

Załącznik nr 3

Do wniosku habilitacyjnego

Autoreferat w języku polskim

dr inż Maurycy Daroch

Spis treści

1. Imię i nazwisko	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:	2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych:.....	2
a. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:.....	3
b. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy:.....	3
c. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
1) Glony eukariotyczne jako surowce do produkcji biopaliw i produktów wysokiej wartości	
2) Sinice prokariotyczne jako organizmy bazowe do waloryzacji CO ₂ i szczepy biorafineryjne do produkcji biopaliw i produktów wysokiej wartości	14
3) Podsumowanie całości osiągnięcia	21
4) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).....	25
a. Uczestnictwo w zespołach redakcyjnych i konkursowych oraz wkład u rozwój literatury branżowej.....	25
b. Udział w konferencjach naukowych i towarzystwach naukowych	25
c. Nagrody	26
d. Dydaktyka.....	26
f. Osiągnięcia naukowe przed uzyskaniem stopnia doktora	29
Piśmiennictwo	32

1. Imię i nazwisko

Maurycy Daroch

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

2013 **Certyfikowane szkolenie podoktorskie** (Chińska Rada Szkoleń Podoktorskich)

Dyscyplina: Nauka o i inżynieria środowiska

Szkoła Nauk o i Inżynierii Środowiska

Uniwersytet Pekijski, Chiny

Opiekun: prof. Jay Jiayang Cheng

2011 **Doktor nauk biologicznych**

Szkoła Nauk o Życiu

Uniwersytet w Liverpoolu, Wielka Brytania

Temat rozprawy doktorskiej: Oksydoreduktazy *Stropharia aeruginosa*

Promotorowie: Dr Lesley Ann Iwanejko i Dr Andrew Derek Bates

2006 **Magister inżynier biotechnolog**

Specjalizacja: Biochemia Techniczna i Biotechnologia Molekularna

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka, Polska

Tytuł pracy magisterskiej: Interdyscyplinarne studium zimnolubnej lipazy/esterazy klasy GDSL z *Pseudoalteromonas sp. 643A*

Opiekun pracy: prof. dr hab. Marianna Turkiewicz

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych:

2015- **Profesor Nadzwyczajny Uniwersytetu Pekieskiego**

obecnie Uniwersytet Pekieski, Szkoła Środowiska i Energetyki w Shenzhen

2013-2015 **Adiunkt**

Uniwersytet Pekieski, Szkoła Środowiska i Energetyki w Shenzhen

2011-2013 Stażysta podoktorski

Uniwersytet Pekijski, Szkoła Nauk i Inżynierii Środowiska

Uniwersytet Pekijski, Szkoła Środowiska i Energetyki w Shenzhen

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/artystycznego:

Cykl dziesięciu powiązanych ze sobą tematycznie publikacji o zbiorczym tytule

„ORGANIZMY FOTOSYNTETYZUJĄCE JAKO SUROWCE I MIKROBIOLOGICZNE FABRYKI KOMÓRKOWE DLA BIORAFINERII”

b. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy:

Lista powiązanych tematycznie publikacji stanowiących podstawę osiągnięcia w dziedzinie nauk technicznych w dyscyplinie biotechnologia.

[H-1] Daroch, M., Geng, S., and Wang G.Y.* (2013) Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks, *Applied Energy* 102, 1371-1381.

MNiSW - 40

IF₂₀₁₃= 5.261

IF_{5y}=7.888

[H-2] Daroch, M., Shao, C., Liu, Y., Geng, S., and Cheng, J.J.* (2013) Induction of lipids and resultant FAME profiles of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta, *Bioresource Technology* 146, 192-199

MNiSW - 45

IF₂₀₁₃= 5.039

IF_{5y}=5.978

[H-3] Guo, H.¹, Daroch, M.¹, Liu, L., Qiu, G., Geng, S., Wang, G.* (2013). Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta. *Bioresource Technol.* 127, 422-428

MNiSW - 45

IF₂₀₁₃= 5.039

IF_{5y}=5.978

[H-4] Jia, Z., Liu, Y., **Daroch, M.***, Geng, S., Cheng, J.J.* (2014). Screening, growth medium optimisation and heterotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 1667–1679

MNiSW – 20 $IF_{2014}= 1.735$ $IF_{5y}=1.919$

[H-5] Li, J., Liu, Y., Cheng, J.J., Mos, M., **Daroch, M.*** (2015). Biological potential of microalgae in China for biorefinery-based production of biofuels and high-value compounds. *N. Biotechnol.* 32, 588–596.

MNiSW – 30 $IF_{2015}= 3.199$ $IF_{5y}=3.454$

[H-6] Shah, M.M.R., Liang, Y., Cheng, J.J., **Daroch, M.*** (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high-value commercial products. *Front. Plant Sci.* 7:531.

MNiSW - 40 $IF_{2016}= 4.291$ $IF_{5y}=3.354$

[H-7] Liang Y.M.¹, Kaczmarek M.B.¹, Kasprzak A.K., Tang J., Shah M.M.R., Jin P., Klepacz-Smółka A., Cheng J.J., Ledakowicz S., **Daroch M.*** (2018). Thermosynechococcaceae as a source of thermostable C-phycoyanins: properties and molecular insights *Algal Research* 35 223-235

MNiSW - 40 $IF_{2017}= 3.745$ $IF_{5y}=4.475$

[H-8] Tang J., Liang Y.M., Jiang D., Li L.H., Luo Y.F., Shah M.M.R., **Daroch M.*** (2018) Temperature-controlled thermophilic bacterial communities in hot springs of western Sichuan, China. *BMC Microbiology* 18: 134

MNiSW – 30 $IF_{2017}= 1.658,$ $IF_{5y}=1.818$

[H-9] Tang J.¹, Jiang D.¹, Luo Y.F, Liang Y.M., Li L.H., Shah M.M.R., **Daroch M.*** (2018). Potential new genera of cyanobacterial strains isolated from thermal springs of western Sichuan, China. *Algal Research* 31 14–20

MNiSW - 40 $IF_{2017}= 3.745,$ $IF_{5y}=4.475$

[H-10] Liang Y.M., Tang J., Luo Y.F, Kaczmarek M.B., Li X.K., **Daroch M.*** (2019) *Thermosynechococcus as a thermophilic photosynthetic microbial cell factory for CO₂ utilisation. Bioresource Technol. 278, 255-265*

MNIŚW - 45

IF₂₀₁₇= 5.807IF_{5y}=5.978

* Corresponding author

¹ Authors contributed equally to the publication

c. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

1) Glony eukariotyczne jako surowce do produkcji biopaliw i produktów wysokiej wartości

Wzrost stężenia CO₂ w atmosferze i związane z nim zmiany klimatu są jednymi z najbardziej poważnych problemów z jakimi ludzkość musi się zmierzyć w najbliższych dekadach. Problem ten został po raz kolejny podkreślony w najnowszym wydaniu raportu IPCC (International Panel on Climate Change – Międzynarodowy Panel ds. Zmian Klimatu) który opisuje konsekwencje globalnego ocieplenia klimatu o 1.5°C [1]. Ponadto zdecydowana większość gospodarek na świecie dotknięta jest ogromnymi dysproporcjami w rozmieszczeniu geograficznym kluczowych zasobów energetycznych takich jak ropa naftowa oraz gaz ziemny. Zasoby te są niezwykle obfite jedynie w niewielu lokalizacjach co prowadzi do znaczących napięć pomiędzy państwami. Od dłuższego czasu oczekuje się, iż biopaliwa i biorafinerie będą w stanie w pewnym stopniu złagodzić te problemy i pozwolić na stworzenie bardziej zrównoważonych gospodarek [2, 3, H-1]. Biorafinerie takie wymagać będą jednak surowców pochodzących z organizmów fotosyntetyzujących zdolnych do pobierania energii pierwotnej ze światła słonecznego. Do chwili obecnej wyróżniono trzy generacje takich surowców. Tak zwane surowce pierwszej generacji takie jak kukurydza, soja lub rzepak są roślinami jadalnymi mającymi za sobą długi proces udoskonalania i zastosowań komercyjnych. Zastosowanie tych surowców do produkcji biopaliw i biochemikaliów wiąże się jednak z bezpośrednim współzawodnictwem o te rośliny pomiędzy zastosowaniami

paliwowymi i żywieniowymi co powodować może wzrost cen produktów żywnościowych a nawet ich braki. Szczegółowe badania analizy cyklu życia procesów konwersji surowców pierwszej generacji do biopaliw wykazały, iż zazwyczaj wiążą się one z niskimi zwrotami energii w stosunku do energii zainwestowanej (Energy Return On Investment - EROI) spowodowanymi m.in. wysokimi kosztami energetycznymi niezbędnymi do uprawy tychże roślin [4, 5]. Jednym ze sposobów rozwiązania tego problemu było zastosowanie szybkorosnących lignocelulozowych roślin energetycznych takich jak miskant, wierzba lub topola [**H-1**, **P-1**]. Rośliny te, zwane także roślinami energetycznymi drugiej generacji, posiadają znaczące zalety w porównaniu do roślin generacji pierwszej, przede wszystkim wyższą efektywność wykorzystania zasobów oraz brak bezpośredniego współzawodnictwa z źródłami żywności. Pojawiły się jednak inne problemy które znacząco ograniczyły szeroki rozwój roślin energetycznych drugiej generacji i ich zastosowanie energetyczne. Po pierwsze, ze względu na oporność lignocelulozy na rozfrakcjonowanie i stosunkowo niską biodegradowalność ligniny, metody termochemiczne wydają się bardziej optymalną metodą konwersji tego typu biomasy [**P-2**]. Te z kolei, by osiągnąć efekt skali wymagają zazwyczaj instalacji dużych rozmiarów, które wymagają dużych areatów uprawy tych roślin co w wielu lokalizacjach jest niemożliwe, lub areaty te są już zagospodarowane przez uprawy roślin jadalnych. Po drugie, dwa główne biopaliwa, które zostały już skomercjalizowane to bioetanol i biodiesel. Bioetanol można otrzymać z lignocelulozy poprzez jedną z dwóch głównych metod: biochemicznie poprzez fermentację lub termochemicznie poprzez gazyfikację i syntezę Fishera-Tropscha [**P-2**]. Pierwsza z tych metod wiąże się z problemem oporności lignocelulozy na scukrzanie i pomimo wielu prób komercjalizacji tej technologii w ostatnich latach, wyniki nadal są dalekie od oczekiwań [6]. Druga z metod wydaje się jeszcze bardziej problematyczna i wdrażanie wielkoskalowej technologii gazyfikacji biomasy kończyło się w ostatnich latach niepowodzeniami [7]. Biodiesel z kolei nie może być efektywnie produkowany z roślin drugiej generacji, gdyż rośliny te nie gromadzą swoich rezerw energii biologicznej w trójglicerydach, nie tworzą więc podstawowego surowca do reakcji transestryfikacji. W poszukiwaniu alternatywnego źródła biomasy uwaga została zwrócona ku roślinom trzeciej generacji. Uważa się, że rośliny energetyczne trzeciej generacji tj. glony, wodorosty oraz sinice mają istotne zalety w porównaniu do roślin energetycznych pierwszej i drugiej generacji [8]. Po pierwsze te organizmy wodne nie wymagają ziemi ornej do ich uprawy a część z nich można uprawiać w morzu. Ponadto wiele

z tych organizmów bardzo dobrze rośnie w wodzie zasolonej lub brachicznej a nawet w ściekach. Powoduje to, iż rośliny te pod wieloma względami są bardziej optymalne od roślin lądowych które wymagają do uprawy wody słodkiej. Cechy te w połączeniu z wydajnymi wielkoskalowymi systemami ich uprawy mogłyby spowodować, że surowce trzeciej generacji byłyby optymalnym źródłem biomasy [9]. Po drugie, glony eukariotyczne mają tendencje do gromadzenia rezerw energii komórkowej w jednej z dwóch postaci: jako trójglicerydy (glony oleiste), lub jako skrobię (glony skrobiowe). Każdy z tych dwóch związków można bezproblemowo zastosować w obecnie skomercjalizowanych technologiach produkcji biopaliw tj. produkcji bioetanolu z surowców bogatych w skrobię (np. kukurydza, pszenica, ziemniaki), lub też produkcji biodiesla w wyniku reakcji transestryfikacji trójglicerydów do ich estrów metylowych [P-2]. Sinice z kolei mają tendencje do gromadzenia rezerw energii komórkowej w postaci glikogenu [10], który jest kompatybilny z procesami technologicznymi opracowanymi dla skrobi [P-2]. Wodorosty wydają się na chwilę obecną najbardziej problematycznym i niekompatybilnym z surowców trzeciej generacji [H-1]

Biorafinerie są zintegrowanymi obiektami przetwarzania surowców biologicznych [2, 11]. Obiekty te rządzą się podobnymi zasadami do klasycznych rafinerii petrochemicznych tj. mają na celu maksymalizację wolumenu i wartości produkcji przy jednoczesnej minimalizacji odpadów. Dzięki kaskadowemu podejściu do przetwarzania biomasy zaczynając od produktów wysokiej wartości, ale niskich wolumenach takich jak witaminy, nutraceutyki lub chemikalia specjalistyczne, skończywszy na produktach nisko marżowych, ale o dużym wolumenie takich jak biopaliwa, znaczące zyski ekonomiczne stają się możliwe. Idealna biorafineria jest obiektem o prawie bezodpadowej produkcji biopaliw, przy minimalizacji strat węgla, azotu i składników odżywczych. Biorafineria taka wymaga jednak odpowiedniego doboru szczepów które są w stanie syntetyzować produkty wysokiej wartości oraz dobrej jakości biomasy jako surowca do produkcji biopaliw. Organizmy fotosyntetyzujące wydają się być idealnym rozwiązaniem, aby zapewnić zarówno jedne jak i drugie.

Zainteresowanie rozwojem biopaliw i produktów z glonów osiągnęło swój szczyt na przełomie pierwszej i drugiej dekady XXI wieku. W okresie tym wiele projektów badawczych i rozwojowych zostało wykonanych na świecie zarówno przez podmioty publiczne jak i

prywatne. W tym właśnie okresie postanowiłem zająć się rozwojem produkcji biopaliw i produktów wysokiej wartości z surowców trzeciej generacji. Badania te prowadziłem we współtworzonym przeze mnie Laboratorium Rozwoju Biopaliw Glonowych w Szkole Energetyki i Środowiska Uniwersytetu Pekińskiego na kampusie w Shenzhen (PKU SEE), początkowo jako stażysta podoktorski a następnie jako adiunkt w tej samej instytucji.

Badania moje rozpocząłem od przeglądu najnowszej literatury (z roku 2012) w problematyce światowych osiągnięć w produkcji biopaliw z surowców trzeciej generacji. Wyniki te opublikowałem w publikacji przeglądowej **H-1** "Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks". Artykuł ten osiągnął dość dużą popularność w środowisku branżowym. Stan na 16.01.2019 wykazał 160 cytowań tej publikacji w Web of Science i został wyróżniony na podstawie danych scjentometrycznych jako **top 1% w swojej dyscyplinie naukowej** w roku opublikowania na podstawie indeksu cytowań. Jest to jedna z dwóch moich publikacji, która osiągnęła takie parametry.

Na podstawie tego przeglądu literatury wyciągnąłem **dwa następujące wnioski**. Po pierwsze najbardziej efektywnymi metodami produkcji biopaliw z glonów były: **fermentacja glonów do bioetanolu oraz produkcja biodiesla w wyniku transestryfikacji biomasy metodą *in situ***. Po drugie uznałem, iż prawdziwy przełom w produkcji biopaliw wiązać się będzie z zastosowaniem **inżynierii metabolicznej organizmów fotosyntetyzujących, celem metabolicznego spięcia procesów fotosyntezy oraz produkcji i sekrecji biopaliw**. Spowoduje to znaczne uproszczenie operacji jednostkowych związanych z wytwarzaniem tych biopaliw.

Rozpocząłem dwa kierunki badań: w dziedzinie bioetanolu oraz biodiesla mając jako **długoterminowy cel inżynierię metaboliczną**, która w kolejnych latach stanie się moją kluczową domeną pracy. W pierwszej połowie 2012 roku Laboratorium Rozwoju Biopaliw Glonowych w Szkole Energetyki i Środowiska Uniwersytetu Pekińskiego było dopiero co powstałą jednostką, która wymagała dużego wysiłku organizacyjnego takiego jak aranżacja przestrzeni, zakup sprzętu, zebranie materiału biologicznego i **stworzenie Kolekcji Glonów Uniwersytetu Pekińskiego (Peking University Algae Collection (PKUAC))**. Moim zadaniem było zajęcie się ostatnim z tych zadań a przede wszystkim screeningiem tej kolekcji w celu produkcji biopaliw, głównie biodiesla. Wyniki tych badań tworzą ciąg trzech publikacji **H-2, H-3, H-4** i są zamknięte artykułem przeglądowym **H-5**, który podsumowuje te badania i

wskazuje zalecenia na przyszłość. **Miałem wiodący wpływ na stworzenie tego cyklu artykułów** i byłem bezpośrednio odpowiedzialny za następujące aspekty tych prac: projektowanie eksperymentów i wybór metod, hodowla i screening glonów, wykonanie analiz instrumentalnych takich jak mikroskopia fluorescencyjna, analiza FTIR węglowodanów, analiza GC lipidów i etanolu, analizy filogenetyczne. Do moich obowiązków należały także, zebranie i analiza literatury, wyciąganie wniosków z zebranych danych, wiodąca rola nad całym cyklem wydawniczym tych publikacji tj. przygotowanie wersji roboczych manuskryptów, rycin, tabel, komunikacja z zespołem redaktorskim i recenzentami oraz wiele innych. Ta seria publikacji koncentruje się na identyfikacji i analizie glonów które mogą zostać wykorzystane do produkcji biopaliw i na próbach maksymalizacji produktywności przy pomocy klasycznych technik takich jak optymalizacja warunków hodowli lub metod konwersji biomasy.

Pierwsza z tych publikacji koncentruje się na produkcji bioetanolu. Badania przedstawione w publikacji **H-2** opisują izolację, identyfikację taksonomiczną, analizę filogenetyczną, screening oraz hodowlę jednych z pierwszych szczepów należących do kolekcji PKUAC. Dwa szczepy z tej kolekcji *Mychonastes afer* PKUAC 9 i *Scenedesmus abundans* PKUAC 12 zostały zastosowane jako surowce do produkcji bioetanolu. Był to jeden z pierwszych artykułów opisujących produkcję bioetanolu z surowców glonowych. Publikacja ta opisuje monitoring akumulacji węglowodanów u tych szczepów w oparciu o spektroskopię FTIR. Przy pomocy spektroskopii zidentyfikowano wczesną fazę stacjonarną jako optymalną dla zbioru biomasy z uwagi na maksymalną akumulację węglowodanów. Obydwa szczepy hodowane były w hodowlach napowietrzanych i poddawane różnym rodzajom obróbki wstępnej używając zarówno hydrolizy kwasowej przy użyciu kwasu siarkowego oraz komercyjnie dostępnych preparatów enzymatycznych: α -amylazy i celulazy. Na podstawie różnych wyników scukrzania dla obydwu szczepów uznano, że ich profile węglowodanowe znacząco się od siebie różnią. Hydrolizaty te zastosowano następnie do produkcji bioetanolu, jednakże osiągnięte wydajności poddawały w wątpliwość celowość prowadzenia dalszych badań. [**H-1, H-2**]. Wyniki takie można przypisać stosunkowo dużej ilości hemicelulozy w obydwu szczepach. Ponadto, szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* Hansen zastosowany w tych badaniach nie jest optymalnym szczepem do fermentacji pentoz, w przeciwieństwie do transgenicznych szczepów *E. coli* zastosowanych w badaniach z najlepszymi wynikami [**H-1,**

H-2]. Najważniejszym osiągnięciem tej części badań było wyizolowanie i zdeponowanie w kolekcji PKUAC pierwszych osiemnastu unikalnych szczepów glonów należących do Chlorellaceae, Scotielloccystoidaceae, Neochloridaceae, Selenastraceae oraz Scenedesmaceae. Liczba ta w kolejnych latach wzrosła sześciokrotnie.

Kontynuując badania nad biopaliwami skierowałem swoją uwagę na maksymalizację produkcji lipidów oraz zastosowanie biomasy glonów oleistych do produkcji biodiesla przy zastosowaniu metody transestryfikacji *in situ* [**H-3, H-4**]. Kontynuowałem też prace nad powiększeniem kolekcji glonów [**H-3**]. Kolejnych trzydzieści siedem szczepów należących do rodzin Chlorellaceae, Scotielloccystoidaceae, Scenedesmaceae, Selenastraceae, Micractiniaceae, Coccomyxaceae, oraz Trebouxiaceae zostało zdeponowanych w PKUAC. Szczepy te poddałem screeningowi mikroskopowemu celem identyfikacji szczepów dających wysokie plony biomasy i o wysokiej produktywności lipidów. Spośród analizowanych szczepów *Hindakia sp.* PKUAC 169 wybrana została do kolejnego etapu badań. Szczep ten jest jednokomórkowym owalnym glonem o średnicy ok 3-4 μm i był trzecim najbardziej produktywnym po szczepach *Chlorella sp.* PKUAC 166 i *Chlorella sp.* PKUAC 138, jeżeli chodzi o wydajność produkcji biomasy podczas hodowli w podłożu BG-11. To co wykazałem i jest bardzo istotne, szczep ten był jedynym, który pozytywnie reagował na obydwie metody indukcji produktywności lipidów tj. w warunkach głodu azotowego oraz przy zastosowaniu indukcji wysokim stężeniem soli [**H-3**]. Dalsze badania wykazały, że zastosowanie indukcji wysokim stężeniem soli w szczepie *Hindakia sp.* PKUAC 169 daje lepsze rezultaty aniżeli standardowo stosowany głód azotowy. Produktywność lipidów przez komórki indukowane wysokim stężeniem soli była trzykrotnie większa niż komórek poddanych głodowi azotowemu. Co najważniejsze lipidy wyizolowane w wybranego przeze mnie szczepu poddanego indukcji wysokim stężeniem soli posiadały optymalny profil do produkcji biodiesla składający się głównie z kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego C14 do C18. Co równie ważne, sumaryczna ilość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych była poniżej limitu 12% ustalonego przez unijny standard EN14214 wykazując możliwość zastosowania tego szczepu jako surowca do produkcji biodiesla.

Kolekcja glonów eukariotycznych została powiększona po raz kolejny [**P-3, publikacja w języku chińskim**] osiągając osiemdziesiąt dziewięć unikalnych szczepów. Szczepy te zostały następnie poddane screeningowi w poszukiwaniu glonów heterotroficznych. Niektóre z

glonów, na przykład z gatunku *Chlorella* są zdolne do wzrostu w warunkach heterotroficznych i wiąże się to ze zwiększoną, od dziesięciu do kilkuset razy większą, produktywnością lipidów względem tych samych szczepów hodowanych w warunkach autotroficznych [12]. Postanowiłem zbadać czy szczepy z kolekcji PKUAC wykazują podobny wzrost produktywności lipidów. Zdolność szczepów do wzrostu w warunkach pełnej heterotrofii była testowana na podłożu Shihira-Ishikawa Kase (S-IK) zawierających różne warianty źródeł węgla i azotu. Spośród osiemdziesięciu dziewięciu szczepów, tylko pięć było w stanie aktywnie rosnąć w warunkach heterotroficznych. Kolejna runda screeningu wykazała, że *Chlorella sp.* PKUAC 102 hodowana na podłożu S-IK wzbogaconym w glukozę i azotan potasu jest najlepszym szczepem spośród kolekcji PKUAC. Produktywność biomasy szczepu w warunkach heterotroficznych była trzykrotnie wyższa niż ta w warunkach autotroficznych (0.3 gL^{-1}) [H-4]. Aby dalej zwiększyć produktywność tego szczepu zastosowaliśmy metodę statystyczną RSM (Response Surface Methodology) celem optymalizacji składu pożywki. Dzięki zastosowaniu tej metody udało się trzykrotnie zwiększyć produktywność biomasy z 1 gL^{-1} do 3 gL^{-1} osiągając zbliżone stężenie lipidów na poziomie 50% suchej biomasy. Podobne efekty osiągnięto podczas podniesienia skali hodowli do poziomu fermentora laboratoryjnego o pojemności 7.5 litra [H-4].

Podsumowując, w ramach badań opisanych w powyższej serii publikacji [H-1 do H-4] założono kolekcję kultur glonów składającą się z osiemdziesięciu dziewięciu unikalnych szczepów glonów eukariotycznych typowych dla sub-tropikalnego klimatu Chin Południowych i ich wód przybrzeżnych oraz przeprowadzono screening szczepów pod kątem ich przydatności do produkcji biopaliw. Dwa szczepy glonów zostały wykorzystane jako surowiec do produkcji bioetanolu [H-2]. Rezultaty tej pracy wykazały, że choć możliwym jest zastosowanie biomasy glonów jako surowca trzeciej generacji do fermentacji alkoholowej, wydajność tego procesu była co najwyżej przeciętna w porównaniu z badaniami innych zespołów i nie dość satysfakcjonująca by dalej kontynuować te badania. Screening szczepów w celu otrzymania surowca do produkcji biodiesla odbywał się dwuetapowo, opracowanie alternatywnych do głodu azotowego metod zwiększania ilości lipidów oraz poszukiwanie i hodowla glonów heterotroficznych. Jeżeli chodzi o pierwszy z tych tematów to trzykrotnie poprawiono produktywność lipidów w szczepie *Hindakia sp.* PKUAC 169 względem szczepu hodowanego w warunkach głodu azotowego [H-3]. Jeżeli

chodzi o drugie z zagadnień badawczych to dziesięciokrotnie poprawiono produktywność szczepu *Chlorella sp.* PKUAC 102 dzięki zastosowaniu hodowli heterotroficznej, względem hodowli w warunkach autotroficznych. Co więcej zademonstrowano, że szczep ten nadaje się do hodowli w powiększonej skali [H-4]. Pomimo tych niewątpliwie pozytywnych wyników badań stwierdziłem, iż nieopłacalna ekonomicznie jest hodowla glonów tylko i wyłącznie do celów produkcji biopaliw i należy poszukiwać alternatywnych zastosowań biomasy, aby podnieść jej atrakcyjność pod względem ekonomicznym. Skierowałem zatem swoją uwagę ku produktom wysokiej wartości oraz biorafinacji w celu wydobycia maksymalnej wartości z biomasy trzeciej generacji [H-5]. Biorafinacja, zintegrowany proces konwersji biomasy do szeregu produktów, jest obiecującym podejściem pozwalającym na poprawę opłacalności biopaliw glonowych dzięki ich koprodukcji z produktami wysokiej wartości. Przeprowadziłem następnie przegląd szczepów, które są zdolne zarówno do produkcji biopaliw jak i produktów wysokiej wartości w celu wskazania obiecujących metod wyboru szczepu do przyszłych badań [H-5]. **Najważniejszym wnioskiem z przeprowadzonych badań było stwierdzenie, iż istnieje bardzo duża ilość szczepów które są odpowiednie do produkcji biopaliw ze względu na powszechność u glonów procesów biosyntezy skrobi i trójglicerydów, zdecydowanie mniej jednak jest szczepów które są w stanie efektywnie syntetyzować produkty wysokiej wartości. I właśnie produkty wysokiej wartości powinny otrzymać wyższy priorytet w screeningu glonów.** Konkluzje z tej pracy doprowadziły do powstania w moich badaniach na temat biorafinerii koncepcji „**po pierwsze produkty wysokiej wartości**”, którą do tej pory kontynuuję wraz z zespołem. Produktami wysokiej wartości mogą być naturalne metabolity takie jak: wielonienasycone kwasy tłuszczowe, karotenoidy, chlorofile, produkty o właściwościach farmaceutycznych lub białka o dużej wartości komercyjnej. Alternatywną metodą zwiększania wartości biomasy może być ekspresja wartościowych białek metodami inżynierii genetycznej co zostało zademonstrowane na przykładzie *Chlamydomonas reinhardtii* [13]. W publikacji H-5 rozważałem następnie różnego rodzaju szlaki pozwalające połączyć różnego rodzaju procesy celem zwiększenia ich efektywności ekonomicznej i pozwalając na odzysk kluczowych składników odżywczych i energii. Kolejnym etapem w badaniach było zastosowanie koncepcji „**po pierwsze produkty wysokiej wartości**” z publikacji H-5 w poszukiwaniu odpowiedniego szczepu glonów do biorafinacji.

Glon eukariotyczny *Haematococcus pluvialis*, najlepszy znany producent ketokarotenoidu o wysokiej wartości – astaksantyny, wydawał się optymalnym szczepem do badań biorafineryjnych. Przeprowadziłem więc przegląd literatury dostępnej w tym temacie, aby zweryfikować tą wstępną hipotezę. Wyniki te są przedstawione w artykule przeglądowym **H-6** “Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high-value commercial products” opublikowanym w *Frontiers in Plant Science*. Podobnie jak artykuł H-1 praca ta osiągnęła dość dużą popularność w środowisku branżowym od czasu swojej publikacji. Stan na 16.01.2019 wykazał 59 cytowań tej publikacji w Web of Science. Publikacja ta także została wyróżniona na podstawie danych scjentometrycznych **jako top 1% w swojej dyscyplinie naukowej**. Jest to druga z moich publikacji, która osiągnęła takie parametry. Z jednej strony glon *H. pluvialis* jest odpowiednim organizmem do biorafinacji i spełnia zasadę „po pierwsze produkty wysokiej wartości” jak niewiele innych. Jeżeli chodzi o aspekt biopaliwowy, biosynteza astaksantyny i trójglicerydów to procesy wzajemnie związane, więc istnieje w tym organizmie duży potencjał do produkcji biodiesla i użycia biomasy odpadowej do produkcji biogazu. Z drugiej zaś strony praca i wykorzystanie tego organizmu wiąże się z koniecznością rozwiązania wielu problemów potwierdzonych tak przez środowisko naukowe jak i przemysł [H-6]. Po pierwsze, *H. pluvialis* jest bardzo podatny na wiele zakażeń, zwłaszcza w dużej skali i rośnie bardzo powoli, w szczególności w „fazie czerwonej”, podczas której następuje biosynteza astaksantyny [H-6]. Po drugie, w momencie podjęcia badań było bardzo niewiele danych w literaturze światowej o systemie genetycznej transformacji tego szczepu. Stąd stwierdzenie, że przełom w dziedzinie produkcji biopaliw i utylizacji CO₂ przy pomocy organizmów fotosyntetyzujących najprawdopodobniej wiązać się będzie z zastosowaniem inżynierii metabolicznej [H-1] ciągle jest aktualny. Trzy lata po opublikowaniu pracy H-6, i powszechnego zastosowania systemu CRISPR/Cas nadal nie ma niezawodnego systemu modyfikacji genetycznych szczepu *H. pluvialis*.

Po opublikowaniu cyklu prac **H-1 do H-6** podjąłem decyzję o zakończeniu badań na eukariotycznych organizmach fotosyntetyzujących i skierowałem swoją uwagę na organizmy prokariotyczne, sinice. Sinice charakteryzują się wieloma cechami, które okazały się idealne dla tego typu badań. Organizmy te rosną bardzo szybko [14], są naturalnymi producentami produktów wysokiej wartości takich jak fikocyjaniny [H-5] i są podatne na genetyczne

modyfikacje [H-1]. Od tego czasu, **sinice stały się moim głównym obiektem badań**, które zostały opisane szczegółowo w dalszej części autoreferatu.

2) Sinice prokariotyczne jako organizmy bazowe do waloryzacji CO₂ i szczepy biorafineryjne do produkcji biopaliw i produktów wysokiej wartości

Sinice są organizmami prokariotycznymi zdolnymi do fotosyntezy tlenowej zbliżonej do roślin wyższych. Mikroorganizmy te są w stanie rosnąć w wodzie zasolonej, nie wymagając gleby ornej oraz wykorzystując nawozy z niemalże 100% efektywnością [15]. Cechy te w połączeniu z brakiem wyspecjalizowanych tkanek przekładają się na wyższą efektywność procesu fotosyntezy w przeliczeniu na komórkę. Dodatkowo wiele z sinic jest naturalnie podatnych na inżynierię genetyczną, co w połączeniu z ich zdolnością do biosyntezy wartościowych białek i metabolitów powoduje, iż są niemalże idealnymi organizmami do waloryzacji dwutlenku węgla i biorafinacji. W ostatnich latach sinice przyciągnęły znaczną uwagę biologów syntetycznych, którzy odkryli w nich niezwykły potencjał jako organizmów bazowych (chassis organism) do waloryzacji CO₂ do biopaliw i biochemikaliów [15]. W ostatnich latach wyprodukowano z CO₂ przy pomocy metabolicznego sprzęgnięcia fotosyntezy z produkcją metabolitu całą gamę produktów m.in. biopaliwa (bioetanol, biobutanol, estry etylowe kwasów tłuszczowych, alkany [16]), biochemikalia (np. izopren [17]), materiały (celuloza [18], polihydroksymaślan [19]), produkty wysokiej wartości [H-7] i wiele innych. Zdecydowana większość z tych prac oparta była jednak o zastosowanie bardzo wąskiego repertuaru organizmów ramowych, składającego się prawie wyłącznie ze szczepów modelowych *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 oraz *Synechococcus* PCC 7002 [16, 20].

Badania w tej dziedzinie rozpocząłem od podobnego podejścia do przedstawionego powyżej, koncentrując się na szczepie modelowym *Synechococcus elongatus* PCC 7942 jako mikrobiologicznej fabryce komórkowej do konwersji CO₂. Po rozpoczęciu badań pojawiły się jednak istotne bariery wejścia, z którymi mój zespół musiał sobie poradzić. Wraz z moim zespołem mieliśmy spore doświadczenie zarówno w hodowli glonów [H-2 do H-4] jak i inżynierii genetycznej następujących organizmów *E. coli* [P-4], drożdże [P-5] oraz traustochydry [P-6], brakowało nam jednak doświadczenia w inżynierii genetycznej sinic, a

zwłaszcza w dostępności i zrozumieniu różnych elementów genetycznych. Aby rozwiązać ten problem nawiązałem współpracę z prof. James'em Golden'em z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Diego (UCSD). W ramach współpracy mój zespół mógł w miarę swobodnie korzystać z systemu Cyano-vector opracowanego przez UCSD i firmę Life Technologies [21]. Mój zespół zdobył elementy genetyczne i niezbędne doświadczenie w pracy z modelowym systemem sinicowym, z drugiej zaś strony sam system Cyano-vector nie spełniał do końca moich oczekiwań ze względu na bardzo duże tło podczas transformacji szczepu. W ramach tej współpracy udało się nam, skonstruować odpowiednie wektory przy pomocy elementów DNA otrzymanymi w wyniku trawienia tępymi enzymami restrykcyjnymi szeregu modularnych wektorów-matek odpowiednich adapterów oraz wysokowydajnego systemu montażu elementów DNA, a następnie dokonać udanej ekspresji bakteryjnej lakazy *Bacillus subtilis* CotA w szczepie *Synechococcus elongatus* PCC 7942 [P-7]. Skonstruowany w ten sposób szczep eksprymował bakteryjną lakazę i został wykorzystany do odbarwiania roztworu indygo wykazując potencjalną użyteczność w oczyszczaniu ścieków włókienniczych. Te wstępne badania pozwoliły mojemu zespołowi zdobyć odpowiednią wiedzę na temat inżynierii genetycznej sinic oraz wzbudziły wątpliwości co do tego, czy modelowe szczepy takie jak *S. elongatus* PCC 7942 nadają się do waloryzacji CO₂ ze źródeł przemysłowych, które ze względów tak ekonomicznych, jak i środowiskowych powinny być priorytetem w redukcji emisji dwutlenku węgla, jego przetwarzaniu i waloryzacji. Doszedłem do wniosku, iż pomimo tego, że dla szczepów modelowych sporządzono już niezawodne protokoły transformacji genetycznej oraz opracowano wiele elementów genetycznych to nie są one optymalne do waloryzacji CO₂ ze źródeł przemysłowych, które zazwyczaj mają wysokie temperatury i są zanieczyszczone tlenkami azotu (NO_x) lub siarki (SO_x). Aby rozwiązać te kwestie rozważałem trzy możliwości: zastosowanie metod inżynierii genetycznej lub ewolucyjnej w celu adaptacji szczepów modelowych, przetestowanie bardziej odpowiednich szczepów z kolekcji kultur, lub próby izolacji bardziej optymalnych szczepów z naturalnego środowiska ekstremofilnego. Pierwszym etapem tego cyklu badań było zakupienie **szczepów termofilnych z różnych kolekcji kultur i zbadanie ich charakterystyki celem wyznaczenia wskaźników będących punktem odniesienia do kolejnych badań** [H-7]. Następnie korzystając z doświadczenia w zakładaniu kolekcji PKUAC rozpocząłem poszukiwania szczepów o parametrach lepszych niż te wskazane w publikacji H-7. Kolejne trzy publikacje opisują: **poszukiwanie nowych organizmów w środowisku**

ekstremofilnym [H-8], izolacja i screening sinic [H-9] i co najważniejsze przekształcenie wyselekcjonowanego szczepu w mikrobiologiczną fabrykę komórkową do konwersji CO₂ w wysokiej temperaturze [H-10]. Miałem wiodący udział w tej serii publikacji i mój bezpośredni wkład polegał na: zdobyciu funduszy na badania, zarządzaniu projektem, projektowaniu eksperymentów i wyborze metod, zaplanowaniu i wykonaniu poboru próbek w środowisku ekstremofilnym, izolacji materiału biologicznego oraz kwasów nukleinowych z zebranych próbek, analizach bioinformatycznych (analiza danych genomowych i metagenomowych, filogenetyka, bioinformatyka strukturalna, proteomika), zaprojektowaniu konstruktów DNA. Do moich obowiązków należały także: zebranie i analiza literatury, wyciąganie wniosków z zebranych danych, wiodąca rola nad całym cyklem wydawniczym tych publikacji tj. przygotowanie wersji roboczych manuskryptów, rycin, tabel, komunikacja z zespołem redaktorskim i recenzentami i wiele innych. Badania te zostały sfinansowane z szeregu grantów, których większości byłem kierownikiem, i wykonane we współpracy i innymi badaczami.

Termofilne glony i sinice są w stanie rosnąć z powodzeniem w wysoce niekorzystnym środowisku. Organizmy te można bardzo często spotkać w źródłach termalnych, rosnące w podwyższonych temperaturach i w ekstremalnych wartościach pH oraz w wysokich stężeniach azotu i siarki zbliżonych do tych, które można spotkać w przemysłowych źródłach CO₂ takich jak gazy wylotowe [H-10]. Połączenie tych czynników jest wysoce szkodliwe dla większości z organizmów za wyjątkiem tych, które do tych warunków zaadaptowały się w toku ewolucji [22]. Zastosowanie termofilnych sinic to przetwarzania przemysłowego CO₂ do biomasy oraz/lub metabolitów docelowych przy pomocy technik inżynierii metabolicznej ma wiele zalet. Wysoka temperatura hodowli, którą można by osiągnąć odzyskując energię z gazów wylotowych, tworzy wysoce selektywne środowisko, które znacząco ogranicza możliwość zakażenia przez organizmy niepożądane. Mikroorganizmy termofilne znane są z biosyntezy termostabilnych, często unikalnych produktów wysokiej wartości, które mają znaczące przewagi nad swoimi odpowiednikami z organizmów mezofilnych [H-7, H-10]. Spośród sinic termofilnych rodzaj *Thermosynechococcaceae* spotykany w gorących źródłach i innych środowiskach termalnych jest najlepiej opracowanym przez naukowców organizmem. Dla termofilnego szczepu *Thermosynechococcus* sp. BP-1 został zsekwencjonowany i opisany genom [23] oraz opracowane zostały podstawy transformacji

genetycznej [24]. Gatunek *Thermosynechococcus* sp. posiada szereg zalet, które predysponują go jako odpowiedni do waloryzacji przemysłowego CO₂. Po pierwsze szczepy tego gatunku rosną szybko w temperaturach powyżej 45°C i bardzo często mają optymalne temperatury wzrostu w okolicy 55 do 57°C [H-10]. Temperatury te są niezwykle ważne biorąc pod uwagę, że dają one dużą ochronę hodowli przed szkodnikami. Eukariotyczne szkodniki takie jak wrotki są jednymi z największych problemów z jakimi boryka się przemysł hodowli glonów. Są one też głównym powodem zakończenia moich badań nad *H. pluvialis*. Tak jak większość eukariontów organizmy te nie są jednak w stanie przetrwać w temperaturach wyższych niż 45°C [25]. Podwyższona temperatura hodowli pozwala również na zmniejszenie kosztów związanych ze schładzaniem gazów wylotowych, jeśli takie źródło węgla zostało zastosowane do hodowli szczepu. Po drugie, Thermosynechococcaceae, podobnie jak inne termofile są producentami wielu białek termofilnych, które mają szereg zalet w porównaniu do swoich mezofilnych odpowiedników. Na przykład elementy sinicowego fotosystemu, fikocyjaniny, są obiecującym produktem wysokiej wartości z termofilnych sinic, ponieważ białka te posiadają znacząco wyższą termostabilność w porównaniu z homologami izolowanymi z sinic mezofilnych [H-7]. Po trzecie, Thermosynechococcaceae i blisko spokrewnione szczepy Synechococcaceae posiadają relatywnie małe genomy o wielkości około 2.5 mln par zasad, które w prosty sposób można sekwencjonować i modyfikować genetycznie [H-10]. Kombinacja tych zalet spowodowała, że zdecydowałem się skierować moją ciekawość naukową w kierunku termofilnych sinic a w szczególności szczepów z rodzaju Thermosynechococcaceae i potraktować te mikroorganizmy jako organizmy bazowe do biologii syntetycznej, a bardziej konkretnie do wykorzystania ich do utylizacji dwutlenku węgla.

Pierwszym zadaniem wykonanym w tym cyklu badań była **analiza parametrów szczepów termofilnych z kolekcji kultur** pod kątem ich tempa wzrostu oraz właściwości ich produktu wysokiej wartości, C-fikocyjaniny. W artykule H-7 we współpracy z naukowcami z Politechniki Łódzkiej w ramach Polsko-Chińskiej międzynarodowej umowy o współpracy naukowej i naukowo – technicznej oszacowałem parametry wzrostu oraz produktywność procesu biosyntezy C-fikocyjaniny u trzech szczepów termofilnych sinic: modelowego termofilnego szczepu *Thermosynechococcus elongatus*, BP-1 (NIES 2133) i dwóch szczepów blisko spokrewnionych z tym organizmem *Thermosynechococcus vulcanus* NIES 2134 oraz

Synechococcus lividus PCC 6715. W ramach tych badań po raz pierwszy stwierdzono, że pod kątem filogenetycznym szczep *Synechococcus lividus* jest zdecydowanie bliższy członkom rodziny Thermosynechococcaceae niż jakimkolwiek innym członkom rodziny Synechococcaceae, sugerować to może, że cała ta grupa organizmów powinna zostać przemianowana w najbliższej przyszłości na *Thermosynechococcus lividus*. Po drugie, **biosynteza produktu wysokiej wartości, C-fikocyjaniny wydaje się być bezpośrednio powiązana ze wzrostem mikroorganizmu.** W związku z tym, **poszukiwania szybko rosnących termofilnych sinic powinny także pozwolić na znalezienie dobrego producenta tego białka.** Po trzecie, **organizmy te syntetyzują wysoce termo i pH- stabilne warianty fikocyjanin, które są obiecującą alternatywą do fikocyjanin izolowanych ze Spiruliny.** Analiza molekularnego modelu tych białek i porównanie ich sekwencji z białkami izolowanymi z innych organizmów sugeruje, że istnieją prawidłowości we wzorcu substytucji aminokwasów pomiędzy białkami termofilnymi i mezofilnymi oraz substytucje te skoncentrowane są w jednym obszarze molekularnej struktury białka prawdopodobnie wpływając pozytywnie na jego stabilność ze względu na dodatkowe oddziaływania pomiędzy jego podjednostkami. W wyniku tych badań ustalono, że typowe organizmy zgromadzone w kolekcjach kultur wykazują optymalną temperaturę wzrostu pomiędzy 45 do 50°C, są w stanie aktywnie rosnać w kwaśnym węglanie sodu o stężeniu 0.1M oraz wykazują tempo wzrostu na poziomie 0.285-0.356 d⁻¹. Te trzy parametry uznane zostały za wskaźniki które należy traktować jako referencyjne w poszukiwaniu lepszych szczepów ze środowiska naturalnego.

W poszukiwaniu szczepów o parametrach lepszych niż te z kolekcji kultur **zaplanowałem wraz z zespołem ekspedycję** w wysoce aktywny tektonicznie region zachodnich Chin, **do zachodniej części prowincji Syczuan celem poboru próbek materiału biologicznego.** W wyniku wyprawy **rozszerzyliśmy kolekcję PKUAC o czterdzieści dziewięć szczepów termofilnych sinic,** z czego **wiele wykazuje duże cechy unikatowości filogenetycznej** oraz opublikowaliśmy dwie publikacje: **H-8** opisującą ekologiczne aspekty miejsca poboru próbek, oraz **H-9,** która skoncentrowana była na izolacji, charakterystyce i screeningu termofilnych sinic z tego obszaru. Prefektura Ganzi w zachodniej części prowincji Syczuan znajduje się pomiędzy Płaskowyżem Tybetańskim a Kotliną Syczuańską na styku płyt tektonicznych eurazjatyckiej i indyjskiej, co powoduje bardzo dużą aktywność tektoniczną tego obszaru. **Na**

obszarze tym, znajdującym się na wysokości 4200 m n.p.m., znajduje się bardzo duża ilość źródeł termalnych o temperaturze od 30 do 98°C powstałych dzięki anomaliiom geotermalnym związanym z aktywnym od Holocenu uskokiem Xianshuihe. W ciągu ostatnich trzystu lat miały na tym terenie wzdłuż uskoku Xianshuihe miejsce cztery duże trzęsienia ziemi przekraczające siedem w skali Richtera. Mniejsze trzęsienia ziemi występują tam raz na kilka lat [H-8]. Tak wysoka aktywność sejsmiczna w połączeniu z wysokimi temperaturami źródeł może powodować presję ewolucyjną na szybsze różnicowanie się gatunków spowodowaną dwoma czynnikami: impulsowymi zmianami ekosystemu spowodowanymi przez trzęsienia ziemi i przewlekłym działaniem wysokiej temperatury. W trakcie ekspedycji **mój zespół pobrał materiał biologiczny z czternastu gorących źródeł** tego regionu w celu analizy metagenomowej społeczności bakteryjnej tych źródeł [H-8] oraz w celu izolacji sinic o dużym potencjale do dalszych badań [H-9]. Najważniejszymi wnioskami z tych badań H-8 były: najbardziej typowymi organizmami dla tych źródeł są Proteobakterie, Aquificae i sinice oraz to, że **mikrobiologiczna różnorodność tych źródeł zależy w największym stopniu od temperatury**. Jeżeli chodzi o sinice w tych źródłach to zaobserwowano, że ich występowanie drastycznie spada wraz wzrostem temperatury powyżej 75°C. Jest to zgodne z hipotezą, że elementy fotosystemu są najbardziej narażone na rozpad pod wpływem temperatury oraz że jest to główny powód, dlaczego organizmy fotosyntetyzujące nie są spotykane w temperaturach powyżej 73–75°C [26]. W publikacji H-9 opisałem analizę tych samych czternastu źródeł tym razem przy zastosowaniu metod mikrobiologicznych ukierunkowanych na izolację termofilnych szczepów sinic, które byłyby w stanie osiągnąć lepsze wskaźniki niż te opracowane w publikacji H-7. W trakcie trwania tych badań otrzymano sto trzydzieści dwa izolanty sinic pochodzące ze źródeł termalnych prefektury Ganzi, z których to **czterdzieści dziewięć uznano za unikalne. Unikalne izolanty zostały przeanalizowane pod kątem morfologii i filogenetyki oraz przetestowane pod kątem maksymalnej temperatury wzrostu oraz odporności na różne stężenia kwaśnego węgla sodu i następnie szczepy te zostały zdeponowane w kolekcji kultur PKUAC**. Podsumowując analizę filogenetyczną sekwencji 16S rRNA sinic z Ganzi można stwierdzić, że wyizolowane szczepy należą do trzech rodzajów *Thermosynechococcus* (63.3%), *Leptolyngbya* (34.7%) oraz *Stanieria* (2.0%). Na podstawie podobieństwa sekwencji DNA do szczepów referencyjnych uznano, że **pięć grup z rodzaju *Leptolyngbya* to dotychczas bardzo słabo poznane organizmy z tego rodzaju a być może nawet kompletnie nowe gatunki sinic**.

Potwierdza to hipotezę z publikacji **H-8**, w której stwierdziliśmy, że warunki panujące w tym ekosystemie tworzą dogodne warunki do różnicowania się gatunków ze względu na przewlekłe działanie wysokiej temperatury i impulsowe zmiany warunków ekosystemu w wyniku częstych trzęsień ziemi. Genomy najbardziej interesujących z tych sinic poddano w ostatnich miesiącach sekwencjonowaniu. Biorąc pod uwagę aplikacyjne zastosowanie szczepów z Ganzi wyniki okazały się obiecujące. **Wszystkie czterdzieści dziewięć szczepów wykazywało termotolerancję w 45°C, podczas gdy dwadzieścia pięć szczepów było w stanie aktywnie rosnać w 60°C** wykazując lepsze wyniki niż wskaźniki ustalone w ramach publikacji **H-7**. Większość ze szczepów Ganzi było w stanie **aktywnie rosnać w kwaśnym węglanie sodowym o stężeniu 0.3M, trzy szczepy zaś były w stanie rosnać w 1M stężeniu** tego związku wykazując przydatność dla systemu hodowli sinic opartego na węglanie sodu jako głównym źródle węgla [**H-9**]. Parametry te także były lepsze od wskaźników ustalonych w publikacji **H-7**. W **kolejnym etapie selekcji** polegającym na porównaniu szybkości wzrostu mikroorganizmów w różnych temperaturach, stężeniach węgla nieorganicznego, obecności siarczanów i azotanów oraz podatności na modyfikację genetyczną, szczep ***Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542** wyizolowany z gorącego źródła nr 5 (temp. 67.2°C, pH 7.95) w lokalizacji Jeziora Lotosów **okazał się najbardziej obiecujący**. Szczep ten wykazywał **najwyższe parametry wzrostu w temperaturze 55°C, jest w stanie aktywnie rosnać w 15% stężeniu CO₂ i 0.5M kwaśnym węglanie sodowym** i co ciekawe podwyższone do 200 ppm stężenie NO i SO₂ w symulowanych gazach wylotowych pozytywnie wpływa na wzrost organizmu. Te pozytywne wyniki spowodowały, że postanowiłem **przekształcić ten szczep w mikrobiologiczną fabrykę komórkową do waloryzacji CO₂** [**H-10**]. Proces ten przeprowadzono kierując się informacjami zawartymi w genomie sinicy, który zsekwencjonowaliśmy metodą hybrydową i opisaliśmy bazując na metodach opracowanych w trakcie naszego wcześniejszego projektu dotyczącego zimnolubnej Antarktycznej sinicy *Synechococcus* SynAce01 [**P-8**]. Wyniki sekwencjonowania genomu szczepu *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 wykazały obecność wielu białek odpowiedzialnych za aktywny transport składników odżywczych, oraz dodatkowych białek opiekuńczych najprawdopodobniej odpowiedzialnych za adaptację do wysokich temperatur. Następnie **na podstawie sekwencji genomu wybrano dwa obszary neutralne, które zostały genetycznie zmodyfikowane przy pomocy modularnie skonstruowanych wektorów, we własnym systemie niezależnym od Cyano-vector. W ramach tych badań**

wykonano insercję genu oporności na spektynomycynę w dwa obszary neutralne oraz wykonano w analogiczny sposób jedną delecję. Wszystkie szczepy transgeniczne okazały się funkcjonalne. Szczep wykazał czas podwojenia biomasy 0.253 d^{-1} to 0.367 d^{-1} [H-10], które były zbliżone lub lepsze od wartości wskaźnikowych ustalonych poprzednio [H-7], wykazywał wzrost w wyższych temperaturach oraz w wysokich stężeniach węgla nieorganicznego dodatkowo zanieczyszczonych tlenkami siarki i azotu które są typowe dla gazów wylotowych z przemysłowych źródeł CO_2 . Co ciekawe, obecność tych związków w źródle węgla miała pozytywny wpływ na wzrost szczepu. Dodatkowo insercja genów oporności na antybiotyki w obszary neutralne genomu nie miała większego wpływu na szybkość wzrostu szczepu. Najświeższe, jeszcze nie opublikowane dane wskazują, że parametry wzrostu szczepu można poprawić stosując optymalizację pożywki a stabilność C-fikocyjaniny wyizolowanej z tego organizmu jest zbliżona do tej z organizmu wskaźnikowego *Synechococcus lividus* PCC6715 [H-7]. Wyniki te wskazują, że *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 może okazać się bardzo przydatną mikrobiologiczną fabryką komórkową do waloryzacji CO_2 ze źródeł przemysłowych i biorafinacji.

W powyższej serii publikacji wraz z moim zespołem znacząco **rozszerzyłem poziom wiedzy na temat biologii źródeł termalnych zachodniego Sycuanu, odkryłem pięć potencjalnie nowych gatunków termofilnych sinic, dokonałem charakterystyki szczepów termofilnych z gatunku *Thermosynechococcus* z kolekcji kultur pod kątem ich parametrów wzrostu oraz wyizolowałem z naturalnego środowiska szczepy o lepszych parametrach, zsekwencjonowałem, opisałem i zdeponowałem dwa nowe genomy termofilnych sinic (CP032152, CP018092).** Co najważniejsze jednak wraz ze swoim zespołem udało mi się używając systemu rekombinacji homologicznej **przekształcić szczep *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 w mikrobiologiczną fabrykę komórkową do utylizacji CO_2 przy użyciu opracowanego przez mój zespół systemu modularnych wektorów kładąc solidne podwaliny pod kolejne badania.**

3) Podsumowanie całości osiągnięcia

Zaprezentowane osiągnięcie jest opisane w serii dziesięciu powiązanych ze sobą publikacji dotyczących wykorzystania organizmów fotosyntetyzujących jako surowców i mikrobiologicznych fabryk komórkowych dla biorafinerii. W ramach osiągnięcia założono i poddano screeningowi kolekcją kultur PKUAC oraz wykorzystano zgromadzone w kolekcji

mikroorganizmy fotosyntetyzujących do produkcji biopaliw, produktów wysokiej wartości i waloryzacji dwutlenku węgla w celach biorafineryjnych. Pierwsza część osiągnięcia koncentruje się na założeniu i screeningu kolekcji osiemdziesięciu dziewięciu unikalnych glonów eukariotycznych reprezentujących sub-tropikalny klimat Chin Południowych oraz wód przybrzeżnych tego obszaru. Screening mikroorganizmów przebiegał pod kątem poszukiwania szczepów będących odpowiednimi surowcami do produkcji bioetanolu oraz biodiesla. W ramach przeprowadzonych badań cztery szczepy zostały uznane jako odpowiednie surowce do produkcji tych biopaliw, jednak niska wydajność i opłacalność ekonomiczna procesu spowodowała zainteresowanie koprodukcją w biopaliw z produktami wysokiej wartości w ramach biorafinacji i wprowadzenie w dalszych badaniach zasady „po pierwsze produkty wysokiej wartości” oraz poszukiwanie szczepów mikroorganizmów fotosyntetyzujących które mogłyby efektywnie korzystać z niskiej jakości CO₂ ze źródeł odpadowych. Druga część osiągnięcia koncentruje się na to opracowaniu fotosyntetyzującego termofilnego organizmu bazowego do waloryzacji CO₂. Początkowe badania w tej części koncentrowały się na charakterystyce termofilnych szczepów sinic zakupionych z kolekcji kultur pod kątem szybkości wzrostu oraz biosyntezy produktu wysokiej wartości, C-fikocyjaniny. Po zakończeniu tych badań zorganizowana została ekspedycja badawcza do wysoce aktywnych tektonicznie zachodnich rejonów prowincji Syczuan w Chinach celem zidentyfikowania lepszych szczepów ze znajdujących się tam źródeł termalnych. Najważniejszymi osiągnięciami z tej wyprawy było powiększenie kolekcji glonów PKUAC o czterdzieści dziewięć unikalnych szczepów termofilnych sinic, izolacja potencjalnie unikalnych mikroorganizmów fotosyntetyzujących oraz screening tych szczepów w poszukiwaniu obiecujących drobnoustrojów do biorafinacji. W ramach screeningu pierwotnego spośród czterdziestu dziewięciu termofilnych sinic wytypowano dwadzieścia pięć będących w stanie aktywnie rosnać w temperaturze 60°C. W ramach drugiej rundy screeningu wybrano szczep *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 jako najbardziej obiecujący do dalszych badań. Mikroorganizm ten wykazuje najwyższe parametry wzrostu w temperaturze 55°C, jest w stanie aktywnie rosnać w 15% stężeniu CO₂ i 0.5M kwaśnym węglanie sodowym i co ciekawe 200 ppm stężenie NO i SO₂ w symulowanych gazach wylotowych pozytywnie wpływa na wzrost organizmu. Szczep ten ponadto można efektywnie modyfikować genetycznie. Szczep ten stał się podstawą do dalszych badań a jego wysoce termofilne jak na sinicę parametry, oraz biosynteza produktu

wysokiej wartości C-fikocyjaniny stwarzają duże możliwości wykorzystania tego szczepu do waloryzacji odpadowego CO₂ do szeregu produktów takich jak biopaliwa, biochemikalia, biomateriały oraz różne substancje aktywne.

Perspektywa kontynuacji badań

Cztery obszary badań bezpośrednio związane z tematem tego osiągnięcia prowadzone są obecnie w moim zespole:

1. Zastosowanie organizmów z rodziny Thermosynechococcaceae jako organizmów bazowych do produkcji węglowodorów (alkany, izopren) z dwutlenku węgla przy zastosowaniu mechanizmów rekombinacji homologicznej oraz systemu CRISPR/Cas
2. Filogenomika pięciu nowych szczepów z rodziny Leptolyngbyaceae
3. Zastosowanie immobilizowanych anhidraz węglanowych do zintensyfikowania absorpcji CO₂, jego mineralizacji i pełnego wykorzystania.
4. Opracowanie koncepcji biorafinerii mającej na celu biokonwersję i waloryzację dwutlenku węgla do biomateriałów i bioproduktów wysokiej wartości mając na uwadze zamknięcie cykli azotu, fosforu oraz minerałów.

Zestawienie tabelaryczne publikacji naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

L.P.	Publikacja	IF _{rok publ.}	MNiSW	Liczba cytowań (WoS)	Liczba cytowań (Scopus)
H-1	<i>Daroch, M., Geng, S., and Wang G.Y.* (2013) Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks, Applied Energy 102, 1371-1381.</i>	5,261	40	160	182
H-2	<i>Daroch, M., Shao, C., Liu, Y., Geng, S., and Cheng, J.J.* (2013) Induction of lipids and resultant FAME profiles of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta, Bioresource Technology 146, 192-199</i>	5,039	45	12	13
H-3	<i>Guo, H.¹, Daroch, M.¹, Liu, L., Qiu, G., Geng, S., Wang, G.* (2013). Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta. Bioresource Technol. 127, 422-428</i>	5,039	45	34	32

H-4	Jia, Z., Liu, Y., Daroch, M.* , Geng, S., Cheng, J.J.* (2014). Screening, growth medium optimisation and heterotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production. <i>Appl. Biochem. Biotechnol.</i> 173, 1667–1679.	1,735	20	16	15
H-5	Li, J., Liu, Y., Cheng, J.J., Mos, M., Daroch, M.* (2015). Biological potential of microalgae in China for biorefinery-based production of biofuels and high-value compounds. <i>N. Biotechnol.</i> 32, 588–596	3,199	30	24	27
H-6	Shah, M.M.R., Liang, Y., Cheng, J.J., Daroch, M.* (2016). Astaxanthin-producing green microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> : from single cell to high-value commercial products. <i>Front. Plant Sci.</i> 7:531.	4,291	40	59	79
H-7	Liang Y.M. ¹ , Kaczmarek M.B. ¹ , Kasprzak A.K., Tang J., Shah M.M.R., Jin P., Klepacz-Smółka A., Cheng J.J., Ledakowicz S., Daroch M.* (2018). Thermosynechococcaceae as a source of thermostable C-phycoyanins: properties and molecular insights <i>Algal Research</i> 35 223-235	3,745	40	0	1
H-8	Tang J., Liang Y.M., Jiang D., Li L.H., Luo Y.F., Shah M.M.R., Daroch M.* (2018) Temperature-controlled thermophilic bacterial communities in hot springs of western Sichuan, China. <i>BMC Microbiology</i> 18: 134	1,658	30	0	0
H-9	Tang J. ¹ , Jiang D. ¹ , Luo Y.F., Liang Y.M., Li L.H., Shah M.M.R., Daroch M.* (2018). Potential new genera of cyanobacterial strains isolated from thermal springs of western Sichuan, China. <i>Algal Research</i> 31 14–20	3,745	40	2	4
H-10	Liang Y.M., Tang J., Luo Y.F., Kaczmarek M.B., Li X.K., Daroch M.* (2019) Thermosynechococcus as a thermophilic photosynthetic microbial cell factory for CO ₂ utilisation. <i>Bioresource Technology</i> 278, 255-265	5,807	45	0	0
Sumaryczny:		41,606	375	307	353

4) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)

a. Uczestnictwo w zespołach redakcyjnych i konkursowych oraz wkład u rozwój literatury branżowej.

Od 2018 roku należę do zespołu redakcyjnego sekcji biologii syntetycznej czasopisma *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Według stanu na koniec stycznia 2019, zbudowałem zespół sześciu recenzentów o zbliżonym profilu naukowym i wzięłem udział jako recenzent wydawniczy w publikacji jednego artykułu oraz opublikowałem w tym czasopiśmie jeden artykuł własnego zespołu, aby wspomóc rozwój tego czasopisma [P-7]. Wysiłki całego zespołu redakcyjnego okazały się udane, czasopismo otrzyma swój pierwszy Impact Factor w kolejnej edycji *Journal Citation Reports* (2018) od razu w pierwszej połowie rankingu *Biotechnologii i Mikrobiologii Stosowanej*. Od roku 2012 brałem także aktywny udział w recenzowaniu publikacji do następujących czasopism: *Applied Energy*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *Energy*, *Bioenergy Research*, *Chemical and Process Engineering*, *Biotechnology Reports*, *Biotechnology for Biofuels*, *Algal Research*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *Frontiers in Microbiology*, oraz *Chemosphere*. Dokładna ilość recenzji jest trudna do określenia jednak mogę ją oszacować na znacząco powyżej piętnastu.

Jeżeli chodzi o recenzowanie grantów badawczych to od 2017 jestem regularnie zapraszany przez Komisję Europejską do recenzji projektów w programie FET-OPEN. Zostałem zaproszony do recenzowania tych grantów czterokrotnie, trzykrotnie przyjąłem zaproszenie. W jednym przypadku zgodziłem się zrecenzować projekt, w pozostałych przypadkach zmuszony byłem odrzucić zaproszenia, gdyż proponowane projekty były zbyt odległe tematycznie.

b. Udział w konferencjach naukowych i towarzystwach naukowych

Pomiędzy 2007 i 2018 wzięłem udział w co najmniej czternastu głównie międzynarodowych konferencjach naukowych w większości w Azji lub Europie, prezentując dziesięć posterów i czterokrotnie występując jako prelegent. Dwie z tych konferencji są moim zdaniem warte podkreślenia: Pierwsze Chińsko-Brytyjskie Forum na temat *Biotechnologii Glonów i ich Zasobów Biologicznych*. Forum miało miejsce od 18 do 21 września 2018 w mieście Wuhan mój wykład na tym symposium miał tytuł: „Termofilne sinice jako organizm bazowy do

wychwytywania i waloryzacji dwutlenku węgla”. Drugi z wykładów miał miejsce podczas 16tego Europejskiego Kongresu Biotechnologicznego który rozpoczął się w Edynburgu 13 lipca 2014. Wykład na tej konferencji zatytułowany był: „Glonowe paliwa z naturalnych zasobów biologicznych delty Rzeki Perłowej”. Jestem także członkiem Stowarzyszenia Stypendystów Marie-Curie oraz byłym członkiem i stypendystą Brytyjskiego Towarzystwo Biochemicznego.

c. Nagrody

Za osiągnięcia w dziedzinie publikacji naukowych w latach 2012-13 otrzymałem w roku 2014 z nadania Administracji Zasobów Ludzkich i Bezpieczeństwa Społecznego metropolii Shenzhen tytuł „Zagranicznego personelu wysokiej jakości kategorii B” i związane z tym tytułem pieniądze i niepieniężne przywileje.

d. Dydaktyka

Od czasu awansu na stanowisko adiunkta w 2013r prowadzę dwa cykle wykładów: „Inżynieria chemiczna nowej energetyki” oraz „Molekularna biotechnologia środowiska”, każdy w wymiarze 48 godzin rocznie. Obydwa cykle wykładów są wykładane po angielsku dla studentów studiów magisterskich i doktoranckich i prowadzone w formacie hybrydowym tj. połączenia tradycyjnych wykładów oraz kształcenia poprzez rozwiązywanie problemów (Problem Based Learning, PBL). Format ten jest unikalny w PKU SEE i pozwala na zastosowanie wiedzy zdobytej na wykładzie w projekcie. W celu stworzenia cyklu wykładów z biotechnologii otrzymałem grant o wysokości 20,000 CNY (11,135 PLN) na opracowanie programu zajęć, przygotowanie materiałów elektronicznych i udział w konferencji EDULEARN 2014.

e. Inne osiągnięcia naukowe po otrzymaniu stopnia doktora

i. Opracowanie programu nauczania w Szkole Energetyki i Środowiska Uniwersytetu Pekinńskiego

Od czasu awansu na stanowisko adiunkta w 2013r prowadzę dwa cykle wykładów: „Inżynieria chemiczna nowej energetyki” oraz „Molekularna biotechnologia środowiska”. O ile w przypadku zajęć z biotechnologii molekularnej jest dużo materiałów dydaktycznych, to w przypadku bioenergetyki, czy nowej energetyki jak to się zwykło określać w Chinach

materiałów dydaktycznych jest zdecydowanie mniej. By pomóc rozwiązać ten problem przyjąłem dwa zaproszenia od profesorów Jay J. Cheng'a i Luciana Lucia z Uniwersytetu Stanowego w Północnej Karolinie celem wspólnego napisania książek o bioenergetyce. Mój wkład w powstanie niniejszych książek polegał na napisaniu rozdziałów książek, odpowiednio o produkcji biobutanolu oraz o metodach konwersji biomasy. Obydwa rozdziały stały się integralną częścią moich wykładów z „Inżynierii chemicznej nowej energetyki” wraz z wcześniejszymi rozdziałami książek napisanych dla Science Press Beijing.

ii. Synteza policistonicznego systemu umożliwiającego efektywną modyfikację chityny i jej pochodnych

We wrześniu 2016r poszerzyłem moją wieloletnią współpracę z Instytutem Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej o wspólny projekt z zespołem prof. Tadeusza Antczaka. Na podstawie umowy o wymianie studentów pomiędzy dwoma uczelniami którą pomogłem zainicjować zaprosiłem Pana Michała Benedykta Kaczmarka, studenta studiów doktoranckich w zespole prof. Antczaka, na sześciomiesięczny staż badawczy do mojego laboratorium w Chinach. Pan Kaczmarek pracował w moim zespole nad dwoma tematami: jednym związanym z termofilnymi sinicami (publikacje **H-7** oraz **H-10**), drugim bezpośrednio związanym z jego tematem pracy doktorskiej tj. enzymatyczną modyfikacją chityny. Podczas gdy część pracy dotycząca sinic została już opublikowana i jest częścią tego osiągnięcia, część dotycząca chityny oczekuje jeszcze na publikację wyników badań i w związku z tym wymaga przedstawienia. Chityna jest, tuż po celulozie drugim najliczniej występującym polimerem pochodzenia biologicznego. Posiada ona szereg wyjątkowych charakterystyk, które mają duży potencjał biotechnologiczny, lecz jej zastosowanie ograniczone jest przez słabą rozpuszczalność w większości rozpuszczalników i niewielkimi możliwościami kontroli procesów jej modyfikacji metodami chemicznymi. Procesy enzymatyczne są jednymi ze sposobów które pozwalają rozwiązać te problemy. W ramach przeprowadzonych badań zaprojektowaliśmy i wykonaliśmy wieloenzymatyczny system do enzymatycznej modyfikacji chityny. Przy zastosowaniu zasad biologii syntetycznej wykonaliśmy pierwszy modułowy, wielogenowy eukariotyczny, system do równoczesnej ekspresji trzech enzymów: chitynazy, chitozanazy oraz deacetylazy chityny zdolnej do jednoczesnej wieloenzymatycznej modyfikacji chityny i jej pochodnych. System bazuje na zastosowaniu konserwatywnych, autonomicznych wirusowych sekwencji 2A zdolnych do skoordynowanej ekspresji wielu

transgenów pod kontrolą jednego promotora. W ramach badań wykonane zostały szczepy transgeniczne *Pichia pastoris* zawierające różne kombinacje tych genów i konstrukty te są obecnie testowane na chitynie celem analizy profilu otrzymanych modyfikacji. Po zakończeniu sześciomiesięcznego stażu, Pan Kaczmarek powrócił do Instytutu Biochemii Technicznej PŁ, ja zaś zostałem jego promotorem pomocniczym. Oczekuje się ukończenia kilku publikacji w tej tematyce w połowie 2019 roku.

iii. Traustrochydry jako źródło ważnego nutraceutyku, kwasu dokozaheksanowego (DHA)

Traustrochydry są morskimi protistami zbliżonymi do glonów, organizmy te są jednymi z najlepszych naturalnych producentów kwasu dokozaheksanowego (DHA), ważnego nutraceutyku i suplementu diety. Podczas pierwszego roku mojego pobytu w PKU SEE, moi współpracownicy wyizolowali szczepy traustrochydrow z lokalnych wód przybrzeżnych Morza Południowochińskiego i wstępnie oszacowali ich produktywność pod kątem biosyntezy DHA i produkcji substancji pozakomórkowych (EPS) [27]. W ramach tych badań wykazano, że kilka z wyizolowanych szczepów jest obiecującymi producentami DHA. W ramach kolejnych badań postanowiłem zająć się tymi szczepami i spróbować opracować jeden z nich jako szczep biorafineryjny. W następującej serii publikacji wybraliśmy szczep *Aurantiochytrium sp.* PKU#SW7 jako najbardziej optymalny producent DHA, ze względu na efektywność biosyntezy tego nutraceutyku oraz fakt, iż większość z kwasu tłuszczowego znajdowała się w trójglicerydach które można w łatwy sposób wyizolować z komórek. Kolejnymi pozytywami tego szczepu było to, że udało nam się podnieść skalę w hodowli tego organizmu oraz to, że posiada on bardzo prosty profil kwasów tłuszczowych złożony prawie wyłącznie z kwasu palmitynowego oraz DHA. Skład kwasów tłuszczowych pozwalał na łatwe wyodrębnienie komponentu wysokiej wartości DHA oraz komponentu biopaliwowego, kwasu palmitynowego na przykład przy wykorzystaniu kompleksacji mocznikiem w niskich temperaturach. Kolejne z badań skoncentrowane było na inżynierii genetycznej tego szczepu i specyficznych modyfikacjach pod kątem określenia który z dwóch potencjalnych szlaków biosyntezy DHA jest odpowiedzialny za syntezę tego kwasu tłuszczowego.

iv. Rzęsa wodna jako organizm bioremediacyjny i surowiec do produkcji biopaliw

Od czasu dołączenia do PKU SEE współpracowałem z kolegami z tej instytucji przy kilku projektach badawczych. Celem jednego z nich było zastosowanie roślin wodnych takich jak rzęsa jako surowców do produkcji biopaliw i jako organizmów bioremediacyjnych. W serii kilku publikacji na ten temat skoncentrowaliśmy się na dwóch kluczowych aspektach zastosowań tej rośliny: polikultury różnych szczepów rzęsy wodnej jako źródeł skrobi i białka, oraz rzęsa wodna jako materiał do bioremediacji ścieków zanieczyszczonych metalami ciężkimi

v. Publikacje we wszystkich obszarach wymienionych powyżej znajdujące się w literaturze chińskojęzycznej

Osiągnięcia naukowe przedstawione powyżej dotyczą tylko i wyłącznie literatury anglojęzycznej, istnieje jeszcze szereg publikacji w języku chińskim. Pełna lista znajduje się w Załączniku 5 punkcie II C.

f. Osiągnięcia naukowe przed uzyskaniem stopnia doktora

i. Początek kariery w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej

Kariere naukową rozpocząłem w Instytucie Biochemii Technicznej w zespole organizmów ekstremofilnych prof. dr hab. Marianny Turkiewicz. Podczas mojej pracy magisterskiej na Politechnice Łódzkiej zespół prof. Turkiewicz pracował nad zimnolubnymi organizmami ekstremofilnymi jako źródłami biokatalizatorów dla przemysłu spożywczego i syntezy chemicznej. Zespół przechodził w tym czasie od klasycznych metod biochemicznych tj. oczyszczania białek i analizy bioproduktów do technologii rekombinowanego DNA oraz bioinformatyki. Mój projekt magisterski zatytułowany „Interdyscyplinarne studium zimnolubnej lipazy/esterazy klasy GDSL z *Pseudoalteromonas sp. 643A*” był projektem prowadzonym we współpracy z zespołem prof. Józefa Kura z Politechniki Gdańskiej. Projekt ten wymagał opanowania szeregu różnych technik, które przydały się następnie podczas całego eksperymentalnego etapu mojej kariery naukowej a także później jako kierownika grupy badawczej. Podczas trwania projektu zająłem się nowatorską esterazą klasy GDSL z morskiej bakterii *Pseudoalteromonas sp. 643A* pierwotnie wyizolowanej z żołądka Antarktycznego kryla *Euphasia superba* Dana złowionego w wodach Zatoki Admiralicji

(Wyspa Króla Jerzego, Szetlandy Południowe, 62°10S, 58°28W). W założeniach projektu odpowiedzialny byłem za ekspresję esterazy w *E. coli*, wyznaczenie charakterystyki enzymu oraz skonstruowanie homologicznego modelu struktury białka w oparciu o znaną strukturę krystaliczną tioesterazy *E. coli*. W trakcie trwania projektu okazało się, iż konstrukt przygotowany przez naszych współpracowników eksprymował gen esterazy w ciałkach inkluzyjnych więc i spektrum moich obowiązków bardzo szybko poszerzyło się o próby renaturacji białka eksprymowanego oraz oczyszczanie tego samego białka ze szczepu natywnego. Wyniki tych prac były pozytywne i opublikowano je bardzo szybko po ukończeniu moich studiów na Politechnice Łódzkiej.

ii. Studia doktoranckie na Uniwersytecie w Liverpoolu, Wielka Brytania

Po otrzymaniu dyplomu Politechniki Łódzkiej, zostałem przyjęty na studia doktoranckie na Uniwersytecie w Liverpoolu w Wielkiej Brytanii w zespole Dr Lesley Ann Iwanejko i Dr Andrew Derek Bates. Studia w Wielkiej Brytanii zostały w całości sfinansowane przez stypendium Marie Skłodowskiej-Curie Early Stage Training. Mój projekt doktorancki był poświęcony oksydoreduktazom grzyba *Stropharia aeruginosa*, głównie chloroperoksydazie i lakazom. Pomimo wcześniejszego, opisanego w rozprawie doktorskiej dr J.K Moore'a raportu dotyczącego obecności chloroperoksydazy w tym organizmie nie byłem w stanie powtórzyć wyników poprzednika oraz wyizolować i oczyścić to białko lub zidentyfikować genu tego enzymu i po wielu miesiącach pracy projekt doktorancki stopniowo przeniósł swój ciężar na identyfikację i charakteryzację izoform lakaz syntetyzowanych przez tego grzyba. Po oczyszczeniu do homogenności dwóch izoform lakaz z tego organizmu przy zastosowaniu szeregu metod chromatograficznych zauważyłem, że spektrum obydwu izoform nie wykazuje absorbancji typowej dla niebieskich lakaz i enzymy te najprawdopodobniej należą do słabo poznanej rodziny lakaz żółtych. Izolacja genów tych lakaz metodami tradycyjnymi okazała się problematyczna najprawdopodobniej ze względu na obecność wielu wariantów splicingowych i izoform tych białek. Postanowiłem więc zastosować nowo skomercjalizowaną metodę sekwencjonowania DNA zwaną pirosekwencjonowaniem, aby zsekwencjonować transkryptom tego organizmu na niskim pokryciu sekwencji celem identyfikacji fragmentów genów homologicznych do lakaz. W wyniku sekwencjonowania zidentyfikowano fragmenty genów o sekwencjach zbliżonych do lakaz, jednak pokrycie sekwencji było zbyt niskie, aby wyizolować całość genów kodujących te białka.

Postanowiłem więc wykorzystać skonstruowaną poprzednio bibliotekę cDNA plazmidów tego organizmu celem wykonania odwrotnego PCR dla nieznanych regionów. Metoda ta była udana i pełnej długości geny zostały wyizolowane i potwierdzone z co do identyczności sekwencji z sekwencjami białek wyizolowanych poprzednio przy pomocy metod chromatograficznych i zsekwencjonowanych proteomicznie. Wyniki te wraz z oszacowaniem potencjału biotechnologicznego tych białek do odbarwiania barwników tekstylnych były głównymi częściami składowymi mojego doktoratu, który obroniłem w lipcu 2011 roku. W trakcie trwania doktoratu odbyłem także tygodniowy staż w grupie prof. Miguela Alcalde Instytucie Katalizy Najwyższej Rady Badań Naukowych w Madrycie, gdzie zapoznałem się z metodami ukierunkowanej ewolucji lakaz którą prof. Alcalde wykonywał we współpracy z zespołem prof. Frances Arnold z Politechniki Kalifornijskiej.

Podczas studiów doktoranckich pozostawałem w bliskim kontakcie z Instytutem Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej i miałem wiodący udział w sprowadzeniu Pana Tomasza Florczaka z zespołu prof. Turkiewicz na sześciomiesięczny staż Marie-Skłodowskiej Curie do naszego zespołu w Liverpoolu. Podczas naszego wspólnego projektu pracowaliśmy stosując taką samą metodykę jak ta opracowana w moim doktoracie nad bardzo nietypową lipazą ze szczepu *Geomyces sp. P7*. Białko to było bardzo nietypowym enantioselektywnym biokatalizatorem który był równocześnie adaptowany do zimna pod względem kinetycznym oraz wysoce termostabilnym. Podczas trwania wcześniejszych prac nad tym enzymem zespół z Politechniki Łódzkiej nie był w stanie wyizolować genu tego białka ani oczyścić go do homogenności. Dzięki metodyce zaadaptowanej z mojej pracy doktorskiej udało nam się ustalić sekwencję genu kodującego to białko, ekspymować je w drożdżach *S. cerevisiae* korzystając z metodyki, którą przywiozłem ze stażu w zespole prof. Alcalde oraz przy pomocy technik proteomicznych potwierdzić identyczność ekspymowanego białka z genem je kodującym otrzymanym z transkryptomu szczepu *Geomyces sp P7* [P-5].

Piśmiennictwo

Publikacje aplikanta cytowane w autoreferacie ale nie będące częścią osiągnięcia:

P-1. Tang, J., Daroch, M., Kilian, A., Jeżowski, S., Pogrzeba, M., Mos, M., 2015. DArT-based characterisation of genetic diversity in a *Miscanthus* collection from Poland. *Planta* 242, 985–996.

P-2. Daroch, M., 2018. Conversion Technologies, in: Ayoub A.S., Lucia, L.A.. (Eds.), *Introduction to Renewable Biomaterials: First Principles and Concepts*. John Wiley and Sons.

P-3. Shao CC, Liu Y, Maurycy Daroch, Geng X, Xu N, Cheng JJ (2013) Isolation and identification of microalgae in Shenzhen Bay with molecular biotechnology *Guangdong Agricultural Sciences* 13 135-138

P-4. Cieśliński, H., Białkowska, A.M.A.M., Długołęcka, A., Daroch, M., Tkaczuk, K.L.K.L., Kalinowska, H., Kur, J., Turkiewicz, M., 2007. A cold-adapted esterase from psychrotrophic *Pseudoalteromas* sp. strain 643A. *Arch. Microbiol.* 188, 27–36.

P-5. Florczak, T., Daroch, M., Wilkinson, M.C., Białkowska, A., Bates, A.D., Turkiewicz, M., Iwanejko, L.A., 2013. Purification, characterisation and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of LipG7 an enantioselective, cold-adapted lipase from the Antarctic filamentous fungus *Geomyces* sp. P7 with unusual thermostability characteristics. *Enzyme Microb. Technol.* 53, 18–24.

P-6. Liang, Y., Liu, Y., Tang, J., Ma, J., Cheng, J., Daroch, M., 2018b. Transcriptomic Profiling and Gene Disruption Revealed that Two Genes Related to PUFAs/DHA Biosynthesis May be Essential for Cell Growth of *Aurantiochytrium* sp. *Mar. Drugs* 16, 310.

P-7. Liang, Y., Hou, J., Liu, Y., Luo, Y., Tang, J., Cheng, J.J., Daroch, M., 2018a. Textile Dye Decolorizing *Synechococcus* PCC7942 Engineered With CotA Laccase. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6, 1–10.

P-8. Tang, J., Du, L.-M., Liang, Y.-M., Daroch, M., 2019. Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of *Synechococcus* sp. CS-601 (SynAce01), a Cold-Adapted Cyanobacterium from an Oligotrophic Antarctic Habitat. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 152.

Pozostała literatura cytowana:

1. IPCC. Global Warming of 1.5°C. Geneva; 2018.
2. Willems P, Reith JH, Eppink MHM, Kleinegris DMM, Wijffels H, Barbosa MJ. Towards industrial products from microalgae. *Energy Environ Sci.* 2016;9:3036–43.
3. Mohan SV, Nikhil GN, Chiranjeevi P, Reddy CN, Rohit M V, Kumar AN. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy : Critical review and future perspectives. *Bioresour Technol.* 2016;215:2–12.
4. Gomez LD, Steele-king CG, Mcqueen-mason SJ. Sustainable liquid biofuels from biomass : the writing's on the walls. *New Phytol.* 2008;178:473–85.
5. Singh P, Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog Energy Combust Sci.* 2011;37:52–68.
6. Lynd LR, Liang X, Bidy MJ, Allee A, Cai H, Foust T, et al. Cellulosic ethanol : status and innovation. *Curr Opin Biotechnol.* 2017;45:202–11.
7. Sansaniwal SK, Pal K, Rosen MA, Tyagi SK. Recent advances in the development of biomass gasification technology : A comprehensive review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2017;72 December 2015:363–84.
8. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 2007; 25:294–306. .
9. Tredici MR. Photobiology of microalgae mass cultures : understanding the tools for the next green revolution Photobiology of microalgae mass cultures : understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels.* 2010;1:143–62.
10. Ungerer J, Lin P-C, Chen H-Y, Pakrasi HB. Adjustments to Photosystem Stoichiometry and Electron Transfer Proteins Are Key to the Remarkably Fast Growth of the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *ASM mBio.* 2018;9:1–12.
11. Laurens LML, Markham J, Templeton DW, Christensen ED, Wychen S Van, Vadelius EW, et al. Development of algae biorefinery concepts for biofuels and bioproducts; a perspective on process-compatible products and their impact on cost-reduction. *Energy Environ Sci.* 2017;10:1716–38.

12. Chen C, Yeh K, Aisyah R, Lee D, Chang J. Cultivation , photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production : A critical review. *Bioresour Technol.* 2011;102:71–81.
13. Rasala BA, Mayfield SP. Photosynthetic biomanufacturing in green algae ; production of recombinant proteins for industrial , nutritional , and medical uses. *Photosynth Res.* 2015;:227–39.
14. Yu J, Liberton M, Cliften PF, Head RD, Jacobs JM, Smith RD, et al. *Synechococcus elongatus* UTEX 2973, a fast growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and CO₂. *Sci Rep.* 2015;5:1–10.
15. Heidorn T, Camsund D, Huang H-H, Lindberg P, Oliveira P, Stensjö K, et al. Synthetic Biology in Cyanobacteria. In: *Methods in Enzymology.* 2011. p. 539–79.
16. Oliver JWK, Atsumi S. Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis. *Photosynth Res.* 2014;120:249–61.
17. Lindberg P, Park S, Melis A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng.* 2010;12:70–9.
18. Kawano Y, Saotome T, Ochiai Y, Katayama M, Narikawa R, Ikeuchi M. Cellulose accumulation and a cellulose synthase gene are responsible for cell aggregation in the cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus* RKN. *Plant Cell Physiol.* 2011;52:957–66.
19. Wu GF, Wu QY, Shen ZY. Accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresour Technol.* 2001;76:85–90.
20. Moses T, Mehrshahi P, Smith AG, Goossens A. Synthetic biology approaches for the production of plant metabolites in unicellular organisms. *J Exp Bot.* 2017;68:4057–74.
21. Taton A, Unglaub F, Wright NE, Zeng WY, Paz-Yepes J, Brahamsha B, et al. Broad-host-range vector system for synthetic biology and biotechnology in cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:1–16.
22. Yen H-W, Ho S-H, Chen C-Y, Chang J-S. CO₂ , NO_x and SO_x removal from flue gas via microalgae cultivation: A critical review. *Biotechnol J.* 2015;10:829–39.

23. Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Ikeuchi M, Katoh H, Sasamoto S, et al. Complete Genome Structure of the Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Res.* 2002;9 May:123–30.
24. Onai K, Morishita M, Kaneko T, Tabata S, Ishiura M. Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: A simple and efficient method for gene transfer. *Mol Genet Genomics.* 2004;271:50–9.
25. Klales A, Duncan J, Nett EJ, Kane SA. Biophysical model of prokaryotic diversity in geothermal hot springs. *Phys Rev E - Stat Nonlinear, Soft Matter Phys.* 2012;85:1–11.
26. Pedersen D, Miller SR. Photosynthetic temperature adaptation during niche diversification of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* A/B clade. *ISME J.* 2017;11:1053–7.
27. Liu Y, Singh P, Sun Y, Luan S, Wang G. Culturable diversity and biochemical features of thraustochytrids from coastal waters of Southern China. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98: 3241–55.

