

AUTOREFERAT

Dr Mariusz Trytek

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej

Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych
w języku polskim

Lublin, 2017

1. Imię i nazwisko: Mariusz Trytek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

Czerwiec 2000 r. – tytuł magistra chemii, specjalność chemia organiczna; Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, Lublin.

Tytuł pracy *„Wpływ karbonizacji na właściwości fizyko-chemiczne porowatych kopolimerów 4,4'- bismaleimidodifenylometanu z diwinylobenzenem”* Promotor: Prof. dr hab. Barbra Gawdzik.

Grudzień 2007 r. – stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii; Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) w Lublinie; tytuł rozprawy doktorskiej: *„Mikrobiologiczna i biomimetyczna transformacja (R)-(+)-limonenu”* Promotor: Prof. dr hab. Jan Fiedurek

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

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (w 2011 roku przekształcony w Wydział Biologii i Biotechnologii)

2000-2007 – asystent (pracownik naukowo-dydaktyczny) w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii (w tym **2002-2003** – urlop bezpłatny).

lutu 2008 – do chwili obecnej – adiunkt (pracownik naukowo-dydaktyczny) w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii.

4. Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl ośmiu publikacji pod wspólnym tytułem:
„Biokatalityczne utlenienie terpenów do związków smakowo-zapachowych przy użyciu grzybów psychrotroficznych i katalizatorów porfirynowych”

Łączny IF publikacji wchodzących w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **23.492**; suma punktów zgodnie z wykazem MNiSW obowiązującym w roku opublikowania: **260 pkt**

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Nr	Publikacja	IF ^a	Punkty MNiSW
[O1]	Trytek M* , Fiedurek J., Lipke A., Radzki S. (2009). Porphyrins incorporated to SiO ₂ gels as fluorescent materials and efficient catalysts in biomimetic photocatalytic systems. <i>Journal of Sol-Gel Science and Technology</i> 51, 272-286.	1.393 (1.575)	35 (35)
[O2]	Trytek M* , Janik E., Maksymiec W., Fiedurek J., Lipke A., Majdan M. (2011). The spectral and catalytic studies of chlorophylls and pheophytins in mimetic biotransformation of α -pinene. <i>Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry</i> 223, 14–24.	2.421 (2.625)	25 (25)
[O3]	Trytek M* , Majdan M., Lipke A., Fiedurek J. (2012). Sol–gel immobilization of octaethylporphine and hematoporphyrin for biomimetic photooxidation of α -pinene. <i>Journal of Catalysis</i> 286, 193–205.	6.249 (6.844)	45 (40)
[O4]	Trytek M* , Lipke A., Majdan M., Pisarek S, Gryko D. (2013). Homo- and heterogeneous α -pinene photooxidation using a protoporphyrin-derived amide. <i>European Journal of Organic Chemistry</i> 2013, 1653–1658.	3.154 (2.834)	35 (35)
[O5]	Lipke A., Trytek M.* , Fiedurek J., Majdan M., Janik E. (2013). Spectroscopic and biocatalytic properties of a chlorophyll-containing extract in silica gel. <i>Journal of Molecular Structure</i> 1052, 158–164.	1.599 (1.753)	20 (20)

[O6]	Trytek M* , Jędrzejewski K., Fiedurek J. (2015). Bioconversion of α -pinene by a novel cold-adapted fungus <i>Chrysosporium pannorum</i> . <i>Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology</i> 42, 181-188.	2.745 (2.81)	30 (30)
[O7]	Trytek M* , Fiedurek J., Gromada A. (2016) Effect of some abiotic stresses on the biotransformation of α -pinene by a psychrotrophic <i>Chrysosporium pannorum</i> . <i>Biochemical Engineering Journal</i> , 112, 86-93.	2.892 (2.892)	35 (35)
[O8]	Fiedurek J., Trytek M.* , Skowronek M. (2012) Strategies for improving the efficiency of bioprocesses involving toxic compounds. <i>Current Organic Chemistry</i> 16, 2946-2960.	3.039 (1.949)	35 (30)
	SUMA	23.492 (23.282)	260 (250)

*** Autor korespondencyjny**

^a Przy każdej pozycji podano *impact factor* oraz punktację MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania pracy oraz w nawiasach zgodnie z rokiem 2017 r.

Oświadczenia współautorów prac wraz z określeniem wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 5

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Cytowania prac naukowych, stanowiących osiągnięcie naukowe podane są wg numeracji publikacji zastosowanej w pkt. 4B niniejszego załącznika. Pozostałe cytowania umieszczono w przypisach.

WPROWADZENIE

Biotransformacja obejmująca enzymatyczną, mikrobiologiczną oraz biomimetyczną katalizę stanowi cenną perspektywę dla kontrolowanego i selektywnego przekształcania związków organicznych. Procesy mikrobiologicznej lub biomimetycznej transformacji dają szereg wymiernych korzyści w porównaniu z metodami chemicznymi, np. cechują się wyższą selektywnością i przebiegają w łagodnych warunkach. Rozwój procesów biokatalitycznych stwarza nadzieję na otrzymanie w większej skali wielu wartościowych związków i substancji

znajdujących zastosowanie w medycynie, perfumerii lub w przemyśle spożywczym, jak również innych cennych i unikatowych związków występujących w przyrodzie w ograniczonych ilościach, np. związków terpenoidowych^{1,2,3}.

Terpeny są bardzo interesującą grupą związków organicznych o różnorodnych właściwościach smakowo-zapachowych, a także leczniczych. Wśród nich wyróżnia się monoterpeny, lotne substancje występujące w olejkach eterycznych wielu roślin. Znanych jest ponad 400 struktur, których niewielkie różnice w budowie cząsteczek determinują ich smak, zapach oraz właściwości terapeutyczne. Duże zróżnicowanie właściwości monotrpenów pozwala na praktyczne wykorzystanie ich w różnych dziedzinach przemysłu. Ze względu na działanie przeciwnowotworowe, chemoprewencyjne, antydnobnoustrojowe, przeciwzapalne czy immunomodulacyjne mogą one znaleźć zastosowanie we współczesnej onkologii i innych gałęziach medycyny. Ze względu na fakt, że najcenniejsze terpeny występują w przyrodzie w małych ilościach (a ograniczony dostęp do materiałów roślinnych dodatkowo zwiększa koszty i decyduje o ich dużej wartości rynkowej), opracowanie sposobów ich wytwarzania w warunkach laboratoryjnych w oparciu o metody biotechnologiczne jest niezwykle istotne. Dogodną metodę stanowi mikrobiologiczna lub biomimetyczna transformacja tanich i łatwo dostępnych substratów takich jak pinen i limonen. α - i β -pinen pozyskiwany jest z terpentyny, będącej produktem ubocznym po przerobieniu pulpy celulozowej drzew iglastych, z kolei limonen, ze skórek owoców cytrusowych (najwięcej znajduje się go w olejku pomarańczowym). W procesie utleniania tych naturalnych prekursorów, przy udziale biokatalizatorów, można otrzymać cenne produkty bioaktywne, np. karwon, mentol, alkohol perylowy, werbenol, myrtenol. Związki te oprócz właściwości aromatycznych, wykazują aktywność w hamowaniu rozwoju wielu typów nowotworów⁴. Terpeny otrzymane przy użyciu biokatalizatorów, choć wytwarzane poza ich naturalnym środowiskiem występowania, charakteryzują się wysoką czystością oraz intensywnym zapachem i mogą otrzymać status „naturalności”.

Reakcje biotransformacji terpenów, przebiegają w warunkach tlenowych przy udziale licznych drobnoustrojów, jednakże mają one w dalszym ciągu charakter podstawowy niż aplikacyjny. Wynika to zarówno z toksyczności monotrpenów, ich dużej lotności i niskiej

¹ Pollard, D.J.; Woodley, J.M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.*, **2007**, 25, 66-73.

² Liu, J.H.; Yu, B.Y. Biotransformation of bioactive natural products for pharmaceutical lead compounds. *Curr. Org. Chem.*, **2010**, 14, 1400-1406.

³ Balcerzak L., Lipok J., Strub D., Lochyński S. Biotransformations of monotrpenes by photoautotrophic microorganisms. *J. Appl. Microbiol.*, **2014**, 117, 1523-1536.

⁴ Paduch R., Kandefier-Szerszeń M., Trytek M., Fiedurek J. Terpenes – substances useful in human health care. *Arch. Immunol. Therap. Ex.* **2007**, 55, 315-327.

rozpuszczalności w wodzie, jak również z niestabilności stosowanych biokatalizatorów⁵. Dodatkowo dochodzi jeszcze problem niskiego poziomu natlenienia podłoża hodowlanych ze względu na niską rozpuszczalność tlenu w temperaturach od 30-45°C^{6,7}.

Założenia i cel badań

Straty substratów i produktów w procesie biotransformacji można częściowo ograniczyć obniżając temperaturę procesu. Z tego względu postanowiłem kontynuować badania nad przekształcaniem monoterpenu przez drobnoustroje charakteryzujące się szybkim wzrostem i wysoką aktywnością enzymatyczną w niskich temperaturach. Drobnoustrojów o takiej aktywności katalitycznej poszukiwałem wśród mikroorganizmów zimnolubnych, do których zaliczane są psychrofile i psychrotrofy. Niewiele badań poświęcono analizie biokatalitycznych uzdolnień tych drobnoustrojów w utlenianiu związków organicznych w przeciwieństwie do mikroorganizmów mezofilnych. W związku z hydrofobowością i hamującym wpływem toksycznych terpenów na wzrost i fizjologię mikroorganizmów w kręgu moich zainteresowań badawczych znalazły się również biokatalizatory porfiryne wykazujące stabilność i zwiększoną rozpuszczalność w układach bezwodnych. Wykazanie kluczowej roli metaloporfiryn w naturalnych procesach redox zachodzących przy udziale cytochromu P-450, peroksydazy i katalazy, otworzyło możliwości zastosowania związków porfiryndowych w obszarze tzw. katalizy biomimetycznej.

Cykl przedstawionych publikacji dotyczy badań nad biotechnologicznymi metodami przekształcania niedrogich prekursorów terpenowych w kierunku wytwarzania cennych związków smakowo-zapachowych.

Cel i zagadnienia badawcze będące przedmiotem prezentowanego osiągnięcia naukowego mają charakter wielowątkowy i zmierzały do opracowania wydajnej metody biotransformacji izomerów pinenu przy użyciu mikroorganizmów psychrotroficznych oraz katalizatorów porfiryndowych. Z naukowego punktu widzenia, w celu wzbogacenia wiedzy na temat właściwości biomimetycznych naturalnych i syntetycznych porfiryndów oraz właściwości biokatalitycznych mikroorganizmów zimnolubnych, istotnym było także określenie mechanizmów i czynników wpływających na aktywność badanych biokatalizatorów oraz na

⁵ Schewe H., Mirata M.A., Holtmann D., Schrader J., Biooxidation ofmonoterpenes with bacterial monooxygenases. *Process Biochem.* **2011**, 46, 1885–1899.

⁶ Krings U., Berger R.G. Biotechnological production of flavors and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 49, 1–8.

⁷ Bicas J.L., Dionisio A.P., Pastore G.M. Bio-oxidation of terpenes: an approachfor the flavor industry. *Chem. Rev.* **2009**, 910 4518–4531.

wydajność reakcji biotransformacji. Celem o znaczeniu aplikacyjnym było opracowanie biotechnologicznych sposobów oksydacji α - i β -pinenu w kierunku zwiększenia wydajności produktów o interesujących właściwościach biologicznych znajdujących zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz perfumeryjnym.

WYNIKI

W pierwszym etapie badań wykonałem szczegółową analizę aktywności wyselekcjonowanych szczepów psychrotroficznych (temp. w zakresie 4-25°C) w kierunku utleniania wybranych terpenów [*R*-(+)-limonen, α - i β -pinen, α - i γ -terpinen]. Wyniki tych badań zaprezentowałem na międzynarodowym kongresie FEMS w Goteburgu⁸. W doświadczeniach wykorzystałem następujące gatunki grzybów nitkowatych (wyizolowanych z próbek gleby ze Spitzbergenu): *Mortierella minutissima* 01, *M. alpina* 22, *Penicillium chrysogenum* 9, *Chrysosporium pannorum* A1⁹. Przeprowadzona przeze mnie analiza produktów biotransformacji techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS), z wykorzystaniem dostępnych bibliotek widm masowych (NIST, MassFinder) wykazała, że szczepy te charakteryzują się wysoką aktywnością biokatalityczną oraz regioselektywnością w utlenianiu monoterpenów. W zależności od stosowanego gatunku grzyba uzyskiwałem zasadniczo różny profil produktów. Najaktywniejszymi biokatalizatorami w procesie utleniania limonenu okazały się *Mortierella minutissima* 01 i *Chrysosporium pannorum* A1. Z użyciem pierwszego szczepu otrzymano najwyższe stężenie alkoholu perylowego, zaś drugiego szczepu, nieokreślonego terpenoidu, który jest nieznanym dotąd produktem utleniania limonenu, aczkolwiek występuje naturalnie w olejkach eterycznych roślin z rodziny werbenowatych (*Caryopteris clandonensis*, *C. mongolica* and *C. incana*).

Analiza ekstraktów pochodowlanych wykazała także, że grzyby *Mortierella alpina* 22 or *C. pannorum* A1 katalizują reakcję hydroksylacji węgla w pozycji C-4 cząsteczki α -pinenu do *trans*-werbenolu i następnie do werbenonu. Ponadto w filtratach pochodowlanych zidentyfikowano jeszcze w dużo mniejszych stężeniach: tlenek α -pinenu, *trans*-karweol (*M. alpina* 22) i *trans*-pinokarweol (*C. pannorum* A1). Z kolei hydroksylacja α -pinenu przy użyciu *Mortierella minutissima* 01 zachodzi w pozycji C-10, z utworzeniem myrtenolu i kwasu myrtenowego. Głównymi produktami biotransformacji β -pinenu przez *C. pannorum*

⁸ Trytek M., Fiedurek J., Skowronek M. Psychrotrophic fungi as catalysts for the oxidation of monoterpenes. 3rd Congress of European Microbiologists FEMS, Gothenburg, Sweden June 28-July 2, 2009, p. 101.

⁹ Fiedurek J., Gromada A., Słomka A., Kornilowicz-Kowalska T., Kurek E., Melke J. Catalase activity in Arctic microfungi grown at different temperatures. *Acta Biol. Hung.* **2003** 54, 105-112.

A1 (oraz *Mortierella alpina* 22) był *trans*-pinokarweol oraz dwa inne nieokreślone związki terpenowe. W przypadku szczepu *M. minutissima* 01, jako główne produkty biotransformacji otrzymałem *cis*-myrtanol, kwas myrtanowy (i dodatkowo jeden nieznany związek). Wśród produktów biotransformacji α - i β -terpinenu zidentyfikowałem terpinen-7-al i 1,8-cineol, jednakże reakcja ta przebiegała z dużo niższą wydajnością w porównaniu do biokonwersji limonenu i obu izomerów pinenu. Z tego względu w kolejnych doświadczeniach skoncentrowałem się na biotransformacji α i β -pinenu z udziałem *C. pannorum* A1 i optymalizacji wydajności tego procesu. Ponadto w obu układach biokatalitycznych otrzymałem bardzo interesujące związki, takie jak: werbenol - wykazujący wysoką aktywność przeciwnowotworową i werbenon – aktywny składnik wielu olejków aromatycznych. Związki te występują w olejkach roślin m.in., *Hyssopus officinalis* (hyzop lekarski), *Rosmarinus officinalis* (rozmaryn lekarski), *Verbena triphylla* (werbena cytrynowa), jednakże w bardzo małych ilościach.

Podsumowując, badania te potwierdziły, że analizowane szczepy psychrotroficzne są obiecującymi biokatalizatorami utleniania terpenów. Pomimo tego, że środowisko naturalne tych mikroorganizmów nie jest bogate w związki terpenowe to, najprawdopodobniej wskutek kumulowania się w strefie podbiegunowej coraz większej ilości różnych ksenobiotyków, grzyby te wykształciły systemy enzymatyczne umożliwiające wykorzystanie terpenów jako alternatywnego źródła węgla i energii w warunkach ograniczonego dostępu do łatwiej przyswajalnych substratów.

W kolejnym etapie brałem udział w badaniach mających na celu opracowanie wydajnej biokonwersji α -pinenu do *trans*-werbenolu i werbenonu z użyciem nieopisanego jeszcze rodzaju biokatalizatora - psychrotroficznego grzyba *Chrysosporium pannorum* [O6]. W wyniku doboru podłoża i obrotów mieszadła określiłem najkorzystniejsze warunki hodowli grzyba w podłożach płynnych (w temp. 20°C) dla uzyskania odpowiedniej formy morfologicznej biokatalizatora w postaci małych regularnych peletów o średnicy 1-2 mm. Rozmiary peletów, kształt, czy stopień ich upakowania są ważnymi parametrami morfologicznymi grzybów wpływającymi na efektywność procesu biotechnologicznego i poprawę biodostępności hydrofobowego substratu oraz tlenu do biokatalizatora. Wykazałem, że wydajność biokatalizy w obecności toksycznego substratu jest skorelowana z szybkością zużycia tlenu z podłoża przez grzybnię. Dzięki temu możliwe było określenie czasu dodatku α -pinenu do hodowli (po 72 h), przy jednoczesnym zminimalizowaniu jego toksycznego wpływu na grzybnię i ograniczeniu efektu hamującego jej aktywność metaboliczną. Stwierdzono, że grzybnia w fazie wzrostu logarytmicznego (24-62 h) charakteryzuje się

ponad 2-krotnie wyższą aktywnością niż w fazie stacjonarnej (62-84 h), co koreluje ze spadkiem aktywności oksygenaz, którą obserwowano u mikroorganizmów mezofilnych osiągających fazę stacjonarną wzrostu^{10,11,12}. Warto podkreślić, że optymalny czas biokonwersji pinenu (od 1 do 3 dni) przy użyciu tego psychrotrofa jest krótszy niż przy zastosowaniu grzybów mezofilnych z rodzaju *Aspergillus*, *Candida*, *Hormonema* czy podstawczaków *Pleurotus sapidus*. Biokatalizator ten wykazuje wysoką aktywność w zakresie temperatur od 10 do 20°C, która gwałtownie spada po przekroczeniu 25°C. Zaobserwowano, że w temp. 15°C, wraz z ograniczeniem przyrostu biomasy, wzrasta wydajność produktów biotransformacji (wyrażona w łącznej ilości związków wytworzonych przez 1 g suchej masy grzybni). Prawdopodobnie ma to związek z konkurencją między metabolizmem podstawowym (mianowicie między procesami biosyntezy głównych składników komórkowych) a hydroksylacją substratu o dostęp do puli zredukowanych nukleotydów: NADPH₂ i NADH₂, które pełnią rolę kofaktorów monooksygenaz odpowiedzialnych za oksydatywną biotransformację¹³.

W wyniku optymalizacji warunków utleniania α -pinenu z użyciem szczepu *C. pannorum* uzyskano najwyższą wydajność *trans*-werbenolu (722 mg/L) i werbenonu (176 mg/L) spośród znanych dotychczas systemów biotransformacji terpenów. Specyficzna wydajność tej biotransformacji jest ok 20-krotnie wyższa w porównaniu z wydajnością tej samej reakcji katalizowanej przez mezofilne bakterie *Pseudomonas* sp. Znaczny wzrost wydajności produktów był możliwy dzięki ustaleniu optymalnej dawki α -pinenu uzależnionej od wieku grzybni, określeniu czasu i obniżeniu temperatury biokonwersji oraz opracowaniu sekwencyjnego dodatku substratu do podłoża. Przetestowano dwa warianty sekwencyjnego dodatku α -pinenu do podłoża w czasie inkubacji *C. pannorum*. Stwierdzono, że stopniowy jego dodatek w stężeniach 0,2% po 24 h inkubacji a następnie 0,3, 0,5 i 0,5% odpowiednio po 36, 48 i 60 h okazał się skutecznym sposobem zwiększenia aktywności badanej grzybni (o 44%) jak i wydajności produktów biotransformacji (niemal 2-krotnie) w porównaniu z jednorazowym podaniem substratu w dawce 1,5% (v/v). Odpowiedni sposób dozowania substratu przyczynił się prawdopodobnie do dalszego ograniczenia toksycznego efektu i stworzenia warunków dla adaptacji grzyba do wzrastającego stężenia α -pinenu, co może

¹⁰ Tan Q., Day D.F., Cadwallader K.R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochem.* **1998**, 33, 29–37.

¹¹ Buhler B., Witholt B., Hauer B., Schmid A. Characterization and application of xylene monooxygenase for multistep biocatalysis. *Appl Environ Microb.* **2002**, 68, 560–568.

¹² Walton A.Z., Steward J.D. Understanding and improving NADPH-dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. *Biotechnol Progr.* **2003**, 20, 403–411.

¹³ Kuhn D., Blank L.M., Schmid A., Buhler B. Systems biotechnology–rational whole-cell biocatalyst and bioprocess design. *Eng Life Sci.* **2010**, 10, 384–397.

wiązać się z indukcją enzymów zaangażowanych w jego oksydacyjną biotransformację. Wyniki tych badań były ważnym osiągnięciem zarówno od strony naukowej jak i praktycznej. Na proponowane rozwiązanie uzyskano patent, a wyniki opublikowano w uznanym czasopiśmie biotechnologicznym *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [O6].

Przeprowadzone badania potwierdziły, że mikroorganizmy psychrofilne cechuje względnie wysoka tolerancja względem niekorzystnych warunków środowiskowych związanych z obecnością terpenów. Ze względu na dużą zdolność adaptacyjną, musiały wykształcić mechanizmy chroniące je przed nagłymi zmianami środowiskowymi. Poznanie mechanizmów adaptacyjnych do określonych stresów może zminimalizować ich negatywne skutki, a nawet przyczynić się do zwiększenia wydajności syntetyzowanych przez te drobnoustroje ważnych metabolitów. Z danych literaturowych wynika, że w regioselektywnej reakcji biokonwersji terpenów katalizowanej przez grzyby ważną rolę odgrywają wolne rodniki¹⁴, które według mojej opinii, łącznie z toksycznym substratem stwarzają warunki stresogenne dla grzybni. Mogą one odgrywać pewną rolę w przystosowaniu się grzybni do toksycznych terpenów. Powyższe fakty były inspiracją do określenia wpływu abiotycznych czynników stresowych na biotransformację α -pinenu [O7]. Chociaż istnieje wiele danych na temat mechanizmów regulacji w odpowiedzi na określone stresy środowiskowe oraz znane są liczne przykłady wykorzystania np. stresu osmotycznego, pH czy oksydacyjnego do produkcji metabolitów pierwszorzędowych jak i drugorzędowych^{15,16,17,18,19}, niewiele wiadomo na temat roli stresów abiotycznych i odpowiedzi drobnoustrojów na takie warunki w procesach biokonwersji toksycznych związków organicznych.

Analiza wydajności produktów biotransformacji oraz pomiar ogólnej aktywności metabolicznej mierzonej szybkością zużycia tlenu przez psychrorofa *C. pannorum* wykazały, że warunki stresowe (stres rozpuszczalnikowy, pH i termiczny) mają negatywny wpływ na metabolizm grzybni. Jednakże w wyniku ich odpowiedniej kontroli, mogą także przyczynić

¹⁴ Krings U., Lehnert N., Fraatz M., Hardebusch B., Zorn H., Berger RG. Autoxidation versus biotransformation of α -pinene to flavors with *Pleurotus sapidus*: regioselective hydroperoxidation of α -pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol. *J Agric Food Chem.* **2009**, 57, 9944–9950.

¹⁵ Varela C.A., Baez M.E., Agosin E. Osmotic stress response: quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 4222–4229.

¹⁶ Fiedurek J. Production of *Aspergillus niger* catalase under various stress conditions. *Acta Microbiol. Polon.* **2000**, 49, 43–49.

¹⁷ Skowronek M., Fiedurek J. Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, 95, 686–692.

¹⁸ Feehily C., Karatzas K.A. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, 114, 11–24.

¹⁹ Wei X., Tian G., Ji Z., Chen S. A new strategy for enhancement of poly- γ -glutamic acid production by multiple physicochemical stresses in *Bacillus licheniformis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, 90, 709–713.

się do zwiększenia aktywności biokatalitycznej grzybni. Stwierdzono, że użycie niektórych czynników stresowych (stres rozpuszczalnikowy i stres pH) wobec grzybni psychrotroficznej przed procesem biotransformacji, pozwala na zwiększenie jej aktywności w procesie utleniania α -pinenu. Wykorzystanie grzybni po stresie kwasowym i alkalicznym (w pH 2,0 i pH 10,0) w biotransformacji umożliwiło znaczący przyrost wydajności produktów (o blisko 50%), w porównaniu do grzybni kontrolnej (pH 5,6) nie poddanej stresowi. Podobną wydajność (1,5-krotny przyrost w przeliczeniu na 1 g biomasy) otrzymano dla głównych produktów biotransformacji: werbenolu i werbenonu. Niewielki wzrost wydajności biokonwersji odnotowano w przypadku stresu rozpuszczalnikowego (1 h) przy użyciu dioksanu, chloroformu i etanolu, w stężeniu 20%. Zauważono jednoczesny spadek ilości poddanej stresom abiotycznym biomasy oznaczonej po procesie biotransformacji. Może mieć to związek z wydłużonym czasem generacji komórek podczas ich adaptacji do nagłych zmian hydrofobowości i kwasowości środowiska, co zaobserwowano w przypadku drożdży *Debaromyces hansenii*²⁰. Z drugiej strony wykazano, że spadek ilości biomasy jest wynikiem długotrwałego stresu rozpuszczalnikowego prowadzącego do jej lizy. Świadczył o tym drastyczny wzrost zawartości białka (oznaczonego metodą Bradforda) w podłożu po 1-h inkubacji z rozpuszczalnikami organicznymi. Powyższe obserwacje sugerowały celowość skrócenia czasu ekspozycji grzybni na rozpuszczalniki. W odpowiedzi na skrócony do 15 minut stres dioksanem uzyskano prawie 2-krotny przyrost aktywności biokonwersji przy zahamowaniu wzrostu i zmniejszeniu ilości nieaktywnej biokatalitycznie biomasy w porównaniu z grzybnią kontrolną. Do najbardziej istotnych zmian w aktywności metabolicznej grzybni poddanej stresowi temperaturowemu (50-60°C), należy zmiana profilu produktów biotransformacji, t.j. znaczący wzrost koncentracji ubocznego produktu (*trans*-pinokarweolu), któremu towarzyszył równoczesny spadek stężenia głównych produktów reakcji. Podobny wynik uzyskałem z wykorzystaniem dioksanu, etanolu i chloroformu, jako czynników stresowych. Najwyższy przyrost wydajności *trans*-pinokarweolu (10-krotny) otrzymano w efekcie zwiększenia temperatury inkubacji z 40 do 50°C. W przypadku zastosowania w.w. rozpuszczalników wydajność tego produktu była ponad 6-krotnie wyższa w porównaniu z kontrolą. Może mieć to związek ze zmianą regioselektywności oksygenaz bądź aktywacją w tych warunkach enzymów przekształcających werbenol i werbenon. *Dzięki tym badaniom wykazano, że efektywność biotransformacji zależy w dużym stopniu od oddziaływania biokatalizatora ze stresami środowiskowymi, które mogą przyczynić się do*

²⁰ Turk M., Montiel V., Zigon D., Plemenitas A., Ramos J. Plasma composition of *Debariomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiol.* **2007**, 153, 3586–3592.

zwiększenia zarówno wydajności powstających produktów biotransformacji, jak też stwarzają możliwość otrzymywania nowych. Dla zwiększenia wydajności katalizowanych przez drobnoustroje reakcji oprócz określenia roli abiotycznych czynników stresowych w reakcjach biotransformacji duże znaczenie mogą mieć pewne modyfikacje i optymalizacja warunków stresowych, takich jak czas ekspozycji komórek na stres [O7].

Ze względu na hydrofobowe i cytotoksyczne właściwości terpenów swoją uwagę skupiłem również na poszukiwaniu biokatalizatorów wykazujących stabilność i zwiększoną rozpuszczalność w układach niewodnych. Z moich wcześniejszych badań nad biotransformacją limonenu wynika, że właściwym kierunkiem usprawniającym reakcję oksydacyjnej biokonwersji jest użycie w tym celu porfiryn w roli katalizatorów biomimetycznych. Układy porfiryne stanowiące centra aktywne peroksydaz i cytochromów P450 odgrywają kluczową rolę w naturalnym procesie utlenienia terpenów i innych węglowodorów przy użyciu tlenu cząsteczkowego. Dlatego też, syntetyczne związki porfiryne są szeroko badane jako analogi enzymów zaangażowanych w reakcje biotransformacji różnorodnych związków chemicznych; zarówno pod kątem wyjaśnienia mechanizmów działania i funkcji enzymów, jaki i zwiększenia wydajności katalizowanych przez nie reakcji^{21,22,23}.

W związku z tym, postanowiłem najpierw określić potencjał biokatalityczny chloryn, naturalnych pochodnych porfiryn, które zastosowałem w charakterze związków imitujących działanie naturalnych enzymów z klasy oksydoreduktaz [O2]. W tym celu wyizolowane (we współpracy z Zakładem Fizjologii Roślin UMCS) z liści szpinaku barwniki fotosyntetyczne (chlorofile i feofityny) przebadano pod kątem aktywności biokatalitycznej w reakcji utlenienia α -pinenu i jego izomeru β - w roztworze dioksanu i chloroformu. Wykazano, że reakcja ta zachodzi w obu rozpuszczalnikach w obecności światła widzialnego w łagodnych warunkach (temp. 20-25°C). Głównymi produktami utlenienia α -pinenu były: pinokarwon, *trans*-pinokarweol, myrtenal oraz trzy inne nieznane związki poboczne; z kolei oksydacja β -pinenu dała odmienny profil produktów, przy czym w przeważającej ilości otrzymano myrtenal. W wyniku biotransformacji α -pinenu uzyskano łącznie ok. 4,5 g/L produktów w czasie 24 h. Dzięki współpracy z Zakładem Chemii Nieorganicznej UMCS możliwe było

²¹ Bernadou J.; Meunier B. Biomimetic chemical catalysts in the oxidative activation of drugs. *Adv. Synth. Catal.*, **2004**, 346, 171-184.

²² Parton R.F., Vankelecom I.F., Casselman M.J., Bezoukhanova C.P., Uytterhoeven J.N., Jacobs P.A. An efficient mimic of cytochrome P-450 from a zeolite-encaged iron complex in a polymer membrane. *Nature*, **2004**, 370, 541-544.

²³ Guo C.C., Liu X.Q., Liu Q., Liu Y., Chu M.F., Lin W.Y. First industrial-scale biomimetic oxidation of hydrocarbon with air over metalloporphyrins as cytochrome P-450 monooxygenase model and its mechanistic studies. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2009**, 13, 1250.

zbadanie mechanizmu tej reakcji. Analiza widm fluorescencji, którą przeprowadziłem w zakresie bliskiej podczerwieni wykazała, że w reakcji biotransformacji uczestniczy generowany w trakcie naświetlania układu tlen singletowy ($^1\text{O}_2$), jako jedna z reaktywnych form tlenu (ROS). W wyniku kolejnych badań z użyciem zmiataczy wolnych rodników (BHT, Trolox) dowiodłem, że w reakcji biotransformacji biorą także udział wolne rodniki tlenowe. Zastosowanie dodatkowych utleniaczy (nadtlenek *tert*-butylu) nie miało istotnego wpływu na wydajność reakcji, zarówno w ciemni jak i na świetle. Ponadto na podstawie wykonanych przez prof. Marka Majdana (Wydział Chemii, UMCS) obliczeń kinetyki reakcji katalizowanej przez cztery barwniki porfiryne, określono rzędowość reakcji biotransformacji pinenu (reakcja I-go rzędu). Te informacje w zestawieniu z analizą (GC\MS) poszczególnych produktów oraz analizą zmian intensywności pasma emisji $^1\text{O}_2$ (bez i w obecności pinenu) umożliwiły mi określenie najbardziej prawdopodobnego mechanizmu tego procesu [O2].

Dzięki analizie dynamiki reakcji wykazałem ponadto, że feofityny a i b (pozbawione jonu magnezu) cechują się wyższą niż chlorofile aktywnością biokatalityczną (*TTN* - *total turnover number*, wyrażoną w liczbie moli produktów wytworzonych z udziałem 1 mola barwnika) a także stabilnością wobec reaktywnych form tlenu. Pomocna w tym była szczegółowa analiza widm absorpcji i emisji barwników monitorowanych w obecności terpenów i przy ich braku w roztworach po kolejnych etapach naświetlania. Chlorofile i feofityny mają charakterystyczne pasma absorpcji UV-Vis i emisji. Chlorofile a i b posiadają pasmo Soreta przy 431 i 460 nm, pasmo Q przy 665, 647 nm i wykazują maks. fluorescencji przy 672 and 651 nm, zaś pasma feofityny a i b widoczne są odpowiednio: Soreta przy 414 i 440 nm i Q przy 668 i 656 nm, a maks. emisji przy 676 i 660 nm. Stopniowy spadek intensywności tych pasm, zaobserwowany podczas 24 godzinnego naświetlania zarówno układów zawierających α -pinen, jak i bez jego dodatku, świadczy o negatywnym wpływie światła na cząsteczki badanych biokatalizatorów. Przesunięcia pasm na widmach w czasie biotransformacji α -pinenu, dodatkowo wskazują na zmiany jakościowe w badanych układach, co wiąże się ze zmianą struktury cząsteczek prowadzących do ich rozkładu. Z analizy tych widm wynika, że feofityna *a* jest najbardziej stabilna, zaś chlorofil *b* najłatwiej ulega wpływom warunków prowadzonej reakcji utleniania. Wykazano większą fotostabilność katalizatorów chlorofilowych w układach nie zawierających α -pinenu, niż w układach z jego udziałem, przy czym na podstawie analizy widm wzbudzenia i emisji można sądzić, że obecność produktów biotransformacji wpływa na stabilizację przejściowych produktów rozpadu chlorofili. Z kolei w przypadku feofityn nie odnotowano zależności pomiędzy

degradacją barwnika i obecnością produktów reakcji biotransformacji. Stwierdzono, że przebieg fotodegradacji chlorofilu a i chlorofilu b może zachodzić różnymi szlakami, co daje informacje na temat ewentualnych miejsc modyfikacji tych naturalnych molekuł, które prowadziłyby do zwiększenia ich stabilności. Fotodestrukcja badanych biokatalizatorów spowodowana była najprawdopodobniej rozpadem pierścienia porfiryнового w pozycji C5 lub/oraz wiązania podwójnego w łańcuchu fitolowym

Badania wskazują także, że efektywność biokatalityczna chlorofilu i feofityny zależy od ich stężenia; jego wzrost powoduje spadek aktywności tych porfiryn. Na podstawie analizy widm wzbudzenia badanych układów stwierdzono, że prawdopodobnie następuje to w wyniku aglomeracji cząsteczek, która powoduje częściowe wyłączenie centrów aktywnych z reakcji. Dlatego istotny dla zwiększenia wydajności biotransformacji jest dobór odpowiedniego stosunku molowego substratu do katalizatora.

Po raz pierwszy użyto chlorofilu oraz feofityny w roli biokatalizatorów reakcji utleniania α - i β -pinenu, wykazano udział tzw. tlenu singletowego i wolnych rodników w tym procesie, oraz stwierdzono wyższą fotostabilność i wydajność biokatalityczną feofityny w porównaniu z chlorofilami. Badania wskazały, że wśród naturalnych porfiryn można poszukiwać katalizatorów biomimetycznych o zróżnicowanych właściwościach katalitycznych i oporności na czynniki oksydacyjne.

W związku z tym kolejną naturalną porfiryną, którą wykorzystano w badaniach nad katalizą biomimetyczną α -pinenu była protoporfiryna IX (PPIX). Żelazoprotoporfiryna IX jest grupą prostetyczną cytochromu P-450. Mając na uwadze słabą rozpuszczalność PPIX i wrażliwość tego typu biokatalizatorów na ROS, celem była modyfikacja tej porfiryny w kierunku otrzymania fotokatalizatora charakteryzującego się dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych oraz zwiększoną stabilnością fotochemiczną. Dzięki nawiązanej współpracy z prof. dr hab. D. Gryko z Instytutu Chemii Organicznej PAN, uzyskano nowy związek PP(Lys-OMe)₂ o nazwie ester dimetylowy 8,13-diwinilo-3,7,12,17-tetrametylo-2,18-bis[3-(N6-tert-butoksykarbonylo-lizyno-karbonylo)etylo]porfiryny, w wyniku przyłączenia estru metylowego lizyny do cząsteczki protoporfiryny IX [O4]. Dokonano charakterystyki strukturalnej otrzymanej pochodnej za pomocą technik spektroskopowych: NMR, IR i UV-Vis. Wykazano, że charakteryzuje się ona bardzo dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych i znacznie większą odpornością na działanie światła widzialnego, w stosunku do wyjściowej porfiryny. Przejawiało się to znacznie mniejszym spadkiem absorbancji i intensywności emisji badanego związku w porównaniu do PPIX pod wpływem naświetlania roztworów w DMSO. Porównanie zdolności

absorpcyjno-emisyjnych wskazało również na fakt, iż przeprowadzona modyfikacja nie obniżyła względnej wydajności kwantowej otrzymanego katalizatora. Przełożyło się to zarówno na zachowanie jego właściwości fluorescencyjnych, jak i na wysoką aktywność fotokatalityczną. Po raz pierwszy określono optymalne stężenie biokatalizatora ($7,5 \times 10^{-6}$ M) dla reakcji fotoutleniania terpenu, na podstawie najwyższej intensywności pasma odpowiadającego fosforescencji $^1\text{O}_2$ (1280 nm), wygenerowanego wskutek wzbudzenia porfiryny światłem o $\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm. W wyniku przeprowadzonej reakcji utleniania α -pinenu otrzymano wodoronadtlenek pinenu oraz pinokarwon, *trans*-pinokarweol i myrtenal z efektywnością katalityczną *TTN* równą 4969,1 po 30 h reakcji.

Istotnym problemem w zastosowaniu biomimetycznych układów porfiryńowych w procesach przemysłowych, oprócz dość niskiej stabilności porfiryn wobec czynników utleniających, jest ich niska regioselektywność, oraz trudność z reizolacją i powtórным ich wykorzystaniem. Z danych literaturowych wynika, że na poprawę stabilności tych katalizatorów, a także regioselektywności, nierzadko wpływa ich immobilizacja w różnych materiałach organicznych i nieorganicznych^{24,25,26,27}. Dlatego istotną częścią moich badań była próba immobilizacji porfiryn. We współpracy z zespołem prof. M. Majdana, przeprowadzono pomyślnie proces enkapsulacji amidowej pochodnej PPIX w matrycy krzemionkowej techniką zol-żel. Wybór żelu krzemionkowego, jako nośnika dla immobilizacji porfiryn, podyktowany był jego korzystnymi właściwościami: transparentnością dla promieniowania widzialnego, możliwością kontroli porowatości, a także względnie łatwym sposobem jego otrzymywania w łagodnych warunkach. W metodzie zol-żel, której istotą jest przeprowadzenie w temperaturze pokojowej serii reakcji hydrolizy i polikondensacji alkoholanów wielu metali, zastosowano tetraetoksyksylan w roli prekursora krzemionki. Otrzymany na tej drodze materiał stanowi złożoną strukturę zawierającą połączone ze sobą pory, utworzone przez trójwymiarową sieć krzemionkową. Poprzez pomiar widm absorpcji, emisji i wzbudzenia monitorowano cały proces tworzenia interkalowanego porfiryną żelu. Dzięki temu zaobserwowano silne oddziaływanie badanego związku z

²⁴ Bedioui F. Zeolite-encapsulated and clay-intercalated metal porphyrin, phthalocyanine and Schiff-base complexes as models for biomimetic oxidation catalysts: an overview. *Coord. Chem. Rev.*, **1995**, 144, 39-68.

²⁵ Skrobot F.C., Valente A.A., Neves G., Rosa I., Rocha J., Cavaleiro, J.A. Oxidation of aromatic monoterpenes with monoterpenes oxidation in the presence of Y zeolite-entrapped manganese(III) tetra(4-Nbenzylpyridyl) porphyrin. *J. Mol. Catal. A Chem.*, **2003**, 201, 211-222.

²⁶ Griesbeck A., El-Idreesy T. Solvent-free photooxygenation of 5-methoxyoxazoles in polystyrene nanocontainers doped with tetrastyrilporphyrine and protoporphyrine-IX. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, 4, 205-209.

²⁷ Huang G., Guo C.C., Tang S.S., Catalysis of cyclohexane oxidation with air using various chitosan-supported metallotetraphenylporphyrin complexes. *J. Mol. Catal. A Chem.*, **2007**, 261, 125-130.

otaczającą siecią krzemionki, szczególnie w końcowym etapie procesu zol-żel, objawiające się protonowaniem jego cząsteczek, utworzeniem formy dikationu i ich aglomeracją. Ostatnim etapem badań było zastosowanie unieruchomionej pochodnej amidowej protoporfiryny IX w postaci żelu krzemionkowego, w oksydatywnej transformacji α -pinenu. W trakcie reakcji nie zaobserwowano wymywania się porfiryny z porów krzemionki, co potwierdza przydatność metody zol-żel dla immobilizacji biokatalizatorów porfiryńowych. Z drugiej strony, unieruchomiona porfiryra PP(Lys-OMe)₂/SiO₂ wykazała 36-krotnie niższą aktywność biokatalityczną w porównaniu z porfiryną w układzie homogenicznym, prawdopodobnie w skutek obniżonej zdolności zaglomerowanych w krzemionce cząsteczek PP(Lys-OMe)₂ do generowania reaktywnych form tlenu i ograniczenia dostępności substratu do centrum katalitycznego.

Wykazano, że możliwa jest modyfikacja naturalnych porfiryn podstawnikami aminokwasowymi w kierunku otrzymania katalizatora biomimetycznego charakteryzującego się wyższą fotostabilnością. Otrzymana z dużą wydajnością amidowa pochodna PPIX zachowuje przy tym wysoką aktywność w fotoutlenianiu terpenów. Pomyślnie przeprowadzona immobilizacja jej cząsteczek w matrycy krzemionkowej metodą zol-żel pozwala na stwierdzenie, że metoda ta jest odpowiednia dla unieruchamiania biokatalizatorów porfiryńowych. Jednakże obniżenie aktywności biokatalitycznej PP(Lys-OMe)₂ (w przeciwieństwie do fluorescencji) w SiO₂ wskazuje na konieczność dalszej modyfikacji PPIX lub zbadania wpływu immobilizacji w SiO₂ na aktywność innych porfiryn posiadających różne podstawniki w makrocyklu porfiryńowym.

W kolejnym etapie [O5] wspólnie z mgr A. Lipke (Wydział Chemii, UMCS) sprawdzono możliwość zimmobilizowania chlorofilu w matrycy krzemionkowej pod kątem poprawy jego stabilności fotochemicznej. Określiłem ponadto, wydajność katalityczną otrzymanego w ten sposób biokatalizatora (w formie sproszkowanej) w zależności od stężenia jego cząsteczek w żelu krzemionkowym, ponieważ jak wskazano w badaniach [O2] parametr ten jest istotny dla zwiększenia efektywności reakcji biotransformacji.

Analiza spektralna żeli krzemionkowych, dotowanych wyciągiem chlorofilowym z liści szpinaku, wykazała obecność cząsteczek chlorofilu w tworzonym się żelu krzemionkowym. Jednakże w dalszych etapach dojrzewania żelu, przesunięcia charakterystycznych dla tego barwnika pasm absorpcji i emisji wskazywały na oddziaływanie jego cząsteczek z krzemionką i stopniowe przekształcanie się chlorofilu *a* w feofitynę *a*. Nastąpiło to poprzez wymianę jonów magnezowych chlorofilu na protony pochodzące prawdopodobnie z kwaśnych grup silanolowych krzemionki. Wykazano, że stężenie

chlorofilu ma istotny wpływ na tworzenie się dimerów i wyższych aglomeratów w krzemionce. Analiza zależności absorbancji chlorofilu i feofityny od stężenia (w zakresie od 10^{-6} do $2,2 \times 10^{-5}$ M) oraz wykonane we współpracy z prof. M. Majdanem obliczenia stałych dimeryzacji chlorofilu i feofityny (K_{dim}) (na podstawie otrzymanych widm absorpcji prób) sugerują przewagę form dimerycznych feofityny nad monomerami w alkożelu. Dzięki analizie spektralnej możliwe było wybranie 2 prób z obniżoną aglomeracją chlorofilu i feofityny do przeprowadzenia reakcji utlenienia α -pinenu w chloroformie. Przy użyciu analizy GC-FID, odnotowano ponad 2-krotnie wyższą aktywność w przypadku biokatalizatora z większą zawartością wyjściową cząsteczek chlorofilu Chl-2/SiO₂ ($2,1 \times 10^{-8}$ moli) w porównaniu z krzemionką o niższej zawartości barwnika Chl-1/SiO₂ ($8,9 \times 10^{-9}$ moli). W próbie kontrolnej bez chlorofilu, którą stanowił sproszkowany żel krzemionkowy, wykryto jedynie śladowe ilości produktów terpenoidowych. Wyniki te były zbieżne z uzyskanymi sygnałami fosforescencji tlenu singletowego badanych proszków; najwyższy sygnał $^1\text{O}_2$ odnotowano dla Chl-2/SiO₂. Zauważono jednocześnie, że w czasie trwania reakcji maleje łączne stężenie produktów: pinokarwonu, *trans*-pinokarweolu oraz myrtenolu względem wodoronadtlenku pinenu. Może mieć to związek m.in. ze spadkiem stężenia pinenu i wskazuje na fakt, że przy pewnym jego stężeniu ważną rolę w biotransformacji obok tlenu singletowego mogą odgrywać inne ROS. Po 30 godz. reakcji uzyskano wysoką efektywnością katalityczną na poziomie $TTN = 3165.6$. Po tym czasie, na widmach odbiciowych UV-Vis użytych w reakcji żeli zawierających chloryny, obserwowano spadek intensywności pasm w wyniku częściowego wymywania się ich cząsteczek z porów krzemionki. W mniejszym stopniu nastąpiło to w próbie Chl-1/SiO₂ ze względu na lepsze związanie się chlorofilu i feofityny z krzemionką w efekcie mniejszej aglomeracji ich cząsteczek. Jednakże w przeciwieństwie do chlorofilu w układzie homogenicznym (gdzie po 24 h obserwowano całkowity „fotobleaching”) w obu żelach krzemionkowych nadal zauważalne były pasma absorpcji pochodzące prawdopodobnie od kompleksu feofityny z SiO₂. Umożliwiło to przeprowadzenie z unieruchomionym katalizatorem 2 kolejnych (30-h) cykli katalitycznych z zachowaniem 8 i 13 % wyjściowej aktywności biokatalizatora. Jednak dla ograniczenia wymywania się chlorofilu z krzemionki i uzyskania wyższych efektywności biokatalitycznych ważne jest zoptymalizowanie warunków procesu zol-żel (np. pH, stosunku TEOS/woda, temp. suszenia, stężenia porfiryny). W wyniku unieruchomienia chlorofilu w krzemionce zwiększono jego stabilność fotochemiczną, co umożliwiło jego powtórne wykorzystanie w kolejnych 2 cyklach katalitycznych w przeciwieństwie do użytego w takim samym stężeniu chlorofilu w układzie homogenicznym.

Obiecujące wyniki powyższych badań stanowiły przesłankę do przeprowadzenia immobilizacji w SiO₂ różnych porfiryn syntetycznych i przebadania otrzymanych materiałów w katalizie biomimetycznej [O1]. We współpracy z prof. S. Radzkiem z Wydziału Chemii UMCS, otrzymano transparentne żele krzemionkowe domieszkowane/interkalowane komercyjnymi porfirynami hydrofobowymi: H₂TPP, H₂OEP, jak i porfirynami rozpuszczalnymi w wodzie: H₂TTMePP, H₂TCPP, H₂TMePyP, CuTTMePP i CuTMePyP. Jedynie wolne od metalu porfiryny wykazały wysoką aktywność biokatalityczną w reakcji utleniania α -pinenu (z użyciem tlenu cząsteczkowego) w temp. 20°C w czasie 16 h. Metaloporfiryny wymagają użycia dodatkowych utleniaczy oraz kofaktorów. Dlatego w dalszych badaniach skupiłem się na porfirynach wolnych od metalu.

Scharakteryzowano właściwości spektralne porfiryn interkalowanych w krzemionce i porównano je z wynikami uzyskanymi dla roztworów. W przypadku H₂TPP zauważono na widmach charakterystyczne dla protonowanej porfiryny przesunięcia maksimów długości fali, a także niemal 2-krotne obniżenie intensywności fluorescencji H₂TPP w zolu i w wysuszonym żelu krzemionkowym (kserożelu) w stosunku do fluorescencji porfiryny w roztworze DMSO. Zmiany te wskazywały na silną tendencję do aglomeracji sprotonowanej H₂TPP w SiO₂. Z kolei dla OEP (o silnych właściwościach elektronodonorowych) wykazano znaczny wzrost intensywności luminescencji w SiO₂ w porównaniu z roztworem THF. Na podstawie analizy widm absorpcji, emisji i dodatkowo spektroskopii Ramana oraz FT-IR stwierdzono tworzenie się kompleksu pomiędzy OEP a SiO₂ i występowanie oddziaływań typu wiązania wodorowego z grupą silksanolową ($\equiv$ Si-O-Si $\equiv$) krzemionki. Rodzaj interakcji jest istotny ze względu na trwałość wiązania się porfiryny z siecią krzemionki i wpływa na aktywność katalizatora.

Najwyższe stężenia produktów biotransformacji (pinokarwonu, pinokarweolu i myrtenolu) otrzymano z użyciem hydrofobowej H₂TPP i hydrofilowej H₂TMePyP. W przypadku H₂TPP/SiO₂ obserwowano dalsze szybkie protonowanie jej cząsteczek w układzie katalitycznym, co wiązało się z koniecznością regeneracji tego katalizatora (w roztworze NaOH) w celu ponownego użycia w reakcji biotransformacji. Dlatego postanowiłem przebadać dokładniej aktywność katalityczną kationowej porfiryny H₂TMePyP rozpuszczalnej w wodzie, wychodząc z założenia, że oprócz enkapsulacji w SiO₂, jej ewentualne wycieki z porów do hydrofobowego środowiska reakcji będą ograniczane barierą dyfuzyjną wynikającą ze słabych oddziaływań międzycząsteczkowych. Po udanej immobilizacji w zol-żelu, określiłem wpływ niektórych parametrów na wydajność biotransformacji (-)- α -pinenu, takich jak: naświetlanie, rodzaj rozpuszczalnika, stężenie

substratu, obecność akceptora/donora elektronów i utleniacza. Reakcja przebiega najwydajniej w chloroformie i dichlorometanie przy wzbudzeniu światłem widzialnym o intensywności od 120 do 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ w temperaturze 20-25°C z użyciem tlenu cząsteczkowego; dodatek silnego utleniacza H_2O_2 nie wpływał na wydajność reakcji. Zaobserwowałem, że obecność związków o umiarkowanych właściwościach elektronodonorowych (1 mmol) nieznacznie zwiększa wydajność reakcji, co można tłumaczyć pewnym podobieństwem do reakcji utleniania terpenów przez O_2 katalizowanej przez monooksygenazy z udziałem zredukowanego kofaktora NAD(P)H. Wykazałem (analiza GC-MS), że H_2TMePyP w żelu krzemionkowym (w stężeniu 10^{-5} mol dm^{-3}) może być użyta aż w 11 cyklach fotokatalitycznych bez znaczącego spadku aktywności. W trakcie reakcji nie obserwowałem wycieku porfiryny z krzemionki, a nieobecność H_2TMePyP w fazie ciekłej potwierdziłem analizą spektrometrii absorbcyjnej UV-Vis. Otrzymane w tym układzie związki są identyczne z produktami biotransformacji α -pinenu z użyciem grzybów z klasy Basidiomycetes oraz z produktami przejściowymi tworzonymi w szlaku degradacji tego terpenu przez bakterie *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* i *Bacillus pallidus*.^{28,29,30} Zatem krzemionka interkalowana hydrofilową porfiryną może pełnić rolę katalizatora biomimetycznego w reakcji utleniania naturalnego substratu, jakim jest α -pinen. Stanowi łagodną i przyjazną dla środowiska metodę otrzymywania pinokarwonu, pinokarweolu i myrtenolu – produktów zapachowych wykorzystywanych w perfumerii oraz do zwalczania szkodników drzew iglastych ze względu na fakt, że związki te są składnikami ich feromonów agregacyjnych. Wyniki tych badań wyróżniono na V Międzynarodowej Konferencji SOL-GEL MATERIALS 1-szą i 2-gą nagrodą za najlepsze komunikaty zjazdowe.

W pracy [O1] Po raz pierwszy opisano wolne od metalu porfiryny, jako katalizatory biomimetyczne unieruchomione w żelu krzemionkowym, w procesie fotoutleniania α -pinenu do pinokarwonu. Otrzymano metodą zol-żel trwały układ katalityczny na bazie hydrofilowej porfiryny i krzemionki, co pozwoliło na wielokrotne jego użycie w 11 cyklach katalitycznych. Wskazano również na pewne zjawiska fizykochemiczne, które mogą wpływać na właściwości luminescencyjne i biokatalityczne porfiryn immobilizowanych w SiO_2 .

²⁸ Busmann D., Berger RG (1994) In: Maarse H, van der Heij DG (eds) Trends in flavour research. Elsevier Science, Amsterdam.

²⁹ Savithiry N., Gage D., Fu W., Oriel P. Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425. *Biodegradation* **1998**, 9:337–341.

³⁰ Schewe H., Kaup B.-A., Schrader J. Improvement of P450BM-3 whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 78, 55-65.

W związku z tym przeanalizowano naturę tych zjawisk w celu wyjaśnienia, w jaki sposób zmiana właściwości fizykochemicznych porfiryn w SiO₂ determinuje efektywność i mechanizm katalizy. Pomocne w tym względzie było określenie korelacji pomiędzy właściwościami spektroskopowymi a aktywnością biokatalityczną porfiryn interkalowanych w krzemionce [O3]. Kierując się wnioskami z wyników poprzednich badań, unieruchomiono metodą zol-żel dwie nierozpuszczalne w wodzie porfiryny o odmiennej budowie (zróżnicowanych podstawnikach): oktaetyloporfiryne (OEP) i hematoporfiryne IX (HmP) w stężeniach od 10⁻⁶ do 2,2×10⁻⁵ M. Dzięki zastosowaniu spowolnionego suszenia w temperaturze pokojowej z użyciem tetraetoksylanu (TEOS) jako prekursora krzemionki otrzymano transparentne matryce dotowane porfirynami. Zarejestrowano i porównano widma absorpcji, emisji i wzbudzenia próbek na różnych etapach procesu zol-żel (zol, alkożel i kserożel), oraz przeprowadzono przy użyciu wysuszonych katalizatorów krzemionkowych fotooksydację α-pinenu do pinokarwonu. Enkapsulacja obu porfiryn w SiO₂ umożliwiła otrzymanie porowatych biomateriałów charakteryzujących się bardzo dobrymi właściwościami luminescencyjnymi. Jednakże tylko układ OEP/SiO₂ wykazał wysoką aktywność biokatalityczną w utlenianiu α-pinenu do wartościowych związków smakowo-zapachowych (pinokarwonu, *trans*-pinokarweolu, oraz myrtenolu), porównywalną z równoważną ilością moli porfiryny użytych w układzie homogenicznym. Znalezione także znaczące różnice spektroskopowe między tymi porfirynami na różnych etapach tworzenia się żeli krzemionkowych. W odróżnieniu od HmP, dla OEP obserwowano drastyczne obniżenie intensywności pasma Soreta w zolu i alkożelu wraz ze wzrostem jej stężenia. Stanowiło to podstawę do oszacowania udziału monomerów, dimerów i trimerów OEP w krzemionce i wykazania przewagi form dimerycznych tej porfiryny nad formami zaglomerowanymi. Przy wysokich stężeniach porfiryn wzrastał udział form zaglomerowanych w kserożelu, co ujawniało się poszerzeniem pasma Soreta porfiryn i charakterystycznym rozszczepieniem pasm wzbudzenia, które wskazuje na występowanie aglomeratów typu *H* (głowa-głowa) i typu *J* (głowa-ogon). W wyniku przeprowadzonej analizy powierzchni właściwej i rozmiaru porów wykazano, że badane biomateriały mają charakter mikroporowaty (> 17 Å), z niewielkim udziałem mezoporów i makroporów o średnicy 17-3000 Å. Rozmiar porów nośnika jest ważnym parametrem, wpływającym na efektywność procesu biokatalitycznego. Przewaga mikroporów potwierdza możliwość silnego zakotwiczenia w nich dimerów OEP bez ograniczeń sterycznych (z wykluczeniem większych oligomerów) i jednocześnie gwarantuje dostępność reagentów do katalizatora. Ponadto na podstawie analizy zmian

spektralnych na widmach absorpcji i emisji stwierdzono, że porfiryny obecne są w krzemionce głównie w formie dikationów.

W kolejnym etapie zbadalem wpływ stężenia obu porfiryn w SiO₂ na wydajność biokatalityczną. Najwyższą aktywność OEP/SiO₂ uzyskano dla stężenia 6×10^{-6} M; przy wyższych koncentracjach następował spadek aktywności katalitycznej, najprawdopodobniej wskutek wzrostu udziału większych agregatów porfiryny. W podobnym stężeniu OEP wykazywała najwyższą fluorescencję w alkożelu oraz ostre pasmo Soreta (i brak rozszczepienia pasma wzbudzenia), które wskazywały na brak aglomeracji w tych próbach. Takiej korelacji nie zaobserwowano w przypadku HmP, która w SiO₂ charakteryzowała się szczątkową (prawie 7-krotnie niższą) aktywnością w całym zakresie stężeń. Zatem znaczące różnice w aktywności katalitycznej, pomiędzy OEP a HmP-IX w krzemionce wynikają z odmiennej budowy ich cząsteczek i różnic we właściwościach elektronowych podstawników, jaki i sposobu oddziaływania z otaczającą siecią krzemionki. Prawdopodobnie silne oddziaływania grup karboksylowych HmP z wolnymi grupami hydroksylowymi krzemionki utrudniają tworzenie się reaktywnych form tlenu, przy czym nie hamują przejść promienistych (fluorescencji) wzbudzonych cząsteczek HmP do stanu podstawowego. Z danych literaturowych³¹ wiadomo, że wiązania kowalencyjne pomiędzy porfiryńą a krzemionką zapobiegają przejściom bezpromienistym stanu wzbudzonego porfiryny w SiO₂. Na podstawie otrzymanych danych ustaliłem formę katalizatora biorącego udział w reakcji biokatalizy i zaproponowałem mechanizm wyjaśniający przebieg, stymulowanej światłem widzialnym, biomimetycznej transformacji pinenu, w którym zasadniczą rolę odgrywają dimery i dikationy porfiryny OEP. Po wzbudzeniu układu, może następować transfer protonów z form dimerycznych OEP na wolne grupy silanolowe (Si-OH) lub wolne pary elektronowe grup siloksanolowych, w przeciwieństwie do HmP, której elektrofilowe podstawniki „blokują” te grupy.

Najwyższą wydajność produktów, tak jak w przypadku H₂TMePyP, otrzymałem z użyciem rozpuszczalników niepolarnych, znanych z utrzymywania względnie długich czasów życia ROS. Wykazałem ponadto, że pinokarwon nie powstaje z *trans*-pinokarweolu, a wszystkie trzy produkty są wynikiem niezależnych reakcji I-go rzędu, przebiegających z różną prędkością. Profil uzyskanych produktów wskazuje, że biotransformacja przebiega dwoma głównymi szlakami, w których udział biorą tlen singletowy (wytwarzanie pinokarwonu jako głównego produktu reakcji) oraz wolne rodniki tlenowe (wytwarzanie *trans*-

³¹ Garcia-Sanchez M.A., De la Luz V., Estrada-Rico M.L., Murillo-Martinez M.M., et al. Fluorescent porphyrins covalently bound to silica xerogel matrices. *J. Non-Cryst. Solids* **2009**, 355, 120-125.

pinokarweolu i myrtenolu jako ubocznych produktów). Wykazałem też, że produktem przejściowym tej reakcji jest wodoronadtlenek pinenu, z którego powstaje pinokarwon. Podobną rolę wodoronadtlenku pinenu opisano w niektórych reakcjach biotransformacji z użyciem mikroorganizmów³², co dodatkowo potwierdza biomimetyczne właściwości porfiryn interkalowanych w SiO₂.

Immobilizacja OEP w porowatych żelach krzemionkowych, obok oszacowania natury oddziaływania porfiryn z siecią krzemionki, umożliwiła otrzymanie katalizatora, który łatwo oddzielić od roztworu i ponownie użyć w biokatalizie w 4 kolejnych cyklach katalitycznych uzyskując łączną efektywność katalityczną TNN = 12 000 w ciągu 1 h. Nie jest to możliwe w przypadku wolnych porfiryn w roztworach, ponieważ są one stosunkowo szybko utleniane lub przechodzą w formę sprotonowaną, która wykazuje dużo niższą aktywność fotokatalityczną. W pracy [O3] po raz pierwszy określono korelację pomiędzy własnościami biomimetycznymi i spektroskopowymi, a także wykazano, że aktywność biokatalityczna porfiryn w matrycach krzemionkowych zależy w dużym stopniu od rodzaju unieruchomionej w porach żelu krzemionkowego porfiryny.

Podsumowując, enkapsulacja porfiryn o zróżnicowanych podstawnikach pomogła ustalić, jakie czynniki przyczyniają się do utraty aktywności biokatalitycznej niektórych porfiryn w żelach krzemionkowych, pomimo zachowania ich zdolności fluorescencyjnych. Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie aplikacyjne w projektowaniu nowych katalizatorów biomimetycznych oraz opracowaniu wydajnego procesu utlenienia terpenów do drogocennych produktów o działaniu leczniczym i właściwościach smakowo-zapachowych.

Wyniki uzyskane w badaniach nad wykorzystaniem grzybów psychrotroficznym w biotransformacji związków terpenowych oraz porfiryn w katalizie biomimetycznej umożliwiły opublikowanie obszernego artykułu przeglądowego w odpowiedzi na zaproszenie Redakcji czasopisma *Current Organic Chemistry*. Na bazie doświadczeń zdobytych w pracach eksperymentalnych nad toksycznymi i lotnymi monoterpunami zaproponowano sposoby rozwiązywania problemów występujących w reakcjach przekształcania tego typu związków. Praca przeglądowa [O8] omawia aktualny stan badań nad zwiększeniem wydajności procesu biotransformacji związków toksycznych. Dokonano w niej przeglądu obszernej literatury (211 pozycji), głównie z ostatnich lat i na ich tle przedstawiono wyniki badań własnych. Treść pracy zawiera zróżnicowane tematycznie zagadnienia, omawiające

³² Krings U., Lehnert N., Fraatz M., Hardebusch B., Zorn H., Berger R. Autoxidation versus biotransformation of α -pinene to flavors with *Pleurotus sapidus*: regioselective hydroperoxidation of α -pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 9944–9950.

zarówno czynniki biotyczne (drobnoustroje, enzymy) jak i abiotyczne (temperatura, pH, stężenie tlenu, rodzaj rozpuszczalnika) mające wpływ na wydajność biotransformacji. Zawarto w niej zarówno aspekty krytyczne jak i sugestie będące rodzajem przewodnika, umożliwiającego bardziej racjonalne planowanie doświadczeń w zakresie biotransformacji związków organicznych. Wiele miejsca poświęcono także wykorzystaniu w procesie biotransformacji związków organicznych biomimetycznych układów porfiryńowych. Chociaż jeszcze dalekie od powszechnego wykorzystania na skalę przemysłową posiadają one obiecujące perspektywy, szczególnie w produkcji farmaceutyków. Zastąpienie wielu tradycyjnych przemysłowych procesów technologicznych procesami opartymi o nowoczesną biokatalizę sprawia, że produkcja wielu leków, biopolimerów oraz innych związków chemicznych, jest dużo tańsza i wydajniejsza, a dzięki temu produkty te są łatwiej dostępne.

Najważniejsze wyniki badań związane z opisanym powyżej nurtem badawczym zawarte w monotematycznym cyklu 7 oryginalnych prac eksperymentalnych i 1 pracy przeglądowej:

- Wykazano, że analizowane szczepy psychrotroficzne są obiecującymi biokatalizatorami utleniania terpenów.
- W wyniku optymalizacji warunków utleniania α -pinenu z użyciem szczepu *C. pannorum* i opracowania sekwencyjnego dodatku substratu do podłoża uzyskano najwyższą wydajność trans-werbenolu (722 mg/L) i werbenonu (176 mg/L) spośród znanych dotychczas systemów biotransformacji terpenów.
- Wykazano, że efektywność biotransformacji zależy w dużym stopniu od oddziaływania biokatalizatora w postaci grzyba *C. pannorum* ze stresami środowiskowymi, które mogą przyczynić się do zwiększenia zarówno wydajności powstających produktów biotransformacji, jak też stwarzają możliwość otrzymywania nowych.
- Po raz pierwszy użyto chlorofile oraz feofityny w roli biokatalizatorów reakcji utleniania α - i β -pinenu, wykazano udział tzw. tlenu singletowego i wolnych rodników w tym procesie, oraz stwierdzono wyższą fotostabilność i wydajność biokatalityczną feofityn w porównaniu z chlorofilami.
- Wykazano, że możliwa jest modyfikacja naturalnych porfiryn podstawnikami aminokwasowymi w kierunku otrzymania katalizatora biomimetycznego charakteryzującego się wyższą fotostabilnością. Otrzymana z dużą wydajnością amidowa

pochodna PPIX zachowuje przy tym wysoką aktywność w fotoutlenianiu α -pinenu. Pomyślnie przeprowadzona immobilizacja jej cząsteczek w matrycy krzemionkowej metodą zol-żel pozwala na stwierdzenie, że metoda ta jest odpowiednia dla unieruchamiania biokatalizatorów porfiryńowych.

- W wyniku unieruchomienia chlorofilu w krzemionce zwiększono jego stabilność fotochemiczną, co umożliwiło jego powtórne wykorzystanie w kolejnych 2 cyklach katalitycznych w przeciwieństwie do użytego w takim samym stężeniu chlorofilu w układzie homogenicznym.*
- Po raz pierwszy opisano wolne od metalu porfiryny, jako katalizatory biomimetyczne unieruchomione w żelu krzemionkowym, w procesie fotoutleniania α -pinenu do pinokarwonu. Otrzymano metodą zol-żel trwały układ katalityczny na bazie hydrofilowej porfiryny i krzemionki, co pozwoliło na wielokrotne jego użycie w 11 cyklach katalitycznych.*
- Po raz pierwszy określono korelację pomiędzy własnościami biomimetycznymi i spektroskopowymi, a także wykazano, że aktywność biokatalityczna porfiryn w matrycach krzemionkowych zależy w dużym stopniu od rodzaju zamykanej w porach żelu krzemionkowego porfiryny.*
- W wyniku optymalizacji procesu biotransformacji α -pinenu do werbenolu, werbenonu oraz pinokarwonu i pinokarweolu przy udziale mikroorganizmów psychrotroficznych oraz w układach biomimetycznych z użyciem syntetycznych i naturalnych pochodnych porfiryn (oraz ich form modyfikowanych) uzyskano 15-krotny wzrost wydajności tego procesu.*

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Wykaz publikacji zamieszczono w odrębnym załączniku 4, w pkt. II A-D.

PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Jestem absolwentem Wydziału Chemii UMCS. Studia wyższe na kierunku chemia (specjalizacja w zakresie chemii organicznej) ukończyłem w 2000 roku. Pracę magisterską wykonałem w Zakładzie Chemii i Technologii Polimerów pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Gawdzik. Tematyka przeprowadzonych przeze mnie badań wpisywała się w

problematykę badawczą Zakładu, która dotyczyła otrzymywania polimerów porowatych i badań nad możliwościami ich zastosowania jako wypełnień do kolumn chromatograficznych, m.in. w cieczerwowej chromatografii sitowo-molekularnej oraz adsorpcyjnej chromatografii gazowej. Pierwszy etap moich badań do pracy magisterskiej obejmował syntezę porowatych kopolimerów 4,4'-bismaleimidodifenyloketanu i diwinylobenzenu metodą suspensyjną. Po przepłukaniu w aparacie Soxhleeta zsyntezowanych polimerowych kulek, przeprowadziłem ich separację na sitach, uzyskując granulaty o odpowiednich rozmiarach. W kolejnym etapie kulki polimerowe poddawałem procesowi karbonizacji w atmosferze azotu, w temp. od 200 do 900°C. Określiłem wpływ różnych parametrów karbonizacji na właściwości fizykochemiczne otrzymywanych materiałów (porowatość, powierzchnia właściwa, selektywność, trwałość termiczna). W końcowym etapie porowate kulki o najlepszych parametrach przebadłem w zakresie zdolności do separacji n-alkanów, n-alkoholi, kwasów karboksylowych, ketonów i amin alifatycznych z zastosowaniem chromatografu gazowego. Efektem pracy magisterskiej była synteza nowego porowatego materiału i jego modyfikacja w kierunku zwiększenia właściwości rozdzielczych, a także opracowanie warunków rozdziału chromatograficznego mieszanin związków należących do różnych szeregów homologicznych, przy użyciu tego materiału jako nośnika w chromatografii gazowej. Wyniki badań opisałem w pracy magisterskiej *„Wpływ karbonizacji na właściwości fizyko-chemiczne porowatych kopolimerów 4,4'- bismaleimidodifenyloketanu z diwinylobenzenem”*, którą obroniłem w czerwcu 2000 r.

Praca doktorska

Po uzyskaniu tytułu magistra, od 1 października 2000 roku rozpocząłem pracę na stanowisku asystenta w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, kierowanym przez prof. dr hab. Janusza Szczodraka. Podjęta przeze mnie tematyka badawcza dotyczyła opracowania warunków dla wydajnej biotransformacji R-(+)-limonenu do użytecznych produktów, począwszy od pozyskiwania aktywnego w tym zakresie drobnoustroju mezofilnego oraz zastosowania oczyszczonych preparatów enzymatycznych. Do istotnych moich osiągnięć poznawczych w tym względzie należy zaliczyć opracowanie nowej metody biotransformacji d-limonenu do karwonu za pomocą kompleksu enzymatycznego składającego się z oksydazy glukozowej i peroksydazy, czego wyrazem było wyróżnienie komunikatu, który wygłosiłem podczas XXXIII Sesji Naukowej Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN w 2002 roku w Lublinie. Następnie moja aktywność

badawcza dotyczyła zastosowania kultur psychrotroficznych grzybów nitkowatych jako katalizatorów w biotransformacji limonenu. W trakcie badań wyselekcjonowałem m.in. szczep *M. minutissima*, aktywnie wytwarzający alkohol perylowy z limonenu i stanowiący nowy, nie opisany dotąd rodzaj biokatalizatora. Zoptymalizowałem częściowo zarówno warunki jego hodowli jak i parametry biotransformacji limonenu, dzięki czemu uzyskałem 11-krotnie wyższą wydajność alkoholu perylowego - cennego związku o właściwościach smakowo-zapachowych i przeciwnowotworowych. Badania te także doceniono przyznaniem nagrody w konkursie im. Prof. Wacława Szybalskiego za najlepszą pracę „Młodego Biotechnologa” na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego w Szczecinie. W kręgu moich zainteresowań znalazły się również związki porfiryne oraz możliwości wykorzystania ich właściwości katalitycznych w transformacji limonenu. Wykazałem, że tetrafenyloporfiryne oraz hematoporfiryne IX mogą być z powodzeniem użyte w roli katalizatorów biomimetycznych w produkcji cennych związków terpenoidowych (np. karwonu), na drodze oksydacji limonenu. Określiłem wpływ różnych parametrów na reakcję utleniania limonenu z użyciem H_2TPP w rozpuszczalnikach organicznych. Przy użyciu tetrafenyloporfiryne uzyskano 3,5 g/l karwonu z limonenu, to jest wielokrotnie więcej niż w reakcjach katalizowanych przez znane z tej aktywności mikroorganizmy. Na zaproponowane rozwiązanie otrzymano patent [P1]. Za najbardziej istotne w tej części badań uważam wykazanie, że fotooksydacja limonenu przebiega z wysoką wydajnością w całym zakresie długości fali światła widzialnego a także, że proces ten może zachodzić według dwóch różnych mechanizmów reakcji uzależnionych od stężenia substratu. Wykonałem symulację komputerową cząsteczek limonenu względem cząsteczki porfiryne H_2TPP przy użyciu programu HyperChem, dzięki czemu wyjaśniłem możliwą przyczynę jej niższej regioselektywności w porównaniu z katalizatorami grzybowymi, oraz zaproponowałem sposób modyfikacji pierścienia tetrapiolowego prowadzący do poprawy jego regioselektywności. Pracę doktorską pt. „Mikrobiologiczna i biomimetyczna transformacja (R)-(+)-limonenu” obroniłem w 2007 r.; promotorem był prof. dr hab. Jan Fiedurek. Wyniki badań prowadzonych w trakcie realizacji doktoratu opublikowano w 4 oryginalnych pracach naukowych [D16-D19]. Uzyskane wyniki zostały również przedstawione na konferencjach krajowych i zagranicznych i opracowane w postaci 1 zgłoszenia patentowego. Powyższa tematyka badawcza została także opisana w 5-ciu artykułach przeglądowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym. W ramach działalności naukowej, w latach 2006-2007 byłem głównym wykonawcą interdyscyplinarnego projektu badawczego Prorektora UMCS ds. Nauki (realizowanego we współpracy z Zakładem Chemii Nieorganicznej UMCS).

PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje:

- 16 prac eksperymentalnych w tym 12 w czasopismach z listy JCR
- 3 artykuły przeglądowe w czasopismach z listy JCR
- 1 monografia (j. angielski)
- 2 patenty i 2 zgłoszenia patentowe
- 43 doniesienia zjazdowe, w tym 20 na konferencjach międzynarodowych

Łączny impact factor opublikowanych po doktoracie prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 33,62 (zgodnie z rokiem 2017 IF₂₀₁₇: 33,33). Suma punktów MNiSW za wspomniane publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 517.

Biotransformacje innych związków organicznych

Doświadczenie zdobyte w badaniach nad aktywnością porfiryn w katalizie biomimetycznej oraz wpływem różnych czynników abiotycznych (w tym warunków stresowych) na biotransformację związków terpenowych przez grzyby psychrotroficzne stały się podstawą do napisania (na zaproszenie Redakcji) monografii pt. „Homogeneous and heterogeneous free-based porphyrins incorporated to silica gel as fluorescent materials and visible light catalysts mimic monooxygenases” do książki pt. Biomimetic Based Applications (ed. Anne George, InTech Publisher, 2011, 59-104) [D29] a także trzech artykułów przeglądowych [D14,D15,D20] opublikowanych w czasopismach z listy JCR. Powyższy rozdział wzbudził spore zainteresowanie w świecie nauki, o czym świadczy duża liczba pobrań (około 5200) tej pozycji ze strony wydawnictwa InTechOpen. Część wyników badań prezentowałem także w formie referatu na międzynarodowej konferencji w Hiszpanii (Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2015, Sitges). W pracach przeglądowych wiele miejsca poświęcono roli czynników abiotycznych w procesach biotechnologicznych i wpływom stresu osmotycznego, temperaturowego, pH, rozpuszczalnikowego i oksydacyjnego na wydajność metaboliczną drobnoustrojów. Zawarte w pracach przeglądowych informacje mogą wnieść cenny wkład nie tylko w procesie optymalizacji biotransformacji terpenów, ale również policyklicznych węglowodorów aromatycznych, steroidów i innych lipofilnych związków.

W trakcie moich badań do doktoratu stwierdziłem, że wydajność biotransformacji limonenu w znacznym stopniu zależy od poziomu natlenienia podłoża hodowlanego; zwiększenie tego parametru skutkowało wzrostem stężenia produktów terpenoidowych. Tlen jest jednym z substratów oksydatywnej transformacji terpenów, wpływa również na fizjologię komórek i pośrednio na wydajność oraz szybkość produkcji określonych metabolitów³³. Kontynuując ten wątek podjąłem próbę poprawy warunków tlenowych w hodowli z psychrotroficznym biokatalizatorem poprzez dozowanie roztworu nadtlenu wodoru. Metoda ta opiera się na generowaniu tlenu cząsteczkowego z nadtlenu wodoru w wyniku jego katalitycznego rozkładu przez obecną w komórkach grzybowych katalazę. Wysoką aktywność tego enzymu w grzybach psychrotroficznym potwierdzono wcześniej w innych badaniach³⁴.

Po raz pierwszy niekonwencjonalną metodę natleniania podłoża hodowlanego wykorzystano w procesie produkcji katalazy i kwasu glukonowego³⁵, jednakże w odniesieniu do biokonwersji terpenów (i innych związków organicznych), badania z tego zakresu należały do pionierskich w skali światowej. W pracy [D9] wykazano po raz pierwszy możliwość wykorzystania metody niekonwencjonalnego natleniania podłoża hodowlanego do procesu biotransformacji monoterpenów przy użyciu psychrotroficznych grzybów nitkowatych, dzięki czemu uzyskano znaczną poprawę wydajności produktu finalnego (alkoholu perylowego). Określono optymalne stężenie H₂O₂ i toksycznego limonenu oraz czas prowadzenia biotransformacji. Wykazano także możliwość użycia metanolu jako rozpuszczalnika zwiększającego biodostępność hydrofobowego substratu. W wyniku utrzymywania względnego nasycenia tlenu w zoptymalizowanym podłożu na poziomie 50%, z zastosowaniem automatycznego dozowania nadtlenu wodoru, uzyskano ponad 2-krotnie wyższą wydajność alkoholu perylowego, w porównaniu z kontrolą, która zawierała jedynie tlen atmosferyczny, rozpuszczony w podłożu w wyniku konwencjonalnego napowietrzania i mieszania. Wyższa aktywność biokatalityczna grzyba w tych warunkach, prawdopodobnie wynika z natychmiastowego wykorzystania uwalnianego (w przestrzeni periplazmatycznej grzybni) tlenu przez monoksygenazę katalizującą utlenianie terpeny. Zaproponowana metoda może się okazać szczególnie korzystna w procesach biotransformacji związków smakowo-zapachowych charakteryzujących się dużą lotnością, takich jak monoterpeny, estry, i

³³ Tan Q., Day D.F., Cadwallader K.R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Proc. Biochem.* **1998**, 33, 29–37.

³⁴ Fiedurek J., Gromada A., Słomka A., Kornilowicz-Kowalska T., Kurek E., Melke J. Catalase activity in Arctic microfungi grown at different temperatures. *Acta Biol. Hung.* **2003**, 54, 105–112.

³⁵ Fiedurek J., Production of gluconic acid by immobilized in pumice stones mycelium of *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *Biotechnol. Lett.* **2001**, 23, 1789–1792.

alkohole, gdyż stwarza możliwość ograniczenia ulatniania się substratów i produktów z układu, będącego także następstwem klasycznego napowietrzania [D9].

Równolegle do badań nad właściwościami biokatalitycznymi grzybów nitkowatych i porfiryn, przedmiotem mojego zainteresowania w okresie po uzyskaniu stopnia doktora są także:

- właściwości cytotoksyczne produktów biotransformacji terpenów skierowane na komórki nowotworowe;
- inulinazy i inulina – otrzymywanie, immobilizacja oraz charakterystyka właściwości biokatalitycznych i sorpcyjnych;
- aktywność fitohormonalna grzybów mezofilnych wobec roślin uprawnych;
- aktywność biologiczna związków porfiryńowych wobec grzybowych patogenów pszczołich z rodzaju *Nosema*.

Właściwości cytotoksyczne produktów biotransformacji terpenów skierowane na komórki raka jelita grubego

Obiecujące wyniki prac dotyczących właściwości leczniczych olejków eterycznych^{36,37}, skłoniły mnie do podjęcia badań nad możliwością zastosowania, otrzymanych w wyniku biotransformacji limonenu i pinenu, produktów terpenoidowych jako potencjalnych czynników/adjuwantów o aktywności przeciwnowotworowej. We współpracy z Zakładem Wirusologii i Immunologii UMCS, oceniono w warunkach *in vitro* aktywność biologiczną α -pinenu i jego utlenionych pochodnych: (1*S*,4*R*,5*S*)-(-)-*trans*-werbenolu, (1*S*)-(-)-werbenonu i (1*S*)-(-)-linalolu oraz *R*-(+)-limonenu i jego pochodnych: *R*-(+)-alkoholu perylowego oraz enancjomerów (*S*)-(+)- i (*R*)-(-)-karwonu. Terpeny po reakcji biotransformacji wyizolowano i oczyszczono z użyciem kolumny preparatywnej, uzyskując enancjomerycznie czyste produkty o wysokiej czystości optycznej (*ee* od 74 do 94%). Następnie, określono ich wpływ na żywotność, metabolizm mitochondrialny i proliferację komórek ludzkiego raka jelita grubego (HT29) oraz linii ludzkich komórek prawidłowych nabłonka jelitowego (CCD 841 CoTr). Określono także właściwości antyoksydacyjne badanych terpenów. Szczególną uwagę zwrócono na różnice w bioaktywności pomiędzy

³⁶ Paduch R., Kandefer-Szerszeń M., Trytek M., Fiedurek J. Terpenes – substances useful in human health care. *Arch. Immunol. Therap. Ex.* **2007**, 55, 315-327.

³⁷ Gonzalez-Burgos E., Gomez-Serranillos M.P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19, 5319-5341.

prekursorami i ich utlenionymi produktami, a także na aktywność mieszanin terpenoidów z obu grup. Badania przeprowadzono w oparciu o metody MTT (aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej), NR (pochłanianie czerwieni obojętnej), DPPH (zmiatanie wolnych rodników tlenowych). Ze względu na to, że rozwój nowotworów w warunkach *in vivo* jest typowym procesem związanym z rozwojem stanu zapalnego, oceniono metodą immunoenzymatyczną (ELISA) także wpływ badanych związków na syntezę tlenku azotu (NO) i poziom cytokin związanych ze stanem zapalnym. Wykonano analizy sprawdzające poziom interleukiny-6 (IL-6), uwalnianej przez komórki w dwóch wariantach doświadczalnych: komórki przed podaniem terpenów inkubowano bez lub w obecności LPS jako induktora stanu zapalnego i potencjalnego czynnika wpływającego na aktywność immunomodulacyjną badanych terpenów.

Badania wykazały, że testowane terpeny w stężeniach 5-500 µg/mL powodują istotny spadek żywotności i aktywności metabolicznej komórek nowotworowych. Poziom cytotoksyczności zależał od stężenia, rodzaju zastosowanych terpenów i typu komórek, przy czym istotnie wyższą aktywność wykazały pochodne utlenione w porównaniu z ich węglowodorowymi prekursorami: limonenem i pinenem. Ponadto, stwierdzono, że alkohole terpenowe (*trans*-werbenol, alkohol perylowy) są bardziej aktywne niż ketony terpenowe. Nie wykazano zdolności badanych związków do zmiatania wolnych rodników tlenowych w zakresie stężeń 5-500 µg/mL. Wzrost tej aktywności obserwowano jedynie w przypadku mieszaniny utlenionych pochodnych limonenu przy ich wysokich stężeniach (10 mg/mL). Wykazano również, że monocykliczne terpeny (limonen i jego pochodne) w przeciwieństwie do bicyklicznych pochodnych pinenu, nie wywierają istotnego wpływu na produkcję IL-6 przez komórki prawidłowe; a co istotne, obniżają jej poziom w komórkach preinkubowanych z LPS-em. Nie odnotowano stymulacyjnych właściwości terpenów w wytwarzaniu IL-6 przez komórki nowotworowe. Podobny efekt uzyskano dla NO.

Stwierdzono, że biotransformacja terpenów jest skuteczną metodą otrzymywania związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej, umożliwia pozyskiwanie unikatowych terpenoidów, spośród których można uzyskać enancjomery o zwiększonej bioaktywności w stosunku do mieszaniny racemicznej. Wyniki te mogą być pomocne w wyborze odpowiedniego związku do uzyskania mieszanin terpenów o pożądanej aktywności przeciwnowotworowej. Otrzymane wyniki opublikowano w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym [D12].

Obecnie badane są inne terpenoidy oraz porfiryny w różnej konfiguracji w celu określenia najkorzystniejszego układu do hamowania wzrostu i proliferacji komórek ludzkiego raka jelita grubego, który wykazywałby ograniczony wpływ na komórki prawidłowe.

Inulinazy i inulina – otrzymywanie, immobilizacja oraz charakterystyka właściwości biokatalitycznych i sorpcyjnych

Uczestniczyłem również w badaniach nad otrzymywaniem, charakterystyką i właściwościami biokatalitycznymi enzymu o nazwie inulinaza. Enzym ten zyskuje coraz większą popularność, gdyż w wyniku hydrolizy inuliny umożliwia uzyskanie fruktozy i fruktooligosacharydów używanych do otrzymywania preparatów prebiotycznych. Uważam, że jednym z moich ważniejszych osiągnięć na tym polu badawczym był udział w opracowaniu metody unieruchomienia inulinazy na nośniku polimerowym. Pomocna w tym względzie okazała się wiedza zdobyta w trakcie wykonywania pracy magisterskiej dotycząca syntezy i właściwości nośników porowatych, która umożliwiła mi połączyć część chemiczną z częścią enzymatyczną badań. Zsyntezowano, we współpracy z Zakładem Chemii Polimerów UMCS, porowate polimery mikrosferyczne zawierające na powierzchni różną liczbę grup epoksydowych zdolnych do tworzenia trwałych, kowalencyjnych wiązań z białkami enzymatycznymi. Wyselekcjonowano nowy typ nośnika do unieruchomienia inulinazy, przy użyciu którego uzyskano wyższą wydajność immobilizacji w porównaniu z tą uzyskiwaną na komercyjnym nośniku Eupergit® C, w tych samych warunkach procesu. Zbadano wpływ rodzaju buforu, jego stężenia molowego, wartości pH, a także ilości nośnika na wydajność procesu immobilizacji. Oznaczono aktywność, termostabilność i wyznaczono optimum temperaturowe unieruchomionego enzymu oraz użyto go w procesie hydrolizy inuliny w systemie ciągłym. Zaobserwowano niewielki spadek aktywności (o 17%) unieruchomionego enzymu po 4 tygodniach pracy. Oznaczono produkty hydrolizy inuliny (fruktozę oraz fruktooligosacharydy) techniką chromatografii cieczowej (HPLC-RID) i spektrometrii mas (LC-ESI/MS).

Brałem także udział w badaniach nad zastosowaniem metody niekonwencjonalnego natleniania podłoża (poprzez dozowanie H_2O_2) w procesie wytwarzania inulinazy w bioreaktorze przez zimmobilizowaną na pianie poliuretanowej grzybnię *Aspergillus niger* 20 Osm. System taki okazał się korzystny pod względem zachowania aktywności w biosyntezie inulinazy przez 22 dni i umożliwił uzyskanie 86 321 jednostek tego enzymu w 7 cyklach doświadczalnych. Kolejny aspekt tego nurtu badań dotyczył wykorzystania inuliny jako

sorbenta do usuwania związków metali ciężkich i pierwiastków radioaktywnych z roztworów wodnych. Przeprowadzono sorpcję jonów uranilowych, chromianowych, kadmu i niklu przy użyciu sproszkowanych bulw topinambura, cykorii i dalii, a także jonów Am(III) i Sr(II) na sproszkowanym korzeniu mniszka lekarskiego, z wydajnością wynoszącą od 60 do 100%. Otrzymane rezultaty opublikowano w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym [D11, D13, D21] oraz w formie zgłoszenia patentowego [P3].

Aktywność fitohormonalna grzybów mezofilnych wobec roślin uprawnych.

Innym kierunkiem badań, w których uczestniczyłem równolegle z pracami nad aktywnością biokatalityczną grzybów strzępkowych, było określenie aktywności szczepów *Fusarium culmorum* w zakresie syntezy fitohormonów. Badania te stanowiły fragment projektu badawczego MNiSW (No. N N310 441338) realizowanego w latach 2010-2013 w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej UMCS. Zbadano trzy szczepy grzyba o zróżnicowanym wpływie na wzrost roślin zbożowych, w tym jeden szczep patogeniczny i dwa szczepy niepatogeniczne. Wykazano ich zdolność do biosyntezy kwasu indoliloctowego (IAA), kwasu giberelinowego (GA) oraz etylenu w hodowlach *in vitro*, na podłożach zawierających różne stężenia glukozy, tryptofanu i metioniny (jako prekursorów fitohormonów). Stężenie fitohormonów IAA i GA oznaczono spektrofotometrycznie, zaś stężenie etylenu określono metodą chromatografii gazowej przy użyciu zmodyfikowanej przeze mnie techniki *headspace*. Badane szczepy charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością w wytwarzaniu poszczególnych fitohormonów. Szczep patogeniczny wykazywał zwiększoną zdolność do syntezy etylenu, natomiast szczepy niepatogeniczne do zwiększonej syntezy IAA oraz GA. Analiza stężeń fitohormonów otrzymanych na podłożach o różnym składzie w zestawieniu z przyrostem biomasy trzech badanych szczepów umożliwiła wykazanie różnic pomiędzy szczepem patogennym i szczepami niepatogennymi, które można wykorzystać jako czynniki wspomagające wzrost roślin uprawnych [D10].

Aktywność biologiczna związków porfiryńowych

W ostatnim okresie moje zainteresowania badawcze skupiają się wokół zagadnień związanych z zastosowaniem porfiryń jako środków leczniczych. Przykładem są prowadzone pod moim kierunkiem badania nad aktywnością związków porfiryńoidowych przeciw wewnątrzkomórkowym pasożytom z rodzaju *Nosema* spp. - mikrosporidiów, które wywołują nosemozę, groźną chorobę pszczoł. Efektem mojej aktywności naukowej w tym zakresie jest

aktualnie realizowany projekt NCN-u (nr 2015/17/B/NZ9/03607) pt: „Aktywność biologiczna i mechanizmy działania związków porfirynoidowych przeciwko wewnątrzkomórkowym patogenom pszczelim z rodzaju *Nosema*”, którego jestem kierownikiem i współwykonawcą. Z uwagi na fakt, że prace te mają charakter multidyscyplinarny, w projekt zaangażowani są wykonawcy o różnych specjalnościach. Celem grantu jest charakterystyka nowych właściwości biologicznych porfirynoidów i analiza potencjalnych mechanizmów zaangażowanych w hamowanie rozwoju nosemozy przez te związki: ich bezpośredni wpływ na mikrosporydia *Nosema* oraz stymulację układu odpornościowego pszczół. We współpracy z Zakładem Botaniki i Mykologii UMCS oraz dr hab. G. Borsukiem (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie) i prof. D. Gryko (IChO PAN w Warszawie) wyselekcjonowałem wstępnie grupę najbardziej aktywnych porfiryn, a także określiłem wpływ światła na ich bioaktywność. Bioaktywność porfiryn w zwalczaniu mikrosporydiów określono (*in vivo*) w oparciu o zdolność do zmniejszania liczby zarodników *Nosema* u pszczół miodnych. Jednym z najbardziej istotnych zagadnień badawczych było udokumentowanie zmian morfologicznych w obrębie ściany komórkowej spor w wyniku działania porfiryn. Odkrycie nowych właściwości biologicznych związków porfirynowych stało się także podstawą do napisania zgłoszenia patentowego nr P.408774 [P4]. Część otrzymanych wyników było prezentowanych na konferencjach pszczelarskich.

Plany przyszłych badań

W najbliższej przyszłości zamierzam kontynuować badania dotyczące procesów biotransformacji związków pochodzenia naturalnego, z użyciem grzybów psychrotroficznych oraz porfiryn. Doświadczenia będą prowadzone w kierunku określenia wpływu innych stresów abiotycznych na wydajność reakcji biotransformacji monoterpenu. Chciałbym także zoptymalizować warunki biokonwersji limonenu przez *C. pannorum* w celu określenia struktury niezidentyfikowanego dotąd produktu, który akumulował się w dużych koncentracjach w podłożu hodowlanym. Powodzenie reakcji biomimetycznej katalizy przemiany związków terpenowych z udziałem porfiryn w układach heterogenicznych uzależnione jest od ich zdolności do utrzymywania się w złożu oraz ich odporności na proces fotowysielania. W związku z tym planuję określić wpływ różnych protektantów, np. surfaktantów (jonowych i obojętnych) użytych w procesie zol-żel, na właściwości biokatalityczne i spektralne porfiryn unieruchomionych w krzemionce. Swoją pracę naukową

zamierzam również poszerzyć o badania *in vitro* biomedycznych zastosowań związków porfirynowych zarówno w terapii antynowotworowej jak i antybakteryjnej.

Podsumowanie efektów działalności naukowo-badawczej.

Mój dotychczasowy dorobek naukowy, łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego obejmuje 33 prace naukowe, z czego 20 jest indeksowanych w bazie Web-of-Science. Jestem współautorem jednej anglojęzycznej monografii i 8 artykułów przeglądowych. W ramach dotychczasowej pracy naukowej zarejestrowałem 2 patenty oraz jestem współautorem 2 kolejnych zgłoszeń patentowych. Wyniki moich badań były prezentowane w formie komunikatów na 56 krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych, podczas których wygłosiłem 4 referaty. Jestem współautorem doniesień naukowych, które 6-krotnie nagradzano i wyróżniano na zjazdach krajowych i 2-krotnie na konferencjach międzynarodowych. W latach 2010-2013 otrzymałem indywidualną i zespołową nagrodę Rektora UMCS za wyróżniające się prace badawcze oraz w 2015 r. Medal Brązowy za Długoletnią Służbę dla Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej. Byłem kierownikiem i wykonawcą kilku prac zleconych przez podmioty zewnętrzne. Brałem udział w badaniach w ramach projektu KBN oraz byłem głównym wykonawcą grantu zespołowego Prorektora ds. Nauki UMCS. Obecnie kieruję realizacją multidyscyplinarnego projektu badawczego (2016-2019) Narodowego Centrum Nauki. Recenzowałem artykuły przesłane do indeksowanych czasopism, z tzw. listy filadelfijskiej (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *J. Food Biochem.*, *J. Mater. Chem.*, *J. Sol Gel Sci. Technol.*, *Curr. Org. Chem.*, *Pol. J. Microbiol.*, *React. Kinet. Mech. Cat.*, *J. Mol. Struct.*). W roku 2012 zostałem powołany do Rady Naukowej lubelskich państwowych uczelni wyższych, oceniającej wnioski w ramach projektu „Staż Sukcesem Naukowca” Jestem członkiem Lubelskiego Towarzystwa Wspierania Nauk Farmaceutycznych i Polskiego Towarzystwa Pszczelniczego.

Sumaryczny *Impact Factor* (wg roku opublikowania) dla wszystkich opublikowanych prac, w których jestem współautorem wynosi: **Σ IF 42,92**. Liczba punktów MNiSW: **689**. Sumaryczny IF dla czasopism, w których opublikowano prace wchodzące w skład głównego osiągnięcia naukowego wynosi: **Σ IF 23.492**. Łączna liczba punktów MNiSW za publikacje oraz uzyskane patenty po doktoracie wynosi **517**.

Według bazy Web of Science, łączna liczba cytowań dla wszystkich opublikowanych prac, w których jestem współautorem wynosi: **205** (168 z wyłączeniem autocytowań).

Indeks Hirscha: **8**

Szczegółowe podsumowanie mojej działalności naukowej przedstawione zostało w poniższej tabeli:

Podsumowanie dorobku publikacyjnego

Typ publikacji	Przed doktoratem (I)			Po doktoracie (II)			Łącznie (I+II)		
	Liczba	IF	Punkty MNSiW	Liczba	IF	Punkty MNSiW	Liczba	IF	Punkty MNSiW
Czasopisma z bazy JCR (w tym oryginalne)	5	9.3	120	15	33.62	415	20	42.92	535
Recenzowane czasopisma polskojęzyczne spoza JCR	4	-	52	3	-	13	7	-	65
Recenzowane czasopisma anglojęzyczne spoza JCR	-	-	0	1	-	10	1	-	10
Monografie i rozdziały w książkach	-	-	0	1	-	25	1		25
Patenty i zgłoszenia patentowe	1	-	0	4	-	2×25 2×2	4		54
RAZEM	9	9.3	172	24	33.62	517	33	42.92	689
Doniesienia konferencyjne									
Konferencje międzynarodowe	0			20					
Konferencje krajowe	12			23					
RAZEM	13			43			56		

Lublin, 31.08.2017 r.



 Podpis Wnioskodawcy