosztowne bombardowanie jonami niemetali lub stosowanie wysokich temperatur i próżni) oraz *chemicznymi* (trudne i zwykle kilkietapowe reakcje służące do wprowadzania grup funkcyjnych typu: -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -C≡N, dających następnie możliwość przyłączania/immobilizacji biologicznie aktywnych cząsteczek i/lub rozpoznawania cząsteczek). Dotychczas nikt nie stosował w tym celu metod biotechnologicznych, które mogą być konkurencyjne do wyżej opisanych, z uwagi na mniejsze zużycie energii, łagodniejsze warunki reakcji i większą selektywność w przypadku zastosowania określonych układów enzymatycznych.

Właśnie to zagadnienie było przedmiotem badań w kierowanym przeze mnie projekcie KBN 3 P04B 00423 zrealizowanym w Instytucie Biochemii Technicznej w latach 2002-2005, pt. „Modyfikacja struktury warstw węglowych metodami biotechnologicznymi”. Efekty badań i osiągnięcia zostały podsumowane przeze mnie w publikacji [H-9]. Modelowe twarde powłoki węglowe (typu DLC (*diamond-like carbon*) i NCD (*nanocrystalline diamond*) na powierzchni płytki krzemowej i stali medycznej AISI 316 L były wytwarzane w Zakładzie Inżynierii Biomateriałowej Politechniki Łódzkiej, metodą RF PCVD (*radio frequency chemical plasma vapour deposition*) polegającą na osadzaniu powstałych z metanu cząstek węgla zawartych plazmie wytworzonej w polu elektrycznym (13,56 MHz) przy ciśnieniu 20-400 Pa. Otrzymane tym sposobem powłoki są mieszaniną diamentu, grafitu i innych odmian alotropowych węgla, w tym węgla amorficznego. Najbardziej charakterystyczne i pożądane są w nich fazy nanokrystalicznego diamentu (węgiel o hybrydyzacji elektronów typu  $\sigma sp^3$ ) i grafitu (o strukturze heksagonalnej i romboedrycznej z wiązaniami C  $\sigma sp^2$ ). W zależności od udziału różnych faz węgla można mówić o warstwach diamentopodobnych DLC, w tym wypadku był to typ, tzw. amorficznego, uwodornionego węgla (a-C:H), lub o warstwach NDC zawierających ok. 95% atomów węgla o hybrydyzacji  $\sigma sp^3$ . Gdy odkryliśmy, że w poddanych wstępnym testom mikrobiologicznym powłokach węglowych zachodzą makroskopowo widoczne zmiany, postawiona została hipoteza, że wynikać one mogą z enzymatycznie i/lub chemicznie katalizowanych przemian [M-10, C-10, zał. 5]. W ramach projektu przetestowano kilkanaście wybranych przeze mnie szczepów drobnoustrojów (pleśnie, bakterie i drożdże z zasobów IBT oraz dostępnych kolekcji mikroorganizmów) i ich metabolitów (zawartych w cieczy pohodowlanej) w kontekście oddziaływania na badane powłoki węglowe i na czysty grafit - jako modelową „fazę grafitową” twardych powłok węglowych. W efekcie wytypowałam kilka szczepów powodujących widoczne makro- i mikroskopowo zmiany (barwy i tekstury) na powierzchni powłok, i scharakteryzowałam ich aparat enzymatyczny, określając poziom aktywności wybranych oksydoreduktaz i esteraz (analizie zdecydowałam się poddać aktywności enzymów, które zgodnie z danymi literaturowymi uczestniczą w biosolubilizacji lignitu lub rozkładzie trudno degradowalnych polimerów i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, co szerzej wyjaśniłam w [H-9]). Porównałam też elektroforetyczne profile (elektroforeza dwukierunkowa) zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych białek wytwarzanych w hodowli standardowej i w obecności grafitu. Wybrane drobnoustroje zastosowane zostały jako źródło indukowanych grafitem enzymów, którymi traktowane były powłoki węglowe NCD i DLC w celu wywołania określonych biotransformacji. Istotnym problemem w tych badaniach był dobór sposobu detekcji chemicznych i strukturalnych zmian, którym podlegały warstwy węglowe. Wykorzystano w tym celu kilka metod spektroskopowych, w tym • powszechnie stosowaną do oceny powłok węglowych

spektroskopię Ramana (możliwa detekcja zmian składu fazowego, gdyż w widmie powłok węglowych obecne są dwa szerokie piki w obszarach  $1500-1650\text{cm}^{-1}$  i  $1300-1400\text{cm}^{-1}$ , odpowiadające odpowiednio fazie grafitowej i nanokrystalicznego diamentu), • spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) - służącą tu do analizy udziału i sposobu związania wodoru oraz detekcji obecności innych wiązań chemicznych, • spektrometrię mas wtórnych jonów (TOF-SIMS) – do określenia składu atomowego i molekularnego, • spektroskopię fotoelektronów wzbudzanych promieniami rentgenowskimi (XPS) – do określania elektronowej struktury materiału, gdyż pozwala odróżnić różne stany chemiczne tego samego pierwiastka; w warstwach węglowych analizuje się głównie pozycję i kształt piku elektronów C1s, z którego wyliczyć można udział atomów węgla o hybrydyzacji  $sp^3$ , • rentgenowską analizę strukturalną (XRD) - charakterystyczne dla warstw węglowych są piki C diamentowego, kubicznego (111)  $2\theta \sim 43,9^\circ$ , romboedrycznego (104)  $2\theta \sim 42,2^\circ$  i amorficznego ( $2\theta \sim 44^\circ$ ) oraz pik „grafitowy” ( $2\theta \sim 26,5^\circ$ ). **Badania wykonane tymi metodami potwierdziły podatność warstw węglowych typu DLC na procesy chemiczne przebiegające w niewysokich temperaturach, z udziałem biokatalizatorów** (komórki niektórych pleśni i enzymy przez nie wytwarzane).

Uzyskane rezultaty były prezentowane na konferencjach międzynarodowych (III-D/14, /19, /23, /25, /26, zał. 5), były też kanwą monografii [M-10] i publikacji [C-10] oraz podsumowałam je w artykule [H-9]. Inspirowana wynikami badań biotechnologiczna metoda modyfikacji grafitu stanowi treść 4 patentów o numerach **PL 206641, PL 206642, PL 206643, PL 206644** (P-31÷P-34, zał. 5). Podstawowe osiągnięcia z tych badań to:

- Ustalono, że niektóre pleśnie dość szybko obrastają powierzchnię zarówno warstw DLC jak i warstw NCD i powodują ich wyraźne zmiany oraz, że zawierające jedynie niewielki udział fazy grafitowej (3-5%) warstwy NCD, są mniej podatne na te zmiany niż zawierające ok. 50% grafitu i węgla amorficznego powłoki DLC. Potwierdziło to naszą hipotezę, że obserwowane zmiany w powłokach mogą rozpoczynać się w klasterach grafitowych i amorficznych tego materiału węglowego. Na mechanizm biotransformacji (a nie zmian korozyjnych o podłożu elektrochemicznym) wskazywało wystąpienie zmian również w powłokach węglowych DLC naniesionych na płytki krzemu, co wyjaśniłam w [H-9]. Określono siłę adhezji komórek poszczególnych drobnoustrojów do powierzchni węglowych (stosując mikroskopię fluorescencyjną) oraz zmiany potencjału przebicia (testy korozyjne) i chropowatości powierzchni (w badaniach profilometrycznych) w efekcie działania żywych komórek drobnoustrojów tworzących biofilm na tych powłokach [M-10].
- Opracowano metodę modyfikacji warstw węglowych, która polega na hodowli wybranego mikroorganizmu (m.in. *Mucor circinelloides* i *Aspergillus niger*) na wyselekcjonowanym

podłożu stałym, na powierzchni którego umieszczano przedmioty pokryte warstwami węglowymi (patent PL 206644). Efekty modyfikacji udokumentowano wynikami analiz z: mikroskopii optycznej i skaningowej (Philips SEM 501), rentgenograficznej mikroanalizy pierwiastków połączonej z mikroskopią elektronową (Philips XL30), spektroskopii Ramana (mikro-spektrometr T-64000 z konfokalnym mikroskopem wyposażonym w półprzewodnikowy detektor CCD) i FT-IR (ze spektroskopu Biorad 175C w Instytucie Technologii Polimerów i Barwników w PŁ) oraz spektroskopii XPS (analizy wykonane w Laboratorium Spektroskopii Elektronowych AES-XPS Instytutu Chemii Fizycznej PAN w Warszawie na spektrometrze fotoelektronów VG ESCALAB-210) [H-9] i [M-10].

- Stwierdzono, że biotechnologiczna modyfikacja (biotransformacja i/lub biokonwersja) warstw węglowych zachodzi najefektywniej z użyciem pleśni *Aspergillus niger* IBT-90 (z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej, o wybitnych uzdolnieniach do degradacji materiałów ligno-celulozowych, w tym hemiceluloz) lub *Fusarium oxysporum* (ŁOCK 0510, szczep E90) a także pleśni *Mucor circinelloides*. Wykryto, że w efekcie przeprowadzonych biotransformacji/biokonwersji skład warstw węglowych może ulec ulepszeniu, dzięki selektywnemu usuwaniu atomów węgla połączonych wiązaniami o hybrydyzacji  $sp^2$  i obniżaniu udziału fazy grafitowej (notowane obniżenie wysokości pików G, „grafitowego” w obszarze  $1600\text{ cm}^{-1}$  widma Ramana i stosunku intensywności pików  $I_D/I_G$  [M-10] oraz, wykryty metodą spektroskopii XPS, wyraźny wzrost udziału węgla o hybrydyzacji typu  $sp^3$  i podwyższenie stosunku  $sp^3/sp^2$  wraz z czasem działania tych pleśni [H-9]). **Zjawisko zwiększania się ilości węgla o hybrydyzacji  $sp^3$  w warstwach węglowych, jako efekt działania żywymi drobnoustrojami i ich metabolitami, nie było wcześniej opisane w literaturze.** Za pomocą analiz FT-IR i XPS wykryto także możliwość zwiększania zawartości wodoru (obecnego w połączeniach:  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  i  $\text{CH}$ ) jak i wprowadzania do fazy grafitowej atomów tlenu (wzrost zawartości elektronów O1s oraz wyraźne pojawienie się grup karbonylowych, diketonowych, enolowych, połączeń arylo-eterowych oraz, co interesujące, wzrost ilości połączeń O-H, o czym świadczy szerokie pasmo FT-IR w zakresie  $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ ). **Wyniki te wyraźnie wskazały na oksydacyjno-redukcyjny charakter zmian zachodzących w warstwach węglowych pod wpływem niektórych pleśni.** Więcej szczegółów badań z tego zakresu, interpretację wyników i ich obszerną dyskusję zawiera publikacja [H-9].
- Porównano aktywności białek enzymatycznych wytwarzanych przez wybrane mikroorganizmy rosnące w obecności grafitu i bez grafitu. Stwierdzono, że niektóre pleśnie reagują na obecność tej formy węgla w środowisku ich rozwoju zwiększoną produkcją niektórych wewnątrz- i/lub zewnątrzkomórkowych enzymów, m.in. wzmaga się biosynteza Mn-zależnych peroksydaz i lakazy (oksydoreduktaza o wolno-rodnikowym mechanizmie działania) oraz dioksygenaz katecholowych (1,2- i 2,3-DOX, intra-



i ekstradiolowa) a także esteraz. Enzymy te były obecne, np. w zmieniających strukturę powłok węglowych komórkach pleśni: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 34511) i *Mucor circinelloides*. U pleśni *A. niger* rosnących na podłożu stałym obecność grafitu wywołała ponad 3,5, 6,5 i 5,3-krotny wzrost aktywności, odpowiednio wewnątrzkomórkowej lakazy, 1,2-DOX i 2,3-DOX [H-9]. Mechanizmy wywoływanych przez różne pleśnie modyfikacji powłok węglowych mogą być odmienne na co wskazały różne profile aktywności enzymatycznych produkowanych przez nie białek.

Powyższe badania, wciąż nowatorskie, mają bardzo duże znaczenie poznawcze oraz praktyczne. Dowiodły, m.in. że w środowisku niektórych drobnoustrojów i ich metabolitów powłoki węglowe, zawierające obok węgla „diamentowego” atomy węgla o hybrydyzacji  $sp^2$  („węgiel grafitowy” zawierający bogate w elektrony  $\pi$  wiązania  $>C=C<$ ) i węgla amorficznego, w domenach wysyconych wodorem ( $a-C:H$ ) oraz inne nie diamentowe formy węgla, podlegają dość szybkiej biotransformacji/biokonwersji. Opublikowane przez nas w [H-9] informacje o możliwej biodegradacji twardych powłok węglowych okazały się bardzo istotne, choćby w badaniach nad poprawą stabilności działania często porastanej przez drobnoustroje, katody węglowej ogniw paliwowych (MFC – *microbial fuel cell*) co zacytowano w [12]. W konkluzjach publikacji [H-9] zasugerowaliśmy celowość wprowadzenia mikrobiologicznych testów, jako standard w ocenie technologii wytwarzania powłok węglowych, co winno dotyczyć szczególnie powłok na implantach medycznych, choćby z uwagi na możliwość wystąpienia infekcji grzybowych w organizmie człowieka (co może doprowadzić do biodegradacji powłoki). Proponujemy też rozważenie możliwości stosowania biokatalizy do chemicznych modyfikacji powłok węglowych w celu dokonania zamierzonych zmian, np. wprowadzania grup hydroksylowych lub karbonylowych na ich powierzchni (patenty: PL 206643, PL 206644). W przyszłości, być może, informacje które opublikowaliśmy w [H-9], zainicjują także badania nad selektywnym *bio-usuwaniem* fazy grafitu z nanowarstw węglowych, co wpłynęłoby korzystnie na właściwości elektryczne powłok stosowanych w mikroelektronice.

#### INFORMACJE DODATKOWE:

Niektóre ze szczepów pleśni modyfikujących powłoki węglowe przekazałam, w 2010 roku, do badań nad solubilizacją polskiego węgla brunatnego, zainicjowanych w IBT PŁ przez prof. S. Bieleckiego. Badania wstępne, które rozpoczął wówczas dr Manu de Groeve wykazały, że spośród przekazanych dwa szczepy pleśni rodzaju *Mucor* efektywnie upłynniają węgiel brunatny. Ta innowacyjna tematyka jest obecnie rozwijana w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ.

Szczepy pleśni *Mucor*, u których oprócz wysokiej aktywności esteraz wykryto także obecność indukowanych grafitem oksydoreduktaz przekazane zostały przeze mnie na użytek rozwijających się wówczas w IBT badań nad wspomaganiem biodegradacji węglowodorów oleju napędowego. Sposób

otrzymywania biopreparatu pleśni *Mucor circinelloides* UD254 oraz sposób bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejem napędowym wspomaganą tym preparatem został w 2015 roku opatentowany (Patent PL 219884, [P-18]) i jestem współautorem tego patentu. Poza tym, informacje o pozytywnym efekcie wspomagania procesu mikrobiologicznej biodegradacji niektórych składników tego odpadu „mycelialnymi preparatami *Mucor*” zostały opublikowane w: 2015 roku w *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 104, p.142-148 (Marchut-Mikołajczyk et al. DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.05.008).

- **Biokataliza w mediach mikro-wodnych z udziałem immobilizowanych komórek grzybów nitkowatych**

Wykorzystanie biokatalizatorów (całe komórki bądź preparaty białek enzymatycznych) w przemianach nietypowych substratów (np. węgiel kopalny, WWA<sup>1</sup>, ropa naftowa, syntetyczne polimery, węgiel), w nietypowych reakcjach a także w niekonwencjonalnych środowiskach jest obszarem wiedzy wciąż rozpoznawanym i wg mnie najbardziej interesującym.

Lipazy (EC 3.1.1.3), których potencjał opisano już w 1930 roku(!) - stanowią grupę enzymów stosowanych obecnie na dużą skalę w przemyśle i wciąż uważanych za niezwykle perspektywiczne z racji różnorodnych właściwości katalitycznych, jakie wykazują w heterogenicznym środowisku wodnym (zemulgowany olej) i środowiskach niewodnych. Termin *promiscuous* (przypadkowość, różnorodność, rozwiąłość - brak dobrego odpowiednika w jęz. polskim - oznacza zdolność do katalizy reakcji alternatywnych, innych niż te dla których „stworzyła je” natura) pojawił się po raz pierwszy w publikacjach opisujących nietypowe katalityczne uzdolnienia właśnie lipaz [13]. Enzymy te stały się siłą napędową rozwoju *enzymologii niewodnej* a wciąż powiększające się zainteresowanie lipazami wynika z ich dużej stabilności i czasem zaskakujących katalitycznych właściwości jakie wykazują w środowiskach innych niż woda [14,15]. Roczny wzrost popytu na te enzymy jedynie w przemyśle detergentów i środków piorących sięga aż 6,2% i wynosił w 2017 roku 1,2 mld USD [15,16]. Przegląd patentów i publikacji wskazuje także na dużą dynamikę wzrostu zainteresowania lipazami przez przemysł chemiczny i farmaceutyczny (szczególnie do kinetycznego rozdzielenia racemicznych mieszanin w celu uzyskania czystych enancjomerów), producentów żywności i pasz oraz biodiesla [15]. Techniki immobilizacji lipaz – jako pierwsze, przełomowe biotechnologiczne innowacje - są wciąż rozwijane, gdyż ewidentnie obniżają koszty aplikacji tych enzymów i umożliwiają ich wykorzystanie w *nienaturalnych* mediach. Dalsze obniżenie ceny preparatów lipaz, co jest istotne w dużej skali ich aplikacji, np. w produkcji biodiesla, uzyskać można stosując całe komórki drobnoustrojów jako źródło enzymu [17].

---

<sup>1</sup> Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

### **Immobilizacja wewnątrzkomórkowych lipaz *Mucor* [H-1, H-3, H-11]**

Lipazami zainteresowałam się niebawem po uzyskaniu stopnia doktora, kiedy to kontynuując niejako tematykę doktoratu, podjęłam się rozwiązać problem wytworzenia aktywnych i stabilnych biokatalizatorów w oparciu o immobilizowane komórki – tym razem nie bakterii tylko pleśni, *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus* - zawierające wewnątrzkomórkowe lipazy. Enzymy te są silnie związane ze strukturami komórkowymi i odpowiednio spreparowane mycelium (korzystne jest jego odtłuszczenie, wysuszenie i ewentualne rozdrobnienie) może być traktowane jako preparat enzymatyczny (tzw. *in situ* immobilizowanej lipazy [18, 19]). Moim zadaniem była poprawa fizyko-chemicznych i mechanicznych właściwości tych preparatów bez utraty ich aktywności katalitycznej. Wybrane efekty pierwszych immobilizacji opisałam w artykułach [H-1], [H-3] i [C-5] oraz monografii [M-5]. Wykazałam, że niektóre hydrofilowe polimery, takie jak kriozele alkoholu poliwinylowego (cryoPVA), lepiej w kompozycji z glikolem polietylenowym (PEG) lub z kwasem olejowym i Tritonem X-100, stanowią stabilną, mechanicznie trwałą i odpowiednio porowatą matrycę dla drobin mycelium z naturalnie związaną lipazą/ami [H-1]. W tych hydrożelowych matrycach można zmieścić maksymalnie ok. 5% wagowych mycelium (parametr zwany *biocatalyst loading*) zawierającego „in situ” immobilizowaną lipazę. Wykazałam, że tego typu preparaty pułapkowanych lipaz są wyjątkowo odporne mechanicznie i mogą być stosowane zarówno w środowisku wodnym, w reakcji hydrolizy estrów, jak i w reakcjach syntezy estrów w środowisku mikrowodnym (w ostatnim przypadku wysoką stabilność katalityczną zapewnia dodatek sita molekularnego 4Å do medium reakcyjnego). Udowodniłam, że usunięcie wody z hydrożelowej matrycy, np. acetonem, zdecydowanie zwiększa katalityczną aktywność biokatalizatora, co prawdopodobnie wiąże się też ze zwiększeniem wielkości porów w strukturze polimerycznego nośnika. Opracowany biokatalizator posiada doskonałe właściwości fizyko-chemiczne, jednakże procedura immobilizacji jest dość długa i wymagająca specjalistycznej aparatury (m.in. kriostatu), dlatego poszukiwaliśmy prostszej i szybszej metody pułpkowania lipolitycznego mycelium pleśni *Mucor*.

Publikacja [H-3] dotyczy głównie nowego sposobu immobilizacji lipaz *Mucor* w nośniku kompozytowym (zawierającym chitozan sieciowany polifosforanami TPP i HMPP<sup>2</sup>), w którego opracowaniu uczestniczyłam. Odpowiednią strukturę nośnika chitozanowego zapewniła jego modyfikacja dodatkiem poliwinynopirolidonu oraz odwodnienie (acetonem lub przez liofilizację) sferycznych form biokatalizatora przed użyciem. Wytworzony biokatalizator testowany był z powodzeniem w reakcji syntezy estrów sacharozy z kwasem kaprylowym (niejonowe surfaktanty). Do katalizy tej reakcji, w środowisku eteru di-*n*-pentyłowego, zastosowałam

---

<sup>2</sup> Trójpolifosforan i heksametapolifosforan

z pewnym sukcesem również lipazę zawartą w usieciowanych aldehydem glutarowym sferycznych formach grzybni (otrzymanych w trakcie hodowli pleśni w odpowiednich warunkach) – jest to najprostsza opracowana przeze mnie forma immobilizowanego biokatalizatora z wewnątrzkomórkową lipazą.

Z powyższego zakresu badań jestem współautorką 3 patentów: PL 204825, PL 204826; PL 204909 [P-40÷P-42] oraz rozdziałów w monografiach [M-5], [M-7] i [M-8] a także rozdziału pt. „Wykorzystanie lipaz do otrzymywania estrów sacharydów, ich charakterystyka i zastosowanie”, w książce „Biotechnologia w produkcji żywności” (E. Kołakowski., S. Bielecki, W. Bednarski (red), 2005), Wyd. Akademii Rolniczej w Szczecinie, [M-9] (cytowane w załączniku 5). W trakcie wyżej opisanych badań nad aplikacją usieciowanego chitozanu do unieruchomienia lipolitycznego mycelium wykryta została chitozanolityczna aktywność tegoż mycelium... tym samym rozpoczęty został w Instytucie Biochemii Technicznej nowy kierunek badań, zakończony dysertacją doktorską Katarzyny Struszczyk-Świta (w 2009 roku).

Pragnąc przybliżyć względnie nową wówczas dziedzinę wiedzy nazywaną *enzymologią niewodną* (obecnie używany termin *mikro-wodna*) w 2005 włączyłam się w opublikowanie artykułów przeglądowych z tego zakresu [C-6, C-7, zał. 5], w których w czasopiśmie *Biotechnologia* zawarty został ówczesny stan wiedzy na temat niekonwencjonalnej enzymologii (w tym biokatalizie w mediach o subkrytycznie niewielkiej zawartości wody). Aby zilustrować pewne zależności w artykułach tych zamieszczone zostały także wyniki badań własnych.

Do zagadnienia immobilizacji lipaz powróciłam gdy uzyskałam finansowanie projektu nr N N205 1448 33 (2007-2009), który dotyczył wytworzenia i zastosowania preparatów lipaz w enzymatycznej syntezie estrów metylowych i etylowych kwasów tłuszczowych (FAME i FAEE). Wg moich założeń mycelium pleśni *Mucor* zawierające wewnątrzkomórkowe lipazy ma znamiona dużej aplikacyjności, z uwagi na prostotę i niską cenę wytworzenia takiego preparatu. Jednakże opracowane, opisane wyżej sposoby stabilizacji tych preparatów lipaz ([H-1, H-3]), podwyższały znacząco ich koszt. Lepszym rozwiązaniem okazał się opracowany w skali laboratoryjnej sposób immobilizacji mycelium tych pleśni w piance poliuretanowej (PUF), bezpośrednio podczas hodowli tych pleśni. Obecnie, poliuretan, w różnej formie i z zastosowaniem różnych technik, wykorzystywany jest dość często do immobilizacji komórek drobnoustrojów, roślinnych i zwierzęcych, enzymów i innych biomolekuł [20]. W ramach realizowanego od 2007 roku projektu dobrałam typ i porowatość dostępnych w handlu pianek poliuretanowych oraz ich kształt a także sposób wstępnej obróbki immobilizowanego mycelium (procedura DSP, *downstream processing*), co zapewniło wysoką katalityczną aktywność lipaz zawartych w tak immobilizowanym mycelium w syntezie estrów metylowych i etylowych kwasów tłuszczowych (FAME i FAEE). Efekty zastosowania tak immobilizowanych preparatów lipaz w procesach prowadzonych w reaktorach kolumnowych prezentowałam lub byłam współautorem prezentacji na

konferencjach naukowych w Polsce i za granicą. Od 2014 roku pojawiają się publikacje badaczy z Brazylii, którzy stosują inny szczep *M. circinelloides* (URM 4182) jako źródło lipaz i podobny sposób immobilizacji [21], przy czym lipolityczna aktywność tych preparatów jest co najmniej 5-krotnie niższa niż otrzymanych w naszym laboratorium.

Osiągnięcia nasze oraz biokatalityczne narzędzie, którym dysponowaliśmy, zaprocentowały włączeniem grupy z IBT do dwóch zespołów realizujących projekty unijne w ramach POIG (w latach 2010-2014/5). Zadaniem naszym było opracowanie warunków wykorzystania lipaz *Mucor* w pierwszym etapie konwersji olejów roślinnych w poliole (projekt o akronimie Biomasa) oraz w syntezie przydatnych dla kosmetologii estrów kwasów tłuszczowych i długołańcuchowych alkoholi, a także – z uwagi na obecność w tym mycelium chitozanas [A-5] - w konwersji chitozanu w chitooligomery (projekt o akronimie Biotransformacje). W związku z tym zakresem badań, rozwiązania wymagał kolejny problem: zwiększenie skali procedury immobilizacji mycelium pleśni *Mucor circinelloides*, tzn. przejście ze skali laboratoryjnej (kolby o poj. 1 dm<sup>3</sup>, z zanurzonymi w pożywce kostkami z pianki poliuretanowej) do skali półtechnicznej. Kolejne kroki, które doprowadziły do rozwiązania tego problemu wraz z efektami immobilizacji mycelium z wykorzystaniem będącego w dyspozycji IBT PŁ bioreaktora 30 L firmy Infors, opisaliśmy szeroko w publikacji [H-11], w *Preparative Biochemistry and Biotechnology* (2017). Bioreaktor został przez nas wyposażony w dodatkową konstrukcję zobrazowaną na Rys. 1 w [H-11], służącą do mocowania arkuszy pianek PU do mechanizmu mieszającego. Wyniki badań opisanych w tej publikacji dowiodły, że na osadzanie lipolitycznej grzybni i jej wzrost we wnętrzu pianek PU zasadniczy wpływ mają siły mechaniczne, które wymuszają lokowanie się aglomeratów mycelium lub kielkujących zarodników sporangialnych (z inokulum) we wnętrzu porowatej struktury nośnika. Ilość biomasy (*biomass loading*) immobilizowanej w PUF (o otwartej strukturze i wielkości porów optymalnie od 1,6 do 3,2 mm), w bioreaktorze o zmodyfikowanej konstrukcji, kilkakrotnie przewyższała wartości uzyskiwane w warunkach hodowli wstrząsanej, sięgając >6 lub >8 g s.m. odtłuszczonego mycelium w 1 g nośnika - wartości nie opisywane dotychczas w literaturze. Badania wykazały, że więcej grzybni pleśni *Mucor* wrasta w polieterowe pianki (typu Filtren, firmy Recticel), które są stosowane do mechanicznej i biologicznej filtracji wody a mniej - w pianki poliestrowe, oferowane do systemów wentylacyjnych. W omawianej publikacji demonstrujemy także warunki użycia tak immobilizowanego mycelium pleśni *Mucor* do katalizy reakcji transestryfikacji (część badań, w które byłam najbardziej zaangażowana) oraz do hydrolizy chitozanu w celu otrzymania chitooligomerów (tematyka w którą byłam początkowo częściowo zaangażowana, obecnie rozwijana w IBT przez dr inż. K. Struszczyk-Świta). Publikacja H-11 była recenzowana przez 7 recenzentów, prawdopodobnie z różnych obszarów badawczych, na co wskazywało meritum zadawanych, licznych pytań. Po moich szczegółowych wyjaśnieniach recenzentom

i po rozszerzeniu manuskryptu o dodatkowe dane doświadczalne bardzo szybko dostał on akceptację do druku. Wg mej opinii, zaproponowany w **H-11** sposób pozwoliłby na intensyfikację immobilizacji w porowatych nośnikach różnorodnych, tworzących mycelium mikroorganizmów co w konkluzjach publikacji poddaliśmy pod rozważenie firmom składającym oferty bioreaktorów. Biorąc pod uwagę prostotę korzystania z enzymów w postaci całych komórek/mycelium (żywych lub metabolicznie nieaktywnych) oraz szereg zalet tego typu biopreparatów, takich jak autoregeneracja kofaktorów niezbędnych w akcie katalizy czy wyższa stabilność enzymów pozostających w naturalnym mikrootoczeniu w komórce lub na jej powierzchni (m.in. tzw. *enzymes displayed on surface* – względnie nowy kierunek badań [22, 23]), zaproponowany w **H-11** sposób immobilizacji w łatwo dostępnym i tanim, porowatym nośniku poliuretanowym, mającym liczne inne zalety szczegółowo opisane w [24], daje szansę na rozszerzenie aplikacji różnych enzymów w procesach biokatalizy w dużej skali, szczególnie w mediach mikro-wodnych.

#### **Immobilizowana lipaza w estryfikacji sacharydów w środowisku bifazowym [H-4]**

Immobilizowane preparaty lipaz wykorzystywałam do katalizy różnych reakcji, m.in. syntezy estrów sacharydów (glukozy i sacharozy) z kwasami tłuszczowymi (produkty o właściwościach emulgujących) w difazowym środowisku wodno-organicznym. W badaniach, w których uczestniczyłam, uwzględniane było oddziaływanie difazowego środowiska reakcji (rodzaj rozpuszczalnika, stężenie i aktywność wody oraz dodatków różnych substancji do tego środowiska) na aktywność immobilizowanych lipaz *Mucor*. Byłam współautorką koncepcji tych badań. Prace w obrębie tej tematyki prezentowane były na konferencjach międzynarodowych [III D/1, 5, 6, 11, 15, zał. 5] w publikacji **[H-4]** i monografiach [zał. 5: M-2, M-7, M-8, M-9].

Aktywność wody ( $a_w$ ) niewodnych układów reakcji enzymatycznych to kluczowy parametr, będący wciąż obiektem badań, decydujący o szybkości i efektywności biokatalizy. W literaturze dotychczas panowało przekonanie, iż aktywność wody w układzie difazowym (hydrofobowy rozpuszczalnik-woda) nie zależy od objętości wyodrębnionej fazy wodnej wyrażonej współczynnikiem stosunku objętościowego faz A ( $A=V_{org}/V_{woda}$ , gdzie  $V_{org}$  i  $V_{woda}$  – objętość faz organicznej i wodnej układu difazowego). W badaniach opisanych w publikacji **[H-4]** dowiedliśmy, że aktywność wody układu difazowego (mierzona nad fazą organiczną) rośnie wraz ze wzrostem objętości wody w tym układzie a zakres tych zmian jest liniowy w przedziale  $A = 3 \div 400$ . Jeżeli woda wydzielona podczas syntezy estrów tworzy drugą fazę, to rzeczywista aktywność wody w tym układzie reakcyjnym rośnie w miarę postępu reakcji. Aktywność wody w układach difazowych, szczególnie tych o niewielkim współczynniku A, jest znacznie większa niż  $a_w$  rozpuszczalnika nasyconego wodą, co może

być bezpośrednim powodem hamowania reakcji estryfikacji. Opis tego zjawiska, podany po raz pierwszy przez nas w literaturze może być bardzo przydatny podczas opracowywania procesów enzymatycznej syntezy estrów w dużej skali. W celu przeprowadzenia badań opisanych w [H-4] niezbędna była konstrukcja (przy moim udziale) odpowiednio wyposażonego reaktora. Zbudowany *de novo* termostatowany mikroreaktor enzymowy (*in situ* immobilizowana lipaza Mucor), przeznaczony dla środowisk niewodnych, wyposażony został w czujnik aktywności wody, który umożliwiał pomiar tego parametru *on line*. Podobny reaktor, jedyny raz, opisano w roku 2001<sup>3</sup>, a prowadzono w nim syntezę kaprylanu decylu katalizowaną przez lipazę *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM) w środowisku samych substratów. Aby zwiększyć szybkość odpowiedzi sensora zastosowano wówczas przepływ odwodnionego powietrza przez medium reakcyjne, dzięki czemu zwiększała się szybkość transferu wydzielanej w reakcji wody do przestrzeni gazowej nad powierzchnią medium reakcyjnego (tu znajdował się połączony z komputerem czujnik monitorujący zmiany  $a_w$ ). W naszym reaktorze pomiar prężności pary wodnej w fazie gazowej odbywał się bez włączania dodatkowego przepływu powietrza wymagającego zawracania rozpuszczalnika. Użyty sensor cyfrowy firmy Rotronic pozwalał na ciągły pomiar aktywności wody z opóźnieniem ok. 5 minutowym. Uzyskane rezultaty zostały opublikowane i przedyskutowane w artykule [H-4] i [M-7, M-8].

W zakresie tej tematyki uczestniczyłam także w wypracowaniu nowej koncepcji aktywacji lipaz w środowisku niewodnym wywodzącej się z faktu, iż szlaki metaboliczne syntezy karotenoidów i kwasów żółciowych, znanych aktywatorów lipaz w środowisku wodnym, wywodzą się ze wspólnego metabolitu - pirofosforanu farnezyli. Dowiodłam empirycznie, że naturalne antyoksydanty, astaksantyna i  $\beta$ -karoten, stosowane w określonym stężeniu (odpowiednio 0,4 i 0,17 mg/ml w przypadku syntezy estrów sacharozy), wykazują nieopisaną dotychczas właściwość aktywacji lipazy (*Mucor*) w środowisku niewodnym. Na wspomaganie astaksantyną i  $\beta$ -karotenem sposoby enzymatycznego wytwarzania estrów cukrowych o właściwościach emulgujących, w 2010 roku UP RP przyznał patenty PL 204825 i PL 205684 [P-42 i P-37], których jestem drugim współautorem. Astaksantyna i  $\beta$ -karoten obok aktywowania lipazy *Mucor*, wykazują właściwość usuwania wolnych rodników, dlatego ich obecność w produktach reakcji zawierających komponenty wrażliwe na utlenienie (np. wielonienasycone kwasy tłuszczowe) jest bardzo korzystna, szczególnie przy wytwarzaniu żywności [25, 26]. Zjawisko aktywacji lipaz w mediach mikrowodnych niewielkimi dodatkami różnych substancji wykorzystywałam jeszcze z sukcesem w późniejszych pracach (w ramach kolejnych projektów) do poprawy wydajności estrów w reakcjach transestryfikacji (alkoholizy oraz acydolizy); informacje w raportach z projektu nr N N205 1448 33 i unijnego

---

<sup>3</sup> Keehoon Won, Sun Bok Lee, (2001), Computer-Aided Control of Water Activity for Lipase-Catalyzed Esterification in Solvent-Free Systems, *Biotechnol. Prog.*, 17, 258-264.

POIG .

**INFORMACJE DODATKOWE:**

Nasze badania opublikowane w **H-1**, **H-3** i **H-4**, mimo relatywnie rzadkiego stosowania lipazy *Mucor circinelloides*, opisanej po raz pierwszy w 1969 roku [26] (dawniej *Mucor javanicus* - nazwa nadal często używana) zostały zauważone przez świat naukowy: wg bazy Web of Science ok. 67 cytowań tych prac na dzień 25-10-2018. Handel oferuje preparat lipazy z *Mucor javanicus* pod nazwą M Amano 10, w formie liofilizowanego proszku (enzym zewnątrzkomórkowy) – jest to oferta japońskiej firmy Amano (Nagoya). Względnie rzadkie używanie lipazy *M. circinelloides* wynika z braku komercyjnej formy immobilizowanej, stąd wciąż prowadzone są próby znalezienia najlepszej metody unieruchomienia tego enzymu i dlatego prawdopodobnie nasze propozycje z tego zakresu zostały zauważone i szeroko omówione w 2013 roku w pracy przeglądowej [26]. Komentując cytowany artykuł, chciałabym zauważyć, że wewnątrzkomórkowa lipaza zawarta w preparacie, którego wytworzenie opracowano w IBT (w postaci związanej z mycelium), i która od dawna jest używana w naszych badaniach, nie musi być tym samym enzymem, który jest oferowany przez firmę Amano. Wciąż śledzę publikacje dotyczące pleśni *Mucor circinelloides*. Niedawno poznano genom szczepu *Mucor circinelloides* CBS 277.49, w którym zidentyfikowano ok. 30 genów potencjalnie kodujących lipazy (w tym kilka takich, w których zauważa się domeny/sekwencje wskazujące na możliwość lokalizacji tych enzymów w błonach komórkowych) [27]. Wiadomo, że na ekspresję wielu genów decydujący wpływ wywiera środowisko wzrostu drobnoustroju, zagadnienie będzie rozwinięte w dalszej części autoreferatu, która dotyczy biosyntezy lipaz i lipidów przez szczepy *Mucor* (publikacje **H-6** i **H-12**).

**Enzymatyczna transestryfikacja – biodiesel i inne estry kwasów tłuszczowych****[H-8, H-10]**

Dysponując wytwarzanymi w naszym laboratorium *tanimi* preparatami lipaz (bo całe komórki stosowane do biokatalizy to wciąż najtańszy biokatalizator), w 2005 roku rozpoczęłam badania nad enzymatyczną syntezą biodiesla, tzn. estrów etylowych i metylowych wyższych kwasów tłuszczowych. W latach 2007-2009 kierowałam projektem badawczym (własnym) nr N N205 1448 33 (o którym już wspomniałam), który zatytułowałam - aplikując o finansowanie badań - „Stabilne preparaty heterogennych biokatalizatorów zawierających naturalnie immobilizowane lipazy *Mucor* w alternatywnych procesach transestryfikacji”. W tamtym okresie na świecie rozpoczęły się – z uwagi na wzrost cen ropy - intensywne badania nad wytwarzaniem biodiesla z olejów roślinnych i metanolu lub etanolu w tym, poszukiwania efektywnego i taniego biokatalizatora do tego procesu. Wg wykonanej w 2015 roku, analizy rynku biotechnologicznego, aplikacje lipaz do syntezy biodiesla zaliczane są wciąż do najnowszych i nadal wymagających nakładów na badania (przede wszystkim w celu



obniżenia kosztów biokatalizy, z uwagi na dużą skalę produkcji i cenę produktu), choć pojawiły się informacje o funkcjonujących już tego typu procesach w dużej skali, w Stanach Zjednoczonych i Chinach [15, 16, 28]. Wg nowych danych OECD w 2020 roku przewiduje się produkcję biodiesla na poziomie 49,1 miliardów litrów [29].

Do swych osiągnięć w tematyce enzymatycznej syntezy estrów metylowych i etylowych kwasów tłuszczowych (FAME i FAEE) mogę zaliczyć: opracowanie nowej, prostej i szybkiej metody otrzymywania immobilizowanej lipazy *Mucor circinelloides* (w postaci mycelium unieruchomionego *in situ*, podczas hodowli (w skali laboratoryjnej) w porowatej pianie poliuretanowej (PUF) oraz optymalizację procesu wytwarzania biodiesla, która uwzględniała: czas, temperaturę, proporcje molowe substratów, pH mikrootoczenia lipazy oraz zawartość wody w środowisku reakcji. Wytworzony preparat lipazy, stanowiący wypełnienie ciągłego reaktora kolumnowego, o czasie półtrwania  $T_{1/2}=4$  miesiące, katalizował reakcję transestryfikacji oleju rzepakowego i 95 % etanolu z wydajnością ok. 95%. Zaproponowane rozwiązania dotyczące enzymatycznego wytwarzania biodiesla w postaci estrów etylowych wyższych kwasów tłuszczowych (opracowane w skali laboratoryjnej) były punktem wyjścia do rozwoju w naszym Instytucie badań nad biokatalitycznym otrzymywaniem różnych innych estrów kwasów tłuszczowych. Rezultaty badań były obiektem zainteresowania na konferencjach międzynarodowych i krajowych, w tym w European Summer School w Bolonii (2006) i na III Krajowym Kongresie Biotechnologii w Poznaniu (2007). Opracowane metody enzymatycznego wytwarzania estrów etylowych i metylowych kwasów tłuszczowych zastrzeżono w 2 patentach PL 206173, PL 206174 [P-36, P-35], których jestem współautorem. Praca przeglądowa z tej tematyki, której jestem współautorem i autorem korespondencyjnym, ukazała się w czasopiśmie z listy filadelfijskiej: *Szczęsna Antczak M\*, Kubiak A., Antczak T., Bielecki S., (2009), Enzymatic biodiesel synthesis - key factors affecting efficiency of the process, Renewable Energy, 34, 1185-1194*. Praca ta [H-8], jest efektem własnych przemyśleń, umożliwiających, w oparciu o światową literaturę oraz wyniki badań w naszym laboratorium, sprecyzowanie, opis i dyskusję, ważnych parametrów wyróżniających i ograniczających syntezę biodiesla na drodze katalizy enzymatycznej. Przyniesione w tej publikacji wyniki własnych badań [Fig. 3 i Fig. 4 w H-8], pokazują, że profile zależności wydajności różnych estrów od aktywności wody poszczególnych komponentów reakcji różnią się (np. różne są wartości  $a_w$  substratu tłuszczowego optymalne dla jego wydajnej metanolizy i etanolizy). Tym samym nieco skorygowaliśmy postulowaną wcześniej sugestię, że wartości  $a_w$  optymalne dla reakcji katalizowanych przez enzymy o zbliżonej konformacji winny być również zbliżone. Naszym zdaniem zmiana formy tego samego enzymu, powoduje konieczność ponownej optymalizacji warunków uwodnienia medium reakcyjnego. Szczególnie ważne i trudne jest ustalenie optymalnego uwodnienia środowiska właśnie dla reakcji transestryfikacji, w której woda uczestniczy w pierwszym

etapie reakcji (hydroliza acyloglicerolu) a „przeszkadza” w drugim, podczas syntezy nowego wiązania estrowego. Praca ta znalazła uznanie, o czym świadczy fakt, iż w rankingu najczęściej cytowanych artykułów naukowych z afiliacją z Polski z dyscypliny naukowej *Energy* (energetyka) znalazła się na pierwszym miejscu (średnia liczba cytowań 17,33 [Źródło: *Wybrane rankingi publikacji naukowych z afiliacją Polski: Raport analityczny*, autor: Wojciech M. Budzianowski, Politechnika Wrocławska]). Ranking objął 436 artykułów opublikowanych w 2009 roku. Do chwili obecnej (wrzesień 2018) praca ta ma ok. 210 cytowań (WoSci) w literaturze światowej a w samym 2018 roku była już zacytowana 31 razy (w bazie Web of Science zaliczona do grupy 1% publikacji najwyżej cytowanych z obszaru Inżynierii (Engineering)).

Zagadnienie modelowania niewodnego środowiska biokatalizy (m.in. przez dobór optymalnej ilości wody, rozpuszczalnika, substancji modyfikujących mikrootoczenie lipazy) absorbowало mnie w kolejno podejmowanych wyzwaniach naukowych. Narzędzie to okazało się niezbędne między innymi podczas opracowywania, w ramach projektów POIG (o akronimach Biomasa i Biotransformacje), optymalnych warunków procesów transestryfikacji prowadzonych w reaktorach okresowych lub ciągłych w celu wytworzenia odpowiednio dużych partii (niezbędnych do dalszych badań) produktów estrowych. Jednym z naszych zadań w tych projektach było, o czym informowałam, opracowanie technologii otrzymywania immobilizowanej formy tanich preparatów lipaz, które w skali półtechnicznej można byłoby wykorzystać do konwersji surowców lipidowych w bloki budulcowe służące do syntezy biodegradowalnych polimerów (projekt: Biomasa) oraz w komponenty kosmetyków (projekt: Biotransformacje). Odpowiedzialna byłam za prace prowadzone w ramach projektu Biomasa i uczestniczyłam, jako współwykonawca, w projekcie Biotransformacje. Wytworzenie dużych ilości estrów w laboratorium wiązało się z koniecznością utrzymania przez maksymalnie długi czas katalitycznej stabilności biokatalizatora jakim wypełnione były reaktory. Ta praktyczna potrzeba spowodowała, iż skupiłam się nie tylko nad rozwiązaniem problemu wytworzenia w większej skali taniego biokatalizatora (o czym pisałam już wcześniej, omawiając publikację [H-11]) ale także nad opracowaniem warunków procesu zapewniających wysoką operacyjną stabilność wytworzonego biokatalizatora. Dodatkowym problemem, rozwiązywanym w ramach projektu Biomasa, było podwyższenie wydajności konwersji olejów w estry 2-metylobutylowe w reakcji transestryfikacji, gdyż opracowany i używany przez nas tani preparat, w postaci immobilizowanego mycelium *M. circinelloides*, zawiera *sn-1,3* specyficzną lipazę. W przypadku stosowania lipaz o takiej regiospecyficzności, a najpowszechniej występują one w naturze, przetwarzanie triacylogliceroli (TAG) w estry możliwe jest tylko przy współdziałaniu chemicznie indukowanej migracji acyli z pozycji 2 do pozycji 1 lub 3 w di- i monoacyloglicerolach (DAG, MAG). Sporo badań, przytaczanych przeze mnie w naszej

publikacji z 2016 roku w *Biocatalysis and Biotransformation* (Taylor & Francis) [H-10], dotyczy ważnej roli tego zjawiska w reakcji enzymatycznej transestryfikacji. Idea zainicjowanych przeze mnie badań, opublikowanych w [H-10] polegała na zastosowaniu wody oraz dietyloaminy (DEA) do modelowania środowiska biokatalizy w celu zwiększenia wydajności estrów w reakcji katalizowanej przez dwie *sn-1,3* specyficzne lipazy, działające w środowisku samych substratów (olej + alkohol) oraz z dodatkiem eteru naftowego. Do użycia amin organicznych w celu aktywacji lipaz w mediach niewodnych zachęciły mnie wyniki naszych wcześniejszych badań, opublikowane w 2002 roku [A-3]. W omawianym artykule [H-10] jako pierwsi wykazaliśmy, że wydajność estrów można zwiększyć (np. estrów 2-metylobutyloowych o ponad 10%) dodając do środowiska transestryfikacji niewielkie ilości wody (z zakresu 0,5%-2%) i DEA (z zakresu 10-30 mmol/dm<sup>3</sup>), zależne od preparatu lipazy, typu środowiska i czasu reakcji. Analiza dynamiki zmian udziału wszystkich produktów mieszaniny po reakcji transestryfikacji (przy użyciu programu Just TLC) oraz stężenia wody w fazie ciekłej (metodą Karla-Fischera) dowiodła, iż obecność odpowiedniej ilości polarnych molekuł aminy stymuluje migrację acyli z pozycji 2 do pozycji 1(3) w diacyloglicerolu oraz powoduje „zatrzymanie” cząsteczek wody w fazie stałej biokatalizatora. Obydwa te zjawiska wpływają pozytywnie na tworzenie nowych estrów. W badaniach nad modelowaniem środowiska transestryfikacji (kontynuowanych w ramach doktoratu przez mgr inż. Jakuba Szeląga, z którym współpracuję) wykazano, że obecność DEA zwiększa także szybkość reakcji hydrolizy wiązań estrowych w TAG – czyli *de facto* szybkość pierwszego etapu transestryfikacji. W mniejszym stopniu wpływa na etap syntezy estrów. Bioinformatyczne modelowanie mikrootoczenia układu lipaza-DEA pozwoli w przyszłości wyjaśnić mechanizm działania tej aminy. W omawianej publikacji [H-10] pokazaliśmy również nieskomplikowany, praktyczny sposób wyznaczania stężenia wody jaką winna mieć mieszanina substratów transestryfikacji na wejściu do bioreaktora aby migracja molekuł wody między fazami: stałą (immobilizowany biokatalizator) i ciekłą (mieszanina reakcyjna) była minimalna. Badania nasze dowiodły bowiem, iż głównym powodem obniżania/utraty katalitycznych uzdolnień lipaz w mediach mikro-wodnych jest usuwanie molekuł wody z mikrootoczenia enzymu – jest to szczególnie uciążliwe w przypadku reaktorów z upakowanym złożem biokatalizatora. Wyjaśniamy to szczegółowo w przygotowanej obecnie publikacji, w której demonstrujemy najwyższą, nie opisaną dotychczas w literaturze, operacyjną stabilność preparatu lipazy, w procesie syntezy estrów w środowisku mikrowodnym, w warunkach zastrzeżonych w patencie PL 228104 [P-1]. W ramach badań prezentowanych w publikacji [H-10] odkryliśmy wreszcie interesującą, aplikacyjną zaletę mycelialnego preparatu lipazy *Mucor*, w którego obecności estry są wydajnie wytwarzane w bi-fazowym środowisku samych substratów, nawet z 5% dodatkiem wody. Preparat taki – tzn. mało wrażliwy na obecność wody - jest szczególnie cenny w przypadku przetwarzania w

estry tłuszczów odpadowych (ważne w produkcji biodiesla). Właściwość tę potwierdziły badania, w których uczestniczyłam (opieka naukowa i pomoc w interpretacji wyników), przeprowadzone w ramach projektu POIG.01.01.02-14-034/09-03 (w latach 2011-2012) we współpracy z Instytutem Technologii Eksploatacji (Państwowy Instytut Badawczy w Radomiu). Lipazy zawarte w mycelium pleśni *Mucor circinelloides* oraz *Mucor racemosus* użyto z dużym powodzeniem (w procedurach zastrzeżonych patentami: PL 227591; PL 227592, [P-4] i [P-5]) do biokonwersji odpadów (tłuszcz kanałowy) i produktów ubocznych z biorafinacji olejów (techniczne kwasy tłuszczowe, szlam pohydratacyjny) i uzyskano produkty zawierające substancje triboaktywne o dobrych właściwościach smarnych [30].

### **Mycelium pleśni *Mucor* jako źródło olejów i narzędzia do biotransformacji [H 6], [H 12]**

Obok poszukiwania nowych źródeł efektywnych biokatalizatorów i ich konstruowania opracowuje się lepsze, biotechnologiczne drogi otrzymywania surowców, zwanych *odnawialnymi* (obszar badań zaliczany do biotechnologii przemysłowej). Najwięcej informacji z zakresu tej tematyki dotyczy: efektywnych dróg biokonwersji lignocelulozowej biomasy roślinnej i pozyskiwania nowych mikrobiologicznych źródeł poli- i oligosacharydów, białek, niskocząsteczkowych związków bioaktywnych, a także nowych źródeł substancji lipidowych. Dużo uwagi poświęca się, m.in. poszukiwaniu mikrobiologicznych *producentów* olejów i opracowaniu metod ich wytwarzania. W dużej skali mogą być one przetworzone w biopaliwo (II generacji), a w mniejszej - wykorzystane w kosmetologii, produkcji żywności, biosurfaktantów, smarów i in. Prognozuje się, że cena olejów pochodzenia drobnoustrojowego może być konkurencyjna do ceny olejów roślinnych (biorąc pod uwagę dwukrotny wzrost cen olejów roślinnych na przełomie lat 2007/2008 [31].

Jak wspominałam wcześniej, szczepy *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus* z kolekcji IBT, w warunkach biosyntezy wewnątrzkomórkowych lipaz gromadzą także lipidy. Usuwano je traktując jako odpad, w ilości ok. 10÷15 g oleju na 12÷16 g wytworzonego, mycelialnego preparatu lipaz. Zainteresowałam się tym fenomenem obecności licznych ciał lipidowych obok wysokoaktywnych wewnątrzkomórkowych lipaz, w tym nie segmentowanym, wielojądrowym mycelium pleśni należących do Sprzężniowców (*Zygomycota*). Nie znalazłam informacji na ten temat w literaturze. Moje zainteresowanie wynikało też z faktu, że do tzw. olejodajnych zalicza się mikroorganizmy (algi, pleśnie, bakterie) akumulujące oleje (SCO – *single cell oil*) w ilości ponad 20% biomasy – a masa lipidów usuwanych z lipolitycznej grzybni obu szczepów *Mucor* z naszej kolekcji przekraczała nawet 50%, co zdecydowanie klasyfikuje je do organizmów wysoko olejodajnych. W literaturze można znaleźć informacje, że olejodajny szczep *M. circinelloides* (dawniej *M. javanicus*) już w latach 80. ubiegłego stulecia używano (przez 5 lat) w UK (firma J&E Sturge) do produkcji w dużej skali (220 m<sup>3</sup>), oleju

bogatego w kwas  $\gamma$ -linolenowy (jednakże olej z wiesiołka wyparł ten produkt z rynku) [32]. Badania nad metabolizmem olejodajnych grzybów (m.in. *M. circinelloides* i *Mortierella alpina*) prowadzone są w różnych ośrodkach, a najbardziej zaawansowane w zespole stworzonym przez prof. Colina Ratledge (Colin Ratledge Center for Microbial Lipids, Chiny) [31-35]. Natomiast, na temat akumulacji olejów przez pleśnie *M. racemosus* brakuje całkowicie informacji w literaturze. Chcąc rozszerzyć wiedzę na temat posiadanych, cennych szczepów, zdecydowałam się na ustalenie korelacji między biosyntezą lipaz i akumulacją olejów przez te pleśnie, co opublikowane zostało w [H-6] (badań z tego zakresu nie opisano wcześniej w literaturze).

Zazwyczaj, w hodowlach olejodajnych szczepów (także *Mucor circinelloides*) wykorzystuje się hydrofilowe źródła węgla (węglowodany, np. syrop glukozowy stosowano do wspomnianej wyżej produkcji oleju w skali przemysłowej w UK), w efekcie uzyskuje się SCO a pozostałość po ekstrakcji stanowi odpad. **Moją ideą było opracowanie propozycji procedury wytwarzania olejów mikrobiologicznych oraz preparatów lipaz, które zawarte będą w pozostałości po ekstrakcji olejów.** Możliwość jednoczesnego wytworzenia in situ immobilizowanego enzymu oraz oleju, który może podlegać konwersji w obecności tego enzymu, zainteresowała mnie nie tylko z powodów poznawczych ale także praktycznych, gdyż brałam pod uwagę kreowaną już wówczas ideę procesów *bezodpadowych*. Realizując swój pomysł przeprowadziłam cykl badań w celu określenia parametrów hodowli decydujących o akumulacji lipidów oraz o biosyntezie wewnątrzkomórkowych lipaz przez pleśnie *Mucor*. Informacji na temat biosyntezy lipaz przez olejodajne mikroorganizmy było wówczas niewiele i dotyczyły one innych drobnoustrojów, lecz ostatnio zainteresowano się biosyntezą lipaz przez, zaliczone do olejodajnych, szczepy *M. circinelloides* CBS 277.49 i WJ11 [36, 37]. Najciekawsze wyniki swoich pierwszych badań opublikowałam już w 2006 roku, w *Enzyme and Microbial Technology*, [H-6] - publikacja ta jest cytowana do chwili obecnej. Zawiera ona szczegółowe dane doświadczalne prezentujące, m.in.: (1) korelacje między efektami hodowli (takimi jak wydajność biomasy i SCO oraz ich skład, w tym zawartość karotenoidów i fosfolipidów, aktywność wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych lipaz i esteraz), a obecnymi w pożywce źródłami węgla (glukoza i olej roślinny) oraz azotu (namok kukurydziany, azotan, sole amonu) (Tabele 1, 2 i 3 w [H-6]); (2) zależność składu lipidów (w tym fosfolipidów i karotenoidów) od użytego do ich ekstrakcji rozpuszczalnika, oraz pokazuje i wyjaśnia wpływ różnych rozpuszczalników organicznych na katalityczną aktywność wewnątrzkomórkowych lipaz zawartych w materiale po ekstrakcji (Tabela 4 w [H-6]). Szczep *M. circinelloides* z naszej kolekcji nie toleruje obecności octanów w pożywce, co różni go od szczepów opisywanych w literaturze i dowodzi jego oryginalności. Poza tym odkryłam, że zastąpienie azotu amonowego (powszechnie stosowanego w hodowlach olejodajnych pleśni) azotanem, zwiększa udział lipidów w grzybni (pierwsza podałam tę

informację, która dotyczyć może także innych olejodajnych organizmów). W omawianej publikacji pokazałam też (Tabele 1 i 2 w [H-6]) różnice składu lipidów akumulowanych przez obydwie badane szczepy *Mucor* w obecności hydrofilowego (glukoza) i hydrofobowego źródła węgla (olej), świadczące o ich syntezie odpowiednio *de novo* (przewaga lipidów obojętnych ze znaczną ilością związanego kwasu palmitynowego, PA) lub *ex novo* (znaczące ilości wolnych kwasów tłuszczowych i niewielka ilość PA). Sprecyzowałam ostatecznie, które czynniki decydują o efektywnym wytwarzaniu obu produktów (lipaz i lipidów), są to: bogate źródło azotu (namok kukurydziany) i olej (jako podstawowe źródło węgla i induktor biosyntezy lipaz) oraz ekstrakcja lipidów w warunkach, które nie powodują denaturacji białek wewnątrzkomórkowych. W artykule [H-6] poinformowałam też o moim zamiarze podjęcia matematycznej optymalizacji warunków hodowli, w tym dobrania poziomu suplementacji pożywki węglowodanami i azotanami, które winny, wg wstępnych badań, zwiększyć wydajności obu produktów. Informacje z w/w badań optymalizacyjnych zawarłam w złożonym w 2010 r. do NCBIr sprawozdaniu merytorycznym z projektu badawczego-własnego nr N N205 1448 33.

Kreowana obecnie idea biogospodarki cyrkularnej („gospodarka o zamkniętym obiegu, w której surowce się nie marnują, produkty wykorzystuje się wielokrotnie, a ilość odpadów jest zredukowana do minimum i wykorzystywane są surowce wtórne”) oraz intensyfikacja poszukiwań biotechnologicznych źródeł olejów zmobilizowały mnie w 2018 roku do podsumowania swych badań nad wytwarzaniem olejów i preparatów lipaz w oparciu o pleśnię *Mucor* (badania te kontynuowałam równolegle z realizacją projektów POIG) i ich publikacji w *Bioresource Technology* [H-12]. W artykule tym podsumowałam efekty matematycznej optymalizacji biosyntezy wewnątrzkomórkowych lipaz z jednoczesną maksymalizacją akumulacji lipidów, pokazuję też możliwość wykorzystania odpadów przemysłu rolno-spożywczego w tym procesie a także oryginalną metodę konwersji lipidów mikrobiologicznych, podczas ich ekstrakcji z grzybni, w estry różnych alkoholi, w reakcji katalizowanej przez endogenne (wewnątrzkomórkowe) lipazy, Patent PL 218192 [H-P1].

W wyniku 2-stopniowej optymalizacji warunków hodowli pleśni *M. circinelloides* wykonanej metodami: RSM (*response surface methodology*) i Boxa-Wilsona, zwiększona została prawie 2-krotnie wartość przyjętego jako kryterium optymalizacji parametru  $Y^*$  (iloczyn wydajności lipidów i lipaz, zdefiniowany wzorem w rozdziale 2.5 tej publikacji). W zoptymalizowanych warunkach z 1L hodowli pleśni *M. circinelloides* uzyskuje się obecnie ponad 50 g suchej masy grzybni zawierającej 60-69% wt. lipidów i wewnątrzkomórkowe lipazy o aktywności 900 – 1000 U na 1g preparatu (pozostałość po usunięciu lipidów). Do czasu ukazania się tego artykułu nie opublikowano informacji o olejodajnych mikroorganizmach, które w warunkach akumulacji olejów zawierają aktywne, wewnątrzkomórkowe lipazy i mogą, z tak dużą wydajnością, wytwarzać oba produkty. Najwyższa, opisana przez Huang i in. w 2017 roku

[38], wydajność biomasy olejodajnych (lecz nie lipolitycznych!) mikroorganizmów (*Trichosporon dermatis* CH007) sięgała nieco ponad 30 g<sub>s.m</sub>/L. Natomiast dotychczas najwyższa wydajność biomasy olejodajnego szczepu *M. circinelloides* CBS277.49 (którego genom jest poznany [39]) wynosiła tylko nieco ponad 21 g/L [36]. Uruchomienie obu szlaków biosyntezy i akumulacji lipidów (*ex novo* i *de novo*), dzięki suplementacji, glukozą lub glicerolem oraz azotanem (jako efekt optymalizacji), pożywki zawierającej olej lub kwas tłuszczowy oraz namok kukurydziany, a także genetyczne cechy szczepu *M. circinelloides* IBT-83 z kolekcji IBT, wyjaśniają ten wysoki poziom akumulacji lipidów oraz wysoką wydajność biomasy zawierającej aktywne lipazy. Filogenetyczna przynależność gatunku naszego szczepu została potwierdzona identyfikacją sekwencji genów kodujących dużą podjednostkę rybosomalnego RNA oraz 18S rRNA, ITS1, ITS2 i 28S rRNA, które zdeponowano 11.05.2015 roku w GenBank, odpowiednio pod numerami KR056084 (autorzy: Kaczmarek, M.B., Florczak, T., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Struszczyk-Świta, K., Stańczyk, L., Szczęsna-Antczak, M., Antczak, T.) i KR056083 (autorzy: Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Kaczmarek, M.B., Florczak, T., Struszczyk-Świta, K., Stańczyk, L., Szczęsna-Antczak, M., Antczak, T.). Identyczność ITS1 i ITS2 izolowanych ze szczepu z kolekcji IBT ze zdeponowanymi w NCBI sekwencjami tych fragmentów innych szczepów *M. circinelloides* sięga 99,53-98,75%.

Publikacja **H-12** zawiera też wybrane wyniki z badań nad wykorzystaniem odpadów bogatych w substancje lipidowe do wytwarzania SCO i lipaz z pleśni *Mucor circinelloides*. Badania te prowadziłam zarówno jako własne (prace dyplomowe) jak i w ramach zlecenia dla Instytutu Technologii Eksploatacji-PIB (Radom) finansowanego z projektu POIG 01.01.02-14-034/09-00, zadanie IV.4.1. „Metody wykorzystania naturalnych surowców odpadowych do komponowania ekologicznych środków smarowych”. Odkryłam, że do hodowli pleśni *Mucor*, bez obniżania wydajności obu produktów (lipidy i lipazy), wykorzystać można różnego typu hydrofobowe odpady (których cena jest bliska zeru) lub produkty uboczne z rafinacji olejów roślinnych (tłuszcz kanałowy (TK), szlasy pohydratacyjne (RL) i kwasy tłuszczowe z kondensatu z procesu destylacji (TKT), tłuszcze odpadowe z restauracji (RWL)), szczególnie te zawierające nasycone kwasy tłuszczowe (olej palmowy, SA50 – mieszanina kwasu stearynowego i palmitynowego w proporcji molowej 1:1) a także glicerol – co było zauważone i docenione przez recenzentów publikacji (Tabela 3 i 4 w [H-12]), gdyż dotychczas ukazało się tylko kilka publikacji informujących o stosowaniu w hodowli *Zygomycetes* tego źródła węgla [40,41]. Badania nad wykorzystaniem glicerolu (odpad z produkcji biodiesla) i innych odpadów przemysłu spożywczego są przeze mnie kontynuowane.

Wreszcie, w związku z bardzo cennym odkryciem, którego dokonałam w trakcie omawianych badań, publikację [H-12] rozszerzyłam o opis **oryginalnej i nowatorskiej metody, szybkiego i prostego przetworzenia zakumulowanych w grzybni lipidów w estry**

**różnych alkoholi, bezpośrednio podczas ich ekstrakcji;** sposób zastrzeżony w patencie **PL 218192** (zgłoszenie nr 385598, dn. 7.7.2008, patent pt. „Sposób wytwarzania *in situ* mieszaniny estrów wyższych kwasów tłuszczowych”, autorzy: M. Szczęsna-Antczak, T. Antczak, S. Bielecki, przyznany dn. 31.10.2014) **[HP-1]**. W literaturze można znaleźć wiele propozycji ekstrakcji lipidów z biomasy (alg, pleśni, drożdży), w połączeniu z ich konwersją w estry, tzw. *direct transesterification* [42-45], w których stosowano różne katalizatory chemiczne [42,43], handlowe preparaty lipaz [44] lub dodatek lipolitycznych mikroorganizmów [45]. W propozycji opracowanej wg mego pomysłu, lipazy zawarte w olejodajnym materiale biologicznym poddawanych ekstrakcji (biomasa), zostały wykorzystane do katalizy reakcji trans/estryfikacji, tym samym koszty tego procesu zostały zminimalizowane. **Wykorzystanie endogennych, wewnątrzkomórkowych lipaz *Mucor* do konwersji lipidów ekstrahowanych z grzybni w estry różnych alkoholi 1-rzędowych rozszerza ofertę o nowe biooleje, obniża koszt ich otrzymywania oraz jest to całkiem oryginalna, zdecydowanie „zielona” biotechnologiczna procedura otrzymywania estrów z olejów mikrobiologicznych. Drugim, cennym produktem tej procedury są natywne lipazy zawarte w materiale po ekstrakcji olejów.** Enzymy te, w formie *in situ* immobilizowanej w mycelium pozostającym po ekstrakcji i przekonwertowaniu olejów w estry, lub w mycelium dodatkowo immobilizowanym w piance poliuretanowej — stanowią gotowy preparat lipaz, które są silnie związane ze strukturami komórkowymi. Preparat ten można stosować w biokatalitycznych reakcjach syntezy estrów na drodze estryfikacji i transestryfikacji a także z uwagi na obecność wewnątrzkomórkowych chitozanas, w syntezie chitooligosacharydów **[H-11]**. W publikacji **[H-12]** opisałam tylko jeden szczep, *M. circinelloides*, podobny zakres badań wykonany został dla drugiego lipolitycznego i olejodajnego szczepu z kolekcji IBT - *M. racemosus*.

Ostatnio zwiększyła się liczba doniesień naukowych, które dotyczą wykorzystania szczepów *Mucor circinelloides* do otrzymywania olejów, głównie pod kątem produkcji biopaliw (FAEE i FAME) [35-37, 39, 46,47]. Poza tym analizie poddawany jest obecnie cały genom tych pleśni, które traktuje się jako bardzo perspektywiczne źródło różnych produktów, w tym olejów i wielu enzymów przydatnych w biorafineriach i w ochronie środowiska [35-37, 39, 48-53]. W jednej z prac z 2018 roku [36], dotyczącej dwóch szczepów *M. circinelloides*: CBS 277.49 (low-lipid producing) oraz WJ11 (high-lipid producing), można przeczytać zdanie: „*It seems to be difficult to understand that the highest intracellular lipase activity and the maximal lipid content were simultaneously observed in the glucose-oil mixed medium*” („*trudno jest zrozumieć/wyjaśnić fakt, że najwyższą aktywność wewnątrzkomórkowych lipaz i jednocześnie największą akumulację lipidów obserwuje się w pożywce zawierającej zarówno glukozę jak i olej*”). Podaną zależność zaobserwowano w przypadku obu szczepów pleśni *M. circinelloides* opisywanych w tej publikacji. Fenomen ten zadziwił mnie znacznie wcześniej,



już wówczas, gdy rozpoczynałam wykorzystywać lipolityczne szczepy *Mucor* z kolekcji IBT w swych badaniach (stąd publikacja [H-11]). Jednym z prawdopodobnych wyjaśnień zjawiska jednoczesnego występowania wysokoaktywnych wewnątrzkomórkowych lipaz i ciał lipidowych jest, mg mnie, zaangażowanie wewnątrzkomórkowych lipaz (i innych esteraz!) o aktywności syntetycznej i transferazowej, w uruchamiane w tych warunkach drogi metaboliczne, które odpowiadają za włączanie wolnych kwasów tłuszczowych, pobieranych ze środowiska i transportowanych do komórek, w ciała lipidowe akumulowane w komórkach. Lokalizacja olejów i lipaz w różnych kompartmentach (organellach) komórek pozwala na ich współistnienie. Tę cechę pleśni *M. circinelloides* wykorzystałam do zrealizowania mej idei biokatalitycznej konwersji mikrobiologicznych olejów w estry podczas ich ekstrakcji z grzybni zawierającej wysokoaktywne lipazy, co opisałam w publikacji [H-12].

Poznanie różnic na poziomie genomu szczepu *M. circinelloides* IBT-83 z dotychczas zdeponowanymi genomami szczepów tego gatunku (*M. circinelloides* CBS277.49 i WJ11, *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* 1006PhL; i inne) z pewnością pozwoli w przyszłości na pełniejsze wykorzystanie potencjału tych cennych szczepów pleśni z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej.

#### Literatura cytowana w autoreferacie:

1. Szczęsna M., Galas E. (2000), Protein hydrolysis by immobilised *Bacillus subtilis* cells. w: Progress in Biotechnology, vol.17, (eds. Bielecki S., Tramper J, Polak J.) Food Biotechnology, pp.177-186
2. Szczęsna M., Galas E., (2001) *Bacillus subtilis* cells immobilised in PVA-cryogels, , *Biomolecular Engineering* 17, 55-63
3. Szczęsna M., Galas E., Bielecki S. (2001), PVA-biocatalyst with entrapped viable *Bacillus subtilis* cells, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 671-676; ISSN: 1381-1177.
4. Antczak T., Szczęsna-Antczak M., Bielecki S., (2001), Niekonwencjonalne procesy biotechnologiczne, W: Książka pt. „KOD – korzyści, oczekiwania, dylematy biotechnologii” (red) T. Twardowski i A. Michalska, wyd. Agencja Edytor, Poznań, s.108-143,
5. Illanes A. 1999, Stability of biocatalysts (rev. article). Electronic Journal of Biotechnology, 2(1), <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34581999000100001>;
6. Bommasius A.S., Riebel B.R. 2004, Biocatalysis. Fundamentals and Applications, Wyd. Wiley-VCH, pp. 33-35 (ISBN 3-527-30344-8)
7. Gaden E.L. Jr (2000) Fermentation process kinetics. Reprinted from Journal of Biochemical Microbiological Technology and Engineering Vol. 1, No. 4 Pages 413-29 (1959), *Biotechnol Bioeng.* 67(6), 629-635.
8. May P. W.: Diamond thin films: a 21 st – century material, The Royal Society, Bristol 2000
9. Dearnaley, G., Arps, J.H., 2005. Biomedical applications of diamond-like carbon (DLC) coatings: A review. *Surface & Coatings Technology* 200, 2518-2524 Roy, R.K., Lee, K.-R., 2007. Biomedical application of diamond-like carbon coatings. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials* 83(1):72-84

10. Rodil, S.E., Olivares, R., Arzate, H., Muhl, S., 2003. Properties of carbon films and their biocompatibility using in-vitro tests. *Diamond and Related Materials* 12, 931-937
11. Linder, S., Pinkowski, W., Aepfelbacher, M., 2002. Adhesion, cytoskeletal architecture and activation status of primary human macrophages on a diamond like carbon coated surface. *Biomaterials* 23, 767-773
12. Noori Md.T., Jain, S.C., Ghangrekar, M. M., & Mukherjee, C. K. (2016) Biofouling inhibition and enhancing performance of microbial fuel cell using silver nano-particles as fungicide and cathode catalyst. *Bioresource Technology* 220, 183-189
13. Lopez-Iglesias M. and Gotor-Fernandes V. (2015) Promiscuity: Hydrolase-Catalysed Reaction for Nonconventional Transformation *Chem. Rec.* 15, 743-759, doi: 10.1002/tcr.201500008
14. Sarmah N., Revathi D., Sheelu G., Yamuna Rani K., Sridhar S., Mathab V., Sumana C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol. Prog.* 2018, 34, 5-28;
15. Daiha KdG., Angeli R., de Oliveira SD. Almeida RV. Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting, *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131624. doi: 10.1371/journal.pone.0131624
16. Cortez D.V., Reis C., Perez V.H., De Castro H.F. (2018) The Realm of Lipases in Biodiesel Production. In: Singh O., Chandel A. (eds) *Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-95480-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-95480-6_10);
17. Fukuda H, Hama S, Tamalampudi S, Noda H. (2008) Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends Biotechnol.* 26(12): 668-673. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.08.001
18. Antczak T., Mrowiec-Bialon J., Bielecki S., Jarzebski A. B., Malinowski J. J., Lachowski A. I., Galas E. (1997) Thermostability and esterification activity of *Mucor javanicus* lipase entrapped in silica aerogel matrix and in organic solvents. *Biotechnology Techniques*, 11(1), 9-11
19. Antczak T., Hiler D., Krystynowicz A., Szczęsna M., Bielecki S., Galas E., (2000) Activity of immobilised in situ intracellular lipases from *Mucor circinelloides* and *Mucor racemosus* in the synthesis of sucrose esters. *Progress in Biotechnology*. Vol. 17, 221-227
20. Thomson T., (2018) *Polyurethane immobilization of cells and biomolecules: medical and environmental application*, Wiley & Sons, Inc. 2018, ISBN 9781119264941(pdf)
21. Soares M.S., Rico A.L.L., Andrade G.S.S., de Castro H.F., Oliveira P.C. (2017) Synthesis, characterization and application of a polyurethane-based support for immobilizing membrane-bound lipase. *Brazilian J of Chem. Engineering*, 34(1), 29-39 <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170341s20140227>
22. Inokuma K., Hasunuma T., Kondo A. (2018) Whole Cell Biocatalysts Using Enzymes Displayed on Yeast Cell Surface, chapter 5 in: (ed. Chang H.N.) *Emerging Areas in Bioengineering*, Wiley-VCH, pp 81-92. DOI:10.1002/9783527803293
23. Kim J. 2017, Surface display of lipolytic enzyme, Lipase A and Lipase B of *Bacillus subtilis* on the *Bacillus subtilis* spore. *Biotechnology and Bioprocess Eng.* 22(4), 462-468
24. Thomson T., *Polyurethane immobilization of cells and biomolecules: medical and environmental application*, Wiley & Sons, Inc. 2018, ISBN 9781119264941(pdf)
25. Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H., (2006) Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 69 (3), 443-449

26. Garcia-Galan C., Barbosa O., Ortiz C., Torres Saez RG., Rodrigues RC., Fernandes-Lafuente R., (2013) Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*. 93:34-43
27. Zan, X., Tang, X., Zhao, L., Chu, L., Chen, H., Chen, W., Chen, Y.Q., Song, Y., (2016) Bioinformatical analysis and preliminary study of the role of lipase in lipid metabolism in: *Mucor circinelloides*. *RSC Advances*. 6 (65), 60673-60682
28. Christopher LP, Kumar H, Zambare VP. (2014) Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*. 119: 497–520
29. OECD—Food and Agricultural Organization of the United Nations, <http://www.oecd.org/site/oecd-faoagriculturaloutlook/48178823.pdf> .
30. Siwiec E., Pawelec E., (2015) Wykorzystanie naturalnych surowców odpadowych do komponowania ekologicznych środków smarowych. W: *Systemy i metody racjonalizacji wykorzystania surowców w procesach wytwarzania i eksploatacji*. Mazurkiewicz A., Grądkowski M. (red. naukowa). Wyd. ITE – PIB, Radom. pp. 27-39. ISBN 978-83-7789-369-2
31. Ratlege C. and Cohen Z., (2008) Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology* 20, 155-160
32. Ratlege C., Microbial production of polyunsaturated fatty acids as nutraceuticals. W: *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals* (eds. Brian McNeill, David Archer, Ioannis Ciavasis, Linda Harvey) Woodhead Publ. Limited, UK, 2013, pp. 531-558, ISBN 978-0-85709-354-7 (online)
33. Ratlegde C., (2002) Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem. Soc. Trans.*, 30 (2002), 1047-1050
34. Wynn J.P., Hamid A.A, Li Y., Ratledge C. (2001) Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpine*. *Microbiology*, 147 (2001), 2857-2864
35. Tang X., Chen H., Chen Y.Q., Garre V., Song Y., Ratledge C., (2015) Comparison of Biochemical Activities between High and Low Lipid-Producing Strains of *Mucor circinelloides*: An Explanation for the High Oleaginicinity of Strain WJ1. *PLoSOne* 10(6): e0128396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128396>
36. Zan X., Tang X., Chu L., Song Y., (2018) Characteristics of cell growth and lipid accumulation of high and low lipid producing strains of *Mucor circinelloides* grown on different glucose-oil mixed media. *Process Biochemistry* 72, 31-40
37. Vongsangnak W., Kingkaw A., Yang J., Song Y., Laoteng K., (2018) Dissecting metabolic behavior of lipid over-producing strain of *Mucor circinelloides* through genome-scale metabolic network and multi-level data integration. *Gene* 670, 87-97
38. Huang Ch., Luo M-T., Chen X-F., Qi G-X., Xiong L., Wang C., Li H-L., Chen X-D. (2017) Combined “de novo” and “ex novo” lipid fermentation in a mix-medium of corncob acid hydrolysate and soybean oil by *Trichosporon dermatis*. *Biotechnol Biofuels*. 10: 147, Published online 2017 Jun 9. doi: 10.1186/s13068-017-0835-8
39. Zan X., Tang X., Chu L., Zhao L., Chen H., Chen Yong Q., Chen W., Song Y., (2016) Lipase genes in *Mucor circinelloides*: identification, sub-cellular location, phylogenetic analysis and expression profiling during growth and lipid accumulation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 43(10), 1467-1480
40. Bellou S., Moustogianni A., Makri A., Aggelis G., 2012. Lipid containing polyunsaturated fatty acids synthesized by *Zygomycetes* grown on glycerol. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 166, 146-158;

41. Papanikolaou S., Rontou M., Belka A., Athenaki M., Gardelli Ch., Mallouchos A., Kalantzi O., Koutinas A.A., Kookos I.K., Zeng A-P., Aggelis G., 2017. Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Eng. Life Sci.*, 17, 262–281
42. Guldhe A., Singh B., Rawat I., Bux F., 2014. Synthesis of biodiesel from *Scenedesmus* sp. by microwave and ultrasound assisted in situ transesterification using tungstated zirconia as a solid catalyst. *Chem. Eng. Res. Des.* 92(8), 1503-1511
43. Sathish A. and Sims R.C., 2012. Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. *Bioresour. Technol.* 118, 643-647
44. Chen L., Li R., Ren X., Liu T., 2016. Improved aqueous extraction of microalgal lipid by combined enzymatic and thermal lysis from wet biomass of *Nannochloropsis oceanica*. *Bioresour. Technol.* 214, 138-143
45. Vicente G., Bautista L.F., Rodríguez R., Gutiérrez F.J., Sádaba I., Ruiz-Vázquez R.M., Torres-Martínez S., Garre V., 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochem. Eng. J.* 48, 22-27
46. Carvalho, A.K.F.; Bento, H.B.S.; Rivaldi, J.D.; de Castro, H.F. Direct transesterification of *Mucor circinelloides* biomass for biodiesel production: Effect of carbon sources on the accumulation of fungal lipids and biofuel properties. *Fuel*, 234, 2018, 789-796,
47. Carvalho, A.K.F., Approaches to convert *Mucor circinelloides* lipid into biodiesel by enzymatic synthesis assisted by microwave irradiations. *Renewable energy*, 2018, 125, 747-754.
48. Corrochano L.M., Kuo A., Marcet-Houben M., Polaino S., Salamov A., Villalobos-Escobedo J.M., Grimwood J., et al. (2016) Expansion of signal transduction pathways in fungi by extensive genome duplication. *Curr Biol.* 26(12): 1577-1584 doi: 10.1016/j.cub.2016.04.038 na <https://genome.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>
49. Tang, X.; Zhao, L.; Chen, H.; Chen, Y.Q.; Chen, W.; Song, Y.; Ratledge, C. Complete Genome Sequence of a High Lipid-Producing Strain of *Mucor circinelloides* WJ11 and Comparative Genome Analysis with a Low Lipid-Producing Strain CBS 277.49 PLOS ONE; 2015; 10; 9. e0137543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137543>
50. Zan X, Tang X, Chu L, Song Y (2018) Dual Functions of Lip6 and Its Regulation of Lipid Metabolism in the Oleaginous Fungus *Mucor circinelloides* J Agric Food Chem. 66(11):2796-2804. doi: 10.1021/acs.jafc.7b06024.
51. Zan X, Tang X, Chu L, Zhao L, Chen H, Chen YQ, Chen W, Song Y. (2016) Lipase genes in *Mucor circinelloides*: identification, sub-cellular location, phylogenetic analysis and expression profiling during growth and lipid accumulation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 43(10): 1467-1480. doi: 10.1007/s10295-016-1820-0
52. Wei H, Wang W, Yarbrough JM, Baker JO, Laurens L, Van Wycken S, Chen X, Taylor LE 2nd, Xu Q, Himmel ME, Zhang M. (2013) Genomic, proteomic, and biochemical analyses of oleaginous *Mucor circinelloides*: evaluating its capability in utilizing cellulosolytic substrates for lipid production. *PLoS One.* 8(9): e71068. doi: 10.1371/journal.pone.0071068
53. Zan X., Tang X., Zhao L., Linfang C., Chen H., Chen YQ., Chen W., Song Y. (2016) Bioinformatical analysis and preliminary study of the role of lipase in lipid metabolism in *Mucor circinelloides*. *RSC Adv.* 6, 60673, DOI: 10.1039/c6ra08285h

#### D) Osiągnięcia naukowe o charakterze podstawowym i aplikacyjnym:

- Taksonomiczna identyfikacja i scharakteryzowanie biochemiczne i fizjologiczne olejodajnych i lipolitycznych szczepów grzybów strzępkowych *Mucor* z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej PŁ.
- Odkrycie możliwości zastosowania biokatalizy (drobnoustrojów i enzymów przez nie wytwarzanych) do wprowadzania chemicznych modyfikacji w twardych powłokach węglowych stosowanych do zabezpieczania różnych powierzchni (m.in. w medycynie, elektrochemii, analityce biochemicznej, mikroelektronice)
- Zaprojektowanie kilku metod immobilizacji komórek wybranych drobnoustrojów (bakterie rodzaju *Bacillus* i grzyby nitkowate *Mucor*) i wskazanie możliwości ich użycia w procesach biokatalizy, w tym w mediach mikro-wodnych.
- Opracowanie, w oparciu o odpady przemysłu spożywczego, warunków wydajnej produkcji preparatów enzymatycznych w postaci mycelium (w tym immobilizowanego w pianie poliuretanowej) zawierającego aktywne lipazy i jednocześnie olejów mikrobiologicznych o dużym potencjale aplikacyjnym (m.in. jako komponent kosmetyków).
- Zaprojektowanie oryginalnej metody przetwarzania akumulowanych w mycelium pleśni *Mucor* olejów w estry I-rzędowych alkoholi (komponent kosmetyków) bezpośrednio podczas ich ekstrakcji z komórek z wykorzystaniem do katalizy reakcji wewnątrzkomórkowych lipaz.

## E) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Moje zainteresowanie poszukiwaniem oraz praktycznym zastosowaniem komórek mikroorganizmów (immobilizowanych lub wolnych, zdolnych lub nie do rozmnażania) jako źródła różnych enzymów powoduje, że z chęcią włączam się w badania, w których można tego typu biokatalizatory wykorzystać, angażowałam się także w opracowania artykułów przeglądowych z tego zakresu. Po uzyskaniu stopnia doktora, w pewnym okresie, współpracowałam z zespołem prof. Marianny Turkiewicz nad opracowaniem metody **immobilizacji komórek bakterii antarktycznych** wytwarzających  $\beta$ -galaktozydazę oraz unieruchomieniem samego enzymu, w celu zastosowania tak wytworzonych biokatalizatorów do hydrolizy laktozy. Stąd moje współautorstwo publikacji pt. „Immobilized preparation of cold-adapted and halotolerant Antarctic  $\beta$ -galactosidase as a highly stable catalyst in lactose hydrolysis”, która ukazała się w 2007 roku w *FEMS Microbiol Ecol.* [A-4] – głównym autorem badań był wykonujący wówczas pracę doktorską, dr inż. Krzysztof Makowski. Profesor Marianna Turkiewicz – wybitna specjalistka w obszarze białek pochodzących z organizmów zimnolubnych - zaprosiła mnie do wspólnego przygotowania

jednego z rozdziałów do książki (monograficznej) zatytułowanej: *Cold-Adapted Yeasts. Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*. Rozdział ten dotyczy aktywnych w niskich temperaturach lipaz pochodzenia drożdżowego. Pierwsza edycja tej książki wydawnictwa Springer ukazała się w 2014 roku (edytorzy: Pietro Buzzini i Rosa Margesin) i zawiera rozdział 16, w przygotowaniu którego miałam największy udział, zatytułowany: „Cold-Active Yeast Lipases: Recent Issues and Future Prospects”.

Z kolei mój udział w publikacji z 2009 roku w *Carbohydrate Polymers* 78, 16-24 [A-5], jest owocem ścisłej współpracy z dr inż. K. Struszczyk-Świta w badaniach nad **wewnątrz-komórkowymi chitozanazami** wykrytymi w komórkach pleśni *Mucor*, ich izolacją i oczyszczaniem oraz wykorzystaniem preparatów tych enzymów do otrzymywania z chitozanu chitoooligomerów - związków, którymi interesuje się zarówno medycyna, jak i kosmetologia (nasze badania z tego zakresu opisane są też w cyklu monografii w *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, które ukazywały się od 2006 do 2010 roku [Zał. 5: M-11, -12, -13, -15]. Otrzymywanie preparatów enzymów chitozanolitycznych oraz ich wykorzystania do hydrolizy chitozanu dotyczą też patenty: PL 214332, PL 217339 i PL 217332, których jestem współautorem. Badania nad wytworzeniem w większej skali preparatów enzymów chitozanolitycznych oraz ich wykorzystaniem do otrzymywania oligomerów chitozanu dla kosmetologii były realizowane w ramach projektu Biotransformacje i wielokrotnie prezentowane na konferencjach naukowych w Polsce i za granicą (informacje w załączniku 5, pkt III-D).

Najnowsze badania nad enzymami biorącymi udział w rozkładzie/modyfikacji chityny i chitozanu zainicjowane zostały po wykryciu dwóch genów **deacetylaz chityny** w genomie szczepu *Mucor circinelloides* IBT-83 i ich syntezie. Po opracowaniu warunków heterologicznej ekspresji tych genów w komórkach *Pichia pastoris*, badania są rozwijane w ramach pracy doktorskiej pana mgr. inż. Michała Benedykta Kaczmarka, a ich główną ideą jest synteza multi-enzymatycznego kompleksu, którego zastosowanie ma umożliwić jednoetapową modyfikację substratów chitynowych i chitozanowych; przy czym jednoczesną ekspresję kilku genów kompleksu oparto o wirusowe, samo-procesujące sekwencje A2 (*self-processing A2 sequences*). Niektóre informacje z tych badań zawiera monografia [M-17] z 2016 roku w *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, której jestem współautorem.

Wcześniej interesowałam się bardziej praktycznym wykorzystywaniem mycelialnych preparatów z pleśni *Mucor* (które – jako całe komórki – mogą być źródłem wielu enzymów), w tym w **procesach biorafinacji i w ochronie środowiska**. Dlatego uczestniczyłam w licznych pracach mających na celu obniżenie kosztów preparatów enzymatycznych uzyskiwanych z pleśni *Mucor*, m.in. nad doбором warunków hodowli w pożywkach stałych komponowanych z odpadów przemysłu spożywczego (typu solid-state), oraz nad

poszukiwaniem tanich nośników do immobilizacji. Efektem tych prac są propozycje opisane w patentach PL 215087 i PL 215088 (których jestem pierwszym autorem) oraz w patentach zgłoszonych do UP w 2011 roku, tzn. po rozpoczęciu badań w ramach projektów Biomasa i Biotransformacje współfinansowanych ze środków unijnych (uzyskane patenty: PL 217695, PL 217686 oraz PL 217358-61). Wytworzone preparaty mycelialne zawierające aktywne chitozany i lipazy, zastosowane zostały z sukcesem m.in. do „wydobycia” **z odpadowych nasion marchwi olejków eterycznych** - cennych dla przemysłu spożywczego (aromat do zup i koncentratów, składnik napojów, bezalkoholowych i alkoholowych) i kosmetologii (gdyż zawierają  $\beta$ -kariofileny i działający bakterio- i grzybobójczo octan geranylu); współpraca z zespołem prof. Krzysztofa Śmigielskiego z Instytutu Chemii Żywności PŁ. Efektem tej współpracy jest publikacja w *Journal of Food Quality* [A-8], w której opisano zwiększenie wydajności wydobycia olejków, na drodze hydrodestylacji, z odpadowych nasion *Daucas carota*, po wstępnym ich traktowaniu (w zoptymalizowanych warunkach) preparatem enzymów z pleśni *Mucor circinelloides*. Uzyskane olejki zachowały podobny skład i cenne właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne. Do wspomaganiania procesu uzyskiwania olejków metodą hydrodestylacji zastosowane zostały także, z dużym powodzeniem, preparaty proteaz, w tym handlowy Protease 8.0 L<sup>®</sup>, czego efektem jest patent PL 223352 (2016), którego jestem także współautorem.

Enzymatyczne preparaty z pleśni *Mucor* (również te wytworzone w hodowli w złożu stałym, *solid-state*) wykorzystane zostały w większej skali do **wspomagania procesu bioremediacji** gleby zanieczyszczonej olejem napędowym, co wykonane zostało w ramach współpracy z dr inż. Olgą Marchut z Instytutu Biochemii Technicznej. Proces ten, z użyciem bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 lub dodatkowo *Achromobacter xylosoxidans* G21, wspomagany preparatem mycelialnym z pleśni *Mucor circinelloides* UD254 (szczep *aktywowany* undekanem) przebiegał efektywniej niż bez udziału tego preparatu, co jest tematem wspólnie przygotowanego patentu, PL 219884 (2015).

W okresie od 2010 do 2015 roku zaangażowana byłam głównie w badania, które wiązały się z realizacją dwóch dużych projektów POIG o akronimach Biomasa i Biotransformacje. W pierwszym projekcie, koordynowanym przez Politechnikę Łódzką, oprócz realizacji tematyki włączonej przeze mnie do głównego osiągnięcia naukowego (biokatalityczna konwersja olejów roślinnych w estry 2-metylobutyłowe - surowce do otrzymywania polioli), uczestniczyłam także w pracach nad uzyskiwaniem **nanowłókien celulozowych**, w tym nad poszukiwaniem enzymów przydatnych do **biorafinacji surowców lignocelulozowych** (zadanie 2.1), głównie enzymów oksydoredukcyjnych, efektywnych w degradacji lignin. Mój udział w tych pracach związany był z wcześniej zdobytym doświadczeniem w projekcie dotyczącym biotechnologicznej modyfikacji warstw węglowych (fazy grafitowej tych warstw),

co opisałam w autoreferacie. Wg mych ustaleń modyfikacje grafitu następowały pod wpływem działania (obok esteraz i dioksygenaz katecholowych), lakazy, peroksydaz i oksydaz (ligninowej i Mn-zależnej), tzn. enzymów powodujących dekompozycję zarówno zawartego w węglu brunatnym lignitu jak i roślinnych lignin. Efektem mego zaangażowania w prace w zadaniu 2.1 było opracowanie procedury rafinacji biomasy roślinnej pod kątem uzyskiwania nanowłókien celulozowych (głównie ze słomy lnianej) z wykorzystaniem wieloenzymowego preparatu z *Aspergillus niger* (źródło pektynaz, hemicelulaz i celulaz) oraz preparatu zawierającego lakazę, oksydazę i peroksydazę ligninową i Mn-zależną z nowo wyizolowanych szczepów pleśni. Technologia zastrzeżona patentami: PL 227785 (*Mucor hiemalis* AK1211), PL 227786 (*Alternaria* sp. AK0911) i PL 225276 (*Trichoderma* sp. QM9123). Podczas przygotowywania powyższych preparatów enzymatycznych (hodowle w podłożu płynnym i solid-state) zastosowaliśmy ozon (we współpracy z zespołem prof. Śmigielskiego) co obniżyło koszt etapu sterylizacji pożywek oraz zwiększyło wydajność wytwarzanych enzymów (patent PL 221763). Przegląd zagadnień obejmujących uzyskiwanie nanowłókien z biomasy celulozowej na drodze *top down* z zastosowaniem metod biotechnologicznych zawarty został w naszej publikacji [A-6], pt. „Nanotechnology – Methods of manufacturing cellulose nanofibers”, która ukazała się w 2012 roku w czasopiśmie z listy JRC (*Fibres and Textiles in Eastern Europe*). W 2016 roku w czasopiśmie *Biotechnology and Food Science* opublikowałam także (wraz z innymi współautorami) pracę przeglądową pt. „Laccases – enzymes with an unlimited potential” – efekt naszego zafascynowania tymi „niebieskimi” białkami enzymatycznymi podczas poszukiwania ich nowych źródeł. W pracy tej zawarte są najnowsze informacje na temat źródeł, genów i molekularnej budowy tych enzymów, szczegółowo opisane różnorodne reakcje, które są katalizowane przez lakazy. Podaliśmy wiele przykładów konkretnych aplikacji tych enzymów, w tym w przemyśle spożywczym, tekstylnym, przetwórstwa drewna, biorafineriach, farmacji, kosmetologii i wielu innych.

W projekcie Biomasa, w pierwszym okresie realizacji zadań 2.2 i 3.2, opracowałam warunki enzymatycznej konwersji olejów roślinnych (rzepakowego, słonecznikowego i sojowego) w tzw. **strukturyzowane triacyloglicerole** (sTG, zawierające nasycone kwasy tłuszczowe (stearynowy lub palmitynowy) w poz. sn-1,3), które w dalszych etapach miały być przetwarzane w polirole i stosowane do otrzymywania polimerów. Ustalona procedura (procesy ciągły lub półciągły katalizowane przez immobilizowane preparaty lipaz *Mucor*) zapewniała bardzo efektywną konwersję olejów w sTG (analiza produktów metodą Peiskera wykonywana przez laboratorium w UW-M, Olsztyn pod kier. Prof. M. Adamczaka), dlatego jej elementy zostały opatentowane (patrz lista patentów). Publikacja w przygotowaniu.



**Pozostałe publikacje niewchodzące w skład przewodu habilitacyjnego (czasopisma z bazy JCR):**

- [A-1] Szczęsna M.\***, Galas E., Bielecki S. (2001), PVA-biocatalyst with entrapped viable *Bacillus subtilis* cells, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 671-676; ISSN: 1381-1177.  
MNiSW – 25 pkt.(A), IF<sub>2001</sub> = 1,480, Q2, Cit - 11
- [A-2] Szczęsna M.\***, Galas E., (2001) *Bacillus subtilis* cells immobilised in PVA-cryogels, , *Biomolecular Engineering* 17, 55-63, ISSN: 1871-6784 (od 2008 kontynuacja czasopisma pt. *New Biotechnology*)  
MNiSW – 30 pkt. (A), IF<sub>2001</sub> = 1,214 , Q2, Cit – 31.
- [A-3] Antczak T.**, Graczyk J., **Szczęsna-Antczak M.**, Bielecki S., (2002), Activation of *Mucor circinelloides* lipase in organic medium. *J. Mol. Catalysis B; Enzymatic*, 19-20, 287-294.  
(MNiSW - 27 pkt., IF<sub>2002</sub> = 1,973), Q3, Cit – 14.
- [A-4] Makowski K.**, Białkowska A., **Szczęsna-Antczak M.**, Kalinowska H., Kur J., Cieśliński H., Turkiewicz M. (2007) Immobilized preparation of cold-adapted and halotolerant Antarctic  $\beta$ -galactosidase as a highly stable catalyst in lactose hydrolysis. *FEMS Microbiol Ecol.*, 59(2), 535-542.  
(Punktacja MNiSW = 35 pkt., IF<sub>2007</sub> = 3,039), Q2, Cit – 16.
- [A-5] Struszczyk K.**, **Szczęsna-Antczak M.**, Pomianowska E., Walczak M., Antczak T., (2009), Isolation and purification of *Mucor circinelloides* intracellular chitosanolytic enzymes, *Carbohydrate Polymers*, 78, 16-24.  
(Punktacja MNiSW = 32 pkt., IF<sub>2009</sub> = 1,782), Q1, Cit - 12
- [A-6] Szczęsna-Antczak M.**, Kazimierczak J., Antczak T. (2012), Nanotechnology – Methods of manufacturing cellulose nanofibers, *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 20(2), 8-12; ISSN 1230-3666  
(MNiSW – 25 pkt.(A), IF<sub>2012</sub> = 0,801), Q3, Cit - 14.
- [A-7] Śmigielski K.B.**, Majewska M., **Szczęsna-Antczak M.**, Kunicka-Styczyńska A., Stańczyk Ł. (2014) The effect of enzyme-assisted maceration on yield, quality and bioactivity of essential oil from waste carrot seeds (*Daucus carota*), *Journal of Food Quality* 37 (4), 219-228; ISSN 0146-9428  
(Punktacja MNiSW = 20 pkt. (A), IF<sub>2014</sub> = 0,838), Q4, Cit - 2

**Projekty badawcze realizowane z moim udziałem, w porządku chronologicznym (więcej informacji o projektach podałam w załączniku 5):**

- 2002 – 2004: Projekt zamawiany, PBZ KBN 021/PO6/99/22 - wykonawca
- 2002 – 2004: Projekt zamawiany, PBZ KBN 021/PO6/99/25 – wykonawca
- 2002 – 2005: Projekt badawczy KBN Nr 3 PO4B 00 423 – kierownik projektu
- 2007 – 2010: Projekt badawczy Nr N N205 1448 33 – kierownik projektu
- 2010 – 2014: Projekt POIG 01.03.01-00-158/09 wykonawca w zadaniu 7
- 2011 – 2012: Projekt POIG 01.01.02-14-034/09-00, zadanie IV.4.1 (wykonawca)
- 2010 – 2015: Projekt POIG 01.01.02-10-123/09 (BIOMASA) – wykonawca w trzech zadaniach projektu: 2.1; 2.2 i 3.2 (**obecnie pełnię rolę koordynatora w okresie trwałości projektu, do 31.07.2020 roku**)

**Efektorem aplikacyjnych badań, w które byłam zaangażowana (również w ramach w/w projektów badawczych) jest współautorstwo technologii, które znajdują się w Ofercie Technologicznej Centrum Współpracy z Gospodarką, Innowacji i Transferu Technologii PŁ, na stronie: <http://www.innowacjedlabiznesu.com/?url=listTechnologies>. Na trzydzieści ofert technologii z Instytutu Biochemii Technicznej – jestem współautorem dwudziestu jeden.**

**Przyznane przez UP patenty, których jestem współautorem (pogrupowane tematycznie), pełne informacje o patentach, chronologicznie w Załączniku 5:**

- Patent na sposób wytwarzania 2,3-butanodiolu przez immobilizowane w PVA bakterie rodzaju *Bacillus*:  
Patent **PL 227253**, dn. 30.11.2017 (Data zgłoszenia nr 412465 dn.25.05.2015)
- Patent na sposób izolowania olejku eterycznego z nasion marchwi z zastosowaniem preparatu enzymatycznego (proteaz):  
Patent **PL 223352**, dn. 31.10.2016. (Data zgłoszenia nr 404423 dn.24.06.2013)
- Patent na sposób otrzymywania preparatu enzymów oraz sposób bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejem napędowym wspomaganą tym preparatem (*Mucor*):  
Patent **PL 219884**, dn.31.07.2015. (Data zgłoszenia nr 399980 dn.16.07.2012)
- Patenty zastrzegające sposoby wykorzystania immobilizowanych preparatów lipaz pleśni *Mucor* do katalizy reakcji syntezy estrów kwasów tłuszczowych i alkoholi alifatycznych (w tym estrów 2-metylobutylowych, etylowych i metylowych):

1. Patent **PL 228104**, dn. 28.02.2018. (Data zgłoszenia nr 408917 dn.18.07.2014).
  2. Patent **PL 206174**, dn. 30.07.2010. (Data zgłoszenia nr 382603 dn. 08.06.2007)
  3. Patent **PL 206173**, dn. 30.07. 2010 (Data zgłoszenia nr 382602 dn.08.06.2007)
- Patenty dotyczące sposobów otrzymywania preparatów enzymów oksydoredukcyjnych w oparciu o nowo wyizolowane szczepy pleśni (efekt badań w ramach zadania 2.1, projektu POIG 01.01.02-10-123/09, o akronimie Biomasa)
    1. Patent **PL 227786**, dn. 31.01.2018. (Data zgłoszenia nr 404540 dn.02.07.2013)
    2. Patent **PL 227785**, dn. 31.01.2018. (Data zgłoszenia nr 404539 dn.02.07.2013).
    3. Patent **PL 225276**, dn. 31.03.2017 (Data zgłoszenia nr 404542 dn.02.07.2013).
  - Patenty dotyczące metod i warunków wytwarzania strukturyzowanych triacylogliceroli (z podstawionymi dwoma cząsteczkami nasyconych kwasów tłuszczowych w pozycji 1 i 3 glicerolu) w procesach katalizowanych przez lipazy zawarte w komórkach pleśni *Mucor*, w tym w warunkach ogrzewania mikrofalowego i z dodatkami aktywatorów lipaz (efekty badań w ramach zadania 3.2 projektu POIG 01.01.02-10-123/09):
    1. Patent **PL 224013**, dn. 30.11.2016 (Data zgłoszenia nr 414604 wydzielenie ze zgłoszenia 403181, dn.18.03.2013)
    2. Patent **PL 224012**, dn. 30.11.2016. (Data zgłoszenia nr 414462 wydzielenie ze zgłoszenia 403181, dn.18.03.2013)
    3. Patent **PL 222934**, dn. 30.09.2016. (Data zgłoszenia nr 403181 dn.18.03.2013)
    4. Patent **PL 222870**, dn. 30.09.2016. (Data zgłoszenia nr 403182 dn.18.03.2013)
    5. Patent **PL 222419**, dn. 29.07.2016. (Data zgłoszenia nr 403185 dn.18.03.2013)
    6. Patent **PL 222418**, dn. 29.07.2016. (Data zgłoszenia nr 403180 dn.18.03.2013).
  - Patenty dotyczące metody otrzymywania nierozpuszczalnego preparatu lipazy w oparciu o komórki pleśni *Mucor* oraz ich wykorzystania w konwersji odpadów z przemysłu tłuszczowego w estry (źródło potencjalnych substancji *triboaktywnych*) - efekt współpracy z ITeE PIB w ramach projektu POIG 01.01.02-14-034/09-00, zadanie IV.4.1.
    1. Patent **PL 227592**, dn. 31.01.2018. (Data zgłoszenia nr 404594 dn.08.07.2013)
    2. Patent **PL 227591**, dn. 31.01.2018 (Data zgłoszenia nr 404593 dn.08.07.2013)
  - Patenty dotyczące sposobów otrzymywania nierozpuszczalnych preparatów enzymatycznych z użyciem różnych nośników, w oparciu o szczepy pleśni *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus* (efekt badań w ramach projektu POIG 01.01.02-10-123/09 (Biomasa) oraz projektu POIG 01.03.01-00-158/09 (Biotransformacje)):
    1. Patent **PL 217695**, dn. 29.08.2014. (Data zgłoszenia nr 396200 dn. 05.09.2011)
    2. Patent **PL 217686**, dn. 29.08.2014. (Data zgłoszenia nr 396201 dn. 05.09.2011).

3. Patent **PL 217361**, dn. 31.07.2014. (Data zgłoszenia nr 396517 dn. 03.10.2011).
  4. Patent **PL 217360**, dn. 31.07.2014. (Data zgłoszenia nr 396516 dn. 03.10.2011).
  5. Patent **PL 217359**, dn. 31.07.2014. (Data zgłoszenia nr 396515 dn. 03.10.2011).
  6. Patent **PL 217358**, dn. 31.07.2014. (Data zgłoszenia nr 396514 dn. 03.10.2011).
- Patenty na nowe sposoby wyjąławiania i modyfikacji pożywek hodowlanych dla pleśni rodzaju *Mucor* i *Aspergillus* z użyciem ozonu oraz otrzymywania tym sposobem preparatów lipaz i enzymów przydatnych w biorafinacji biomasy roślinnej – efekt badań w ramach zadań 2.1 oraz 2.2 projektu Biomasa, POIG 01.01.02-10-123/09 (współpraca z zespołem prof. K. Śmigielskiego, PŁ)
    1. Patent **PL 222527**, dn. 31.08.2016. (Data zgłoszenia nr 398613 dn. 26.03.2012)
    2. Patent **PL 221763**, dn. 31.05.2016. (Data zgłoszenia nr 398611 dn. 26.03.2012).
    3. Patent **PL 221762**, dn. 31.05.2016. (Data zgłoszenia nr 398612 dn. 26.03.2012).
  - Patenty na sposoby otrzymywania nierozpuszczalnych preparatów enzymów katalizujących hydrolizę chitozanu (we współpracy z dr Katarzyną Struszczyk-Świta, PŁ)
    1. Patent **PL 217339**, dn. 31.07.2014. (Data zgłoszenia nr 395967 dn. 16.08.2011)
    2. Patent **PL 217332**, dn. 31.07.2014. (Data zgłoszenia nr 395968 dn. 16.08.2011)
    3. Patent **PL 214332**, dn. 31.07.2013. (Data zgłoszenia nr 385093 dn. 05.05.2008)..
  - Patenty na metody otrzymywania tanich, immobilizowanych preparatów lipaz w hodowlach pleśni *Mucor circinelloides* i *M. racemosus* na złożu stałym (*solid state*) sporządzonym z odpadów przemysłu spożywczego (m.in. śruta kukurydziana i wyciąki rzepakowe, sojowe lub słonecznikowe)
    1. Patent **PL 215088**, dn. 31.10.2013 (Data zgłoszenia nr 391955 dn.26.07.2010)
    2. Patent **PL 215087**, dn. 31.10.2013 (Data zgłoszenia nr 391954 dn.26.07.2010).
  - Opatentowane metody wytwarzania oleju mikrobiologicznego w oparciu o hodowle pleśni *Mucor* oraz konwersji tych olejów *in situ* (podczas ekstrakcji z komórek) w estry alkoholi alifatycznych:
    1. **Patent PL 218192 [HP-1], przyznany dn. 31.10.2014 (Data zgłoszenia nr 385598 dn.07.07.2008)**
    2. Patent **PL 204912**, dn. 26.02.2010 (Data zgłoszenia nr 367564 dn.26.04.2004)
    3. Patent **PL 204911**, dn. 26.02.2010 (Data zgłoszenia nr 367563 dn.26.04.2004)
  - Patenty dotyczące metod immobilizacji w nośnikach żelowych mycelium pleśni *Mucor* będącego źródłem lipaz:
    1. Patent **PL 204909**, dn. 26.02.2010 (Data zgłoszenia nr 366413 dn.18.03.2004)
    2. Patent **PL 204826**, dn. 26.02.2010. (Data zgłoszenia nr 366414 dn.18.03.2004)

- Patenty dotyczące sposobów modyfikacji twardych powłok węglowych oraz grafitu metodami biotechnologicznymi (z wykorzystaniem drobnoustrojów, w tym pleśni, oraz ich metabolitów) – współautorstwo zespołu prof. S. Mitury z Wydz. Mechanicznego PŁ:
  1. Patent **PL 206644**, dn. 30.09.2010 (Data zgłoszenia nr 375127 dn.16.05.2005).
  2. Patent **PL 206643**, dn. 30.09.2010 (Data zgłoszenia nr 375126 dn.16.05.2005).
  3. Patent **PL 206642**, dn. 30.09.2010 (Data zgłoszenia nr 375125 dn.15.05.2005)
  4. Patent **PL 206641**, dn. 30.09.2010 (Data zgłoszenia nr 375124 dn.16.05.2005)
- Patenty na nowe sposoby wytwarzania estrów sacharozy i glukozy oraz kwasów tłuszczowych
  1. Patent **PL 205684**, dn. 26.02.2010 (Data zgłoszenia nr 364846 dn.05.02.2004)
  2. Patent **PL 204825**, dn. 26.02.2010 (Data zgłoszenia nr 364845 dn.05.02.2004)



.....