

## **AUTOREFERAT**

**dr Monika Osińska-Jaroszuk**

Zakład Biochemii  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin 2019

**SPIS TREŚCI:**

|                                                                                                                                                                           |         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE.....                                                                                                                                       | STR.3   |
| 2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....                                                                                                  | STR.3   |
| 3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....                                                                                                                                   | STR.4   |
| A. TYTUŁ.....                                                                                                                                                             | STR.4   |
| B. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO..                                                                                                       | STR.4   |
| C. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z<br>OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA.....                                                      | STR.8   |
| CEL NAUKOWY WYBRANYCH PRAC.....                                                                                                                                           | STR.6   |
| WPROWADZENIE .....                                                                                                                                                        | STR.6   |
| OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE<br>PREZENTOWANE W POSTĘPOWANIU HABILITACYJNYM.....                                                        | STR.8   |
| LITERATURA.....                                                                                                                                                           | STR.17  |
| PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ STANOWIĄCYCH TREŚĆ OSIĄGNIĘCIA<br>NAUKOWEGO PRZEDSTAWIONEGO W POSTĘPOWANIU HABILITACYJNYM ORAZ<br>OMÓWIENIE EWENTUALNEGO ICH ZASTOSOWANIA..... | STR.18  |
| 4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO–BADAWCZYCH.....                                                                                                                | STR.19  |
| A) PRACA NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA.....                                                                                                           | STR.19  |
| B) PRZEBIEG MOJEJ PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA ORAZ<br>REALIZOWANE AKTUALNIE ZADANIA BADAWCZE.....                                                         | STR. 23 |
| 5. PLANY NAUKOWE.....                                                                                                                                                     | STR. 31 |
| PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ.....                                                                                                                                     | STR. 32 |

**dr Monika Osińska-Jaroszuk**

Zakład Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

[monika.osinska-jaroszuk@poczta.umcs.lublin.pl](mailto:monika.osinska-jaroszuk@poczta.umcs.lublin.pl)

tel. +48 81 537-50-29, fax +48 81 537-56-65

**1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE**

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1998</b> | <b>Magister biologii</b><br>Praca magisterska pt.: „ <i>Efekt szoku termicznego na lakazę u grzyba ligninolitycznego Abortiporus biennis</i> ”<br>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie<br>Promotor: prof. dr hab. Andrzej Leonowicz                    |
| <b>2007</b> | <b>Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii</b><br>Rozprawa doktorska pt.: „ <i>Modyfikacja biomateriałów naczyniowych antybiotykami aminoglikozydowymi</i> ”<br>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie<br>Promotor: prof. dr hab. Grażyna Ginalska |

**2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

**1999-2001** – ASYSTENT w Dziale Badań i Rozwoju w Przedsiębiorstwie Zagranicznym CORMAY (prace badawcze w zakresie mikrobiologii i biochemii klinicznej, walidacja projektów, opracowywanie dokumentacji projektowej zgodnie z normami ISO 9001)

**2001-2003** – ASYSTENT STAŻYSTA w Zakładzie Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**2003-2010** – ASYSTENT w Zakładzie Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**2010- DO CHWILI OBECNEJ** – ADIUNKT w Zakładzie Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

### 3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

(wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki [Dziennik Ustaw nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami jak w dz. U. 2005 nr 164, poz. 1365, art. 251; Dz. U. 2011, nr 84, poz. 455])

#### A) TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

Osiągnięcie naukowe stanowi **cykl 7 publikacji** opublikowanych w latach 2013–2018 pod wspólnym tytułem:

### **„Charakterystyka i potencjał aplikacyjny wybranych polisacharydów bakteryjnych i grzybowych”**

#### B) PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

| Nr   | Publikacja, dane bibliograficzne                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | IF <sup>1</sup> | Punkty MNiSW <sup>1</sup> |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| [O1] | Osińska-Jaroszuk M.*, Wlizio K., Szałapata K., Jarosz-Wilkolazka A. (2014) Correlation between the production of exopolysaccharides and oxalic acid secretion by <i>Ganoderma applanatum</i> and <i>Tyromyces palustris</i> . <b>World Journal of Microbiology and Biotechnology</b> 30 (12):3065-3074.                                                                                                                    | 1,779           | 20                        |
| [O2] | Osińska-Jaroszuk M., Jaszek M., Mizerska-Dudka M., Błachowicz, A., Rejczak T.P., Janusz G., Wydrych J., Polak J., Jarosz-Wilkolazka A., Kandefer-Szerszeń M. (2014) Exopolysaccharide from <i>Ganoderma applanatum</i> as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. <b>BioMed Research International (poprzednia nazwa Journal of Biomedicine and Biotechnology)</b> 2014, 743812:1-10. | 3,169           | 30                        |
| [O3] | Osińska-Jaroszuk M.*, Jarosz-Wilkolazka A., Jaroszuk-Ścisiel J., Szałapata K., Nowak A., Jaszek M., Ozimek E., Majewska M. (2015) Extracellular polysaccharides from <i>Ascomycota</i> and <i>Basidiomycota</i> : production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. <b>World Journal of Microbiology and Biotechnology</b> 31 (12):1823-1844.                                                 | 1,532           | 20                        |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |               |            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------|
| [O4]          | Bancerz R., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jaszek M., Janusz G., Stefaniuk D., Sulej J., Janczarek M., Jarosz-Wilkolazka A., Rogalski J. (2016) New alkaline lipase from <i>Rhizomucor variabilis</i> : Biochemical properties and stability in the presence of microbial EPS. <i>Biotechnology and Applied Biochemistry</i> 63 (1):67-76.                                  | 1,413         | 20         |
| [O5]          | <b>Osińska-Jaroszuk M.*</b> , Wiater A., Choma A., Pleszczyńska M., Jaszek M., Janusz G., Skowronek M., Szczodrak J. (2017) (1→3)- $\alpha$ -D-glucan from fruiting body and mycelium of <i>Cerrena unicolor</i> (Bull.) Murrill: Structural characterization and use as a novel inducer of mutanase. <i>International Journal of Polymers Science</i> 2017, 1249134:1-9. | 1,718         | 25         |
| [O6]          | <b>Osińska-Jaroszuk M.*</b> , Jaszek M., Starosielec M., Sulej J., Matuszewska A., Janczarek M., Bancerz R., Wydrych., J., Wiater A., Jarosz-Wilkolazka A. (2018) Bacterial exopolysaccharides as a modern biotechnological tool for modification of fungal laccase properties and metal ion binding. <i>Bioprocess and Biosystem Engineering</i> 41 (7):973-989.         | 2,139         | 30         |
| [O7]          | Bancerz R., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jaszek M., Sulej J., Wiater A., Matuszewska A., Rogalski J. (2018) Fungal polysaccharides as a water-adsorbing material in esters production with the use of lipase from <i>Rhizomucor variabilis</i> . <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> 118:957-964.                                                   | 3,909         | 35         |
| Suma punktów: |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | IF            | MNiSW      |
|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <u>15,659</u> | <u>180</u> |

<sup>1</sup>zgodnie z rokiem opublikowania

\*autor korespondencyjny

Z osiągnięciem naukowym są związane następujące twórcze prace zawodowe, które zostały wykonane po uzyskaniu stopnia doktora:

1. [P1] Bancerz R., **Osińska-Jaroszuk M.**, Jaszek M., Janczarek M., Rogalski J. (2017) Polisacharydy pochodzenia grzybowego do zastosowania wraz z lipazą wyizolowaną z *Rhizomucor variabilis* w reakcjach estyfikacji wyższych kwasów tłuszczowych oraz sposób otrzymywania takich estrów. Zgłoszenie Patentowe nr P.420800
2. [P2] Bancerz R., **Osińska-Jaroszuk M.**, Jaszek M., Janczarek M., Rogalski J. (2017) Polisacharydy pochodzenia bakteryjnego do zastosowania wraz z lipazą wyizolowaną z *Rhizomucor variabilis* w reakcjach estyfikacji wyższych kwasów tłuszczowych oraz sposób otrzymywania takich estrów. Zgłoszenie Patentowe nr P.420801

### C) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW

#### CEL NAUKOWY WYBRANYCH PRAC

Badania przedstawione w wybranych pracach naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego miały na celu pozyskanie i charakterystykę wybranych polisacharydów bakteryjnych i grzybowych oraz poszukiwanie nowych możliwości ich potencjalnego zastosowania w szeroko rozumianej biotechnologii. Prace badawcze pozwalające na realizację tego założenia obejmowały:

1. izolację, charakterystykę i ocenę potencjału biomedycznego nowych polisacharydów pochodzenia grzybowego,
2. optymalizację warunków otrzymywania, charakterystykę biochemiczną oraz zbadanie możliwości zastosowania biomedycznego wyselekcjonowanych nowych egzopolisacharydów grzybowych,
3. ocenę możliwości praktycznego użycia wybranych polisacharydów pochodzenia grzybowego i bakteryjnego.

#### WPROWADZENIE:

Bakterie i grzyby należą do najliczniejszych organizmów syntetyzujących naturalne polimery węglowodanowe. W przeciwieństwie do egzopolisacharydów bakteryjnych, polisacharydy grzybowe są znacznie bardziej zróżnicowaną grupą biopolimerów węglowodanowych. Mogą one bowiem zarówno stanowić część składową ściany komórkowej, mogą być gromadzone wewnątrz komórek, gdzie pełnią rolę substancji zapasowych, albo być wydzielane na zewnątrz komórek, w celu np. ich ochrony [Giavasis, 2014]. Pod względem budowy chemicznej polisacharydy stanowią zróżnicowaną grupę związków występującą najczęściej w postaci dużych polimerów cukrowych utworzonych z podjednostek monosacharydowych połączonych wiązaniami glikozydowymi. Ze względu na miejsce występowania dzieli się je na: egzopolisacharydy (EPS; ang. *exopolysaccharides*), polisacharydy cytozolowe (IPS; ang. *intracellular polysaccharides*) oraz polisacharydy ścienne (FCW; ang. *fungus cell wall*) [Jaroszuk-Ściśeł i Kurek, 2012; Yan i wsp., 2014]. Fizjologiczna rola egzopolisacharydów (EPS) zależy od ekosystemu w jakim bytuje organizm je wytwarzający. Uważa się, że wytwarzanie EPS przez mikroorganizmy związane jest bezpośrednio z mechanizmami odpowiedzi na stresowe warunki wzrostu w tym temperaturę, ciśnienie czy natężenie światła [Donot i wsp., 2012]. Egzopolisacharydy poprzez tworzenie otoczki na zewnątrz mikroorganizmów, pozwalają także na akumulację odpowiedniej ilości wody i ochronę tych organizmów przed nadmiernym wysuszeniem. Dodatkowo dzięki

anionowemu charakterowi cząsteczek egzopolisacharydowych możliwy jest ich udział w wychwytywaniu odpowiednich substancji odżywczych z podłoża, a także biosorpcja i unieruchamianie szkodliwych jonów metali ciężkich [Breierova i wsp., 2002; Da Silva i wsp., 2014]. Polisacharydy są związkami wykazującymi szerokie spektrum właściwości bioaktywnych, takich jak: antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe, immunomodulacyjne, przeciwnowotworowe, hipolipidemiczne, hipoglikemiczne czy aktywności hepato-protekcyjne [Usui i wsp., 1983; Miranda-Nantes i wsp., 2011; Kozarski i wsp., 2012]. Ich naturalne właściwości polegające na zdolności sorpcji metali ciężkich, wspomaganiu procesu solubilizacji składników mineralnych u grzybów, a także wywoływaniu odporności u roślin, znalazły szerokie zastosowanie w rolnictwie przy bionawożeniu roślin, bioremediacji wody i w biologicznej ochronie roślin [Welch i wsp., 1999; Seneviratne i wsp., 2008].

Bioaktywne właściwości polisacharydów uzależnione są od ich struktury przestrzennej, masy cząsteczkowej, obecności innych monosacharydów w cząsteczce oraz rodzaju wiązań glikozydowych. Istotne znaczenie ma także źródło ich pozyskiwania (typ organizmu, szczep), warunki hodowli mikroorganizmu oraz metody ekstrakcji i izolacji. Ponieważ grzyb *Cerrena unicolor* stanowi bogate źródło metabolitów wtórnych (substancji niskocząsteczkowych oraz glikoprotein) o dużym potencjale biomedycznym, wstępne badania dotyczące polisacharydów koncentrowały się wokół charakterystyki i określenia bioaktywnej roli polisacharydów wewnątrzkomórkowych izolowanych z tego organizmu. Doświadczenie zdobyte w trakcie prowadzenia prac nad izolacją i charakterystyką biochemiczną polisacharydów wewnątrzkomórkowych skłoniły mnie do poszukiwania kolejnych organizmów dających możliwość otrzymywania polisacharydów prostszymi i bardziej ekonomicznymi metodami [Jaszek i wsp., 2013]. Po wstępnej selekcji organizmów grzybowych w kręgu moich zainteresowań szczególną rolę odegrały gatunki grzybów należące do grupy tzw. „białej i brązowej zgnilizny drewna”: *Tyromyces palustris*, *Ganoderma applanatum* oraz *Abortiporus biennis* mające zdolność do biosyntezy egzopolisacharydów, które nie zostały do tej pory opisane w literaturze. Wiadomym jest, że polisacharydy zewnątrzkomórkowe stanowią bogate źródło substancji bioaktywnych pozyskiwanych szczególnie z bakterii, jednakże w niewielu pracach opisano biosyntezę tych substancji przez grzyby wyższe, szczególnie *Basidiomycota*. Dodatkowo pomimo dużej różnorodności występujących egzopolisacharydów i ich fizyko-chemicznych właściwości tylko nieliczne z tych makrocząsteczek znalazły przemysłowe i biomedyczne zastosowanie. Ze względu na prostą metodykę otrzymywania tej grupy polimerów, moje zainteresowania badawcze koncentrowały się także wokół

polisacharydów zewnątrzkomórkowych izolowanych ze szczepów bakteryjnych *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2, *Sinorhizobium meliloti* Rm1021, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 oraz *Bradyrhizobium elkanii* USDA76, dotąd nieopisanych w kontekście przedstawionych propozycji aplikacyjnych.

#### OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

##### **Ad. 1 Izolacja, charakterystyka i ocena potencjału biomedycznego nowych polisacharydów pochodzenia grzybowego.**

Obiecujące wyniki badań prowadzone od 2011 roku w ramach działania multidyscyplinarnej sieci badawczej (działającej w oparciu o podpisane listy intencyjne pomiędzy następującymi jednostkami naukowymi: UMCS, Politechnika Lubelska, Uniwersytet Medyczny w Lublinie i Centrum Onkologii – Instytut Marii Skłodowskiej–Curie w Warszawie) zajmującej się określeniem potencjału biomedycznego metabolitów wtórnych izolowanych z grzybów białej zgnilizny drewna, stanowiły punkt wyjścia do podjęcia tematyki związanej z poszukiwaniem nowych grup polisacharydów oraz możliwości ich nowatorskich zastosowań w medycynie i biotechnologii.

Ocenę unikalnych właściwości bioaktywnych substancji pochodzenia grzybowego rozpoczęłam od grzyba „białej zgnilizny drewna” *C. unicolor*, znanego wcześniej z literatury jako producenta znacznych ilości lakazy i innych enzymów zaangażowanych w procesach biodegradacji ligniny, ale o nie zbadanym dotychczas potencjale biomedycznym. Testowałam trzy grupy związków izolowanych z *C. unicolor*: 1) zewnątrzkomórkowy enzym lakazę (ex–LAC); 2) frakcję niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych (ex–LMS) oraz 3) izolowane po raz pierwszy z tego organizmu surowe preparaty polisacharydów wewnątrzkomórkowych (c–EPL). Mój główny udział w pracy eksperymentalnej dotyczył procesu izolacji oraz określenia właściwości antyoksydacyjnych i bakteriostatycznych otrzymanych polisacharydów. Źródłem polisacharydów wewnątrzkomórkowych była grzybnia *C. unicolor*. W trakcie prac eksperymentalnych uzyskałam surowy, rozpuszczalny w wodzie, preparat polisacharydowy pochodzenia cytozolowego, który poddałam wstępnej charakterystyce biochemicznej pozwalającej określić jego skład ilościowy (cukry całkowite i redukujące, białka i substancje fenolowe). Dodatkowo w celu określenia obecności poszczególnych grup funkcyjnych wchodzących w skład struktury badanego endopolisacharydu preparat poddałam hydrolizie w obecności kwasu trifluorooctowego, a następnie analizie FT-IR, która potwierdziła typowy udział grup chemicznych charakterystycznych dla związków cukrowych. Po wykonaniu badań związanych ze wstępną charakterystyką endopolisacharydu sprawdziłam



jego właściwości antyoksydacyjne oraz przeciwbakteryjne. Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem trzech niezależnych metod analizy właściwości antyoksydacyjnych (z odczynnikami ABTS, DPPH oraz metodą chemiluminescencyjną) wykazała wysoki potencjał antyoksydacyjny badanych frakcji c-EPL. Preparaty c-EPL odznaczały się także właściwościami bakteriostatycznymi wobec bakterii *Staphylococcus aureus*. Efektem uzyskanych wyników zaprezentowanych w pracy było wykazanie możliwości zastosowania biomedycznego nowego endopolisacharydu izolowanego z grzyba *C. unicolor* [Jaszek i wsp., 2013].

Interesujące wyniki badań endopolisacharydu izolowanego z *C. unicolor* były podstawą do dalszej pracy eksperymentalnej związanej z tą tematyką badawczą. Ponieważ nie stwierdziłam w przetestowanych warunkach doświadczalnych możliwości wytwarzania przez grzyb *C. unicolor* polisacharydów zewnątrzkomórkowych, swoją uwagę skupiłam na badaniach polisacharydów ścianowych, izolowanych zarówno z wegetatywnej grzybni jak i z liofilizowanych owocników. W celu ekstrakcji polisacharydów ścianowych wykorzystałam najczęściej stosowaną i opisaną w wielu pracach metodę z użyciem 1 M NaOH (z późniejszą neutralizacją 1 M HCl), w wyniku której uzyskałam polisacharydy nierozpuszczalne w wodzie a rozpuszczalne w zasadach (ASP). Wydajność ekstrakcji ASP wynosiła 46,1% dla owocników i 9,5% dla grzybni. Następnie dzięki metodzie immunofluorescencyjnego znakowania z przeciwciałami dokonałam detekcji (1→3)- $\alpha$ -D-glukanu w ścianie komórkowej grzybni. Uzyskane glukany poddano szczegółowej analizie strukturalnej z wykorzystaniem technik  $^1\text{H}$  NMR i FT-IR, które potwierdziły obecność grup (1→3)- $\alpha$ - w badanych polisacharydach. Analiza składu monosacharydów ASP wykazała, że podstawowym monomerem budującym polisacharydy izolowane z owocnika (93,5%) i grzybni (95,3%), jest glukoza, dodatkowo występują w niewielkiej ilości ksylloza i mannoza. Z kolei analizy produktów metylacji pokazały, że głównym typem wiązania budującego glukany izolowane z grzybni i owocników jest wiązanie  $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-Glcp-(1→ . Po przeprowadzeniu pełnej charakterystyki składu chemicznego i strukturalnego badanych glukanów izolowanych z *C. unicolor* swoją uwagę skierowałam na poszukiwanie możliwości ich biotechnologicznego zastosowania. Ze względu na fakt, iż zewnątrzkomórkowe enzymy – mutanazy, mają zdolność rozkładania związków cukrowych zawierających w swojej budowie wiązania  $\alpha$ -(1→3)- glikozydowe, w pierwszej kolejności postanowiłam sprawdzić możliwość wykorzystania (1→3)- $\alpha$ -D-glukanów izolowanych z *C. unicolor* jako induktorów syntezy tego enzymu [Wiater i wsp., 2005]. Realizacja tego etapu badań była możliwa dzięki

współpracy z pracownikami naukowymi Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS w Lublinie. Prace prowadzone w tym zespole badawczym, kierowanym przez prof. Janusza Szczodraka, wskazują na duży potencjał biotechnologicznego zastosowania mutanazy w produkcji preparatów dentystycznych, służących do usuwania płytki nazębnej, dlatego poszukiwanie nowych, efektywnych induktorów stymulujących syntezę tego enzymu wydaje się jak najbardziej uzasadnione. Obecnie najczęściej stosowanym induktorem syntezy mutanazy jest streptokokowy  $\alpha$ -D-glukan znany jako mutan [Wiater i wsp., 2008]. Badania indukcji syntezy mutanazy przez *Trichoderma harzianum* wykazały wyraźny wzrost aktywności tego enzymu po wprowadzeniu do kultur (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-glukanów izolowanych z grzybni *C. unicolor*. **W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano nowe preparaty nierozpuszczalnych w wodzie polisacharydów izolowanych z *C. unicolor*, które poddano szczegółowej charakterystyce. Istotnym osiągnięciem było również wykazanie możliwości nowego zastosowania biotechnologicznego (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-glukanów izolowanych z grzybni *C. unicolor* jako alternatywnego dla mutanu induktora wykorzystywanego w syntezie mutanazy.** Wyniki zaprezentowanych prac eksperymentalnych przedstawiono w następującej publikacji [O5]:

Osińska-Jaroszuk M., Wiater A., Choma A., Pleszczyńska M., Jaszek M., Janusz G., Skowronek M., Szczodrak J. (2017) (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-glucan from fruiting body and mycelium of *Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill: Structural characterization and use as a novel inducer of mutanase. *Int. J. Pol. Sci.*, 2017, 1249134:1-9.

## **Ad. 2 Optymalizacja warunków otrzymywania, charakterystyka biochemiczna oraz możliwości zastosowania biomedycznego wyselekcjonowanych nowych egzopolisacharydów grzybowych.**

### 2.1 Optymalizacja warunków otrzymywania oraz charakterystyka biochemiczna wybranych egzopolisacharydów pochodzenia grzybowego

Zachęcające wyniki badań dotyczące biotechnologicznego wykorzystania polisacharydów pochodzenia grzybowego stały się dla mnie podstawą do poszukiwania nowych grup związków cukrowych o potencjale bioaktywnym. Ponieważ dotychczasowe doniesienia literaturowe skupiały się głównie na pracach eksperymentalnych dotyczących endopolisacharydów pochodzenia grzybowego, natomiast nieliczne badania dotyczyły grzybowych egzopolisacharydów izolowanych szczególnie z gatunków należących do *Basidiomycota*, postanowiłam przeprowadzić eksperymenty w obrębie tej grupy organizmów. Po wstępnej selekcji wybranych szczepów grzybowych moją uwagę skupiłam na badaniach dwóch różnych ekologicznie gatunków należących do grzybów „brązowej zgnilizny drewna”:

*Tyromyces palustris* i „białej zgnilizny drewna”: *Ganoderma applanatum*, u których wykazałam zdolność wytwarzania egzopolisacharydów w warunkach laboratoryjnych. W wyniku przeprowadzonych prac eksperymentalnych ustalono optymalne warunki hodowli grzybów (czas, temperaturę, wpływ źródła węgla w pożywce oraz wartości pH podłoża), umożliwiające uzyskanie jak największej biomasy grzybni oraz wytwarzanych egzopolisacharydów. Wykonano także wstępną charakterystykę otrzymanych biopolimerów przy użyciu analitycznych technik biochemicznych.

Badania prowadzone w celu zwiększenia ilości wytwarzanych polisacharydów poprzez dodanie do podłoża węglowodanów (np. sacharozy), wskazują na możliwość wytwarzania przez organizmy grzybowe toksycznego ko-produktu w postaci kwasu szczawiowego [Wnag i McNeil, 1994]. Ze względu na fakt, iż grzyb *T. palustris* znany jest ze zdolności do syntezy dużych ilości kwasu szczawiowego oraz potwierdzoną rolę kwasu szczawiowego w odpowiedzi na obecność tlenków metali u grzyba *G. applanatum*, w kolejnym etapie badań podjęto próbę sprawdzenia wpływu kwasu szczawiowego na sekrecję polisacharydów do podłoża. Zaobserwowano, że wytwarzanie kwasu szczawiowego jest bezpośrednio związane z poziomem początkowej wartości pH pożywki hodowlanej. Wraz ze wzrostem wartości pH obserwowano wzrost ilości kwasu szczawiowego. W przypadku *G. applanatum* przy wyjściowej wartości pH podłoża hodowlanego wynoszącej 6,5, wykazano wzrost stężenia kwasu szczawiowego do stężenia  $1,66 \pm 0,2$  mM, natomiast u grzyba *T. palustris* zaobserwowano obniżenie ilości tego kwasu z wartości  $7,7 \pm 0,6$  mM przy początkowej wartości pH 6,0 do  $1,99 \pm 0,2$  mM przy wartości pH 3,5. Wykazano także związek pomiędzy ilością wytwarzanego kwasu szczawiowego, wartością pH podłoża oraz ilością wytwarzanego polisacharydu. W porównaniu do *G. applanatum* grzyb *T. palustris* wytwarzał znacznie większe ilości kwasu szczawiowego, natomiast większą ilość wydzielonego egzopolisacharydu zaobserwowano u grzyba *G. applanatum* ( $45,8 \pm 1,2$  g/l) niż u *T. palustris* ( $19,1 \pm 1,2$  g/l). **Podsumowując, uzyskane wyniki wyraźnie wskazywały na wpływ początkowych wartości pH pożywki hodowlanej na wzrost grzybni, syntezę kwasu szczawiowego oraz egzopolisacharydu. Zaobserwowano, iż zwiększone wydzielanie kwasu szczawiowego hamuje syntezę egzopolisacharydów. Po raz pierwszy wykazano możliwość regulacji syntezy polisacharydów grzybowych poprzez zmianę wartości pH podłoża. W wyniku przeprowadzonych analiz ustalono także skład biochemiczny otrzymanych egzopolisacharydów rozpuszczalnych w wodzie oraz poddano je wstępnej**

**charakterystyce z użyciem techniki FT-IR.** Wyniki opisanych badań zostały opublikowane w następującej pracy [O1]:

**Osińska-Jaroszuk M.,** Wlizło K., Szałapata K., Jarosz-Wilkolazka A. (2014) Correlation between the production of exopolysaccharides and oxalic acid secretion by *Ganoderma applanatum* and *Tyromyces palustris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30 (12):3065-3074.

## 2.2 Przedstawienie nowych możliwości zastosowania biomedycznego otrzymanych egzopolisacharydów grzybowych

W kolejnej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego, zbadalam właściwości bioaktywne polisacharydów zewnątrzkomórkowych (GpEPS) wyizolowanych z kultur grzyba *G. applanatum*, dla którego uzyskałam ilości polisacharydu najbardziej obiecujące pod kątem jego biotechnologicznego zastosowania. Wykonałam analizy określające właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe, immunostymulacyjne oraz antyoksydacyjne otrzymanego polisacharydu. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały działanie przeciwbakteryjne GpEPS wobec szczepu *Staphylococcus aureus* oraz toksyczny wpływ tego polisacharydu na komórki *Vibrio fischeri* (82,8% uszkodzenia komórek). Jednocześnie preparaty GpEPS zostały poddane testom cytotoksyczności w warunkach *in vitro* wobec linii komórkowych raka szyjki macicy pierwotnych i metastatycznych (SiHa i CaSki) i linii fibroblastów ludzkich skóry (HSF). Uzyskane wyniki wykazały, że GpEPS (w stężeniu powyżej 22,85 µg/ml i 228,5 µg/ml) może wykazywać selektywną aktywność wobec linii komórek nowotworowych SiHa. Immunomodulujące właściwości egzopolisacharydu określono za pomocą komórek THP-1, zdolnych do wytwarzania IL-6 i TNF-α. Badania wykazały, iż 6-godzinna inkubacja GpEPS w stężeniu 228,5 µg/ml spowodowała wytwarzanie TNF-α przez makrofagi pochodzące z THP-1 na poziomie 752,17 pg/ml, co odpowiada około 54-krotnemu wzrostowi w porównaniu do kontroli negatywnej. Realizacja tego etapu badań była możliwa dzięki współpracy z pracownikami naukowymi Zakładu Wirusologii i Immunologii UMCS. Zdolność polisacharydów do usuwania wolnych rodników określiłam z udziałem odczynnika DPPH, dla którego uzyskano stopień redukcji utlenienia na poziomie 20% w stosunku do kontroli. W kolejnym etapie badań postanowiłam sprawdzić właściwości sorpcyjne polisacharydów wobec cholesterolu, triglicerydów, glukozy oraz jonów magnezu i żelaza. W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano zdolność egzopolisacharydu z *G. applanatum* do wiązania *in vitro* cholesterolu przy czym ilość związanego cholesterolu ulegała zwiększeniu wraz z czasem inkubacji (39,2% po 2 godzinach i 57,9% po 24 godzinach inkubacji). Podobnej korelacji nie zaobserwowano w przypadku wiązania triglicerydów. **Zrealizowane doświadczenia pozwoliły na odkrycie**

**nowych możliwości biomedycznego zastosowania egzopolisacharydu z *G. applanatum* i potwierdziły jego wysoki potencjał w zakresie działania przeciwnowotworowego, immunomodulacyjnego, przeciwbakteryjnego i hipocholesterolemicznego.** Wyniki opisanych badań zostały opublikowane w następującej pracy [O2]:

**Osińska-Jaroszuk M.**, Jaszek M., Mizerska-Dudka M., Błachowicz, A., Rejczak T.P., Janusz G., Wydrych J., Polak J., Jarosz-Wilkołazka A., Kandefer-Szerszeń M. (2014) Exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. **BioMed Res. Int. poprzednia nazwa J. Biomed. Biotechnol.**, 2014, 743812:1-10.

Dodatkowo część wyników badań poświęconych egzopolisacharydom zostało przedyskutowanych w pracy przeglądowej [O3]:

**Osińska-Jaroszuk M.**, Jarosz-Wilkołazka A., Jaroszuk-Ściśel J., Szałapata K., Nowak A., Jaszek M., Ozimek E., Majewska M. (2015) Extracellular polysaccharides from *Ascomycota* and *Basidiomycota*: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 31 (12):1823-1844.

### **Ad. 3 Ocena możliwości praktycznego użycia wybranych polisacharydów pochodzenia grzybowego i bakteryjnego.**

#### 3.1 Polisacharydy jako czynniki stabilizujące i poprawiające właściwości katalityczne wybranych grup enzymów

Uzyskanie odpowiedniej stabilności enzymów jest istotnym czynnikiem umożliwiającym ich zastosowanie na skalę przemysłową. Opierając się na danych literaturowych i fakcie, iż do tej pory nie podjęto prób wykorzystania polisacharydów jako stabilizatorów enzymatycznych, postanowiłam przeprowadzić cykl badań mających na celu sprawdzenie możliwości zastosowania polisacharydów pochodzenia grzybowego i bakteryjnego jako czynników stabilizujących aktywność wybranych grup enzymów. Szczególną uwagę skupiłam na badaniach enzymów o wysokim potencjale biotechnologicznym: lipazy i lakazy. W pierwszej kolejności wykonano analizy mające na celu sprawdzenie wpływu dwóch polisacharydów pochodzenia grzybowego z *G. applanatum* (GaEPS) i bakteryjnego z *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 (RhEPS), na aktywność nowo zidentyfikowanej i scharakteryzowanej lipazy ze szczepu *Rhizomucor variabilis*. Udowodniono, że inkubacja (30 dni w temp. 4° i 30°C) preparatów lipazy zarówno z preparatami GaEPS jak i RhEPS, wyraźnie wpływa na aktywność lipazy w porównaniu do preparatów kontrolnych przechowywanych bez dodatku tych polisacharydów. W próbkach enzymu inkubowanych z EPS (30 dni w temp. 4°C) aktywność lipazy była znacznie wyższa w porównaniu do kontroli odpowiednio o 22% w obecności GaEPS i 31% w przypadku

RhEPS. Uzyskane wyniki badań wykazały pozytywny efekt działania polisacharydów na lipazę w zakresie alkalicznych wartości pH, w którym lipaza zachowywała wyraźnie wyższą aktywność w stosunku do enzymu nie poddanego procesom stabilizacji przez dodatek preparatów bakteryjnych i grzybowych EPS. **Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują na wyraźny wzrost stabilności lipazy z *R. variabilis* w obecności GaEPS i RhEPS. Wykazano, że wprowadzenie preparatów egzopolisacharydowych przyczyniło się do poprawy właściwości lipazy oraz zwiększyło stabilność enzymu w pH 8.0 i temperaturze 40°C co ma istotne znaczenie w rozszerzaniu możliwości jego praktycznego wykorzystania.** Opisane wyniki badań stały się treścią następującej publikacji [O4]:

Bancerz R., Osińska-Jaroszuk M., Jaszek M., Janusz G., Stefaniuk D., Sulej J., Janczarek M., Jarosz-Wilkolazka A., Rogalski J. (2016) New alkaline lipase from *Rhizomucor variabilis*: Biochemical properties and stability in the presence of microbial EPS. **Biotech. App. Biochem.**, 63 (1): 67-76.

Obiecujące wyniki badań, dotyczące poprawy właściwości katalitycznych lipaz z zastosowaniem egzopolisacharydów bakteryjnych, zainspirowały mnie do dalszej pracy z wykorzystaniem tych substancji jako stabilizatorów enzymatycznych. Dzięki współpracy z Zakładem Genetyki i Mikrobiologii UMCS z czterech szczepów bakteryjnych: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2, *Sinorhizobium meliloti* Rm1021, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, i *Bradyrhizobium elkanii* USDA76, uzyskałam polisacharydy zewnątrzkomórkowe, które poddałam charakterystyce biochemicznej, a następnie wykorzystałam jako narzędzie biotechnologiczne do modyfikacji lakazy wyizolowanej z grzyba białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor*. Przygotowane preparaty lakazowo-polisacharydowe oraz kontrolne, poddałam analizom biochemicznym umożliwiającym sprawdzenie zmian w poziomie aktywności lakazy, optimum wartości pH reakcji enzymatycznej, parametrów kinetycznych zmodyfikowanej lakazy oraz zmian profili białkowych preparatów lakazy, zawierających wybrane polisacharydy bakteryjne.

Uzyskane wyniki badań wskazywały na wyraźny wpływ bakteryjnych egzopolisacharydów na stabilność lakazy w porównaniu do preparatów kontrolnych (nie stabilizowanych EPS) w trakcie 30 dniowej inkubacji w temp. 25°C. Najwyższą aktywność lakazy zaobserwowano w przypadku preparatów modyfikowanych Rh76EPS i Rh1021EPS (odpowiednio 49,5 i 41,5% w porównaniu do kontroli bez EPS 12,8%). Egzopolisacharydy uzyskane z bakterii *Bradyrhizobium elkanii* USDA76 i *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 również najkorzystniej wpływały na stabilność lakazy w szerokim zakresie wartości pH od

4,6 do 6,2. Obserwowane, wyraźne przesunięcie optimum działania enzymu w ww. zakresie wartości pH w obecności bakteryjnych EPS, stwarzają szersze możliwości wykorzystania tego enzymu w procesach technologicznych (np. w konstrukcji biosensorów). Jednocześnie wykonałam analizę zmian parametrów elektrochemicznych lakazy stabilizowanej dodatkiem EPS-u oraz lakazy stabilizowanej polisacharydami i unieruchomionej na jednościennej nanorurce węglowej (SWCNTs). Cykliczna woltamperometria wskazywała na wyraźne przesunięcie potencjału redoks preparatów stabilizowanych egzopolisacharydem w porównaniu do enzymu niepoddanego stabilizacji. Specyficzna budowa lakazy związana z obecnością atomów miedzi w centrum aktywnym, sugeruje także na możliwości stabilizacji enzymu poprzez sorpcyjne oddziaływanie EPS-ów na jony miedzi. Dlatego w kolejnym etapie badań sprawdzono właściwości sorpcyjne polisacharydów bakteryjnych wobec jonów żelaza i magnezu, gdzie najwyższe właściwości sorpcyjne (odpowiednio na poziomie 42 i 14,5%) zaobserwowano wobec polisacharydów izolowanych z *B. japonicum* USDA110. Uzyskane wyniki potwierdzające zdolności adsorpcyjne bakteryjnych EPS-ów w stosunku do dwuwartościowych jonów żelaza i magnezu mogą wskazywać na bezpośredni związek egzopolisacharydów w procesach stabilizacji enzymu. **Zrealizowane doświadczenia pozwoliły na odkrycie nowych możliwości zastosowań bakteryjnych EPS jako czynników stabilizujących oraz poprawiających właściwości katalityczne lakazy. Poprawa właściwości katalitycznych lakaz w obecności bakteryjnych EPS-ów, w szczególności w podwyższonej temperaturze i w szerokim zakresie wartości pH może być obiecującym narzędziem w licznych zastosowaniach biotechnologicznych. Jednocześnie wykazano, iż bakteryjne egzopolisacharydy zmieniają znacząco elektrochemiczne właściwości lakazy, co może mieć zastosowanie w poprawie właściwości enzymu, stosowanego jako element składowy biosensorów i bioogniw.** Opisane wyniki badań stały się treścią następującej publikacji O6:

Osińska-Jaroszuk M., Jaszek M., Starosielec M., Sulej J., Matuszewska A., Janczarek M., Banczerz R., Wydrych, J., Wiater A., Jarosz-Wilkolazka A. (2018) Bacterial exopolysaccharides as a modern biotechnological tool for modification of fungal laccase properties and metal ion binding. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 41 (7): 973-989.

### 3.2 Polisacharydy jako czynniki adsorbujące wodę w procesie syntezy estrów

Dane literaturowe wskazują na coraz większe zainteresowanie wykorzystaniem lipaz jako katalizatorów reakcji w procesach bezpośredniej estryfikacji bądź transestryfikacji. Istotnym czynnikiem determinującym kierunek reakcji katalizowanych przez lipazy jest ilość wody w mieszaninie reakcyjnej. Reakcja estryfikacji i transestryfikacji zachodzi przy

niewielkiej ilości wody lub jej braku, natomiast nadmiar wody sprzyja procesowi hydrolizy. Dlatego w celu sprawdzenia w jaki sposób polisacharydy wpływają na proces enzymatycznej estryfikacji przy udziale lipazy *Rhizomucor variabilis*, zaplanowano kolejny cykl doświadczeń poświęcony badaniom otrzymywania estru z kwasu kaprylowego lub oleinowego i butanolu. Powstały w reakcji kwasu oleinowego i butanolu produkt oleinian-1 butylu, jest stosowany w przemyśle jako dodatek do oleju napędowego, plastifikator polichlorku winylu, środek wodoodporny lub dodatek do płynów hydraulicznych [Sharma i Kanwar, 2014]. W badaniach zastosowałam scharakteryzowane wcześniej egzopolisacharydy otrzymane z *Ganoderma applanatum* (GaEPS), pozyskane po raz pierwszy i opisane przez nasz zespół [Bancerz i wsp., 2018] egzopolisacharydy z *Abortiporus biennis* (AbEPS) oraz polisacharydy wyizolowane z owocników *Piptoporus betulinus* (PbPS) i *Laetiporus sulphurous* (LsPS). W początkowym etapie doświadczeń wykonano optymalizację procesu syntezy dwóch estrów kaprylanu butylu i oleinianu butylu poprzez ustalenie parametrów reakcji, takich jak: typ rozpuszczalnika organicznego, stosunek molowy alkoholu i kwasu, stężenie substratu oraz ilości lipazy. Następnie w optymalnych warunkach reakcji estryfikacji przeprowadzono jej modyfikację poprzez dodatek odpowiednich polisacharydów. Uzyskane wyniki badań wskazywały na bardzo wyraźną poprawę wydajności syntezy estrów (kaprylanu butylu i oleinianu butylu) w obecności zastosowanych preparatów polisacharydowych. Najwyższy współczynnik konwersji (95,2%) w trakcie syntezy kaprylanu butylu, zaobserwowano w obecności 1 mg preparatu AbEPS (czas reakcji 24 godziny, 500 U aktywności lipazy), natomiast najwyższy stopień konwersji w syntezie oleinian butylu (91,2%) został uzyskany w obecności 1 mg preparatu LsPS. Przeprowadzone doświadczenia doprowadziły do **znaczej poprawy wydajności reakcji estryfikacji poprzez nowatorskie wykorzystanie polisacharydów jako czynników adsorbujących wodę**. Opisane wyniki badań okazały się na tyle istotne i obiecujące, iż stały się przedmiotem dwóch zgłoszeń patentowych [P1, P2] oraz treścią następującej publikacji [O7]:

[O7] Bancerz R., **Osińska-Jaroszuk M.**, Jaszek M., Sulej J., Wiater A., Matuszewska A., Rogalski J. (2018) Fungal polysaccharides as a water-adsorbing material in esters production with the use of lipase from *Rhizomucor variabilis*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 118:957-964.

[P1] Bancerz R., **Osińska-Jaroszuk M.**, Jaszek M., Janczarek M., Rogalski J. (2017) Polisacharydy pochodzenia grzybowego do zastosowania wraz z lipazą wyizolowaną z *Rhizomucor variabilis* w reakcjach estryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych oraz sposób otrzymywania takich estrów. Zgłoszenie Patentowe nr P.420800

[P2] Bancerz R., **Osińska-Jaroszuk M.**, Jaszek M., Janczarek M., Rogalski J. (2017) Polisacharydy pochodzenia bakteryjnego do zastosowania wraz z lipazą wyizolowaną z *Rhizomucor variabilis* w reakcjach estryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych oraz sposób otrzymywania takich estrów. Zgłoszenie Patentowe nr P.420801



**LITERATURA:**

1. Giavasis I. (2014) Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinon Biotechnology* 26:162–173.
2. Jaroszuk-Ściśel J., Kurek E. (2012) Hydrolysis of fungal and plant cell walls by enzymatic complexes from cultures of *Fusarium* isolates with different aggressiveness to rye (*Secale cereale*). *Archives of Microbiology* 194:653–665.
3. Yan J.K., Wang W.Q., Wu J.Y. (2014) Recent advances in *Cordyceps sinensis* polysaccharides: Mycelial fermentation, isolation, structure, and bioactivities: A review. *Journal of Functional Food* 6:33–47.
4. Danot F., Fontana A., Baccou J.C., Schorr-Galindo S. (2012) Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers* 87:951–962. doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.083.
5. Breierová E., Vajcziková I., Sasinková V., Stratilová E., Fišera M., Gregor T., Šajbidor J. (2002) Biosorption of cadmium ions by different yeast species. *Z Naturforsch* 57c:634–639.
6. Da Silva L.J., de Rezende Pinto F., do Amaral L.A., Garcia-Cruz C.H. (2014) Biosorption of cadmium (II) and lead (II) from aqueous solution using exopolysaccharide and biomass produced by *Colletotrichum* sp. *Desalin Water Treat* 52:7878–7886. doi:10.1080/19443994.2013.833871.
7. Kozarski M., Klaus A., Niksic M., Jakovljevic D., Helsper J.P.F.G., Van Griensven L.J.L.D. (2011) Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry* 129:1667–1675. doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.029.
8. Usui T., Iwasaki Y., Mizuno T., Tanaka M., Shinkai K., Arakawa M. (1983) Isolation and characterization of anti-tumor active  $\beta$ -D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydrate Research* 115:273–280.
9. Miranda-Nantes C.C.B.O., Fonseca E.A.I., Zaia C.T.B.V., Dekker R.F.H., Khaper N., Castro Barbosa A.M. (2011) Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in diabetes-induced and hyperlipidemia conditions in rats. *Mycobiology* 39(3):187–193. doi:10.5941/MYCO.2011.39.3.187.
10. Welch S.A., Barker W.W., Banfield J.F. (1999) Microbial extracellular polysaccharides and plagioclase dissolution. *Geochim Cosmochim Acta* 63(9):1405–1419. doi:10.1016/S0016-7037(99)00031-9.
11. Seneviratne G., Kecskés M.L., Kennedy I.R. (2008) Biofilmed biofertilizers: novel inoculants for efficient nutrient use in plants. *ACIAR Proc* 130:126–130.
12. Jaszek M., Osińska-Jaroszuk M., Janusz G., Matuszewska A., Stefaniuk D., Sulej J., Polak J., Ruminowicz M., Grzywnowicz K., Jarosz-Wilkolazka A. (2013) New bioactive fungal molecules with high antioxidant and antimicrobial capacity isolated from *Cerrena unicolor* idiophasic cultures. *BioMed Res. Int. dawna nazwa J. Biomed. Biotechnol*, 2013 497492, 1–11.
13. Wiater A., Szczodrak J., Pleszczyńska M. (2005) Optimization of conditions for the efficient production of mutan in streptococcal cultures and post-culture liquids. *Acta Biologica Hungarica* 56(1-2):137–150.
14. Wiater A., Szczodrak J., Pleszczyńska M. (2008) Mutanase induction in *Trichoderma harzianum* by cell wall of *Laetiporus sulphureus* and its application for mutan removal from oral biofilms. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(7):1335–1341.
15. Wang Y., McNeil B. (1994) Scleroglucan and oxalic acid formation by *Sclerotium gluconicum* in sucrose supplemented fermentation. *Biotechnology Letters* 16:605–610.
16. Sharma S., Kanwar S.S. (2014) Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal* 2014, ID 625258, 15.

**PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ STANOWIĄCYCH TREŚĆ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDSTAWIONEGO W POSTĘPOWANIU HABILITACYJNYM ORAZ OMÓWIENIE EWENTUALNEGO ICH ZASTOSOWANIA:**

Za najważniejsze osiągnięcia badawcze zrealizowanego przeze mnie cyklu doświadczeń stanowiących treść osiągnięcia naukowego można uznać:

1. Otrzymanie i po raz pierwszy scharakteryzowanie preparatów polisacharydowych nierozpuszczalnych w wodzie i rozpuszczalnych w zasadach, zawierających 1→3)- $\alpha$ -D-glukan izolowanych z grzybni *C. unicolor* oraz wykazanie możliwości jego zastosowania jako alternatywnego dla mutanu induktora w procesie otrzymywania mutanazy.
2. Otrzymanie nowych zewnątrzkomórkowych preparatów polisacharydowych rozpuszczalnych w wodzie z *Ganoderma applanatum* i *Tyromyces palustris*. Optymalizacja warunków hodowli grzybów *Ganoderma applanatum* i *Tyromyces palustris* w celu uzyskania jak najwyższej wydajności produkcji nowej frakcji polisacharydowej wraz z określeniem korelacji pomiędzy ilością wytwarzania kwasu szczawowego a wydajnością produkcji egzopolisacharydu przez badane grzyby; zaobserwowanie, że wytwarzanie kwasu szczawowego jest związane z początkową wartością pH pożywki hodowlanej. W porównaniu do *G. applanatum* grzyb *T. palustris* wytwarzał znacznie większe ilości kwasu szczawowego przy czym większą ilość wydzielonego egzopolisacharydu ( $45,8 \pm 1,2$  g/l) obserwowano u grzyba *G. applanatum* w porównaniu do *T. palustris* ( $19,1 \pm 1,2$  g/l).
3. Przedstawienie po raz pierwszy możliwości biomedycznego zastosowania egzopolisacharydu z *G. applanatum* oraz potwierdzenie jego wysokiego potencjału w zakresie działania przeciwnowotworowego, immunomodulacyjnego, przeciwbakteryjnego oraz hipocholesterolemicznego. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano działanie przeciwbakteryjne GpEPS wobec szczepu *Staphylococcus aureus* oraz zaobserwowano toksyczny wpływ tego polisacharydu na komórki *Vibrio fischeri*. Uzyskane wyniki wykazały, że GpEPS (w stężeniu powyżej 22,85  $\mu$ g/ml i 228,5  $\mu$ g/ml) może wykazywać selektywną aktywność wobec linii komórek nowotworowych raka szyjki macicy (SiHa). Wykazano także zdolność egzopolisacharydu z *G. applanatum* do wiązania cholesterolu w warunkach *in vitro*.
4. Nowatorskie zastosowanie polisacharydów pochodzenia grzybowego i bakteryjnego jako czynników stabilizujących i poprawiających właściwości katalityczne enzymów (lakazy i

lipazy) w podwyższonej temperaturze i w szerokim zakresie wartości pH. Lakaza stabilizowana preparatem Rh1021EPS, zachowywała ponad 4 krotnie większą aktywność w porównaniu do preparatu natywnego. Wykazano po raz pierwszy zmiany właściwości elektrochemicznych lakazy w obecności bakteryjnych egzopolisacharydów.

5. Otrzymanie nowego preparatu egzopolisacharydowego z podłoża hodowlanego *Abortiporus biennis*; opisanie po raz pierwszy możliwości zastosowania polisacharydów grzybowych w zwiększeniu poziomu estryfikacji (synteza kaprylanu butylu i oleinianu butylu) przy udziale lipazy z *Rhizomucor variabilis*. Nowatorski charakter przeprowadzonych badań dał podstawę do opracowania dwóch zgłoszeń będących przedmiotem ochrony patentowej.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w **6 oryginalnych pracach naukowych i 1 pracy przeglądowej**. We wszystkich byłam głównym wykonawcą eksperymentów, wniosłam też znaczący wkład w koncepcję badań, analizę i opracowanie graficzne wyników oraz przygotowanie manuskryptów.

#### 4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

##### A) PRACA NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

- **Studia i praca magisterska**

Pracę naukową rozpocząłam w 1997 roku w zespole badawczym kierowanym przez prof. dr hab. Andrzeja Leonowicza w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Prowadzone przeze mnie badania związane były z próbą poszukiwania nowych metod indukcji lakazy - enzymu ligninolitycznego pochodzącego z grzyba białej zgnilizny drewna *Abortiporus biennis*. Moje badania koncentrowały się na sprawdzeniu wpływu szoku termicznego na aktywność lakazy jako alternatywnej metody stymulacji produkcji enzymu w stosunku do znanych chemicznych, a jednocześnie toksycznych induktorów, np. ksylidyny. W trakcie przeprowadzonych badań dokonałam optymalizacji temperatur oraz czasów ich działania na poziom syntezy zewnątrzkomórkowej lakazy. Wykazałam, że w warunkach działania zarówno niskiej jak i wysokiej temperatury dochodzi do zwiększenia poziomu syntezy badanego enzymu. W dalszej części badań podjęłam próbę wyjaśnienia mechanizmów związanych z tym procesem, poprzez badanie poziomu RFT, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy, oraz produktów jego przemian.

Przeprowadzone przeze mnie prace badawcze stały się tematem pracy magisterskiej pt. „*Efekt szoku termicznego na lakazę u grzyba ligninolitycznego Abortiporus biennis*”, pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Leonowicza.

- **Praca naukowa w Dziale Badawczo-Rozwojowym P.Z. CORMAY S.A.**

Po ukończeniu studiów magisterskich w 1999 roku rozpoczęłam pracę naukową w Dziale Badawczo-Rozwojowym P.Z. CORMAY (jeden z pierwszych producentów odczynników diagnostycznych i dystrybutor sprzętu medycznego), kierowanym przez dr Emilię Paleń. Moje prace badawcze związane były głównie z opracowaniem nowych technologii produkcji odczynników stosowanych w biochemii klinicznej i mikrobiologii. Opracowane przeze mnie odczynniki do analizy albuminy i białek całkowitych zostały z sukcesem wprowadzone na rynek produkcyjny. W ramach pracy badawczej zajmowałam się również walidacją nowych metod pomiarowych zgodnie z obowiązującymi normami ISO 9001 oraz wdrażaniem i dostosowaniem jakościowym produktów do norm europejskich.

- **Praca naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora**

W 2002 roku rozpoczęłam pracę w Zakładzie Biochemii UMCS w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Grażynę Ginalską, gdzie prowadziłam badania związane z modyfikacją biomateriałów naczyniowych oraz immobilizacją na nich substancji biologicznie czynnych. Badania miały na celu opracowanie nowej, skutecznej metody unieruchamiania antybiotyków aminoglikozydowych na wybranych protezach naczyniowych w sposób trwały, uniemożliwiający szybką elucję w czasie ich stosowania. W celu realizacji zaplanowanych badań samodzielnie opracowałam nowatorskie metody immobilizacji antybiotyków aminoglikozydowych (gentamycyny i amikacyny), poprzez wiązanie kowalencyjne pomiędzy komponentą cukrową antybiotyku a grupami aminowymi matrycy. Drugą zaproponowaną metodą immobilizacji było wiązanie antybiotyku z wykorzystaniem jego grup aminowych. W ramach zrealizowanego projektu badawczego opracowałam nowe metody analityczne (metodę spektrofotometryczną oraz metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), umożliwiające ilościowe oznaczenie gentamycyny i amikacyny w preparatach zawierających unieruchomiony antybiotyk. W badaniach użyłam komercyjne kolagenowane protezy naczyniowe (Hemashield<sup>TM</sup> oraz Wovex<sup>TM</sup>) oraz żelatynowane (Gelsoft<sup>TM</sup>, Unigraft<sup>®</sup>, Tricogel<sup>®</sup>). Wykonałam optymalizację warunków immobilizacji wybranych antybiotyków (wartość pH środowiska, stężenie czynnika redukującego, stężenie leku), w wyniku której wykazałam zdolność immobilizacji antybiotyku do wszystkich typów badanych protez, choć

z różną wydajnością i różną ilością związanego leku. Ponadto stwierdziłam, że testowane antybiotyki wiążą się do biomateriałów w sposób mieszany: adsorpcyjnie, jonowo i kowalencyjnie, przy czym największy procentowy udział w wiązaniu leku ma wiązanie kowalencyjne. Wykazałam, że zastosowanie nowej metody wiązania antybiotyków aminoglikozydowych poprzez trwałe wiązanie kowalencyjne, znacznie wydłuża czas ich elucji z protezy naczyniowej (do 30 dni) w porównaniu do protez kontrolnych nasączanych antybiotykiem (3 dni), co ma istotne znaczenie w praktycznym wykorzystaniu tego typu protez w leczeniu pacjentów z tendencją do zakażenia protez naczyniowych. Kolejny etap moich badań dotyczył określenia właściwości biologicznych zmodyfikowanych biomateriałów. Dokonałam oceny działania przeciwbakteryjnego otrzymanych protez. Badania prowadziłam zarówno z udziałem referencyjnych szczepów bakteryjnych ATCC (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*), jak i na izolatach klinicznych pozyskiwanych od pacjentów lubelskich szpitali (PSK4 i PSK1 Lublin). Na podstawie uzyskanych wyników wykazałam, że immobilizacja antybiotyków aminoglikozydowych nie wpływała na zmianę ich właściwości przeciwbakteryjnych i pozwalała na skuteczną ochronę protez naczyniowych przed zasiedlaniem testowanych szczepów. Dodatkowo wykonana przez mnie ocena adhezji bakterii do biomateriału zmodyfikowanego antybiotykami, wykazała specyficzne właściwości zapobiegające przyleganiu komórek bakteryjnych do powierzchni protez naczyniowych, w przeciwieństwie do przetestowanych protez kontrolnych, niemodyfikowanych antybiotykiem, bądź impregnowanych solami srebra. W kolejnym etapie badań dokonałam oceny cytotoksyczności protez naczyniowych modyfikowanych gentamycyną wobec komórek śródbłónka bydlęcego (BEAC), która wykazała brak efektu toksycznego. Wyniki przeprowadzonych analiz stały się treścią przygotowanej rozprawy doktorskiej pt. *"Modyfikacja biomateriałów naczyniowych antybiotykami aminoglikozydowymi"*, której promotorem była prof. dr hab. Grażyna Ginalska.

***Badania wykonane w ramach mojej pracy doktorskiej zostały częściowo sfinansowane ze środków pochodzących z Projektu Badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - 3 T09B 052 29 pt.: "Kowalencyjna immobilizacja antybiotyków, w celu uzyskania antybakteryjności protez naczyniowych", realizowanego we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie.***

Wyniki doświadczeń prowadzonych przeze mnie przed obroną doktoratu stały się częścią następujących opracowań naukowych:

| Nr  | Publikacja, dane bibliograficzne                                                                                                                                                                                                                                                                                            | IF <sup>1</sup> | Punkty MNiSW <sup>1</sup> |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| [1] | Ginalska G., <b>Osińska M.*</b> , Uryniak A. (2004) A covalent method of gentamicin bonding to silica supports. <b>J. Biomater. Applic.</b> 18(4):279-289.                                                                                                                                                                  | 0,951           | 15                        |
| [2] | Ginalska G., Kowalczyk D., <b>Osińska M.*</b> (2005) A chemical method of gentamicin bonding to gelatine-sealed prosthetic vascular grafts. <b>Int. J. Pharm.</b> 288(1):131-140.                                                                                                                                           | 2,156           | 20                        |
| [3] | Ginalska G., <b>Osińska M.*</b> , Uryniak A., Urbanik-Sypniewska T., Belcarz A., Rzeski W., Wolski A. (2005) Antibacterial activity of gentamicin-bonded gelatin-sealed polyethylene terephthalate vascular prostheses. <b>Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.</b> 29(4):419-424.                                                 | 2,026           | 20                        |
| [4] | Ginalska G., Kowalczyk D., <b>Osińska M.*</b> (2007) Amikacin-loaded vascular prosthesis as an effective drug carrier. <b>Int. J. Pharm.</b> 339(1-2): 39-46.                                                                                                                                                               | 2,408           | 20                        |
| [5] | Ginalska G., Uryniak A., <b>Osińska M.*</b> , Urbanik-Sypniewska T. (2004) Antibiotic protection of gelatinated vascular prostheses using the method of covalent immobilization (Antybiotykowa ochrona żelatynowanych protez naczyniowych metodą kowalencyjnej immobilizacji). <b>Pol. Przegl. Chir.</b> 76(10): 1063-1070. | -               | 5                         |

<sup>1</sup>zgodnie z rokiem opublikowania

Wyniki badań w których uczestniczyłam przed uzyskaniem stopnia doktora stały się również przedmiotem 2 patentów krajowych, które przyznano już po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora:

1. Ginalska G., Uryniak A., Łobarzewski J., **Osińska M.\*** (2009) Sposób immobilizacji antybiotyków zawierających I-rzędowe grupy aminowe ze stałymi matrycami pokrytymi białkiem. Patent Nr 201383, MNiSW = 30 pkt
2. Ginalska G., Uryniak A., Łobarzewski J., **Osińska M.\*** (2009) Sposób immobilizacji antybiotyków na stałych matrycach, zwłaszcza antybiotyków zawierających w swojej budowie komponent cukrowy. Patent Nr 203306, MNiSW = 30 pkt

\*Osińska M. – nazwisko panieńskie

Część wyników zawartych w pracy doktorskiej została opublikowana po uzyskaniu stopnia doktora w pracy [D1].

| Nr   | Publikacja, dane bibliograficzne                                                                                                                                                                                                                                                       | IF <sup>1</sup> | Punkty MNiSW <sup>1</sup> |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| [D1] | <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Ginalska G., Belcarz A., Uryniak A. (2009) Vascular prostheses with covalently bound gentamicin and amikacin reveal superior antibacterial properties than silver-impregnated ones-an in vitro study. <b>Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.</b> 38(6):697-706. | 2,919           | 24                        |

<sup>1</sup>zgodnie z rokiem opublikowania

Wyniki badań w których uczestniczyłam przed uzyskaniem stopnia doktora stały się także treścią streszczeń naukowych zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych **(10)** oraz krajowych **(7)**.

Sumaryczny współczynnik wpływu **(IF)** moich prac, opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych, zgodnie z rokiem opublikowania wyniósł **7,541**.

Suma punktów MNiSW uzyskanych przeze mnie za prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora, zgodnie z rokiem opublikowania, wyniosła **80**.

#### **B) PRZEBIEG MOJEJ PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA ORAZ REALIZOWANE AKTUALNIE ZADANIA BADAWCZE**

Dorobek naukowy (wraz z pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego) po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje:

- **33** prace naukowe, w tym **25** w czasopismach z listy JCR,
- **59** doniesień zjazdowych, w tym **28** na konferencjach międzynarodowych,
- **4** patenty krajowe,
- **2** zgłoszenia patentowe.

Wyniki wszystkich prac, poza publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego, w których brałam udział po obronie doktoratu, zostały opublikowane w następujących artykułach naukowych:

| Nr   | Publikacja, dane bibliograficzne                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | IF <sup>1</sup> | Punkty MNiSW <sup>1</sup> |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| [D1] | <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Ginalska G., Belcarz A., Uryniak A. (2009) Vascular prostheses with covalently bound gentamicin and amikacin reveal superior antibacterial properties than silver-impregnated ones- an in vitro study. <b>Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.</b> 38(6):697-706.                                                                                           | 2,919           | 24                        |
| [D2] | Sulej J., Janusz G., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Małek P., Mazur A., Komanińska I., Choma A., Rogalski J. (2013) Characterization of cellobiose dehydrogenase and its FAD-domain from the ligninolytic basidiomycete <i>Pycnoporus sanguineus</i> . <b>Enzyme Microb. Technol.</b> 53(6-7):427-437                                                                               | 2,966           | 30                        |
| [D3] | Jaszek M., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Janusz G., Matuszewska A., Stefaniuk D., Sulej J., Polak J., Ruminowicz M., Grzywnowicz K., Jarosz-Wilkolazka A. (2013) New bioactive fungal molecules with high antioxidant and antimicrobial capacity isolated from <i>Cerrena unicolor</i> idiophasic cultures. <b>BioMed Res. Int. (J. Biomed. Biotechnol.)</b> , 2013, 497492, 1–11. | 2,706           | 30                        |
| [D4] | Jaszek M., Kos K., Matuszewska A., Grąz M., Stefaniuk D., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Predecka M., Jóźwik E., Grzywnowicz K. (2014) Effective stimulation of the biotechnological potential of the medicinal white rot fungus: <i>Phellinus pini</i> by menadione-mediated oxidative stress. <b>Appl. Biochem. Biotechnol.</b> 174(2):644–656.                                   | 1,735           | 20                        |
| [D5] | Sulej J., Janusz G., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Rachubik P., Mazur A., Komanińska I., Choma A., Rogalski J. (2015) Characterization of cellobiose dehydrogenase from a biotechnologically important <i>Cerrena unicolor</i> strain. <b>App. Biochem. Biotech.</b> , 176 (6):1638-1658.                                                                                          | 1,606           | 20                        |
| [D6] | Mizerska-Dudka M., Jaszek M., Błachowicz A., Rejczak T.P., Matuszewska A., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Stefaniuk D., Janusz G., Sulej J., Kandefer-Szerszeń M. (2015) Fungus <i>Cerrena unicolor</i> as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anticancer compounds. <b>Int. J. Biol. Macromol.</b> 79:459-468.                                             | 3,138           | 25                        |
| [D7] | Janusz G., Jaszek M., Matuszewska A., Drączkowski P., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> (2015) Proteolytic modifications of laccase from <i>Cerrena unicolor</i> . <b>J. Mol. Catal. B: Enz.</b> 122, 330-338.                                                                                                                                                                           | 2,189           | 25                        |
| [D8] | Jaszek M., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Sulej J., Matuszewska A., Stefaniuk D., Maciag K., Polak J., Matuszewski Ł., Grzywnowicz K. (2015) Stimulation of the antioxidative and antimicrobial potential of the blood red bracket mushroom <i>Pycnoporus sanguineus</i> (higher Basidiomycetes). <b>Int. J. Med. Mushrooms.</b> 17(8):701–712.                                     | 1,357           | 15                        |



|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |       |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----|
| [D9]  | Matuszewska A., Karp M., Jaszek M., Janusz G., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Sulej J., Stefaniuk D., Tomczak W., Giannopoulos K. (2016) Laccase purified from <i>Cerrena unicolor</i> exerts antitumor activity against leukemic cells. <b>Oncol. Lett.</b> 11(3):2009-2018.                                                                                                                                             | 1,39  | 15 |
| [D10] | Szałapata K., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Bryjak J., Jaszek M., Jarosz-Wilkolazka A. (2016) Immobilization of pepsin on various porous carriers. <b>Braz. J. Chem. Eng.</b> 33(2):251-260.                                                                                                                                                                                                                             | 1,104 | 25 |
| [D11] | <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jaszek M., Sulej J., Stefaniuk D., Urbaniak M., Siwulski M., Janusz G. (2016) Complex biochemical analysis of fruiting bodies from newly isolated polish <i>Flammulina velutipes</i> strains. <b>Pol. J. Microb.</b> 65(3): 295-305.                                                                                                                                                       | 0,746 | 15 |
| [D12] | Prendecka M., Mlak R., Jaszek M., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jakubiak-Hulicz M., Leibold Ch., Bieser A., Wójcik W., Małecka-Massalska T. (2016) Effect of exopolysaccharide from <i>Ganoderma applanatum</i> on the electrical properties of mouse fibroblast cells line L929 culture using an electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) – Preliminary study. <b>Ann. Agric. Environ. Med.</b> 23 (2):280-284. | 0,829 | 20 |
| [D13] | Pawlik A., Wójcik M., Rułka K., Motyl-Gorzel K., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A., Rogalski J., <b>Janusz G.</b> (2016) Purification and characterization of laccase from <i>Sinorhizobium meliloti</i> and analysis of the lacc gene. <b>Int. J. Biol. Macromol.</b> 92:138-147.                                                                                                | 3,671 | 35 |
| [D14] | Polak J., Jarosz-Wilkolazka A., Szałapata K., Grąz M., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> (2016) Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties - the optimisation process. <b>New Biotechnol.</b> 33(2):255-262.                                                                                                                                                                | 3,813 | 30 |
| [D15] | Janusz G., Sulej J., Jaszek M., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> (2016) Effect of different wavelengths of light on laccase, cellobiose dehydrogenase, and proteases produced by <i>Cerrena unicolor</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> and <i>Phlebia lindtneri</i> . <b>Acta Biochim. Pol.</b> 63(2):223-228.                                                                                                               | 1,159 | 15 |
| [D16] | Tutaj K., Szlajak R., Szałapata K., Starzyk J., Luchowski R., Gudziński W., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jarosz-Wilkolazka A., Szuster-Ciesielska A., Gruszecki W. (2016) Amphotericin B-silver hybrid nanoparticles: synthesis, properties and antifungal activity <b>Nanomed. Nanotech. Biol. Med.</b> 12(4):1095-1103.                                                                                               | 5,72  | 40 |
| [D17] | Statkiewicz M., Matuszewska A., Jaszek M., Janusz G., <b>Osińska M.</b> , Sulej J., Stefaniuk D., Mikula M., Ostrowski J. (2017) Antimelanomic effects of high- and low-molecular weight bioactive subfractions isolated from the mossy maze mushroom, <i>Cerrena unicolor</i> (Agaricomycetes). <b>Int. J. Med. Mushrooms.</b> 19(7):619-628.                                                                          | 1,211 | 20 |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                            |                            |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| [D18]         | Rudawska A., Haniecka I., Jaszek M., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> (2017) The influence of biochemical modification on the properties of adhesive compounds. <b>Polymers</b> 9(1),9.                                                                                                                                                                                                                          | 2,935                      | 40                         |
| [D19]         | <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Ginalska G. (2011) Methods of antibiotics bonding to vascular prostheses. Metody wiązania antybiotyków do protez naczyniowych. Annales Univeristatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio DDD, Pharmacia, 24(3):71-78.                                                                                                                                                             | -                          | 7                          |
| [D20]         | <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jarosz-Wilkołazka A. (2012) Chromatograficzne metody oczyszczania polisacharydów grzybowych. <b>Inż. Aparat. Chem.</b> 51(43)4:162-163.                                                                                                                                                                                                                                       | -                          | 5                          |
| [D21]         | Szałapata K., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jarosz-Wilkołazka A. (2013) Bakteryjna degradacja policyklicznych węglowodorów aromatycznych. [w:] Postępy w naukach przyrodniczych. 1 Progresses in Life Sciences, red. Kamil Maciąg, Mirosław Szala, Grzegorz Winiarski. Lublin, Politechnika Lubelska, 2013, s. 6-21. ISBN 978-83-63569-84-6.                                                                | -                          | 4                          |
| [D22]         | Wlizio K. <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jarosz-Wilkołazka A. (2013) Taksol- cząsteczka nadziei w leczeniu nowotworów. [w:] Postępy w naukach przyrodniczych. 1 Progresses in Life Sciences, red. Kamil Maciąg, Mirosław Szala, Grzegorz Winiarski. Lublin, Politechnika Lubelska, 2013, s.100-113. ISBN 978-83-63569-84-6.                                                                                  | -                          | 4                          |
| [D23]         | Swatek A., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> (2014) Biomateriały w chirurgii naczyniowej. [w:] Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w inżynierii materiałowej = Theoretical and application issues in materials science engineering, red. Mariusz Walczak, Mirosław Szala. Lublin: Politechnika Lubelska, 2014, s. 68-80. ISBN 978-83-7947-017-4.                                                                | -                          | 4                          |
| [D24]         | Szałapata K., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jarosz-Wilkołazka A. (2015) Roślinne inhibitory enzymów proteolitycznych i ich właściwości. [w:] Rośliny: fizjologia, uprawa i ich interdyscyplinarne wykorzystanie [monografia naukowa], red. Kinga Kropiwek, Mirosław Szala. Lublin, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, 2015, s.207-218, ISBN: 978-83-65272-12-6, 207-218.                    | -                          | 4                          |
| [D25]         | Szałapata K., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jarosz-Wilkołazka A. (2015) Inhibitory proteaz jako wielofunkcyjne narzędzia stosowane w różnych dziedzinach życia. [w:] Biotechnologia w analizie, ochronie środowiska, medycynie i przemyśle: [monografia naukowa], red. Kinga Kropiwek, Mirosław Szala. Lublin: Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, 2015, s.158-170, ISBN: 978-83-65272-06-5. | -                          | 4                          |
| [D26]         | Szałapata K., <b>Osińska-Jaroszuk M.</b> , Jarosz-Wilkołazka A. (2017) Inhibitory enzymów o potencjalnym zastosowaniu medycznym <b>Post. Bioch.</b> 63(4):261-268.                                                                                                                                                                                                                                         | -                          | 8                          |
| Suma punktów: |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>IF</b><br><b>41,194</b> | <b>MNiSW</b><br><b>484</b> |

<sup>1</sup>zgodnie z rokiem opublikowania

Wyniki badań w których uczestniczyłam po uzyskaniu stopnia doktora stały się również przedmiotem 4 patentów krajowych:

1. Ginalska G., Uryniak A., Łobarzewski J., **Osińska M.\*** (2009) Sposób immobilizacji antybiotyków zawierających I-rzędowe grupy aminowe ze stałymi matrycami pokrytymi białkiem. Patent Nr 201383, MNiSW = 30 pkt.
2. Ginalska G., Uryniak A., Łobarzewski J., **Osińska M.\*** (2009) Sposób immobilizacji antybiotyków na stałych matrycach, zwłaszcza antybiotyków zawierających w swojej budowie komponent cukrowy. Patent Nr 203306, MNiSW = 30 pkt.
3. Jaszek M., Matuszewska A., **Osińska-Jaroszuk M.**, Janusz G., Sulej J., Stefaniuk D., Giannopoulos K., Karp M. (2013) Enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych krwi. Patent Nr 225934, MNiSW = 30 pkt.
4. Matuszewska A., Jaszek M., Janusz G., **Osińska-Jaroszuk M.**, Sulej J., Stefaniuk D., Rogalski J., Mizerska-Dudka M., Kandefer-Szerszeń M. (2013). Enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu raka szyjki macicy Patent Nr 225869, MNiSW = 30 pkt.

\*nazwisko panińskie

oraz treścią streszczeń zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych **(28)** i krajowych **(31)**.

Moje zainteresowania badawcze z okresu pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora można podzielić na kilka grup tematycznych:

### **1. Immobilizacja enzymów (proteaz) i inhibitorów proteaz w celu modyfikacji wybranych grup biomateriałów**

Tematyka immobilizacji stanowi kontynuację moich zainteresowań w obszarze modyfikacji różnych typów materiałów medycznych m.in. protez naczyniowych. Badania obejmują m.in. poszukiwanie nowych substancji o właściwościach antyseptycznych (AEBSF, inhibitor sojowy,  $\alpha_1$ -antytrypsyna), umożliwiających ochronę poliestrowych protez naczyniowych i poliestrowo-polipropylenowej kości czaski przed zasiedlaniem patogenów oraz badanie właściwości biologicznych i fizykochemicznych zmodyfikowanych biomateriałów. W ramach tego tematu sprawowałam częściową opiekę merytoryczną (promotor pomocniczy) nad pracą doktorską dr Katarzyny Szałapaty (2018) pt. „*Właściwości wybranych materiałów biomedycznych modyfikowanych inhibitorami enzymów proteolitycznych.*” Wyniki doświadczeń zostały opisane w pracy: **D9**. Obecnie w ramach powyższej tematyki biorę udział w pracach zespołu kierowanego przez prof. dr hab. Annę

Jarosz-Wilkolażką, która realizuje projekt finansowany ze środków NCN pt. "*Modyfikacja materiałów biomedycznych inhibitorami enzymów proteolitycznych*" (2017/25/B/NZ7/01084). Tematyka immobilizacji stała się także przedmiotem licznych prac przeglądowych dotyczących metod immobilizacji antybiotyków [D18] oraz przeglądu wiedzy na temat biomateriałów stosowanych w chirurgii naczyniowej [D22], a także roślinnych inhibitorów proteaz, ich właściwości i zastosowań biotechnologicznych i medycznych [D23, D24, D25].

## **2. Polisacharydy - wybór organizmów, izolacja, charakterystyka i zastosowanie biotechnologiczne**

Główny obszar moich zainteresowań związanych z pracą badawczą po osiągnięciu tytułu doktora, dotyczy tematyki pozyskiwania i charakterystyki polisacharydów pochodzenia grzybowego i bakteryjnego (szczególnie egzopolisacharydów). W ramach tych prac (oprócz opracowań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego), przeprowadziłam badania związane z optymalizacją metod oczyszczania polisacharydów z wykorzystaniem metod chromatograficznych, których wyniki stały się treścią pracy D19. Jednocześnie zajmowałam się poszukiwaniem nowych zastosowań biotechnologicznych i biomedycznych dla wyizolowanych przeze mnie polisacharydów co stało się treścią prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego. Dokonałam charakterystyki rozpuszczalnego w wodzie endopolisacharydu izolowanego z grzyba *C. unicolor* oraz wykazałam jego właściwości antyoksydacyjne i bakteriostatyczne wobec bakterii *Staphylococcus aureus* (publikacja D3) oraz przeprowadziłam badania związane z określeniem wpływu egzopolisacharydów z *G. applanatum* na właściwości mysich komórek fibroblastów linii L929 z wykorzystaniem systemu ECIS (publikacja D11).

## **3. Biomedyczne zastosowanie substancji biologicznie czynnych pozyskiwanych z grzybów**

Grzyby białej zgnilizny drewna stanowią bogate źródło substancji o charakterze bioaktywnym. W ramach zespołu naukowego, kierowanego przez panią dr hab. Magdalenę Jaszek biorę aktywny udział w pracach nad poszukiwaniem nowych związków niskocząsteczkowych, lakazy oraz polisacharydów o potencjalnych zastosowaniach biomedycznych wykazujących aktywność przeciwnowotworową, antyoksydacyjną, i przeciwdrobnoustrojową. Projekt badawczy funkcjonuje w oparciu o multidyscyplinarną sieć badawczą, w której uczestniczą następujące jednostki naukowe:

- 1) Uniwersytet Marii Curie–Skołodowskiej w Lublinie:
  - Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii
  - Zakład Wirusologii i Immunologii, Wydział Biologii i Biotechnologii
- 2) Uniwersytet Medyczny w Lublinie:
  - Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej, II Wydział Lekarski
  - Katedra i Zakład Fizjologii Człowieka, I Wydział Lekarski
- 3) Centrum Onkologii – Instytut Marii Skłodowskiej–Curie w Warszawie:
  - Zakład Genetyki.

Mój obszar zainteresowań w ramach funkcjonującego zespołu naukowego dotyczy badań związanych z izolacją i charakterystyką różnych grup polisacharydów grzybowych i bakteryjnych oraz badań właściwości antyoksydacyjnych i przeciwdrobnoustrojowych wszystkich grup związków. Wyniki badań stały się treścią prac eksperymentalnych [D5, D7, D8 i D16] oraz **dwóch patentów** dotyczących wykorzystania enzymu lakazy w leczeniu chorób nowotworowych krwi oraz raka szyjki macicy. Z kolei badania owocników jadalnego grzyba *Flammulina velutipes* potwierdziły jego prozdrowotne właściwości antyoksydacyjne oraz przeciwdrobnoustrojowe i stały się treścią publikacji D10.

#### 4. Izolacja, charakterystyka i zastosowanie enzymów ligninocelulolitycznych

Kolejny obszar moich zainteresowań związany jest z badaniami dotyczącymi różnych aspektów związanych z izolacją, charakterystyką i zastosowaniem enzymów ligninocelulolitycznych: lakazy i dehydrogenazy celobiozowej.

##### • Lakaza

W ramach Badań Statutowych związanych z enzymami ligninolitycznymi prowadzonymi w Zakładzie Biochemii UMCS brałam udział w następujących pracach dotyczących enzymu lakazy:

- izolacja i charakterystyka biochemiczna lakazy z *Sinorizhobium meliloti*, których wyniki zostały opisane w publikacji D12,
- proteolityczna modyfikacja izoform lakazy, która umożliwiała zwiększenie aktywności enzymu oraz poprawę jego potencjału oksydoredukcyjnego, których wyniki zostały przedstawione w pracy D6,
- określenie wpływu różnych długości fali świetlnej na syntezę enzymów: lakazy, dehydrogenazy celobiozowej i proteaz izolowanych z grzybów białej zgnilizny drewna, których tematyka stała się przedmiotem publikacji D14.

Dodatkowy obszar moich zainteresowań naukowych związany jest z określeniem potencjału biotechnologicznego enzymów ligninolitycznych. Prace naukowe związane z tą tematyką dotyczyły badań realizowanych w ramach grantu kierowanego przez dr Jolantę Polak, dotyczących syntezy barwników tekstylnych z wykorzystaniem enzymu lakazy pt: *”Barwniki tekstylne o aktywności antymikrobiologicznej syntetyzowane przez lakazę grzybową”* (0533/IP1/2011/71), w których realizowałam badania związane z właściwościami przeciwbakteryjnymi i antyoksydacyjnymi. Efektem pracy była publikacja **D13**. Badania prowadzone we współpracy z Politechniką Lubelską pozwoliły na przeprowadzenie eksperymentów sprawdzających możliwości wykorzystania lakazy jako biochemicznego czynnika modyfikującego właściwości adhezyjne substancji klejących, których wyniki zostały przedstawione w pracy [D17].

- **Dehydrogenaza celobiozowa**

W trakcie badań w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki pt. *„Dehydrogenazy celobiozowe wybranych grzybów ligninolitycznych”* (2011/01/N/NZ1/03458) wyizolowano i scharakteryzowano dehydrogenazę celobiozową z *Cerrena unicolor* i *Pycnoporus sanguineus*. Moje zadanie badawcze w tym projekcie polegało na ocenie właściwości antyoksydacyjnych badanych enzymów. Wyniki uzyskanych badań zostały opisane w publikacjach **D2 i D4**. Obecnie uczestniczę w realizacji projektu kierowanego przez panią dr Justynę Sulej pt. *„Ocena potencjału antyoksydacyjnego i przeciwdrobnoustrojowego grzybowej dehydrogenazy celobiozowej jako składnika opakowań aktywnych”* (2015/17/D/NZ9/02066), dotyczącego wykorzystania dehydrogenazy celobiozowej z *Phlebia lindtnerii*, *Cerrena unicolor*, *Pycnoporus sanguineus* i *Phanerochaete chrysosporim*. W ramach powyższej pracy projektowej zajmuję się badaniami związanymi z oceną potencjału antyoksydacyjnego wybranych dehydrogenaz celobiozowych (CDH) oraz metodyką immobilizacji oczyszczonych preparatów CDH na matrycach organicznych i nieorganicznych.

Poza wymienionymi głównymi dziedzinami badawczymi brałam także udział w części doświadczalnej prac dotyczących:

- właściwości przeciwgrzybiczych zmodyfikowanej srebrem amfoterycyny B, w której uczestniczyłam w badaniach mikrobiologicznych. Wyniki doświadczeń zostały opublikowane w pracy **D15**,

- określenia wpływu stymulacji menadionu jako głównego czynnika wywołującego stres oksydacyjny na aktywność zewnątrzkomórkowej peroksydazy manganozależnej i wewnątrzkomórkowej chitynazy, których wyniki zostały opublikowane w pracy **D3** oraz w systematycznym opracowaniu wiedzy na temat bakteryjnej degradacji policyklicznych węglowodorów **D20** i przeglądowego opracowania dotyczącego taksolu **D21**.

**Podsumowując**, najważniejsze wyniki mojej pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym, dotyczą:

1. prac związanych z modyfikacją biomateriałów w celu ich ochrony bakteriostatycznej,
2. izolacji, charakterystyki i biomedycznego zastosowania szerokiej grupy metabolitów pochodzenia grzybowego (lakazy oraz związki niskocząsteczkowe),
3. izolacji i charakterystyki wybranych grup enzymów: lakazy, dehydrogenazy celobiozowej i lipazy o znaczeniu biotechnologicznym.

Sumaryczny współczynnik wpływu (**IF**) moich prac, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych (bez uwzględnienia prac złożonych do oceny w postępowaniu habilitacyjnym) zgodnie z rokiem opublikowania wyniósł **41,194**. Suma punktów MNiSW uzyskanych przeze mnie za prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora (bez uwzględnienia prac złożonych do oceny w postępowaniu habilitacyjnym) zgodnie z rokiem opublikowania wyniosła **444**. Podsumowanie całego dorobku (bez prac stanowiących osiągnięcie naukowe): **IF = 41,194**, punkty **MNiSW = 604**).

## **5. PLANY NAUKOWE**

Moje najbliższe plany naukowe związane są z kontynuacją dotychczasowej pracy badawczej i obejmują:

- 1) Prace nad nowymi metodami modyfikacji materiałów biomedycznych i poszukiwanie nowych naturalnych substancji o charakterze bakteriostatycznym.
- 2) Poszukiwanie nowych grup związków pochodzenia grzybowego (polisacharydy, enzymy, substancje niskocząsteczkowe) ich izolacja i charakterystyka.

- 3) Badania nowych możliwości zastosowania biotechnologicznego i biomedycznego substancji izolowanych z grzybów.

#### PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ

| DANE BIBLIOMETRYCZNE                                                                                                                                                                                                                                                                    | IF                            | PUNKTY MNiSW            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego - <b>7 publikacji</b><br>Inne zawodowe prace twórcze (zgłoszenia patentowe) związane z osiągnięciem naukowym - <b>2 zgłoszenia patentowe</b>                                                                                         | <b>15,659</b>                 | <b>180</b><br><b>4</b>  |
| Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR) (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego):<br>A) przed uzyskaniem stopnia doktora - <b>4 publikacji</b><br>B) po uzyskaniu stopnia doktora - <b>18 publikacji</b> | <b>7,541</b><br><b>41,194</b> | <b>75</b><br><b>444</b> |
| Publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazach lub na liście JCR:<br>A) przed uzyskaniem stopnia doktora - <b>1 publikacja</b><br>B) po uzyskaniu stopnia doktora - <b>8 publikacji</b>                                            | -<br>-                        | <b>5</b><br><b>40</b>   |
| Inne zawodowe prace twórcze (zgłoszenia patentowe) - <b>4 patenty</b>                                                                                                                                                                                                                   |                               | <b>120</b>              |
| Liczba streszczeń naukowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych:<br>A) przed uzyskaniem stopnia doktora – <b>17 doniesień</b><br>B) po uzyskaniu stopnia doktora – <b>59 doniesień</b>                                                                         |                               |                         |
| <b>ŁĄCZNA LICZBA PUBLIKACJI*</b> <b>RAZEM =37</b>                                                                                                                                                                                                                                       |                               |                         |
| <b>Łączny IF zgodnie z rokiem opublikowania</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                               | <b>64,394</b>           |
| <b>Łączny MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania</b>                                                                                                                                                                                                                                      |                               | <b>868</b>              |
| *Wykaz wszystkich prac obejmujących mój dorobek naukowy przedstawiono w Załączniku 3                                                                                                                                                                                                    |                               |                         |
| <b>OCENA BIBLIOMETRYCZNA (Z DNIA 31 GRUDNIA 2018)</b>                                                                                                                                                                                                                                   |                               |                         |



|                                                                       |            |
|-----------------------------------------------------------------------|------------|
| Całkowita liczba cytowań (wg <i>Web of Science</i> ):                 | <b>173</b> |
| Całkowita liczba cytowań bez autocytowań (wg <i>Web of Science</i> ): | <b>153</b> |
| Całkowita liczba cytowań (wg <i>Scopus</i> ):                         | <b>217</b> |
| Całkowita liczba cytowań bez autocytowań (wg <i>Scopus</i> ):         | <b>147</b> |
| Indeks <i>Hirscha</i> (wg <i>Web of Science</i> ):                    | <b>8</b>   |
| Indeks <i>Hirscha</i> (wg <i>Scopus</i> ):                            | <b>10</b>  |
| Indeks <i>Hirscha</i> bez autocytowań (wg <i>Scopus</i> ):            | <b>7</b>   |

M. Osińska-Jaroszuk