

**AUTOREFERAT**

**Jolanta Anna Polak**

**Katedra Biochemii i Biotechnologii  
Instytut Nauk Biologicznych  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie**

**Lublin 2023**

## Spis treści

<b>1. Imię i Nazwisko.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych .....</b>	<b>3</b>
<b>4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....</b>	<b>4</b>
<b>4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....</b>	<b>4</b>
<b>4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego .....</b>	<b>4</b>
<b>4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników.....</b>	<b>8</b>
<b>4.3.1. Wprowadzenie .....</b>	<b>8</b>
<b>4.3.2. Cel badań.....</b>	<b>11</b>
<b>4.3.3. Osiągnięte wyniki.....</b>	<b>12</b>
<b>4.3.4. Podsumowanie najważniejszych wyników badań opublikowanych w artykułach stanowiących osiągnięcie naukowe .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.5. Piśmiennictwo.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....</b>	<b>37</b>
<b>6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę .....</b>	<b>40</b>
<b>7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej .....</b>	<b>43</b>

## 1. Imię i Nazwisko

**Jolanta Anna Polak**

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

### **2010 - stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii**

Rozprawa doktorska pt.: „Synteza substancji barwnych przez lakazę grzybową”, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie wykonana pod opieką promotorską prof. dr hab. Anny Jarosz-Wilkołazkiej.

### **2002 - tytuł zawodowy magistra biologii w zakresie biochemii**

Praca magisterska pt.: „Badania funkcjonalne mutantów *Lactococcus lactis* IL1403 zaburzonych w metabolizmie laktozy indukowanym celobiozą”, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Praktyczną część pracy wykonano w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pod opieką naukową prof. dr. hab. Jacka Bardowskiego oraz prof. dr hab. Magdaleny Fikus (promotor pracy).

## 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

**1 X 2012 - do chwili obecnej – adiunkt**, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**16 II 2009 – 30 IX 2012 – asystent**, Zakład Biochemii (obecnie Katedra Biochemii i Biotechnologii), Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**1 XI 2005 - 30 IX 2008 – samodzielne stanowisko pracy - biochemik**, Zakład Biochemii (obecnie Katedra Biochemii i Biotechnologii), Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, realizacja grantu finansowanego z 6-go Programu Ramowego UE (SOPHIED)

**1 VI 2003 - 31 X 2005 – asystent naukowy**, Zakład Biologicznych Szkodliwości Zawodowych, Instytut Medycyny Wsi im. W. Chodźki w Lublinie

**1 II 2003 - 31 VIII 2003 – asystent techniczny**, Zakład Biochemii (obecnie Katedra Biochemii i Biotechnologii), Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, realizacja grantu finansowanego z 5-go Programu Ramowego UE (PUBLIER)

**4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)**

*Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.*

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

Przedstawione osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu oryginalnych artykułów naukowych i jednej pracy przeglądowej opublikowanych w latach 2012 – 2022 ujętych w tytule:

**Lakaza grzybowa jako uniwersalny biokatalizator syntezy nowych związków organicznych o potencjale aplikacyjnym**

**4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

Wyniki badań przedstawione w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia uzyskano m.in. podczas kierowanych przeze mnie projektów:

- „Enzymatyczna synteza związków o aktywności antymikrobiologicznej i antyoksydacyjnej w dwuskładnikowych układach transformacyjnych”, 2016/21/D/NZ9/02460, SONATA 11, NCN,

- „Barwniki tekstylne o aktywności antymikrobiologicznej syntetyzowane przez lakazę grzybową”, IP2011 043371, Iuventus Plus, MNiSW.

**Oryginalne prace eksperymentalne:****Publikacja 1 (P1)**

---

**Polak J\***, Wlizło K, Pogni R, Petricci E, Grąż M, Szałapata K, Osińska-Jaroszuk M, Kapral-Piotrowska J, Pawlikowska-Pawłęga B, Jarosz-Wilkołazka A. (2020) Structure and bioactive properties of novel textile dyes synthesised by fungal laccase, *International Journal of Molecular Sciences* 21, 2052

IF<sub>2020</sub> = 5,924; punkty MEiN<sub>2021</sub> = 140

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przygotowaniu planu doświadczeń oraz opracowaniu zastosowanej metodyki. Brałam udział w następujących pracach badawczych: charakterystyka elektrochemiczna i biochemiczna substratów, optymalizacja procesu biotransformacji, synteza i oczyszczanie barwników. Ponadto wspólnie z poszczególnymi członkami zespołu brałam czynny udział w analizie właściwości bioaktywnych, analizach chromatograficznych i molekularnych produktów reakcji. Opracowałam i opisałam uzyskane wyniki, przygotowałam tekst manuskryptu oraz wykonałam korekty wydawnicze na każdym etapie procesu publikacji. Byłam autorem korespondencyjnym tej publikacji.*

**Publikacja 2 (P2)**

---

**Polak J\***, Grąż M, Wlizło K, Szałapata K, Kapral-Piotrowska J, Paduch R, Jarosz-Wilkołazka A. (2022) Bioactive properties of a novel antibacterial dye obtained from laccase-mediated oxidation of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, *Molecules* 27 (2), 487

IF<sub>2022</sub> = 4,927; punkty MEiN<sub>2021</sub> = 140

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przygotowaniu planu doświadczeń oraz opracowaniu metodyki. Przeprowadziłam następujące prace badawcze: charakterystyka elektrochemiczna i biochemiczna substratu i optymalizacja biotransformacji. Brałam udział w pracach innych członków zespołu, m.in. w analizie chromatograficznej, syntezie barwnika, analizie barwnika pod kątem oceny toksyczności środowiskowej i właściwości bioaktywnych. Przygotowałam rysunki i tabele pod kątem publikacji. Opracowałam i opisałam uzyskane wyniki, przygotowałam tekst manuskryptu oraz wykonałam korekty wydawnicze na każdym etapie procesu publikacji. Byłam autorem korespondencyjnym tej publikacji.*

---

**Publikacja 3 (P3)**

---

**Polak J**, Jarosz-Wilkołazka A\*, Szuster-Ciesielska A, Wlizło K, Kopycińska M, Sójka-Ledakowicz J, Lichawska-Olczyk J. (2016) Toxicity and dyeing properties of dyes obtained through laccase-mediated synthesis, *Journal of Cleaner Production* 112, 4265-4272

IF<sub>2016</sub> = 5,715; punkty MNiSW<sub>2016</sub> = 40

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przygotowaniu planu doświadczeń oraz opracowaniu części metodyki wykorzystanej w podczas realizacji planu eksperymentalnego. Brałam czynny udział w następujące doświadczeniach: spektroskopowej analizie produktów, syntezie barwników, analizie toksyczności środowiskowej, wstępnej ocenie potencjału barwierskiego produktów, przygotowaniu produktów pod kątem oceny ich cytotoxyczności. Opracowałam i opisałam uzyskane wyniki, przygotowałam pierwotny tekst manuskryptu oraz brałam udział w wykonaniu korekt wydawniczych na każdym etapie procesu publikacji.*

---

**Publikacja 4 (P4)**

---

Wlizło K, **Polak J\***, Jarosz-Wilkołazka A, Pogni R, Petricci E. (2020) Novel textile dye obtained through transformation of 2-amino-3-methoxybenzoic acid by free and immobilised laccase from a *Pleurotus ostreatus* strain, *Enzyme and Microbial Technology* 132, 109398

IF<sub>2020</sub> = 3,493; punkty MEiN<sub>2020</sub> = 70

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań i metodyki pracy doświadczalnej, przeprowadzeniu części doświadczeń (synteza i oczyszczanie barwnika, analizy chromatograficzne i molekularne), brałam udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu części manuskryptu (wstęp i dyskusja) brałam udział w wykonaniu korekt wydawniczych na każdym etapie procesu publikacji. Byłam autorem korespondencyjnym tej publikacji.*

---

**Publikacja 5 (P5)**

---

**Polak J\***, Jarosz-Wilkołazka A, Szałapata K, Grąż M, Osińska-Jaroszuk M. (2016) Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties - the optimisation process. *New Biotechnology* 33 (2), 255-262

---

**IF<sub>2016</sub>** = 3,816; punkty **MNiSW<sub>2016</sub>** = 25

*Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, przygotowaniu planu doświadczeń oraz opracowaniu zastosowanej metodyki. Przeprowadziłam następujące doświadczenia: otrzymanie i oczyszczanie lakazy, optymalizacja parametrów syntezy. Brałam udział w pracach innych członków zespołu, m.in. w analizie chromatograficznej, określeniu właściwości antymikrobiologicznych i antyoksydacyjnych produktu reakcji. Opracowałam i opisałam uzyskane wyniki, przygotowałam pierwotną wersję tekstu manuskryptu oraz wykonałam korekty wydawnicze na każdym etapie procesu publikacji. Byłam autorem korespondencyjnym tej publikacji.*

**Artykuł przeglądowy:**

**Publikacja 6 (P6)**

---

**Polak J, Jarosz-Wilkotazka A\***. (2012) Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis *Process Biochemistry* 47 (9), 1295–1307

**IF<sub>2012</sub>** = 2,414; punkty **MNiSW<sub>2012</sub>** = 35

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracowaniu koncepcji pracy przeglądowej, przeglądu piśmiennictwa i prac patentowych. Przygotowałam część tekstu manuskryptu, ryciny i tabele oraz brałam udział w wykonaniu korekt wydawniczych na każdym etapie procesu publikacji.*

\* - autor korespondencyjny

**Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) wg Journal Citation Reports:**

zgodnie z rokiem opublikowania – **26,289**

zgodnie z rokiem 2021 – **37,470**

**Suma punktów ww. publikacji:**

zgodnie z rokiem opublikowania – **450**

zgodnie z wykazem Ministra Nauki i Edukacji z 21 grudnia 2021 roku - **660**

**Liczba cytowań ww. publikacji wg Web of Science (bez autocytowań): 169**

### 4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

#### 4.3.1. Wprowadzenie

Lakaza należy do klasy oksydoreduktaz (EC 1.10.3.2) i jest przedstawicielem oksydaz wielomiedziowych, zawierającym w swoim centrum katalitycznym 4 atomy miedzi, które reprezentują trzy typy: Typ 1 (T1), Typ 2 (T2) Typ 3 (T3) [1]. Odpowiadają one za wiązanie substratu, transfer elektronów i czteroelektronową redukcję tlenu cząsteczkowego do wody, najczystsze ko-substratu reakcji [2, 3]. Lakazę wytwarzają rośliny [4], grzyby [5-7], bakterie [8] i niektóre owady [9], gdzie bierze udział w bardzo różnorodnych procesach związanych z lignifikacją i zdrowieniem ran roślin, grzybową depolimeryzacją ligniny, syntezą barwników grzybowych, sporulacją bakterii lub sklerotyzacją kutykuli owadów. I tak np. lakaza roślinna utlenia naturalne związki o strukturze fenolowej, zawierającej podstawniki metoksyłowe, czego przykładem mogą być monolignole stanowiące podjednostki G struktury ligniny a ostatecznym produktem tych reakcji jest polimer ligniny, który przyczynił się do ekspansji roślin wyższych na Ziemi [10].

Na szczególną uwagę zasługuje **lakaza grzybowa**, którą produkują przedstawiciele niemal wszystkich grup taksonomicznych grzybów, a więc gatunki należące zarówno do Basidiomycota, Ascomycota jak i Deuteromycota [5]. Naturalną funkcją lakaz grzybowych jest ich działanie w wieloenzymatycznym kompleksie rozkładającym polimer ligninocelulozy roślin wyższych. Inną ważną cechą lakaz otrzymanych z grzybów jest ich udział w wytwarzaniu pigmentów o właściwościach bioaktywnych, czego przykładem może być kwas cynabarynowy wytwarzany przez *Pycnoporus cinnabarinus* [11]. Jest ona zwykle produktem pozyskiwanym z sekretu grzybów należących do ekologicznej grupy gatunków białej zgnilizny drewna, co czyni ją łatwym do otrzymania z płynu pochodowlanego biokatalizatorem. Występuje w formie glikozylowanej, dlatego jest wyjątkowo odporna na działanie temperatury, pH i obecności innych białek i substancji wydzielanych do podłoża hodowlanego podczas wzrostu grzybów.

Lakaza grzybowa wykazuje niską specyficzność substratową i w związku z tym może utleniać szerokie spektrum substratów organicznych, od naturalnych fenoli po aminy aromatyczne i związki heterocykliczne. Reakcje przez nią katalizowane można podzielić na trzy różne typy w zależności od budowy przekształcanego związku. Pierwszym typem jest **bezpośrednie utlenianie** substratów, którymi mogą być np. związki fenolowe,



charakteryzujące się niskim potencjałem redoks [12]. Podczas utleniania fenoli podstawnik hydroksylowy ulega deprotonacji, w wyniku czego powstają bardzo reaktywne rodniki fenoksylowe, które przekształcają się do formy chinonu lub ulegają nieenzymatycznemu uwodornieniu i polimeryzacji [13]. Drugim typem reakcji jest **utlenianie substratów za pomocą mediatorów** reakcji, do których zalicza się małe cząsteczki organiczne, które pośredniczą w przekazywaniu elektronów z substratu na tlen. Ta reakcja jest bardzo ważna w utlenianiu cząsteczek o dużej masie, które nie mogą penetrować centrum aktywnego lakazy np. ligniny oraz związków organicznych, które charakteryzują się wysokim potencjałem utleniania [14]. Trzecim typem reakcji są **reakcje sprzęgania** rodników, które powstają w wyniku bezpośredniego utleniania substratu [15, 16]. Takie rodniki są bardzo reaktywne i mogą być sprzęgane ze sobą w reakcjach homomolekularnych lub z innymi związkami chemicznymi w reakcjach heteromolekularnych. Szczególnie reakcje heteromolekularne stwarzają możliwości utleniania substratów, które ze względu na wysoki potencjał redoks nie mogą być bezpośrednio utleniane przez lakazę. W wyniku ataku rodnika na ten sam lub inny substrat dochodzi do wytworzenia nowych wiązań typu węgiel-węgiel, węgiel-tlen, węgiel-azot lub nawet węgiel-siarka a proces sprzęgania może zachodzić nieenzymatycznie i często spontanicznie. Produktami tych reakcji są nowe struktury chemiczne o budowie dimeru, oligomeru a nawet polimeru, o zupełnie nowych właściwościach fizykochemicznych [12, 16]. Reakcje sprzęgania katalizowane przez lakazę, stanowią przyjazną środowisku naturalnemu alternatywę dla klasycznych procesów syntezy związków chemicznych, nie wymagają bowiem użycia szkodliwych, często toksycznych substancji utleniających oraz skrajnych wartości pH i temperatury, a ko-substratem reakcji jest powszechnie dostępny tlen cząsteczkowy. Przykłady zastosowania lakazy do reakcji syntezy nowych związków w oksydacyjnych procesach biotechnologicznych stały się obiektem badań wielu ośrodków naukowych. W wyniku tych procesów powstają nowe produkty o wysokim potencjale aplikacyjnym w przemyśle papierniczym, tekstylnym, kosmetycznym, spożywczym czy też farmaceutycznym [12, 16-18]. Przykładem związków, które mogą być otrzymane w reakcjach katalizowanych przez lakazę grzybową są związki o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Najczęściej są one produktami reakcji sprzęgania homo- lub heteromolekularnego znanych antybiotyków ale mogą być również otrzymywane jako zupełnie nowe substancje antybiotyczne w wyniku zaprojektowanej katalizy enzymatycznej [18]. Wśród wielu struktur opisywanych w

literaturze można znaleźć  $\beta$ -laktamy, czego przykładem jest dimer penicyliny X otrzymany w reakcji sprzęgania homomolekularnego [19], a także produkty sprzęgania heteromolekularnego dihydroksyarenów z penicylinami, cefalosporynami lub karbacefemami [20-23]. Charakteryzują się one dobrymi właściwościami antybakteryjnymi, porównywalnymi z właściwościami oryginalnych substratów. Dużą grupą związków otrzymywanych przy udziale lakaz grzybowych i bakteryjnych są fenoksazyny otrzymywane w wyniku sprzęgania ortoaminofenoli i ich pochodnych, zawierających grupy metylowe, karboksylowe lub sulfonowe, które na wzór naturalnie występujących związków fenoksazynowych takich jak kwas cynabarynowy, wykazują właściwości bioaktywne [24-26]. Wiele z otrzymanych związków o charakterze fenazyn i fenoksazyn charakteryzuje się intensywną barwą, jak chociażby wspomniany wcześniej kwas cynabarynowy, który nadaje owocnikom *Pycnoporus* intensywny pomarańczowy kolor. Właściwości te rozszerzają wachlarz zastosowań otrzymanych produktów, które mogą być potencjalnymi substancjami barwiącymi. Lakazy, tak jak większość enzymów, wykazują wiele cech, które czynią je niezwykle cennymi „zielonymi” biokatalizatorami stosowanymi do biotransformacji związków chemicznych, o właściwościach porównywalnych lub lepszych w porównaniu z katalizatorami stosowanymi w klasycznych procesach chemicznych. Są nimi przede wszystkim wysoka wydajność katalizowanych reakcji, biodegradowalność i łatwość ich usuwania ze środowiska reakcji, możliwość standaryzacji procesu, działanie w łagodnych warunkach temperatury, ciśnienia i wartości pH.

Bazując na dostępnych publikacjach oceniłam, że niewiele nowych molekuł, otrzymanych w wyniku utleniania substratów organicznych przy udziale lakazy jako biokatalizatora reakcji, charakteryzowało się jednocześnie możliwością ich zastosowania jako środków barwiących, substancji przeciwdrobnoustrojowych lub antyoksydantów. **Zasadne wydaje się więc poszukiwanie nowych związków organicznych o szerokim spektrum właściwości i zastosowań, które są produktami reakcji sprzęgania substratów aromatycznych z udziałem tak uniwersalnego i wszechstronnego biokatalizatora jakim jest lakaza grzybowa. Produktami takich reakcji mogą być całkowicie nowe związki organiczne, wykazujące bardzo dobre właściwości barwierskie a nawet bioaktywne, które nadają im dodatkowe cechy i poszerzają możliwości aplikacyjne wybarwionych włókien.**

#### 4.3.2. Cel badań

Celem badań stanowiących treść przedstawionego osiągnięcia było zastosowanie oczyszczonej lakazy grzybowej, otrzymanej z grzybów białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor* lub *Pleurotus ostreatus*, jako biokatalizatora reakcji transformacji związków organicznych w nowe produkty o unikatowych właściwościach i potencjale aplikacyjnym. Należy podkreślić, że według dostępnych danych literaturowych, substraty te nie były dotąd opisane jako potencjalne prekursory barwników lub/i związków bioaktywnych, co wyraźnie podkreśla nowatorski charakter podjętych badań. Biokataliza z udziałem lakazy była przeprowadzana w przyjaznych dla środowiska naturalnego warunkach, bez użycia dodatku toksycznych środków utleniających oraz w łagodnych warunkach pH, ciśnienia i temperatury.

**Prace badawcze, które doprowadziły do realizacji przedstawionego celu obejmowały:**

1. charakterystykę wybranych związków organicznych jako potencjalnych substratów reakcji biotransformacji dla lakazy grzybowej w nowe produkty reakcji o właściwościach aplikacyjnych,
2. biotransformację homomolekularną i heteromolekularną substratów w nowe związki chemiczne z udziałem lakazy grzybowej oraz określenie najważniejszych parametrów procesu biotransformacji,
3. ocenę toksyczności otrzymanych produktów biotransformacji enzymatycznej,
4. wykazanie właściwości bioaktywnych wybranych produktów syntezy, wśród których najważniejszymi były zdolność do hamowania wzrostu bakterii *Staphylococcus* sp. oraz/lub właściwości antyoksydacyjne,
5. ocenę możliwości zastosowania otrzymanych produktów do wybarwiania włókien oraz analizę trwałości tych wybarwień pod wpływem działania różnorodnych czynników fizykochemicznych,
6. zaproponowanie mechanizmu zaprojektowanej reakcji enzymatycznej i określenie struktury wybranych, oczyszczonych produktów reakcji.

### 4.3.3. Osiągnięte wyniki

#### **Ad.1. Charakterystyka biochemiczna związków organicznych jako potencjalnych substratów dla lakazy grzybowej**

Przystępując do poszukiwania nowych związków organicznych jako potencjalnych substratów dla lakazy grzybowej i prekursorów związków barwnych, w pierwszym etapie przeanalizowałam dostępne piśmiennictwo i opisy patentowe, opisujące możliwe struktury chemiczne, które są szczególnie łatwo utleniane przez lakazę. Zebrane informacje były podstawą pracy przeglądowej wchodzącej w skład niniejszego osiągnięcia **(P6)**. Wśród wielu struktur chemicznych utlenianych przez lakazę w produkty barwne, większość stanowiły pochodne fenolowe, które z racji obecności grupy hydroksylowej, są naturalnymi substratami dla lakazy. Znacznie mniej publikacji opisywało możliwość zastosowania lakazy do syntezy substancji barwnych, których prekursorami były substraty niefenolowe takie jak aminy aromatyczne oraz barwniki azowe. W niniejszej pracy opisałam molekularny mechanizm reakcji katalizowanej przez lakazę oraz scharakteryzowałam charakterystyczne dla lakazy trzy typy reakcji. Głównym typem reakcji utlenienia tych substratów pod wpływem działania lakazy grzybowej były reakcje oksydacyjnego sprzęgania w dimery, oligomery i polimery podczas ich transformacji heteromolekularnej, któremu towarzyszyło wytworzenie nowych wiązań chemicznych. W niniejszej publikacji dokonałam syntezy prac opisujących możliwość reakcji enzymatycznej „*in situ*”, które są mniej kosztowną opcją barwienia tkanin podczas biotransformacji prekursorów w barwniki. Ponadto przytoczyłam przykłady reakcji biotransformacji katalizowanych przez lakazę, których produkty były barwne jak chociażby fenoksazyny i fenazyny, które ze względu na obecność charakterystycznych struktur heterocyklicznych mogą również posiadać właściwości bioaktywne. W opisywanych przeze mnie reakcjach sprzęgania heteromolekularnego z fenolami drugim substratem była najczęściej amina aromatyczna, co skłoniło mnie do poszukiwania substratów dla lakazy i jednocześnie prekursorów substancji barwnych o możliwych właściwościach bioaktywnych, właśnie w tej grupie związków chemicznych.

Analiza dostępnej bibliografii i opisów patentowych dotyczących możliwości zastosowania lakazy do syntezy barwników została opublikowana w następującej pracy przeglądowej, wchodzącej w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego:

**P6. Polak J, Jarosz-Wilkołazka A\***. (2012) Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis *Process Biochemistry* 47 (9), 1295–1307

Opierając się w dużej mierze na danych opublikowanych w przytoczonej we wcześniejszym akapicie pracy przeglądowej skupiłam się na poszukiwaniu związków organicznych, które mogą być jednocześnie substratami dla lakazy grzybowej, są przekształcane w produkty barwne i mogą być prekursorami nowych związków bioaktywnych. Zaliczały się one do pochodnych amin aromatycznych i w większości były niefenolowymi pochodnymi benzenu i naftalenu, które według dostępnej mi wiedzy nie były dotąd opisane w literaturze jako potencjalne substraty dla lakazy grzybowej, co potwierdza innowacyjność prowadzonych badań (Tabela 1).

**Tabela 1.** Wykaz substratów i produktów ich biotransformacji katalizowanych przez lakazę grzybową, przedstawionych w niniejszych badaniach i opisanych w publikacji.

<b><i>Biotransformacje homomolekularne</i></b>			
<b>Substraty i ich akronimy</b>	<b>Akronimy produktów</b>	<b>Źródło lakazy</b>	<b>Publikacja</b>
Kwas 2-amino-3-metoksybenzoesowy (A, N15 substrat, AMeBA)	A3 N15 produkt	<i>Cerrena unicolor</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	<b>P3</b> <b>P4</b>
Kwas 8-anilino-1-naftalenosulfonowy (ANS)	ANS barwnik	<i>Cerrena unicolor</i>	<b>P2</b>
Kwas 3-amino-4-hydroksybenzeno-sulfonowy (AHBS)	POZ	<i>Cerrena unicolor</i>	<b>P5</b>
<b><i>Biotransformacje heteromolekularne z kwasem 2-amino-3-metoksybenzoesowym (A)</i></b>			
Kwas 5-amino-1-naftalenosulfonowy (B1)	AB1	<i>Cerrena unicolor</i>	<b>P1, P3</b>
Kwas 2-amino-1-naftalenosulfonowy (B2)	AB2	<i>Cerrena unicolor</i>	<b>P1, P3</b>
Kwas 4-amino-1-naftalenosulfonowy (B3)	AB3	<i>Cerrena unicolor</i>	<b>P1, P3</b>

W pierwszym etapie badań, w celu określenia możliwości ich utleniania przez lakazę grzybową, wybrane substraty analizowałam pod kątem określenia ich potencjału oksydoredukcyjnego, którego wartość wpływa na zdolność lakazy do ich utleniania. Im mniejsza jest różnica potencjału redoks pomiędzy atomem miedzi T1 enzymu a substratem,

tym łatwiej prekursor jest utleniany [16]. Lakazy grzybowe charakteryzują się wysokimi potencjałami oksydoredukcyjnymi atomu miedzi T1, o wartości pomiędzy 0,7 a 0,8 V (vs. NHE), natomiast potencjał utlenienia substratów wynika przede wszystkim ze struktury związku, charakteru dodatkowych grup funkcyjnych, a także stopnia zjonizowania cząsteczki [12, 27]. W dalszej kolejności analizowałam zużycie tlenu w reakcji substratu z lakazą oraz wartość stałej Michaelis-Menten, które to parametry potwierdzają powinowactwo substratu do lakazy grzybowej i możliwości jego utleniania na drodze biotransformacji enzymatycznej. Testowane związki zawierały w szczególności aminowe grupy funkcyjne, które biorą udział w procesie utleniania za pomocą lakazy. Oprócz podstawników aminowych substraty zawierały inne grupy funkcyjne, takie jak grupy karboksylowe, hydroksylowe, sulfonowe, metoksyłowe lub fenylowe, które wpływały na polarność cząsteczki.

**Substraty naftalenowe**, analizowane przeze mnie pod kątem oceny parametrów elektrochemicznych i kinetycznych to cztery różne związki aromatyczne zawierające podstawniki anilinowe lub aminowe, które potencjalnie mogą brać udział w procesie biotransformacji przy użyciu lakazy grzybowej (**P1**, **P2**). Wśród nich szczególną grupę związków stanowiły trzy izomery kwasu aminonaftalenosulfonowego, które charakteryzowały się obecnością jednej grupy aminowej oraz ugrupowania sulfonowego zwiększającego rozpuszczalność cząsteczki w roztworach wodnych. Testowanymi przeze mnie substratami były: kwas 5-amino-1-naftalenosulfonowy (akronim B1), kwas 2-amino-1-naftalenosulfonowy (akronim B2) oraz kwas 4-amino-1-naftalenosulfonowy (akronim B3). W pierwszej kolejności wspomniane związki analizowałam pod kątem określenia wartości potencjału oksydoredukcyjnego w buforze winianowym o pH 4,5 za pomocą voltamperometrii cyklicznej. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczyłam wartość potencjałów utlenienia dla tych związków, które miały wartość 0,879 V, 1,021 V oraz 0,913 V (vs NHE) odpowiednio dla izomeru B1, B2 i B3. Wysokie wartości potencjału miały znaczący wpływ na zdolność lakazy do ich utleniania, co potwierdziłam oznaczając zużycie tlenu podczas reakcji enzymatycznej. Odnotowałam, że im potencjał utlenienia był niższy tym zużycie tlenu było większe, co zaobserwowałam w przypadku substratu B1, dla którego zużycie tlenu wynosiło 134 nmol/min/ml. W przypadku substratu B2 zaobserwowałam jednocześnie najwyższą wartość potencjału utlenienia oraz najmniejsze zużycie tlenu

wynoszące 23 nmol/min/ml. Substrat B3 charakteryzował się zużyciem tlenu na poziomie 34 nmol/min/ml, co koreluje z pośrednią wartością potencjału utlenienia tego substratu. Obserwacje te potwierdziłam analizami, których celem było określenie wartości stałej Michaelis-Menten ( $K_M$ ). Dla kwasu 5-amino-1-naftalenosulfonowego (B1) uzyskałam wartość  $K_M$  wynoszącą 3,94 mM, dla kwasu 4-amino-1-naftalenosulfonowego (B3) wynosiła ona 5,38 mM, podczas gdy dla kwasu 2-amino-1-naftalenosulfonowego (B2) wartość ta była około cztery razy większa i wynosiła około 17 mM. Otrzymane przeze mnie wyniki wyraźnie wskazują na niskie powinowactwo substratu B2 do lakazy grzybowej, co objawiało się niskim zużyciem tlenu oraz wysokimi wartościami potencjału utlenienia i stałej Michaelis-Menten. W przypadku tych substratów, posiadających tylko jedną grupę aminową istotną w kontekście utleniania przez lakazę, ułożenie tego podstawnika wobec grupy sulfonowej zlokalizowanej w pozycji 1, miało istotne znaczenie dla przebiegu reakcji utleniania enzymatycznego. Zaobserwowałam, że substrat B1, posiadający podstawnik aminowy zlokalizowany w pozycji 5 wobec grupy sulfonowej, jest najłatwiej utleniany przez lakazę, podczas, gdy substrat B2, który posiada grupę aminową w pozycji 2 wobec grupy sulfonowej, był najtrudniej utleniany przez enzym (**P1**).

Kolejnym z substratów naftalenowych, który został scharakteryzowany pod kątem wcześniej wspomnianych parametrów był kwas 8-anilino-1-naftalenosulfonowy (ANS), będący aminą drugorzędową, z jednym atomem azotu jako jedynym, potencjalnie wrażliwym na atak lakazy (**P2**). Za pomocą woltamperometrii cyklicznej wykazałam, że ANS w buforze o pH 4,5 wykazuje wartość potencjału utlenienia 0,768 V (vs NHE). Otrzymana wartość potencjału wskazuje na możliwość bezpośredniego utleniania go przez oczyszczoną lakazę z *C. unicolor*, której wartość potencjału oksydoredukcyjnego wynosi powyżej 0,7 V (vs NHE) i z tego względu różnica potencjałów pomiędzy ANS a lakazą jest na tyle mała, że umożliwia jego biotransformację. Moje przypuszczenia co do zdolności lakazy z *C. unicolor* do utlenienia ANS potwierdziłam pomiarem zużycia tlenu, który został przeprowadzony za pomocą elektrody Clark'a. Wykazałam, że zużycie tlenu w czasie utleniania 1 mM roztworu ANS wyniosło aż 1583 nmol/min/ml, co bezpośrednio dowodzi udziału lakazy w tym procesie. Kolejnym etapem badań, które wykonałam na poparcie wcześniejszych obserwacji był pomiar wartości stałej Michaelis-Menten, przeprowadzony w buforze o pH 4, optymalnym dla utleniania ANS w barwny produkt reakcji. Odnotowałam wartość stałej  $K_M$  wynoszącą 0,435 mM, która wskazuje na wysokie powinowactwo lakazy

grzybowej do kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego i jest zbliżona do wartości  $K_M$  substratów, które są powszechnie stosowane do oceny aktywności lakaz grzybowych (np. syryngaldazyny i ABTS).

Substratem benzenowym, który analizowałam pod kątem oceny zdolności lakazy grzybowej do jego biotransformacji był kwas 2-amino-3-metoksybenzoowy (akronimy: A, 2A3MeBA, N15), stosowany jako partner w reakcji sprzęgania heteromolekularnego (**P1**) i w reakcji utleniania homomolekularnego (**P3, P4**). Charakteryzuje się on obecnością grupy aminowej oraz ugrupowaniem metoksyowym, które równie silnie co podstawnik aminowy aktywuje pierścień benzenowy w reakcjach substytucji. Substrat ten posiada również grupę karboksylową zwiększającą polarność cząsteczki i dezaktywującą pierścień aromatyczny. Pierwszym parametrem, który analizowałam za pomocą woltamperometrii cyklicznej był potencjał oksydoredukcyjny. Na podstawie przeprowadzonych analiz wyznaczyłam potencjał utlenienia kwasu 2-amino-3-metoksybenzoowego, który wyniósł 0,805 V (vs NHE). Następnie substrat został poddany działaniu lakazy otrzymanej ze szczepu *C. unicolor* w pH 4,5, który stosowałam jako standardowy bufor do badań przesiewowych. Podczas analiz kinetycznych odnotowałam zużycie tlenu na poziomie 352 nmol/min/ml oraz wartość stałej Michaelis-Menten wynoszącą 1,58 mM. Otrzymane przeze mnie dane wskazują jednoznacznie, że kwas 2-amino-3-metoksybenzoowy może być utleniany bezpośrednio przez lakazę grzybową.

**Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że charakterystyka elektrochemiczna związków organicznych stwarza możliwości weryfikacji zdolności bezpośredniego utleniania potencjalnych substratów przez opisywaną lakazę grzybową. Jednocześnie analizy te potwierdziły, że niski potencjał oksydoredukcyjny testowanych substratów warunkuje ich bezpośrednie utlenianie do intensywnie zabarwionych produktów. Im wartość potencjału utlenienia jest wyższa, tym mniejsze powinowactwo enzymu do substratu, co skutkuje wyższą wartością stałej Michaelis-Menten i niższym zużyciem tlenu podczas reakcji biotransformacji katalizowanej przez lakazę grzybową.**

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń zostały opublikowane w następujących pracach oryginalnych:



**P1. Polak J\***, Wlizło K, Pogni R, Petricci E, Grąz M, Szałapata K, Osińska-Jaroszuk M, Kapral-Piotrowska J, Pawlikowska-Pawłęga B, Jarosz-Wilkołazka A. (2020) Structure and bioactive properties of novel textile dyes synthesised by fungal laccase, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2052

**P2. Polak J\***, Grąz M, Wlizło K, Szałapata K, Kapral-Piotrowska J, Paduch R, Jarosz-Wilkołazka A. (2022) Bioactive properties of a novel antibacterial dye obtained from laccase-mediated oxidation of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, *Molecules* 27 (2), 487

**Ad.2. Analiza spektroskopowa produktów transformacji homomolekularnej i heteromolekularnej substratów w nowe produkty przy udziale lakazy grzybowej jako biokatalizatora reakcji oraz optymalizacja parametrów procesu ich syntezy**

Lakaza grzybowa otrzymana z hodowli wgłębnych szczepów grzybów ligninolitycznych *C. unicolor* lub *P. ostreatus* została oczyszczona za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu HQ-sefaroza i następnie zastosowana do reakcji **transformacji homomolekularnej** wybranych substratów lub **transformacji heteromolekularnej** mieszaniny dwóch różnych związków organicznych. Produkty enzymatycznej transformacji substratów charakteryzowały się intensywną barwą, która wyraźnie odróżniała się od barwy substratów biorących udział w transformacji.

W pierwszym etapie wybrane produkty utleniania zostały przeanalizowane za pomocą spektroskopii UV-Vis w celu określenia długości fali charakterystycznej dla głównego produktu reakcji w maksimum jego absorpcji. Wykazałam, że substraty takie jak: kwas 2-amino-3-metoksybenzoesowy (akronimy: A, 2A3MeBA, lub N15) oraz kwas 8-anilino-1-naftalenosulfonowy (ANS), po 24-godzinnej inkubacji z lakazą zostały bezpośrednio utlenione do intensywnie zabarwionych produktów w **reakcjach homomolekularnych**. Bezbarwny kwas 2-amino-3-metoksybenzoesowy był utleniany przy udziale lakazy otrzymanej ze szczepu *C. unicolor* (**P3**) i *P. ostreatus* (**P4**) a produkty jego utleniania homomolekularnego (odpowiednio A3 i N15) w obu przypadkach charakteryzowały się intensywną pomarańczową barwą. Na podstawie przeprowadzonych badań widm UV-Vis produktów otrzymanych po 24-godzinnej biotransformacji wyznaczyłam długość fali w maksimum absorpcji, która mieściła się w zakresie wartości pomiędzy 440 nm a 450 nm, niezależnie od szczepu grzybowego jako źródła lakazy stosowanej do biotransformacji. Należy zaznaczyć, że długość ta nieznacznie różniła się od

długości fali stosowanej do badań kinetycznych w procesie wyznaczenia wartości  $K_M$  z zastosowaniem lakazy z *C. unicolor*, która wynosiła 490 nm i była charakterystyczna dla produktu otrzymanego w pierwszej minucie utleniania tego związku (**P1**). W przypadku kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego (ANS), który był transformowany w zielony produkt reakcji otrzymałam wyraźny pik charakteryzujący główny produkt, którego maksimum absorpcji odnotowałam przy długości fali 440 nm. Ponadto zaobserwowałam, że substrat ten wykazuje charakterystyczne pasmo fluorescencji przy długości fali około 530 nm (ekscytacja 375 nm), podczas gdy produkt jego enzymatycznego utlenienia nie wykazuje takich właściwości, co jednoznacznie wskazuje, że zachodzi całkowita transformacja substratu ANS w nowy związek chemiczny (**P2**).

W badaniach obejmujących **transformację heteromolekularną**, mieszanina reakcyjna zawierała kwas 2-amino-3-metoksybenzoesowy (akronim: A) oraz jeden z trzech izomerów kwasu aminonaftalenosulfonowego (substraty B1, B2 lub B3). Wspomniane substraty różniły się od siebie wartością potencjału utlenienia, która wpływała na powinowactwo tych substratów do lakazy z *C. unicolor*. Wykazałam, że produkty utleniania mieszaniny heteromolekularnej substratów, tj. AB1, AB2 i AB3 w stosunku molowym 1:1, charakteryzują się intensywnie czerwoną barwą, odmienną niż delikatnie zabarwione czerwone produkty reakcji utleniania pojedynczych izomerów B oraz pomarańczowy produkt otrzymany w wyniku utleniania substratu A. Dla produktów AB1, AB2 i AB3 otrzymanych w wyniku transformacji heteromolekularnych mieszanin substratów jak i dla produktów uzyskanych w transformacjach homomolekularnych pojedynczych substratów B2 i B3, wykazałam zbliżoną wartość długości fali w maksimum absorpcji, w zakresie od 490 nm do 505 nm, charakterystyczną dla czerwonej barwy widzialnej. W przypadku produktu transformacji homomolekularnej substratu B1 odnotowałam nieznacznie mniejszą długość fali charakteryzującą główny produkt reakcji mieszczącą się w zakresie 460-470 nm, odpowiadającą barwie brązowo-czerwonej (**P1**).

**Przeprowadzone badania dowodzą pośrednio, że w wyniku działania lakazy na mieszaninę heteromolekularną wybranych związków organicznych, tworzą się nowe związki chemiczne o odmiennych właściwościach spektroskopowych, co zostanie dokładniej omówione w kolejnych punktach niniejszego autoreferatu (Ad. 6, P1).**

W następnym etapie badań określiłam **optymalne parametry procesu syntezy wybranych produktów** z zastosowaniem lakazy grzybowej jako biokatalizatora reakcji. Optymalizację parametrów takich jak: wartość pH, stężenie substratu/-ów, aktywność lakazy prowadziłam dla procesów biotransformacji homomolekularnej kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego (ANS) z zastosowaniem lakazy z *C. unicolor* i kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego (N15) z zastosowaniem lakazy z *P. ostreatus*. Mieszanki kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego (substrat A) i izomerów kwasu aminonaftalenosulfonowego (substraty B1, B2 i B3) były utleniane z zastosowaniem lakazy z *C. unicolor*. Dodatkowo dla biotransformacji wybranych substratów przeprowadziłam badania określające wpływ stężenia metanolu (ANS) oraz stężenia i rodzaju buforu reakcyjnego i temperatury reakcji (P15) na absorbancję produktów reakcji.

W pierwszym etapie badań przeanalizowałam wpływ **wartości pH** buforu reakcyjnego na ilość uzyskanego produktu, a podstawowym kryterium wyboru był poziom absorbancji głównego produktu, świadczący o wydajności procesu biotransformacji. W przypadku transformacji ANS układ buforowany o wartości pH 4 był optymalny do uzyskania największej absorbancji głównego produktu, pomimo, iż wartości absorbancji uzyskane w innych wartościach pH nie odbiegały znacząco od absorbancji produktu odnotowanej w optimum pH. W przypadku transformacji kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego w mieszaninie homomolekularnej odnotowano wyższą wartość optimum pH, wynoszącą 5,5, niezależnie od rodzaju zastosowanego buforu. Dla produktów reakcji heteromolekularnych AB1 oraz AB3 odnotowałam najwyższą absorbancję produktu podczas biokatalizy w buforze o pH 4,5, natomiast dla produktu AB2 optymalne pH jego syntezy wynosiło 4. W przypadku wszystkich wspomnianych wariantów mieszanin kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego (substrat A) z pochodnymi aminonaftalenosulfonowymi (substraty B1, B2 lub B3), krzywa dzwonowa optimum pH była wyraźnie zaznaczona w przedziale wartości od 4 do 4,5, natomiast w buforze o pH 5,5, który był optymalny do transformacji substratu A (N15), nie tworzył się w przypadku tych produktów charakterystyczny intensywnie czerwony produkt reakcji biotransformacji heteromolekularnej, a produkt o barwie brązowej.

**Dla większości analizowanych procesów biotransformacji krzywa optymalizacyjna miała charakterystyczny dla lakaz grzybowych kształt krzywej dzwonowej z maksimum**

**absorbancji produktów uzyskanych w zakresie wartości pH od 4 do 5,5 w zależności od zastosowanego substratu lub mieszanin substratów.**

W kolejnych etapach badań analizowałam **wpływ aktywności lakazy i stężenia substratu** na wydajność procesu biokatalizy i również w tym przypadku podstawowym kryterium wyboru była absorbancja głównych produktów reakcji.

Dla mieszaniny heteromolekularnej substratu A (kwas 2-amino-3-metoksybenzoesowy) oraz izomeru B2 (kwasu 2-amino-1-naftalenosulfonowego) w pierwszym etapie analizowałam wpływ stosunku molowego substratów A do B. Badania wykazały, że po zastosowaniu mieszaniny substratów A i B w stosunku molowym 1:1 uzyskano najwyższy przyrost absorbancji produktu reakcji na minutę ( $\Delta A_{495}$  nm/min), dlatego taki układ stosowałam w dalszych badaniach optymalizacyjnych. Następnie skupiłam się na optymalizacji stężeń substratów A i B2 użytych do syntezy barwnika AB2. **Wyróżniał się on od produktów AB1 oraz AB3 unikatowymi właściwościami antymikrobiologicznymi, które według mojej najlepszej wiedzy, nie zostały dotąd opisane dla tego produktu, co podkreśla innowacyjność tych badań.** Optymalizację procesu biotransformacji wykonałam dla trzech różnych stężeń substratów mieszaniny reakcyjnej o stężeniu końcowym 1, 5 i 10 gram na litr i z zastosowaniem szeregu aktywności lakazy wyrażonej w jednostkach U na 1 gram mieszaniny substratów (zakres 12,5 U - 500 U na gram mieszaniny substratów). Po 48-godzinnej biotransformacji odnotowałam, że główny produkt reakcji AB2 wytrącał się w postaci osadu rozpuszczalnego w metanolu, który następnie analizowałam za pomocą techniki HPLC. Odkryłam, że frakcja rozpuszczalna w wodzie zawierała również nieznaczną ilość głównego produktu AB2, ale jego ilość była niezależna od aktywności lakazy zastosowanej do biotransformacji. Na podstawie przeprowadzonych badań odnotowałam, że użycie lakazy o aktywności w zakresie 100-200 U na gram mieszaniny substratów warunkuje efektywną biotransformację wszystkich zastosowanych przeze mnie stężeń substratów po 48 godzinach utleniania. Następnie przeprowadziłam badania szczegółowe transformacji substratów A i B2 w czasie (120 godzin) o stężeniu końcowym mieszaniny 5/g za pomocą lakazy o aktywności końcowej 200 U/g. Odnotowałam, że po 120 godzinnej transformacji około 60% substratu B2 było obecne w mieszaninie reakcyjnej, podczas gdy całość substratu A została w tym czasie utleniona przez lakazę grzybową (**P1**). Obserwacje te pośrednio potwierdzają udział substratów w tworzeniu struktury głównego produktu reakcji (Ad. 6).

**Realizując zaplanowaną hipotezę badawczą dowiedziono, że lakaza grzybowa może efektywnie katalizować transformację mieszanin substratów niefenolowych o stężeniu końcowym nawet 10 g/l, a substraty naftalenowe, które wykazują małe powinowactwo do lakazy grzybowej (substrat B2 o  $K_M = 17$  mM), również biorą udział w tworzeniu głównych produktów reakcji, co zostanie przedyskutowane w dalszej części niniejszego autoreferatu (Ad.6, P1).**

Optymalizacji procesu biotransformacji homomolekularnej kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego (ANS) dokonałam pod kątem doboru optymalnego stężenia substratu w zakresie stężeń od 1 g/l do 10 g/l, aktywności lakazy w zakresie od 2,5 U do 200 U na gram ANS oraz stężenia metanolu (5%, 10% i 35%, v/v), jako ko-rozpuszczalnika (**P2**). Podstawowym kryterium wyboru optymalnych parametrów była absorbancja głównego produktu reakcji przy długości fali 440 nm. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność ANS w wodzie, w pierwszym etapie badań przeprowadziłam biotransformację ANS o stężeniu 1 g/l w układzie zawierającym metanol, którego dodatek usprawnił prace badawcze i umożliwił zastosowanie większego stężenia ANS. Przeprowadzone badania dowiodły, że w obecności metanolu o stężeniu 5% efektywność biotransformacji ANS o stężeniu 1 g/l wyniosła 100% po 24 godzinnej inkubacji z lakazą o aktywności końcowej 12,5 U na gram substratu, z jednoczesnym uzyskaniem wysokiej absorbancji produktu (70% maksymalnej absorbancji produktu uzyskanego dla aktywności 200 U/g). Zastosowanie metanolu o stężeniu końcowym 35% skutkowało jednocześnie zmniejszoną efektywnością transformacji ANS, która przejawiała się obecnością ANS w mieszaninie reakcyjnej nawet po użyciu najwyższej badanej aktywności lakazy tj. 200 U/g (około 20%). Transformacja wyższych stężeń substratu odbywała się w obecności 5% metanolu, a ilość otrzymanego produktu zależała od końcowej aktywności lakazy. Dla stężenia ANS wynoszącego 5 g/l była to aktywność 25 U/g, podczas gdy dla stężenia substratu 10 g/l zastosowanie aktywności końcowej lakazy 50 U na gram ANS umożliwiło efektywną syntezę produktu w czasie 24-godzin reakcji.

W przypadku biotransformacji homomolekularnej kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego (substrat N15) optymalizację procesu przeprowadzono za pomocą lakazy otrzymanej ze szczepu *P. ostreatus* (**P4**). W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że jego roztwór o stężeniu 10 mM był wydajnie utleniany przez lakazę o aktywności 3 U na milimol substratu. Ponadto wykazano, że zastosowanie buforu sodowo-

winianowego o stężeniu minimum 40 mM jest konieczne do 100% transformacji tego substratu z jednoczesnym uzyskaniem wysokiej absorpcji produktu reakcji. Szczegółowa analiza mieszaniny transformacyjnej przeprowadzona za pomocą micellarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej (MEKC) dowiodła, że po 6-godzinnej transformacji substratu N15, w mieszaninie reakcyjnej obecne są cztery barwne produkty reprezentujące na chromatogramie cztery piki A, B, C i D, wśród których dominuje produkt A. Wydłużenie reakcji do 72 godzin skutkowało ilościową zmianą składu mieszaniny. Po tym czasie zaobserwowano dominację produktu C, który przyjęto za główny produkt reakcji otrzymany w wyniku przekształceń enzymatycznych i nieenzymatycznych innych produktów reakcji (A, B i D). Na podstawie uzyskanych wyników zaprojektowano doświadczenie mające na celu ocenę wpływu temperatury inkubacji mieszaniny transformacyjnej na ilość poszczególnych produktów A-D w mieszaninie. W tym celu po 6 godzinach reakcji prowadzonej w temperaturze 23°C lub 28 °C, kiedy to całość kwasu 2-amino-3-metoksybenzoowego została przetransformowana przez lakazę grzybową z *P. ostreatus*, temperaturę podniesiono do 40 °C. Zaobserwowano, że podniesienie temperatury reakcji przyspieszyło tempo przekształcenia produktu A do produktu C niemal dwukrotnie. Dodatkowo przeprowadzono badanie kontrolne polegające na inkubacji mieszaniny transformacyjnej bez lakazy, którą usunięto poprzez ultrafiltrację, w temperaturze 40 °C po 6 godzinach biotransformacji substratu (100%). W tym wariacie również zaobserwowano dalszy przyrost ilości produktu C, który był głównym produktem reakcji, pomimo braku biokatalizatora w mieszaninie reakcyjnej.

**Uzyskane wyniki wskazują, że nawet nieznaczne podwyższenie temperatury (do 40 °C) na dalszym etapie biotransformacji sprzyja przekształceniom nieenzymatycznym rodników substratu otrzymanych w wyniku reakcji enzymatycznej i ich sprzęganiu w główny produkt reakcji.**

Charakterystyka spektroskopowa otrzymanych produktów oraz badania dotyczące optymalizacji procesu transformacji wybranych substratów zostały przedstawione w następujących pracach oryginalnych:

**P1. Polak J\***, Wliżło K, Pogni R, Petricci E, Grąż M, Szałapata K, Osińska-Jaroszuk M, Kapral-Piotrowska J, Pawlikowska-Pawłęga B, Jarosz-Wilkołazka A. (2020) Structure and bioactive properties of novel textile dyes synthesised by fungal laccase, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2052

**P2. Polak J\***, Grąż M, Wlizło K, Szałapata K, Kapral-Piotrowska J, Paduch R, Jarosz-Wilkołazka A. (2022) Bioactive properties of a novel antibacterial dye obtained from laccase-mediated oxidation of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, *Molecules* 27 (2), 487

**P3. Polak J**, Jarosz-Wilkołazka A\*, Szuster-Ciesielska A, Wlizło K, Kopycińska M, Sójka-Ledakowicz J, Lichawska-Olczyk J. (2016) Toxicity and dyeing properties of dyes obtained through laccase-mediated synthesis. *Journal of Cleaner Production* 112, 4265-4272

**P4.** Wlizło K, **Polak J\***, Jarosz-Wilkołazka A, Pogni R, Petricci E. (2020) Novel textile dye obtained through transformation of 2-amino-3-methoxybenzoic acid by free and immobilised laccase from a *Pleurotus ostreatus* strain, *Enzyme and Microbial Technology* 132, 109398

### **Ad. 3. Toksyczność wybranych produktów otrzymanych w wyniku biotransformacji enzymatycznej z zastosowaniem lakazy grzybowej**

Zastosowanie enzymów jako wydajnych biokatalizatorów reakcji syntez nowych związków chemicznych ma za zadanie maksymalne ograniczenie toksycznego efektu tych procesów na środowisko naturalne i tym samym organizm człowieka. Zastosowanie lakazy jako utleniacza działającego w łagodnych warunkach pH, ciśnienia i temperatury powodują, że proces nie jest uciążliwy dla środowiska, pomimo że substraty stosowane do przekształceń mogą być pochodnymi toksycznych związków organicznych. Niestety zdarza się, że w wyniku przekształceń enzymatycznych dochodzi do aktywacji metabolicznej substratów, co może przyczynić się do wzrostu ich toksyczności. Dlatego zasadne jest monitorowanie toksyczności zarówno substratów stosowanych do syntez jak i powstających w ich wyniku produktów reakcji enzymatycznych. Z tego względu, w ramach przeprowadzonych badań wybrane, nieoczyszczone produkty reakcji poddałam **ocenie** zarówno **toksyczności środowiskowej** (wobec bakterii *Vibrio fischeri*) jak i **cytotoksyczności** (wobec prawidłowych ludzkich linii komórkowych).

**Toksyczność środowiskową** oceniono za pomocą bakterii morskich *Vibrio fischeri* na aparacie Microtox, który jest wystandaryzowanym narzędziem do oceny poziomu ich bioluminescencji w próbkach zawierających dodatek substancji potencjalnie zakłócających ich żywotność. Na podstawie przeprowadzonych testów produktów reakcji heteromolekularnej AB1, AB2 i AB3 można stwierdzić, iż charakteryzują się one dość wysokim stężeniem hamującym żywotność bakterii *V. fischeri* na poziomie 50% (wskaźnik

IC<sub>50</sub> / EC<sub>50</sub>), wynoszącym odpowiednio 1,2 mg/ml, 0,9 mg/ml i 0,42 mg/ml, co wskazuje na niską toksyczność środowiskową tych preparatów **(P3)**. W przypadku barwnika A3 otrzymanego w wyniku transformacji homomolekularnej kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego nie było możliwe określenie parametru IC<sub>50</sub> ze względu na interferencję luminescencji bakterii z absorbancją badanej próbki **(P3)**. W przypadku produktu otrzymanego w wyniku transformacji substratu ANS, wartości parametru EC<sub>50</sub> wyniosła 0,067 mg/ml, co świadczyć może o jego wysokiej toksyczności **(P2)**.

**Zastosowanie testów do oceny toksyczności środowiskowej związków organicznych o możliwościach aplikacyjnych, które mogą stanowić zagrożenie dla organizmów wodnych, poszerza wiedzę na temat potencjalnych zagrożeń ich stosowania. Według mojej wiedzy, w pracach dotyczących biotransformacji z zastosowaniem lakazy jako biokatalizatora reakcji, ten aspekt toksyczności nie jest powszechnie badany.**

**Cytotoksyczność** produktów reakcji heteromolekularnej oceniono z zastosowaniem komórek nabłonka okrężnicy (linia CCD-841CoTr). Najmniejsze wartości parametru IC<sub>50</sub>, wskazujące stężenie hamujące żywotność 50% komórek, otrzymałam dla produktu reakcji heteromolekularnej AB2. Kształtowały się one na poziomie 0,367 mg/ml i 0,394 mg/ml dla testu odpowiednio MTT i LDH, co świadczyć może o średniej cytotoksyczności tego produktu. W przypadku produktu AB1 otrzymałam wyraźnie wyższe wartości parametru IC<sub>50</sub> dla testu MTT i LDH wynoszące odpowiednio 1,598 mg/ml i 2,129 mg/ml, co potwierdza niską toksyczność tego produktu. Dla produktu AB3 uzyskałam wartości pośrednie IC<sub>50</sub>, które wynosiły 0,75 mg/ml niezależnie od rodzaju przeprowadzonego testu **(P3)**.

W przypadku produktu otrzymanego w wyniku transformacji homomolekularnej kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego z zastosowaniem lakazy z *C. unicolor* (produkt A3) zanotowałam wartości IC<sub>50</sub> wynoszące 0,620 mg/ml i 0,38 mg/ml dla testów odpowiednio MTT i LDH wykonanych z użyciem linii komórek nabłonka okrężnicy (linia CCD-841CoTr) **(P3)**. Cytotoksyczność produktu otrzymanego w wyniku transformacji homomolekularnej substratu ANS oceniono z zastosowaniem komórek nabłonka okrężnicy (linia CCD-841CoTr) i dodatkowo komórek fibroblastów okrężnicy (linia CCD-18Co) **(P2)**. Badania wykazały, że linia komórkowa fibroblastów była bardziej wrażliwa na obecność tego produktu reakcji. W testach LDH i MTT parametr IC<sub>50</sub> wyniósł odpowiednio 0,321 mg/ml i 0,363 mg/ml. Komórki normalne nabłonka okrężnicy były nieco bardziej odporne na obecność tego produktu. Dla



nich wartości  $IC_{50}$  kształtowały się na poziomie 0,436 mg/ml i 0,473 mg/ml dla odpowiednio testów LDH i MTT (**P2**).

**Wyniki cytotoksyczności otrzymanych produktów wyraźnie wskazują, że w większości przypadków są one mało lub średnio toksyczne dla prawidłowych ludzkich komórek nabłonka jelit, co potwierdza bezpieczeństwo potencjalnego stosowania tych preparatów. Badania cytotoksyczności produktów nie we wszystkich przypadkach korelowały z toksycznością środowiskową otrzymanych preparatów, co potwierdza zasadność przeprowadzania wieloparametrowych analiz toksyczności.**

Dodatkowo produkt otrzymany w wyniku transformacji substratu ANS, który charakteryzował się wysoką toksycznością środowiskową, oceniono pod kątem **działania drażniącego i alergizującego**. Badanie przeprowadzono na grupie 50 ochotników o skórze wrażliwej i atopowej, wykonanego we współpracy z Instytutem Badań Kosmetyków Dr Koziej (Warszawa). Ochotnicy, którzy brali udział w tym badaniu byli różnej płci (34 kobiety i 16 mężczyzn) i w różnym wieku (od 19 do 70 lat), a produkt testowany na skórę w stężeniu 1% był w kontakcie z nią przez 48 godzin. Żaden z ochotników nie odnotował uwrażliwienia się skóry na obecność tego produktu reakcji, który był zaaplikowany na skórę przez 48 godzin, co wskazuje na brak efektu drażniącego i alergizującego testowanego preparatu, otrzymanego w wyniku utleniania kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego (ANS) przez lakazę grzybową (**P2**).

**Produkt otrzymany w wyniku transformacji kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego przy udziale lakazy grzybowej wydaje się być bezpieczny dla stosowania zewnętrznego jako barwnik tekstylny, gdyż nie wykazuje działania alergizującego i drażniącego skórę atopową.**

Ocena cytotoksyczności i toksyczności środowiskowej otrzymanych produktów zostały przedstawione w następujących pracach oryginalnych:

**P2. Polak J\***, Grąż M, Wlizio K, Szałapata K, Kapral-Piotrowska J, Paduch R, Jarosz-Wilkołazka A. (2022) Bioactive properties of a novel antibacterial dye obtained from laccase-mediated oxidation of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, *Molecules* 27 (2), 487

**P3. Polak J**, Jarosz-Wilkołazka A\*, Szuster-Ciesielska A, Wlizio K, Kopycińska M, Sójka-Ledakowicz J, Lichawska-Olczyk J. (2016) Toxicity and dyeing properties of dyes obtained through laccase-mediated synthesis. *Journal of Cleaner Production* 112, 4265-4272

#### **Ad.4. Właściwości bioaktywne barwnych produktów reakcji biotransformacji**

Produkty opisane we wcześniejszym akapicie, otrzymane w wyniku transformacji homomolekularnej i heteromolekularnej substratów lub ich mieszanin zostały przebadane również **pod kątem oceny hamowania wzrostu bakterii**. W świetle prac dotyczących biotechnologicznego zastosowania lakazy, właściwości antymikrobiologiczne produktów otrzymanych w wyniku syntezy *de novo* nie są powszechnie badane i dotyczą głównie preparatów naturalnych lub uzyskanych w wyniku enzymatycznej modyfikacji znanych antybiotyków [20-23]. Modelowymi mikroorganizmami użytymi w przeprowadzonych badaniach były bakterie *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) i *Escherichia coli* (ATCC25922) reprezentujące odpowiednio gram dodatnie i gram ujemne mikroorganizmy. Badanymi związkami były barwne produkty reakcji biotransformacji homomolekularnej kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego oraz produkty biotransformacji heteromolekularnej kwasu 2-amino-3-metoksybenzoowego w obecności izomerów kwasu aminonaftalenosulfonowego. Dodatkowym produktem analizowanym pod kątem oceny potencjału antymikrobiologicznego był produkt o strukturze fenoksazynej (POZ), otrzymany w wyniku transformacji homomolekularnej kwasu 3-amino-4-hydroksybenzenosulfonowego (AHBS), dla którego część badań (badania optymalizacyjne) została wykonana przed uzyskaniem przeze mnie stopnia naukowego doktora i z tego względu ich wyniki nie były poddane opisowi szczegółowemu w niniejszym autoreferacie **(P5)**. Pierwszym etapem badań było wykonanie testów jakościowych na szalkach Petriego z podłożem zestalonym agarem, na których zostały posiane mikroorganizmy. W tak przygotowanych płytkach za pomocą korkoboru wycięto otwór o średnicy około 1 cm, do którego wiano 100 µl testowanego produktu o stężeniu 10 mg/ml. Po upływie doby odnotowałam obecność lub brak strefy zahamowania wzrostu bakterii. Na podstawie uzyskanych wyników **wykazałam unikatowe właściwości antymikrobiologiczne wobec szczepu *S. aureus* produktu ANS otrzymanego w wyniku transformacji kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego oraz produktu AB2 uzyskanego po utlenieniu mieszaniny kwasu 2-amino-3-metoksybenzoowego i kwasu 2-amino-1-naftalenosulfonowego (P1, P2)**. Następnie wykonałam badania szczegółowe w celu wyznaczenia parametrów MIC i MBC określających odpowiednio najniższe stężenie hamujące wzrost bakterii i najniższe stężenie bójcze. Dla produktu AB2 uzyskałam wartość parametru MIC 0,3 mg/ml i jednocześnie nie

uzyskałam wartości MBC dla testowanych stężeń (zakres od 0,01 do 4 mg/ml). Badania przeprowadzone za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) potwierdziły efekt ograniczający wzrost bakterii na włóknach wełnianych wybarwionych produktem AB2 w stężeniu 10% omf (m/m; masa barwnika na masę włókien). Na zdjęciach mikroskopowych można wyraźnie zauważyć niskie miano komórek bakterii obserwowanych na włóknach barwionych w porównaniu do próbek kontrolnych włókien niebarwionych, które były inkubowane w obecności *S. aureus* (P1). W przypadku barwnika ANS badania w kierunku oceny właściwości antymikrobiologicznych rozszerzono o szczep *Staphylococcus epidermidis* (ATCC14990). Badania wykazały, że zarówno substrat jak i produkt charakteryzowały się potencjałem antymikrobiologicznym. Produkt biotransformacji kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego charakteryzował się wartością MIC 0,4 mg/ml i wartością MBC 1 mg/ml wobec szczepu *S. aureus*, podczas gdy dla szczepu *S. epidermidis* wartość MIC produktu była prawie 16-krotnie mniejsza i wynosiła 0,025 mg/ml przy jednoczesnej 10-krotnie niższej wartości parametru MBC wynoszącego 0,1 mg/ml (P2).

**Spośród przeprowadzonych przeze mnie w badaniach przesiewowych wielu testów na potencjał antymikrobiologiczny produktów otrzymanych w wyniku biotransformacji lakazowej, dla zaledwie kilku odnotowałam ograniczenie wzrostu bakterii. Do nich zaliczają się opisane w niniejszym autoreferacie produkty AB2 i ANS. Należy tutaj podkreślić, że wartości MIC i MBC otrzymane dla nieoczyszczonego produktu biotransformacji kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego jednoznacznie wskazują na jego wysoki potencjał antymikrobiologiczny, co jest bardzo pożądane w kontekście jego przyszłych zastosowań, gdyż nie wymaga czasochłonnego i kosztochłonnego procesu oczyszczania.**

Omówione we wcześniejszym akapicie produkty reakcji zostały poddane również testom w kierunku oceny ich **właściwości antyoksydacyjnych**. Do oceny tych właściwości zastosowano różne metody analityczne, wśród których podstawową była metoda chemiluminescencyjna z luminolem, który nie jest substratem dla lakazy grzybowej i nie wykazuje absorpcji w zakresie światła widzialnego (nie jest barwny). Dla wszystkich testowanych produktów otrzymanych w wyniku biotransformacji za pomocą lakazy jako biokatalizatora reakcji wykazano właściwości antyoksydacyjne metodą

chemiluminescencyjną. Największy potencjał antyoksydacyjny wykazałam dla produktu otrzymanego w wyniku utlenienia substratu ANS, dla którego otrzymano wartość parametru EC<sub>50</sub> na poziomie 42 µg/ml (efektywne stężenie zmiatające 50% rodników) (**P2**). Dla produktu POZ otrzymanego w wyniku biotransformacji kwasu 3-amino-4-hydroksy-benzenosulfonowego wskaźnik EC<sub>50</sub> wynosił 189 µg/ml (**P5**). Produkty otrzymane w wyniku transformacji heteromolekularnej kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego z izomerami kwasu aminonaftalenosulfonowego charakteryzowały się zbliżonymi wartościami EC<sub>50</sub> wynoszącymi 470, 440 i 630 µg/ml dla odpowiednio produktów AB1, AB2 i AB3 (**P1**). Wyniki dotyczące właściwości antyoksydacyjnych uzyskane dla barwnika POZ zostały potwierdzone metodą z rodnikiem ABTS, dla której otrzymano wyższe wartości EC<sub>50</sub> wynoszące 1428 µg/ml (**P5**). W przypadku barwnika ANS wartość parametru EC<sub>50</sub> wynosiła 0,115 µg/ml co wskazuje na jego ogromny potencjał antyoksydacyjny. Metoda z rodnikiem DPPH została zastosowana jedynie do oceny produktu otrzymanego w wyniku utlenienia ANS, ze względu na jego odmienną, zieloną barwę, która nie interferowała z barwą rodnika. W tym przypadku wartość EC<sub>50</sub> wynosiła 660 µg/ml, co potwierdziło potencjał antyoksydacyjny tego produktu wykazany za pomocą innych testów (**P2**).

**W przedstawionych badaniach wykazano, że lakaza grzybowa może katalizować reakcję syntezy związków o właściwościach bioaktywnych. Potencjał antymikrobiologiczny wykazują w szczególności produkty utleniania homo- i heteromolekularnego wybranych pochodnych naftalenowych, podczas gdy właściwości antyoksydacyjne wykazują wszystkie opisane powyżej produkty.**

Właściwości bioaktywne otrzymanych produktów zostały przedstawione w następujących pracach oryginalnych:

**P1. Polak J\***, Wliziło K, Pogni R, Petricci E, Grąż M, Szałapata K, Osińska-Jaroszuk M, Kapral-Piotrowska J, Pawlikowska-Pawłęga B, Jarosz-Wilkołazka A. (2020) Structure and bioactive properties of novel textile dyes synthesised by fungal laccase, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2052

**P2. Polak J\***, Grąż M, Wliziło K, Szałapata K, Kapral-Piotrowska J, Paduch R, Jarosz-Wilkołazka A. (2022) Bioactive properties of a novel antibacterial dye obtained from laccase-mediated oxidation of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, *Molecules* 27 (2), 487

**P5. Polak J\***, Jarosz-Wilkołazka A, Szałapata K, Grąż M, Osińska-Jaroszuk M. (2016) Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties - the optimisation process. *New Biotechnology* 33 (2), 255-262

### **Ad. 5. Charakterystyka produktów reakcji biokatalizy pod kątem ich zastosowania jako barwników tekstylnych**

Produkty otrzymane w wyniku lakazowej biotransformacji wybranych substratów (barwniki ANS, POZ, AB1, AB2, AB3, N15) były testowane pod kątem oceny możliwości ich zastosowania **do wybarwiania materiałów tekstylnych**, głównie włókien wełnianych. Wybarwione produkty zostały poddane **ocenie trwałości barwy** po działaniu takich czynników jak: sztuczne światło, woda destylowana, pranie, pot słodki, pot kwaśny, tarcie suche i/lub tarcie mokre. Właściwości nowych barwników oceniono w skalach od 1 do 8 lub od 1 do 5 według standardów ISO, gdzie 1 oznacza wyraźną zmianę koloru. Z kolei produkt POZ był testowany jako potencjalny barwnik wobec takich włókien jak: celuloza, bawełna, nylon, akryl i wełna a jakość tych wybarwień na działanie światła, prania, wody i wody chlorowanej została oceniona w skali od 1 do 5, również według standardów ISO.

Odnotowałam, że produkty otrzymane w wyniku reakcji katalizowanej przez lakazę charakteryzowały się dobrymi właściwościami barwierskimi w szczególności włókien wełnianych, którym nadawały intensywne barwy: oliwkowo-zieloną w przypadku barwnika ANS, czerwono-różową dla barwników AB1, AB2 i AB3 i pomarańczową w przypadku barwników N15 i POZ, a intensywność wybarwień zależała od jakości włókien. W przypadku barwnika AB3 wykazywał on bardzo dobre właściwości barwierskie również wobec włókien jedwabnych i poliamidu, które charakteryzowały się wysokimi wartościami indeksów odporności na działanie różnych czynników, o wartościach z zakresu pomiędzy 4 a 5, w 5-stopniowej skali (**P3**). Skutkowało to wysoką odpornością na działanie takich czynników jak pranie, pot alkaliczny, pot kwaśny, woda destylowana, tarcie suche i tarcie mokre. Na podstawie przeprowadzonych testów wykazałam, że barwnikiem najbardziej odpornym na działanie światła jest barwnik otrzymany w wyniku transformacji ANS, który otrzymał indeks 6-7 w skali 8-stopniowej, podczas gdy pozostałe barwniki charakteryzowały się indeksem 5 (barwnik AB2) i 5-6 (barwnik N15) w skali 8-stopniowej. Zarówno w przypadku barwnika ANS jak i barwnika AB2 aż w 9 na 14 wariantów testów odporności charakteryzowały się one indeksem równym lub wyższym 4 w skali 5-stopniowej, co świadczy o ich wysokiej użyteczności jako barwników stosowanych do wybarwiania włókien wełnianych (**P1, P2**). Barwnik ANS był najmniej odporny na pranie w 40 °C i działanie tarcia na sucho i mokro. Barwnik AB2 wykazywał zmniejszoną odporność na działanie potu

słodkiego, powodującego zabarwienie włókien towarzyszących. Dla barwnika N15 otrzymano indeks równy i wyższy wartości 4 w skali 5-stopniowej aż dla 11 ocenianych wariantów testów odporności (P4). Dodatkowo barwnik ten był badany pod kątem barwienia innych włókien takich jak: bawełna, jedwab, wiskoza i len. Tylko w przypadku wiskozy barwnik N15 nie był w stanie przyłączyć się do włókien, podczas gdy innym włóknom nadał mniej (len, jedwab, bawełna) lub bardziej (wełna) intensywny odcień pomarańczowy. W przypadku barwnika POZ odnotowałam zbliżone wartości indeksów niezależnie od testowanych włókien, indeks 3 dla odporności na światło, 4/5 dla prania oraz 3/4 dla wody chlorowanej. Tylko w przypadku działania wody na włókna nylonowe indeks wyniósł 3 podczas gdy dla innych włókien wynosił on 4 lub 4/5, co oznacza bardzo dobrą odporność wybarwionych włókien na działanie tego czynnika (P5).

**Przeprowadzone analizy pozwalają stwierdzić, że produkty otrzymane w wyniku biotransformacji wybranych amin aromatycznych przy użyciu lakazy grzybowej, charakteryzują się intensywną barwą i mogą być stosowane do wybarwiania włókien wełnianych. Wybarwione włókna charakteryzują się odpornością na działanie wielu czynników fizykochemicznych, co potwierdza aplikacyjny aspekt podjętych badań. Biotransformacja substratów posiadających ugrupowanie sulfonowe lub karboksylowe w produkty barwne pozwala na uzyskanie produktów, które są rozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych, co ułatwia proces ich aplikacji na włókna wełniane. Dobre właściwości barwierskie produktów N15, AB2 i AB3 mogą być spowodowane tworzeniem wiązań jonowych pomiędzy grupami karboksylowymi, które są obecne w strukturze barwników a grupami aminowymi włókien wełnianych.**

Wyniki dotyczące charakterystyki nowych oryginalnych produktów, uzyskanych w wyniku biotransformacji z użyciem lakazy grzybowej, pod kątem ich zastosowania jako barwników zostały przedstawione w następujących pracach oryginalnych:

**P1. Polak J\***, Wliziło K, Pogni R, Petricci E, Grąż M, Szałapata K, Osińska-Jaroszuk M, Kapral-Piotrowska J, Pawlikowska-Pawłęga B, Jarosz-Wilkołazka A. (2020) Structure and bioactive properties of novel textile dyes synthesised by fungal laccase, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2052

**P2. Polak J\***, Grąż M, Wliziło K, Szałapata K, Kapral-Piotrowska J, Paduch R, Jarosz-Wilkołazka A. (2022) Bioactive properties of a novel antibacterial dye obtained from laccase-mediated oxidation of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, *Molecules* 27 (2), 487

**P3. Polak J**, Jarosz-Wilkolazka A\*, Szuster-Ciesielska A, Wlizło K, Kopycińska M, Sójka-Ledakowicz J, Lichawska-Olczyk J. (2016) Toxicity and dyeing properties of dyes obtained through laccase-mediated synthesis. *Journal of Cleaner Production* 112, 4265-4272

**P4. Wlizło K, Polak J\***, Jarosz-Wilkolazka A, Pogni R, Petricci E. (2020) Novel textile dye obtained through transformation of 2-amino-3-methoxybenzoic acid by free and immobilised laccase from a *Pleurotus ostreatus* strain, *Enzyme and Microbial Technology* 132, 109398

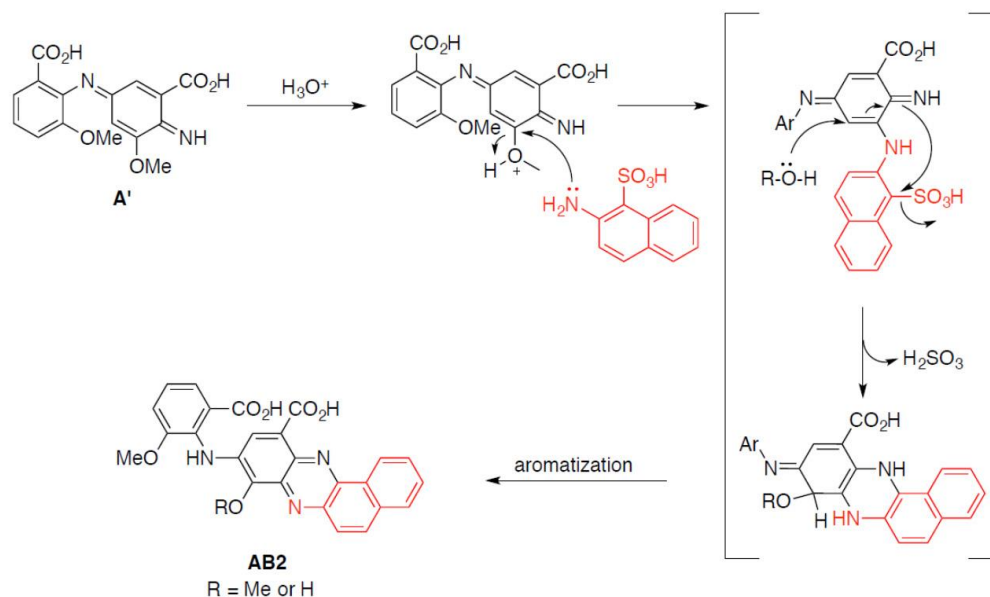
**P5. Polak J\***, Jarosz-Wilkolazka A, Szałapata K, Grząd M, Osińska-Jaroszuk M. (2016) Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties - the optimisation process. *New Biotechnology* 33 (2), 255-262

#### **Ad. 6. Struktura wybranych produktów barwnych otrzymanych w wyniku lakazowej biotransformacji substratów organicznych**

W ostatnim etapie badań wybrane barwniki, otrzymane w wyniku heteromolekularnej transformacji kwasu 2-amino-3-metoksybenzenowego z izoformami kwasu aminonaftalenosulfonowego (barwniki AB1, AB2 i AB3) oraz produkt transformacji homomolekularnej kwasu 2-amino-3-metoksybenzenowego (barwnik N15), zostały oczyszczone do głównego produktu reakcji a następnie poddane analizom w kierunku **określenia ich struktury chemicznej.**

Produkty AB1, AB2 i AB3 zostały przebadane za pomocą takich technik jak ES-MS, 1H-NMR i 13C-NMR oraz FTIR, których rezultaty pozwoliły na zaproponowanie struktury głównych produktów biotransformacji enzymatycznej oraz mechanizmu reakcji. W przypadku transformacji heteromolekularnej mieszaniny kwasu 2-amino-3-metoksybenzoowego (A) i kwasu aminonaftalenosulfonowego (B1, B2 lub B3) za pomocą lakazy grzybowej, w pierwszym etapie dochodzi do utlenienia substratu A, który charakteryzuje się niższym potencjałem utlenienia niż obecny w mieszaninie substrat naftalenowy i dlatego wykazuje większe powinowactwo do lakazy, objawiające się również niższą wartością stałej  $K_M$ . Podstawnikiem biorącym udział w tym procesie jest grupa aminowa ulegająca przekształceniu do rodnika. W następnym etapie powstały rodnik atakuje pozycję *para* drugiej cząsteczki substratu A, a w wyniku tej reakcji tworzy się nowe wiązanie typu węgiel-azot. Produktem reakcji sprzęgania jest produkt pośredni (A'), który jest dimerem, chinonodiiminą o właściwościach elektrofilowych. W kolejnym etapie reakcji tak utworzony elektrofil jest następnie sprzęgany z nukleofilem czyli kwasem

aminonaftalenosulfonowym poprzez jego grupę aminową, a podczas tej reakcji dochodzi do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji i przegrupowania grupy metoksyowej (**Rycina 1**).



**Rycina 1.** Proponowany mechanizm reakcji syntezy barwnika AB2 (**P1**).

W ostatnim etapie ma miejsce aromatyzacja cząsteczek do ostatecznych produktów reakcji, czyli pochodnych fenazyńowych AB1, AB2 i AB3. W przypadku rearanżacji produktu pośredniego AB2 traci on dodatkowo grupę sulfonową, dlatego odróżnia się on od produktów AB1 i AB3 słabą rozpuszczalnością w mieszaninie reakcyjnej, co obserwujemy wypadaniem jego z roztworu.

Struktura produktów jednoznacznie wskazuje, że główny produkt reakcji AB1, AB2 i AB3 powstaje w wyniku sprzęgnięcia dwóch cząsteczek kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego i jednej cząsteczki kwasu aminonaftalenosulfonowego, co zostało pośrednio dowiedzione podczas badań optymalizacyjnych syntezy AB2 (Ad. 2). W tym przypadku niemal połowa zastosowanego stężenia substratu B2 nie została utleniona i pozostała w mieszaninie transformacyjnej. Barwnik ten jako jedyny z trzech otrzymanych pochodnych fenazyńowych charakteryzował się właściwościami antymikrobiologicznymi i był mieszaniną dwóch związków AB2a i AB2b, które różniły się obecnością grupy metoksyowej (AB2a) lub hydroksylowej (AB2b) w pozycji 11, spośród których dominował produkt AB2a. Jego nazwa chemiczna to kwas 10-((2-karboksy-6-metoksyfenylo)amino)-11-metoksybenzoylo[a]fenazyńo-8-karboksyowy. Należy tutaj podkreślić, że obecność



grupy hydroksylowej w cząsteczce produktu AB2a, która jest donorem elektronów, może mieć wpływ na uzyskanie właściwości antymikrobiologicznych i antyoksydacyjnych tego produktu. Badania wykazały, że oba związki AB2a i AB2b są trimerami o masie cząsteczkowej odpowiednio 470 (M+H)<sup>+</sup> i 456 (M+H)<sup>+</sup>. Główne produkty barwników AB1 i AB3 są wobec siebie izomerami różniącymi się ułożeniem grupy sulfonowej w pozycji 4 (barwnik AB1) i pozycji 5 (barwnik AB3) i charakteryzują się taką samą masą cząsteczkową 550 (M+H)<sup>+</sup>.

Dla oczyszczonego głównego produktu N15, otrzymanego w wyniku lakazowej biotransformacji homomolekularnej kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego, uzyskano masę cząsteczkową 449,37. Bazując na wspomnianym powyżej mechanizmie reakcji heteromolekularnej opisującym udział tego substratu w tworzeniu struktury barwnika AB2, dla produktu N15 została zaproponowana struktura chemiczna fenazyny o nazwie: 7-(2-karboksy-6-metoksyfenilo)amino)-4,9-dikarboksy-6-hydroksyfenazyna. Powstała ona w wyniku oksydacyjnego sprzęgania trzech cząsteczek substratu N15 przy udziale lakazy grzybowej jako biokatalizatora reakcji.

**Produkty otrzymane na drodze biotransformacji heteromolekularnej kwasów amino-naftalenosulfonowych z kwasem 2-amino-3-metoksybenzoesowym mają strukturę fenazyn o zbliżonych właściwościach antyoksydacyjnych i toksyczności, a w przypadku produktu AB2 również o właściwościach antymikrobiologicznych. Według mojej wiedzy, są to pierwsze związki fenazynowe otrzymane w wyniku biotransformacji heteromolekularnej wybranych pochodnych amin aromatycznych przy użyciu lakazy grzybowej jako biokatalizatora reakcji.**

Charakterystyka produktów pod kątem ich struktury chemicznej została przedstawiona w następujących pracach oryginalnych:

**P1. Polak J\***, Wliziło K, Pogni R, Petricci E, Grąż M, Szałapata K, Osińska-Jaroszuk M, Kapral-Piotrowska J, Pawlikowska-Pawłęga B, Jarosz-Wilkołazka A. (2020) Structure and bioactive properties of novel textile dyes synthesised by fungal laccase, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2052

**P4.** Wliziło K, **Polak J\***, Jarosz-Wilkołazka A, Pogni R, Petricci E. (2020) Novel textile dye obtained through transformation of 2-amino-3-methoxybenzoic acid by free and immobilised laccase from a *Pleurotus ostreatus* strain, *Enzyme and Microbial Technology* 132, 109398

#### 4.3.4. Podsumowanie najważniejszych wyników badań opublikowanych w artykułach stanowiących osiągnięcie naukowe

W pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wykazałam, że:

1. lakaza zewnątrzkomórkowa otrzymana z hodowli grzybów ligninolitycznych *C. unicolor* i *P. ostreatus* jest wydajnym katalizatorem biotransformacji wybranych amin aromatycznych, w nowe produkty barwne o potencjale aplikacyjnym, a proces biokatalizy z użyciem lakazy w proponowanym układzie doświadczalnym zachodzi w łagodnych warunkach pH, temperatury i ciśnienia oraz nie wymaga użycia toksycznych związków utleniających (**P1, P2, P3, P4, P5, P6**);
2. wybrane benzenowe i naftalenowe pochodne aminowe mogą być bezpośrednio utleniane przez lakazę grzybową w reakcjach homomolekularnych lub sprzęgane w reakcjach heteromolekularnych z pochodnymi amin aromatycznych (**P1, P2, P4**);
3. struktura substratów aminowych ma wpływ na ich potencjał oksydoredukcyjny i tym samym na zdolność lakazy do ich biotransformacji; izomery kwasu aminonaftalenosulfonowego, charakteryzujące się wysoką wartością potencjału utlenienia, trudno są utleniane przez lakazę grzybową do intensywnie zabarwionych produktów w reakcjach homomolekularnych, ale mogą być stosowane jako ko-substrat w reakcjach sprzęgania heteromolekularnego z kwasem 2-amino-3-metoksybenzoesowym, a produkty tych reakcji wykazują bardzo dobre właściwości barwierskie i antyoksydacyjne (**P1**);
4. niski potencjał utlenienia pochodnej naftalenowej ANS sprzyja jego biotransformacji z użyciem lakazy grzybowej, co przejawia się niską wartością stałej Michaelis-Menten oraz wysokim zużyciem tlenu podczas utleniania (**P2**);
5. krzywa optymalizacyjna pH analizowanych procesów biotransformacji lakazowej pochodnych amin aromatycznych ma kształt krzywej dzwonowej z maksimum w zakresie wartości pomiędzy 4 a 5,5 w zależności od stosowanego substratu lub mieszaniny substratów; ponadto możliwa jest efektywna biotransformacja wysokich stężeń substratów, nawet do 10g/l, co poprawia ekonomikę procesu biotransformacji, a obecność niewielkich ilości metanolu w procesie biotransformacji substratu ANS, umożliwia zastosowanie jego wysokich stężeń i nie wpływa na efektywność biokatalizy przy udziale lakazy grzybowej (**P1, P2**);

6. niewielkie podniesienie temperatury reakcji do 40 °C w późniejszym etapie biotransformacji substratu N15 może aż 2-krotnie przyspieszać nieenzymatyczne sprzężanie intermediatów w końcowy produkt reakcji **(P4)**;
7. produkty reakcji biotransformacji homomolekularnych i heteromolekularnych wybranych amin aromatycznych przy udziale lakazy grzybowej, charakteryzują się bardzo dobrymi właściwościami barwierskimi, w szczególności wobec włókien wełnianych co nie zostało do tej pory opisane dla tych produktów, a wybarwione włókna są odporne na działanie wielu czynników fizykochemicznych, **(P1, P2, P3, P4, P5)**;
8. większość otrzymanych produktów barwnych charakteryzowała się niską lub średnią toksycznością środowiskową i cytotoksycznością w badaniach *in vitro*, a dla produktu ANS również brakiem właściwości alergizujących skórę atopową, co zwiększa bezpieczeństwo stosowania tych substancji jako środków barwiących i zwiększa ich potencjał aplikacyjny **(P2, P3)**;
9. w wyniku biotransformacji kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego przy udziale lakazy z *C. unicolor* produktem reakcji jest barwnik, który może być stosowany do wybarwiania włókien wełnianych, dodatkowo wykazujący aktywność antymikrobiologiczną wobec szczepów *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* a także właściwości antyoksydacyjne, co nie zostało do tej pory opisane dla tego produktu, a co podnosi aspekt nowatorski zrealizowanych badań **(P2)**;
10. produkt enzymatycznego sprzężania heteromolekularnego kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego z kwasem 2-aminonaftalenosulfonowym charakteryzuje się dobrymi właściwościami barwierskimi, potencjałem antyoksydacyjnym i co ważne aktywnością antymikrobiologiczną wobec szczepu *S. aureus*, co zostało po raz pierwszy opisane **(P1)**;
11. produkty otrzymane w wyniku biotransformacji homomolekularnej kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego i transformacji heteromolekularnej mieszaniny kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego z izomerami kwasu aminonaftalenosulfonowego charakteryzują się strukturą fenazykową, co według mojej wiedzy nie zostało do tej pory opisane dla tych substratów **(P1, P4)**.

#### 4.3.5. Piśmiennictwo

- [1] Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev.* 1996;96:2563–2606
- [2] Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 1999;3(1);1–25
- [3] Couto SR and Toca Herrera JL. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.* 2006;24(5);500–513
- [4] O'Malley DM, Whetten R, Bao W, et al. The role of laccase in lignification. *Plant J.* 1993;4:751–757.
- [5] Janusz G, Pawlik A, Świdarska-Burek U, Polak J, Sulej J, Jarosz-Wilkołazka A, Paszczyński A. Laccase properties, physiological functions, and evolution. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(3):966
- [6] Baldrian P. Fungal laccases -occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30:215–42.
- [7] Leonowicz A, Cho N-S, Luterek J, et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 2001;41:185–227.
- [8] Sharma P, Goel R, Capalash N. Bacterial laccases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2006;23:823–832.
- [9] Kramer KJ, Kanost MR, Hopkins TL, Jing H, Zhu YC, Xu R, Kerwin JL, Turecek F. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron* 2001;57:385-392.
- [10] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003;54:519–46.
- [11] Eggert C, Temp U, Dean JF, Eriksson KE. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS Lett.* 1995;376:202–206.
- [12] Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem.* 1997;72:924–928
- [13] Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 1994;140:19-26.
- [14] Fernandez-Sanchez C, Tzanov T, Gubitz GM, Cavaco-Paulo A. Voltametric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions. *Bioelectrochemistry* 2002;58:149-156.
- [15] Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 1996;96(7):2563–2605.
- [16] Mikolasch A, Schauer F. Fungal laccase as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009;82:605-624.
- [17] Bassanini I, Ferrandi EE, Riva S, Mont, D. Biocatalysis with laccases: An updated overview. *Catalysts* 2021;11:26.
- [18] Hahn V. Potential of the enzyme laccase for the synthesis and derivatization of antimicrobial compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2023;39:107
- [19] Agematu H, Tsuchida T, Kominato K, Shibamoto N, Yoshioka T, Nishida H, Okamoto R, Shin T, Murao S. Enzymatic dimerization of penicillin-X. *J. Antibiot.* 1993;46(1):141–148.

- [20] Mikolasch A, Niedermeyer THJ, Lalk M, Witt S, Seefeldt S, Hammer E, Schauer F, Gesell M, Hessel S, Jülich WD, Lindequist U. Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from *Trametes spec.* Chem. Pharm. Bull. 2006;54(5):632–638.
- [21] Mikolasch A, Niedermeyer THJ, Lalk M, Witt S, Seefeldt S, Hammer E, Schauer F, Gesell Salazar M, Hessel S, Jülich WD, Lindequist U. Novel cephalosporins synthesized by amination of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives using fungal laccases II. Chem. Pharm. Bull. 2007;55(3):412–416.
- [22] Mikolasch A, Hessel S, Gesell Salazar M, Neumann H, Manda K, Gördes D, Schmidt E, Thurow K, Hammer E, Lindequist U, Beller M, Schauer F. Synthesis of new N-analogous corollosporine derivatives with antibacterial activity by laccase catalyzed amination. Chem. Pharm. Bull. 2008;56(6):781–786.
- [23] Mikolasch A, Wurster M, Lalk M, Witt S, Seefeldt S, Hammer E, Schauer F, Jülich WD, Lindequist U. Novel beta-lactam antibiotics synthesized by amination of catechols using fungal laccase. Chem. Pharm. Bull. 2008;56(7):902–907.
- [24] Osiadacz J, Al-Adhami AJH, Bojraszewska D, Fischer P, Peczyńska-Czoch W. On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. J. Biotechnol. 1999;72:141-149.
- [25] Bruyneel F, Dive G, Marchand-Brynaert J. Non-symmetrically substituted phenoxazinones from laccase-mediated oxidative cross-coupling of aminophenols: an experimental and theoretical insight. Org. Biomol. Chem. 2012;10(9):1834–1846.
- [26] Bruyneel F, Enaud E, Billottet L, Vanhulle S, Marchand-Brynaert J. Regioselective synthesis of 3-hydroxyorthanilic acid and its biotransformation into a novel phenoxazinone dye by use of laccase. Eur. J. Org. Chem. 2008;1:70–79.
- [27] Xu F, Berka RM, Wahleithner JA, Nelson BA, Shuster JR, Brown SH, Palmer AE, Solomon EI. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. Biochem. J. 1998;334:64-70.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

W ramach porozumienia pomiędzy Zakładem Biochemii UMCS (obecnie Katedrą Biochemii i Biotechnologii UMCS) a **Instytutem Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (IBB PAN) w Warszawie** miałam możliwość odbycia rocznego stażu naukowego (1.09.2001-1.09.2002) w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów IBB PAN. Celem tego pobytu było wykonanie praktycznej części pracy magisterskiej pod bezpośrednią opieką naukową prof. dr. hab. Jacka Bardowskiego oraz dr hab. Tamary Aleksandrak-Piekarczyk. Promotorem mojej pracy magisterskiej była prof. dr hab. Magdalena Fikus. Tematem mojej

pracy magisterskiej było uzyskanie mutantów zaburzonych w transporcie laktozy oraz ich analiza. Pod koniec pobytu w IBB PAN zostałam oddelegowana na miesięczny staż do **Instytutu CRJ-INRA w Jouy-en-Josas we Francji** do zespołu prof. Renault (1-31 lipca 2002 r.), gdzie analizowałam aktywność transkrypcyjną otrzymanych przeze mnie mutantów. Rezultaty badań uzyskane podczas obu staży zostały opublikowane w następującej pracy:

Aleksandrak-Piekarczyk T, **Polak J**, Jezierska B, Renault P, Bardowski J (2011). Genetic characterization of the CcpA-dependent, cellobiose-specific PTS system comprising CelB, PtcB and PtcA that transports lactose in *Lactococcus lactis* IL1403. *International Journal of Food Microbiology* 145:186–19

*Moim wkładem w powstanie tego artykułu było przeprowadzenie części prac doświadczalnych, analiza wyników oraz udział w przygotowaniu ich pod kątem publikacji.*

**Po ukończeniu studiów** rozpoczęłam pracę w **Instytucie Medycyny Wsi w Lublinie** pod opieką prof. dr hab. Jacka Dutkiewicza i dr Jolanty Chmielewskiej-Badory. Tematyką moich badań była analiza mikrobiologiczna kleszczy jako wektorów zakażeń bakteryjnych ze szczególnym uwzględnieniem zakażeń krętkiem boreliozy, bardzo często diagnozowanym u rolników i pracowników Lasów Państwowych. Ponadto badałam poziom przeciwciał u tych dwóch grup zawodowych, którzy ze względu na charakter wykonywanej pracy są najbardziej narażeni na choroby przenoszone przez *Ixodes ricinus* oraz analizowałam występowanie różnych genogatunków *Borrelia burgdorferi* w kleszczach. Rezultaty przeprowadzonych badań zostały opublikowane w następujących pracach:

Cisak E, Chmielewska-Badora J, Zwoliński J, Wójcik-Fatla A, **Polak J**, Dutkiewicz J. (2005) Risk Of Tick-Borne Bacterial Diseases Among Workers Of Roztocze National Park (South-Eastern Poland), *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12, 127-132

Cisak E, Chmielewska-Badora J, Wójcik-Fatla A, **Polak J**. (2004) Różnicowanie genogatunków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w aspekcie zakażeń pracowników leśnictwa. *Medycyna Ogólna* 10, 323-331

*Moim wkładem w powstanie tych artykułów był współudział w pracach doświadczalnych, analiza wyników i przygotowanie ich pod kątem publikacji.*

Od roku 2005, moja aktywność zawodowa i naukowa jest związana z **Katedrą Biochemii i Biotechnologii UMCS** (wcześniej Zakładem Biochemii UMCS) i pracą zespołu Profesor dr hab. Anny Jarosz-Wilkołazkiej, która jest promotorem mojej pracy doktorskiej. W latach 2005-2008 byłam wykonawcą projektu pt. **“Novel sustainable bioprocesses for the**

**European colour industries” (SOPHIED - NMP2-CT-2004-505899)**, finansowanego w ramach 6-go Programu Ramowego UE. Badania obejmowały zastosowanie lakazy i biomasy grzybów ligninolitycznych jako biokatalizatorów użytecznych w reakcjach degradacji barwników syntetycznych jak i reakcji syntezy nowych związków barwnych. W ramach prac projektowych, które były częściowo związane z tematem mojej **pracy doktorskiej**, poszukiwałam nowych substancji barwnych, które były naturalnie wydzielane przez grzyby lub były produktami biotransformacji związków organicznych przy udziale lakazy grzybowej. Substraty stosowane do badań przesiewowych należały głównie do pochodnymi fenoli, naturalnych substratów dla lakazy grzybowej. Wybrane związki testowałam w reakcjach homomolekularnych i heteromolekularnych z lakazą grzybową jak i biomasą grzybów ligninolitycznych o zdolności do wydzielania lakazy zewnątrzkomórkowej, jako biokatalizatorów reakcji. W ramach przeprowadzonych badań zoptymalizowałam syntezę barwnika fenoksazynowego (POZ), który był produktem reakcji dimeryzacji kwasu 3-amino-4-hydroksybenzenosulfonowego (AHBS) oraz brałam udział w określeniu jego struktury chemicznej. Równolegle prowadziłam prace badawcze nad użyciem biomasy grzybowej do biotransformacji związków organicznych. Badania nad zastosowaniem unieruchomionej biomasy grzybowej jako biokatalizatora reakcji skupiały się nad doborem odpowiedniego szczepu grzybowego i nośnika oraz nad wyborem optymalnych parametrów zarówno do prowadzenia hodowli jak i do biotransformacji substratów. Parametrami poddanymi szczegółowym badaniom optymalizacyjnym były: wartość pH, obecność induktora i skład mieszaniny transformacyjnej. W badaniach dowiodłam, że siatka polipropylenowa jest dobrym nośnikiem do unieruchamiania grzybów ligninolitycznych, a obecność induktora w postaci siarczanu miedzi (II) może indukować wydzielanie lakazy przez grzyb i tym samym zwiększać efektywność procesu biotransformacji. Ponadto brałam udział w budowie prototypu systemu zamkniętego do biotransformacji substratu (AHBS) z zastosowaniem biomasy *Fomes fomentarius* unieruchomionej na siatce polipropylenowej. Badania te były wykonane w ramach projektu finansowanego z Programu VENTURES Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (Ventures/2008-1/4), którego byłam kierownikiem i wykonawcą. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy oryginalnej z listy JCR:

**Polak J\***, Jarosz-Wilkołazka A. (2010) Whole-cell fungal transformation of precursors into dyes. *Microbial Cell Factories* 9:51

*Moim wkładem w powstanie tego artykułu było współpracowanie metodyki badań, przeprowadzenie wszystkich prac doświadczalnych, analiza wyników i ich interpretacja, udział w przygotowaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz korekta na każdym etapie prac redakcyjnych. Byłam autorem korespondencyjnym tej pracy.*

Podczas realizacji w/w projektów została nawiązana współpraca z wieloma ośrodkami badawczymi z Europy. Umożliwiło mi to przeprowadzenie badań naukowych podczas kilku krótkoterminowych staży odbytych w roku 2008 w **Universite Catholique de Louvain w Louvain-La-Nueve (Belgia)** oraz w **Wetlands Engineering w Louvain-La-Nueve (Belgia)**. W kolejnych latach kontynuowałam współpracę z zespołem prof. Rebeci Pogni z **Uniwersytetu w Sienie (Włochy)**, gdzie w roku 2015 odbyłam tygodniowy staż naukowy. Wyniki prac badawczych realizowanych we współpracy z tymi ośrodkami naukowymi zostały opublikowane w następujących publikacjach z listy JCR:

Forte S, **Polak J**, Valensin D, Taddei M, Basosi R, Vanhulle S, Jarosz-Wilkołazka A, Pogni R. (2010) Synthesis and structural characterization of a novel phenoxazinone dye by use of a fungal laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63:116-120;

**P1. Polak J\***, Wlizio K, Pogni R, Petricci E, Grąz M, Szałapata K, Osińska-Jaroszuk M, Kapral-Piotrowska J, Pawlikowska-Pawłęga B, Jarosz-Wilkołazka A. (2020) Structure and bioactive properties of novel textile dyes synthesised by fungal laccase, *International Journal of Molecular Sciences* 21, 2052;

**P4.** Wlizio K, **Polak J\***, Jarosz-Wilkołazka A, Pogni R, Petricci E. (2020) Novel textile dye obtained through transformation of 2-amino-3-methoxybenzoic acid by free and immobilised laccase from a *Pleurotus ostreatus* strain, *Enzyme and Microbial Technology* 132, 109398;

a także były podstawą **zgłoszenia patentowego**:

Bruyneel F, Jarosz-Wilkołazka A, **Polak J**, Bols Ch-M, Vanhulle S, Enaud E, Basosi R, Pogni R, Jager I, Hercher Ch, Marchand J, „Phenoxazine dyes”, Numer zgłoszenia patentowego US20100000032.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę



Od 2005 roku, od kiedy jestem związana z pracami badawczymi prowadzonymi w Katedrze Biochemii i Biotechnologii UMCS, aktywnie uczestniczę w procesach dydaktyczno-wychowawczych związanych z opieką nad studentami wykonującymi badania w ramach pracowni magisterskiej oraz prowadzeniem zajęć dydaktycznych. Już podczas odbywania niestacjonarnych studiów doktoranckich (2005-2008) byłam zaangażowana w prowadzenie zajęć dydaktycznych w ramach wielu kierunków studiów prowadzonych na Wydziale Biologii i Biotechnologii oraz Wydziale Chemii UMCS. Dla studentów Wydziału Chemii kierunku chemia środków bioaktywnych i kosmetyków prowadziłam zajęcia laboratoryjne z przedmiotu *biochemia skóry i tkanek współzależnych* oraz przedmiotu *biotechnologia*, a także konwersatoria z przedmiotu *podstawy biochemii* dla studentów kierunku chemia.

Obecnie prowadzę ćwiczenia laboratoryjne dla studentów I i II stopnia kierunków biologia i biotechnologia w ramach kursów:

- *chemii organicznej dla biologów*,
- *biochemii*,
- *analitiky biochemicznej*,
- *metabolizmu wtórnego*,
- *biokatalizy stosowanej*,
- *oraz biochemii metabolitów wtórnych*.

Realizuję również zajęcia laboratoryjne **w języku angielskim** z kursu *organic chemistry for biology students* dla studentów kierunku anglojęzycznego medical biology oraz kursu *biochemistry of secondary metabolites* dla studentów przyjeżdżających w ramach programu Erasmus+. Jestem **koordynatorem** wykładu z *toksykologii biochemicznej* dla studentów kierunku biologia, specjalność biochemia oraz współkoordynatorem kursu *analitika biochemiczna* dla studentów kierunku biologia, specjalność bioanalitika. W związku z pełnieniem tych funkcji opracowałam autorskie programy zajęć, wykłady i skrypty do ćwiczeń laboratoryjnych dla wyżej wymienionych kursów. Ponadto brałam udział w przygotowaniu skryptów do zajęć laboratoryjnych z *biochemii*, *biochemii metabolitów wtórnych* i *biokatalizy stosowanej* dla studentów kierunku biologia i biotechnologia.

W latach 2012-2018 pełniłam rolę opiekuna pracy doktorskiej Pani dr Kamili Marii Wliżło, która obroniła pracę doktorską w roku 2018, której byłam **promotorem pomocniczym**. Ponadto byłam **promotorem 13** i **recenzentem 7** prac licencjackich jak również pełniłam rolę **opiekuna merytorycznego dla 15** studentów kierunku biologia i

biotechnologia przygotowujących swoje prace magisterskie w Katedrze Biochemii i Biotechnologii UMCS. W latach 2018-2023 byłam **opiekunem praktyk** zawodowych trojga studentów biologii i biotechnologii, którzy odbywali je w Katedrze Biochemii i Biotechnologii na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS.

Brałam udział w **koordynowaniu** i/lub przygotowaniu doświadczeń laboratoryjnych dla uczniów szkół podstawowych i ponadpodstawowych oraz mieszkańców Lublina w ramach następujących działań popularyzujących nauki biologiczne, a w szczególności biochemię:

- **Lubelski Festiwal Nauki**: byłam **koordynatorem** i realizatorem projektu festiwalowego przedstawianego na pikniku naukowym, promującym badania z zakresu biochemii i biokatalizy stosowanej (edycja 2010, 2013, 2016, 2017, 2018, 2019, 2021, 2022);

- **Objazdowy Festiwal Nauki**: w 2015 roku przeprowadzałam warsztaty dla uczniów Gimnazjów z województwa lubelskiego (w Bychawie, Ludwinie i Łaziskach), które odbyły się w ramach projektu „Objazdowy Festiwal Nauki, czyli nauka bez barier” 85/UD/SKILLS/2015 przyznanego w konkursie ENGAGE finansowanego w ramach programu SKILLS przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej (kierownik projektu prof. dr hab. Anna Jarosz-Wilkolażka);

- **Noc Biologów**: brałam czynny udział w przygotowaniu i realizacji warsztatów w 7 edycjach Nocy Biologów prowadzonych w latach 2013-2019 na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS;

- **Szkoły Partnerskie**: brałam czynny udział w przygotowaniu i realizacji warsztatów dla dzieci i młodzieży ze szkół podstawowych i ponadpodstawowych w ramach Szkół Partnerskich UMCS (2018-2022);

- brałam czynny udział w realizacji **warsztatów biochemicznych** dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych, którzy przygotowywali się do centralnego etapu Olimpiady Biologicznej w 2017, 2018 i 2020 roku.

Jestem współkoordynatorem **Ogólnopolskiego Konkursu Biochemicznego** organizowanego dla uczniów szkół ponadpodstawowych, którego zadaniem jest pogłębienie wiedzy z zakresu biochemii. W bieżącym roku odbyła się **XIV edycja** Konkursu Biochemicznego, moim zadaniem była koordynacja prac podczas przygotowania zadań konkursowych do dwóch etapów Konkursu oraz czuwanie nad ich prawidłowym przebiegiem. Zasiadam w Radzie Naukowej Konkursu.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej

Poza aktywnością naukową przedstawioną w punkcie 4 i 5 niniejszego Autoreferatu moje zainteresowania naukowe dotyczyły innych aspektów zastosowania enzymów grzybowych w biokatalizie. Równoległą tematyką realizowaną przeze mnie podczas pracy naukowej była możliwość zastosowania **unieruchomionych biokatalizatorów w reakcjach syntezy i degradacji**. Realizowane badania obejmowały zastosowanie zarówno biomasy grzybów ligninolitycznych jak i wyizolowanych enzymów (lakazy) do unieruchomienia na różnych rodzajach nośników, w celu ich wielokrotnego zastosowania do syntezy nowych związków lub do degradacji zanieczyszczeń organicznych obecnych w środowisku naturalnym i stanowiących zagrożenie dla organizmów żywych.

W przypadku zastosowania unieruchomionej lakazy do procesu biokatalizy, badania obejmowały wybór optymalnego nośnika, spośród wielu komercyjnie dostępnych membran i substancji porowatych, jako potencjalnych nośników do jej unieruchomienia. Zadania były realizowane w ramach grantu NCN Preludium 9 pt. „Unieruchomiona lakaza grzybowa jako uniwersalny katalizator w transformacji związków aromatycznych” (2015/17/N/NZ9/03647), którego byłam opiekunem merytorycznym. Unieruchomiona na nośniku lakaza została zastosowana do degradacji bisfenolu A, który jest uważany za niebezpieczny dla zdrowia modulator endokryny. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy oryginalnej:

Wlizio K, **Polak J\***, Kapral-Piotrowska J, Grąz M, Paduch R, Jarosz-Wilkołazka A. (2020) Influence of carrier structure and physicochemical factors on immobilisation of fungal laccase in terms of bisphenol A removal, *Catalysts*, 10, 951

*Moim wkładem w powstanie tego artykułu było współpracowanie metodyki badań doświadczalnych, pomoc w analizie wyników oraz współudział w przygotowaniu ich pod kątem publikacji. Brałam udział w przygotowaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz w korekcie wydawniczej na każdym etapie procesu publikacji. Byłam autorem korespondencyjnym tej publikacji.*

Ponadto wraz ze współautorami dokonałam przeglądu piśmiennictwa obejmującego możliwości zastosowań lakazy do usuwania zanieczyszczeń organicznych, co zostało opublikowane w następujących pracach przeglądowych:

Wlizło K, **Polak J**, Jarosz-Wilkołazka A. (2017) Związki biologicznie aktywne i metody ich usuwania na drodze biokatalizy, *Postępy Biochemii*, 63, 304-314

Wlizło K, **Polak J**, Grąż M, Bryjak J, Jarosz-Wilkołazka A. (2015) Zastosowanie unieruchomionej lakazy grzybowej w biotransformacji związków aromatycznych. *Inż. Aparat. Chem.* 4/2015, str. 211

Pozdnyakova N, Jarosz-Wilkołazka A, **Polak J**, Wlizło K, Dubrovskaya E, Turkovskaya O, (2017). "Unique properties of fungal laccases for biodegradative processes". W: *Laccase: Applications, investigations and insights*, Harris A. (Ed), ISBN: 978-1-53610-556-8, pp. 143-180, Nova Science Publishers, Inc., New York 2017, 2

oraz w rozdziale monografii:

Wlizło K, **Polak J**, Jarosz-Wilkołazka A. (2017) Lakaza z *Pleurotus ostreatus* w transformacji barwnych ksenobiotyków, W: *Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie*, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, praca zbiorowa pod redakcją Doroty Kołodziej, ISBN 978-83-939465-9-4, 117-120

*Moim wkładem w powstanie tych artykułów był udział w tworzeniu oryginalnej i ostatecznej wersji manuskryptu i korekta na każdym etapie prac redaktorskich.*

Kolejnym tematem prowadzonych przeze mnie badań było **zastosowanie nanocząstek żelaza i tytanu jako nośników do unieruchamiania lakazy grzybowej** otrzymanej z *Cerrena unicolor*, który realizowałam wraz z zespołem prof. dr hab. Adriany Zaleskiej-Medyńskiej z Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Gdańskiego. Lakaza unieruchomiona na nanocząstkach charakteryzowała się wysoką aktywnością operacyjną i stabilnością podczas przechowywania przez 28 dni w warunkach chłodniczych i w warunkach podwyższonej temperatury. Wyniki doświadczeń zostały zaprezentowane podczas międzynarodowej konferencji naukowej Oxizymes w Sienie (rok 2022) oraz były podstawą pracy magisterskiej (2021), której byłam opiekunem merytorycznym.

Innym aspektem badań było zastosowanie innych enzymów grzybowych należących do klasy oksydoreduktaz takich jak **peroksydaza**, do degradacji związków organicznych o różnych strukturach chemicznych, które powszechnie są uważane za szkodliwe, toksyczne i stanowiące główne źródło zanieczyszczeń środowiska naturalnego. We współpracy z Panią

Profesor Natalią Pozdnyakovą z Instytutu Biochemii i Fizjologii Roślin i Mikroorganizmów Rosyjskiej Akademii Nauk w Saratowie (Rosja) zbadano możliwości zastosowania peroksydazy uniwersalnej (VP) otrzymanej z *Bjerkandera fumosa* i *Pleurotus ostreatus* do **degradacji** barwników syntetycznych o strukturze antrachinonowej i antracenowej oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (PAH). Wyniki tych doświadczeń były prezentowane na międzynarodowej konferencji naukowej w Helsinkach (rok 2016) i zostały opublikowane w artykule:

Pozdnyakova NN, Jarosz-Wilkolazka A, **Polak J**, Grąż M, Turkovskaya OV: Decolourisation of anthraquinone-and anthracene-type dyes by versatile peroxidases from *Bjerkandera fumosa* and *Pleurotus ostreatus* D1. Biocatalysis and Biotransformation 33 (2), 69-80, 2015 (IF=0,691, MNiSW=15)

*Moim wkładem w powstanie tego artykułu była synteza i oczyszczanie peroksydazy, udział w pisaniu oryginalnej wersji manuskryptu i korekta na każdym etapie prac redaktorskich.*

W latach 2021-2022 byłam zaangażowana w koordynację pobytu Pani Jihene Maatti z Uniwersytetu w Kartaginie, filia w Tunisie (Tunezja), która odbywała staż doktorski w Katedrze Biochemii i Biotechnologii UMCS pod opieką naukową prof. dr hab. Anny Jarosz-Wilkolazkiej. Współpraca z Panią Maatti dotyczyła otrzymywania i charakterystyki **lakazy ze szczepu *Bacillus halodurans*** w warunkach heterologicznej ekspresji w układzie *Escherichia coli*. Otrzymaną lakazę wstępnie oczyszczono i scharakteryzowano pod względem podstawowych parametrów katalitycznych. Ponadto posłużyła ona jako biokatalizator w reakcjach biotransformacji substratów organicznych w warunkach podwyższonej wartości pH mieszaniny reakcyjnej. Mój wkład w niniejsze badania polegał na opracowaniu metodyki oczyszczania lakazy i charakterystyki lakazy pod kątem oceny właściwości katalitycznych oraz przeprowadzeniu biotransformacji substratów organicznych. Otrzymane wyniki stały się podstawą publikacji, która na obecnym etapie (V 2023) jest poddawana recenzji w czasopiśmie z bazy JCR.

W latach 2013-2015 brałam udział w badaniach prowadzonych przez Pracowników Katedry Biochemii i Biotechnologii UMCS dotyczących potencjału antyoksydacyjnego i antymikrobiologicznego preparatów otrzymanych z hodowli grzybów ligninolitycznych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w następujących pracach oryginalnych:

Osińska-Jaroszuk M, Jaszek M, Mizerska-Dudka M, Blachowicz A, Rejczak T, Janusz G, Wydrych J, **Polak J**, Jarosz-Wilkolazka A, Kandefler-Szerszeń M. (2014) Exopolysaccharide

from *Ganoderma applanatum* as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. *BioMed Research International* ID 743812

Jaszek M, Osinska-Jaroszuk M, Sulej J, Matuszewska A, Stefaniuk D, Maciag K, **Polak J**, Matuszewski L, Grzywnowicz K. (2015) Stimulation of the Antioxidative and Antimicrobial Potential of the Blood Red Bracket Mushroom *Pycnoporus sanguineus* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 17 (8)

Jaszek J, 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 Research International* ID 497492

*Moim wkładem w powstanie tych artykułów było współpracowanie części metodyki badań i przeprowadzenie części prac doświadczalnych (potencjał antymikrobiologiczny i analiza toksyczności środowiskowej).*

Omówione powyżej publikacje powstałe w ramach współpracy z naukowcami Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS, m.in. z Katedry Biochemii i Biotechnologii, Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, Katedry Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii oraz Katedry Wirusologii i Immunologii UMCS, były podstawą przyznanych **nagród J.M.**

#### **Rektora UMCS:**

**2010** – Nagroda Zespołowa I stopnia J.M. Rektora UMCS

**2017** – Nagroda Indywidualna I stopnia J.M. Rektora UMCS za pozyskanie środków zewnętrznych

**2019** – Nagroda Zespołowa III stopnia J.M. Rektora UMCS za organizację 10-ciu edycji Konkursu Biochemicznego skierowanego do uczniów szkół ponadpodstawowych i ponadgimnazjalnych promujących nauki biologiczne a w szczególności biochemię

**2020** - nagroda zespołowa J.M. Rektora UMCS za wyróżniającą się pracę naukową, a w szczególności za wysoko punktowany artykuł naukowy opublikowany w okresie od stycznia 2020 r. do 31 marca 2020 r.

**2020** - nagroda zespołowa J.M. Rektora UMCS za wyróżniającą się pracę naukową, a w szczególności za wysoko punktowany artykuł naukowy opublikowany w okresie od marca 2020 r. do 31 czerwca 2020 r.

**2022** – nagroda zespołowa J.M. Rektora UMCS za wyróżniającą się pracę naukową, a w szczególności za wysoko punktowany artykuł naukowy opublikowany w okresie od stycznia 2022 r. do 31 marca 2022 r.

Ponadto w uznaniu dotychczasowej pracy naukowej w roku 2021 otrzymałam „**Brązowy Medal za długoletnią służbę**” nadany przez Prezydenta RP Andrzeja Dudę.

Jestem współautorem kilkudziesięciu doniesień konferencyjnych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, wśród których trzy otrzymały nagrody:

**2006** - Polak J, Jarosz-Wilkołazka A, Grąz M, Malarczyk E. Transformation of simple phenolic compounds by fungal laccase to produce colour compounds. 3<sup>rd</sup> European Meeting in OxiZymes, Oeiras, Portugalia, **nagroda za najlepszy poster,**

**2010** - Polak J, Jarosz-Wilkołazka A. Biosynthesis of dyes - comparative studies of laccase and laccase-secreted fungal biomass as biocatalysts, Acta Biochim. Polon. 57, suppl.3/2010 P1.19; EUROBIOTECH 2010, Kraków, **nagroda za najlepszą prezentację ustną posteru,**

**2011** - Jarosz-Wilkołazka A, Polak J. Fungal laccase – blue enzyme for green biotechnology. IV Congress of Polish Biotechnology and IV Eurobiotech 2011, Kraków, Poland, October 12-15, Acta Biochim. Polon. 58, suppl. 4/2011, 11, **nagroda za najlepszy poster,**

Brałam udział w **szkoleniach i kursach** z zakresu zarządzania projektami badawczymi, m.in. w roku 2011 ukończyłam studia podyplomowe z „Zarządzania projektami badawczymi i pracami rozwojowymi”, WSEI, Lublin (2 semestry).

W roku **2015** uczestniczyłam w prestiżowym stażu szkoleniowym na **Uniwersytecie w Berkeley w Stanach Zjednoczonych** w ramach **programu TOP500 Innovators**, który był organizowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego RP. Program był skierowany do naukowców i pracowników centrów transferu technologii w celu podniesienia kwalifikacji w zakresie współpracy z gospodarką, zarządzania badaniami naukowymi oraz komercjalizacji wyników. Podczas dwóch miesięcy stażu i licznych spotkań z przedstawicielami przedsiębiorstw z Doliny Krzemowej (październik-listopad 2015), miałam okazję poznać jeden z najlepszych ekosystemów innowacji na świecie.

Moje przyszłe **plany badawcze** będą kontynuacją badań nad zastosowaniem grzybowych enzymów oksydoredukcyjnych w procesach biokatalizy, w tym do degradacji związków toksycznych. Produkty oksydacyjnych transformacji tych zanieczyszczeń mogą być sprzęgane w reakcjach heteromolekularnych do oligomerów i polimerów o zmniejszonej toksyczności, unikatowych właściwościach bioaktywnych i nowych

zastosowaniach. Obecnie koncentruję się nad ustaleniem struktury barwnika ANS o działaniu antymikrobiologicznym, co ze względu na jego charakter chemiczny nie jest łatwe.

.....

(podpis wnioskodawcy)