



**Politechnika Łódzka**  
**Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska**

ul. Wólczańska 213, 93-005 Łódź

tel. 42 631 3700, fax. 42 636 5663



dr inż. Tomasz Boruta

**Załącznik 3**

**Autoreferat**

Łódź 2023

## Autoreferat

1. Imię i nazwisko: **Tomasz Boruta**

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

### 2016 **Doktor nauk technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna**

Politechnika Łódzka

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska

Tytuł rozprawy: "Metabolizm wtórny *Aspergillus terreus*: indukcja biosyntezy metabolitów, analiza bioinformatyczna oraz modelowanie w skali genomu

### 2009 **Magister inżynier biotechnologii**

Politechnika Łódzka

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności / Centrum Kształcenia Międzynarodowego

### 2009 **Master of Science, Biotechnology**

Technical University of Denmark

Department of Systems Biology

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

2018 – nadal            **Adiunkt** w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych, Katedra Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka

2016 – 2018            **Asystent**, Katedra Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka

04.2010 - 08.2010    **Biotechnolog Laboratorium Badawczego**, Finepharm S.A., Jelenia Góra

01.2010 - 04.2010    **Asystent Dyrektora ds. Produkcji**, Finepharm S.A., Jelenia Góra

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.).

## Wprowadzenie

Grzyby strzępkowe i promieniowce stanowią bogate źródło metabolitów wtórnych o znaczeniu biotechnologicznym, m.in. antybiotyków, pigmentów i substancji wykazujących działanie immunosupresyjne (Seca et al., 2019). Biosynteza tych cząsteczek nie jest bezpośrednio związana ze wzrostem i gospodarką energetyczną komórki. Obecnie uważa się, że rola metabolitów wtórnych związana jest przede wszystkim z uzyskaniem przewagi nad konkurentami w danym środowisku, a zatem posiada istotne znaczenie ekologiczne. Przykładowo, wytwarzanie antybiotyków może być postrzegane jako produkcja „broni chemicznej”, natomiast biosynteza pigmentów jako sposób uzyskania ochrony przed promieniowaniem. Większość odkrytych metabolitów nie jest jednak scharakteryzowana pod kątem ich funkcji, co stanowi niemałe wyzwanie dla nauk biologicznych (Demain i Fang, 2000). W kontekście biotechnologii przemysłowej szczególnie istotne jest izolowanie ze źródeł naturalnych nowych metabolitów wtórnych wykazujących działanie lecznicze (Carratore et al., 2022). Oporność bakterii względem dostępnych antybiotyków budzi uzasadniony niepokój i motywuje chemików do poszukiwania związków wiodących, które mogłyby stanowić podstawę do opracowania skutecznych leków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Chociaż od odkrycia penicyliny przez Alexandra Fleminga minęło już prawie 100 lat, mikroorganizmy wciąż postrzegane są jako bogate i w znacznym stopniu niezbadane źródło antybiotyków i innych cennych substancji stanowiących przedmiot zainteresowania przemysłu farmaceutycznego (Peng et al., 2021). Co więcej, biosynteza mikrobiologiczna stanowi alternatywę wobec chemicznych metod generowania nowych struktur chemicznych, np. syntezy kombinatorycznej.

Aktywacja produkcji określonego metabolitu wtórnego wymaga odpowiednich bodźców, czyli sygnałów o charakterze chemicznym lub fizycznym, które w toku ewolucji zostały powiązane z produkcją danej cząsteczki. Zapewnienie tych bodźców w warunkach laboratoryjnych nie zawsze jest możliwe. Udowodniono wielokrotnie, że standardowe procedury hodowli mikroorganizmów nie prowadzą do indukowania biosyntezy kompletnego zestawu metabolitów wtórnych znajdujących się w „katalogu biosyntetycznym” badanego drobnoustroju (Ren et al., 2017). Oznacza to, że konwencjonalne metody mikrobiologiczne nie pozwalają na pełne zrozumienie i wykorzystanie olbrzymiego potencjału ukrytego w genomach mikroorganizmów. W celu zapewnienia odpowiednich sygnałów pobudzających drobnoustroje do produkcji nieznanych dotąd metabolitów wtórnych konieczne jest nowatorskie podejście do kwestii hodowli mikroorganizmów. Jedną z najbardziej obiecujących strategii jest stosowanie kokultury, rozumianej jako celowe konfrontowanie różnych gatunków w ramach jednej hodowli (Bertrand et al., 2014). Takie postępowanie jest uzasadnione, gdyż w środowisku naturalnym

mikroorganizmy nie żyją zwykle w odosobnieniu (w monokulturze), ale wchodzą w różnego rodzaju interakcje z innymi gatunkami i dostosowują swoją maszynię metaboliczną pod tym właśnie kątem, tzn. produkują bioaktywne cząsteczki w ilościach zapewniających wywołanie pożądanej reakcji w obrębie ekosystemu (Netzker et al., 2015). Najnowsze badania wskazują, że zdolności metaboliczne mikroorganizmów ewoluują w odpowiedzi na interakcje międzygatunkowe zachodzące w środowisku (McClure et al., 2022). Prowadzenie hodowli w warunkach kokultury pozwala na laboratoryjne odwzorowanie istniejących w środowisku oddziaływań i wprowadzenie badań nad metabolizmem wtórnym na poziom ekosystemowy. Badanie efektów interakcji drobnoustrojów znajduje się w centrum zainteresowania coraz liczniejszej grupy badaczy, a metabolizm wtórny jest szczególnie interesującym aspektem tego typu prac (Molloy i Hertweck, 2017). Potencjał związany z mikrobiologiczną „pracą zespołową”, tak często obserwowaną w środowisku naturalnym i ukształtowaną w toku ewolucji, wciąż pozostaje nieodkryty. W tym kontekście szczególnie istotne jest prowadzenie badań podstawowych pod kątem scharakteryzowania przebiegu hodowli mikroorganizmów w kokulturach oraz opisanie efektów tego typu procesów w sposób nie tylko jakościowy, ale również ilościowy. Należy podkreślić, że grzyby strzępkowe oraz promieniowce hodowane w warunkach kokultury mogą prowadzić biosyntezę metabolitów, których obecności nie stwierdza się w przypadku monokultur. Przykładem jest praca dotycząca *Aspergillus fumigatus* i *Streptomyces peucetius*, z którą wiąże się odkrycie fumiformamidu (Zuck et al., 2011). Kokultura *A. fumigatus* i *Streptomyces rapamycinicus* doprowadziła z kolei do wzbudzenia biosyntezy metabolitów z grupy fumicyklin (König et al., 2013). W jednej z najnowszych prac tego typu, Ninomiya et al. (2022) opisali kokulturę grzybów strzępkowych *A. fumigatus* i *Aspergillus nidulans*, której efektem była indukcja biosyntezy metabolitów eterowych o działaniu przeciwbakteryjnym. Wykazano, że interakcje między mikroorganizmami mogą prowadzić do znacznych zmian natury ilościowej poprzez hamowanie lub pobudzenie biosyntezy metabolitów. Przykładowo, Verheecke et al. (2015) zaobserwowali, że produkcja aflatoksyn u *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* jest wyraźnie hamowana w obecności bakterii z rodzaju *Streptomyces*.

### **Uzasadnienie podjęcia badań**

Gdy zainteresowałem się tematem kokultur mikroorganizmów strzępkowych i przeprowadziłem wstępną analizę literatury w 2018 roku doszedłem do wniosku, że prace eksperymentalne dotyczące kokultur prowadzonych pod kątem indukcji biosyntezy metabolitów wtórnych skupiały się najczęściej na identyfikacji i strukturalnej charakterystyce odkrytych w ten sposób cząsteczek. Aspekty bioprocesowe hodowli zakończonych odkryciem nowych

metabolitów, np. składy pożywek i warunki prowadzenia procesu, nie były w tych pracach poddawane analizom i nie podlegały dyskusji, a temat opracowania sposobu hodowli był najczęściej traktowany jedynie jako element prac wstępnych. Było to dość zaskakujące, ponieważ w kontekście opracowania hodowli mikrobiologicznej perspektywa bioprosowa ma znaczenie wręcz fundamentalne i dotyczy to zarówno monokultur, jak i kokultur. W niektórych pracach można było znaleźć odniesienia do sposobu inicjacji kokultury, który pozwala uniknąć wyeliminowania gatunku odpowiedzialnego za produkcję danego metabolitu przez drugi, szybciej rosnący i bardziej „agresywny” mikroorganizm (Carlson et al., 2015; Ezaki et al., 1992; Luti i Mavituna 2011; Mavituna et al., 2016, Shin et al., 2018). Nie odnalazłem jednak artykułów dotyczących wpływu składu podłoża i warunków prowadzenia hodowli na produkcję metabolitów wtórnych w kokulturach mikroorganizmów strzępkowych. Dalszą motywację do podjęcia badań w tym kierunku stanowił fakt, że w opublikowanych wcześniej pracach koncentrowano się zwykle na tych cząsteczkach, które zostały właśnie odkryte, a wpływ kokultury na produkcję wielu innych metabolitów należących do repertuaru danego mikroorganizmu pozostawał niezbadany. Biorąc pod uwagę fakt, iż moja praca doktorska, dotycząca monokultur grzyba *A. terreus*, skupiała się na analizowaniu bioprodukcji całego wachlarza metabolitów wtórnych, badanie aparatu biosyntetycznego danego grzyba lub promieniowca w warunkach kokultury stanowiło interesujący kierunek badań. Co więcej, prace tego typu można było przeprowadzić nie tylko w kolbach wstrząsanych, ale również w bioreaktorach zbiornikowych z mieszadłem. W tym kontekście inspirujące były badania nad stymulującym wpływem kokultury na biosyntezę undecyloprodigiozyny u *Streptomyces coelicolor*, które przeprowadzono w 2-litrowym bioreaktorze zbiornikowym (Luti i Mavituna, 2011). Praca ta stanowiła jednak wyjątek, gdyż większość kokultur mikroorganizmów strzępkowych opracowanych pod kątem produkcji metabolitów wtórnych została przeanalizowana z wykorzystaniem kolb laboratoryjnych lub, w przypadku hodowli na podłożu stałym, na płytkach z podłożem agarowym. Z uwagi na szerokie zastosowanie bioreaktorów zbiornikowych w przemyśle biotechnologicznym podjęcie próby scharakteryzowania kokultur bioreaktorowych było w pełni uzasadnione. Istotny był również fakt, iż wiele modelowych mikroorganizmów strzępkowych o znaczeniu biotechnologicznym nie zostało wcześniej zbadanych pod kątem prowadzenia kokultur wglębnych. Do grupy tej zaliczyć można grzyby strzępkowe *A. terreus* (producenta lowastatyny, substancji obniżającej poziom cholesterolu u człowieka) i *Penicillium rubens* (producenta penicyliny, wcześniej znanego pod nazwą *Penicillium chrysogenum*) oraz promieniowce *Streptomyces rimosus* (producenta antybiotyku oksytetracykliny) i *Streptomyces noursei* (producenta nystatyny, substancji o działaniu przeciwgrzybicznym).

## Cel i zakres badań

Głównym celem przedstawionych prac było scharakteryzowanie produkcji metabolitów wtórnych w kokulturach wgłębnych wybranych mikroorganizmów strzępkowych. Dodatkowo, w niektórych artykułach przedstawiono wyniki analizy morfologicznej oraz poruszono temat zużycia tlenu i substratów węglowych przez mikroorganizmy w kokulturze. Kluczowym elementem badań było porównanie produkcji metabolitów wtórnych w warunkach mono- i kokultury.

Zakres badań obejmował hodowle mikroorganizmów w bioreaktorze zbiornikowym z mieszadłem oraz w kolbach wstrząsanych, analizę danych bioprosesowych dotyczących poziomu tlenu rozpuszczonego i szybkości zużycia substratów w hodowli bioreaktorowej, analizę metabolitów wtórnych z zastosowaniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas oraz analizę morfologii mikroorganizmów przeprowadzoną na podstawie fotografii mikroskopowych.

Przedstawiony cykl publikacji zawiera 8 tytułów, w tym 7 artykułów zawierających oryginalne wyniki eksperymentalne oraz 1 artykuł o charakterze przeglądowym.

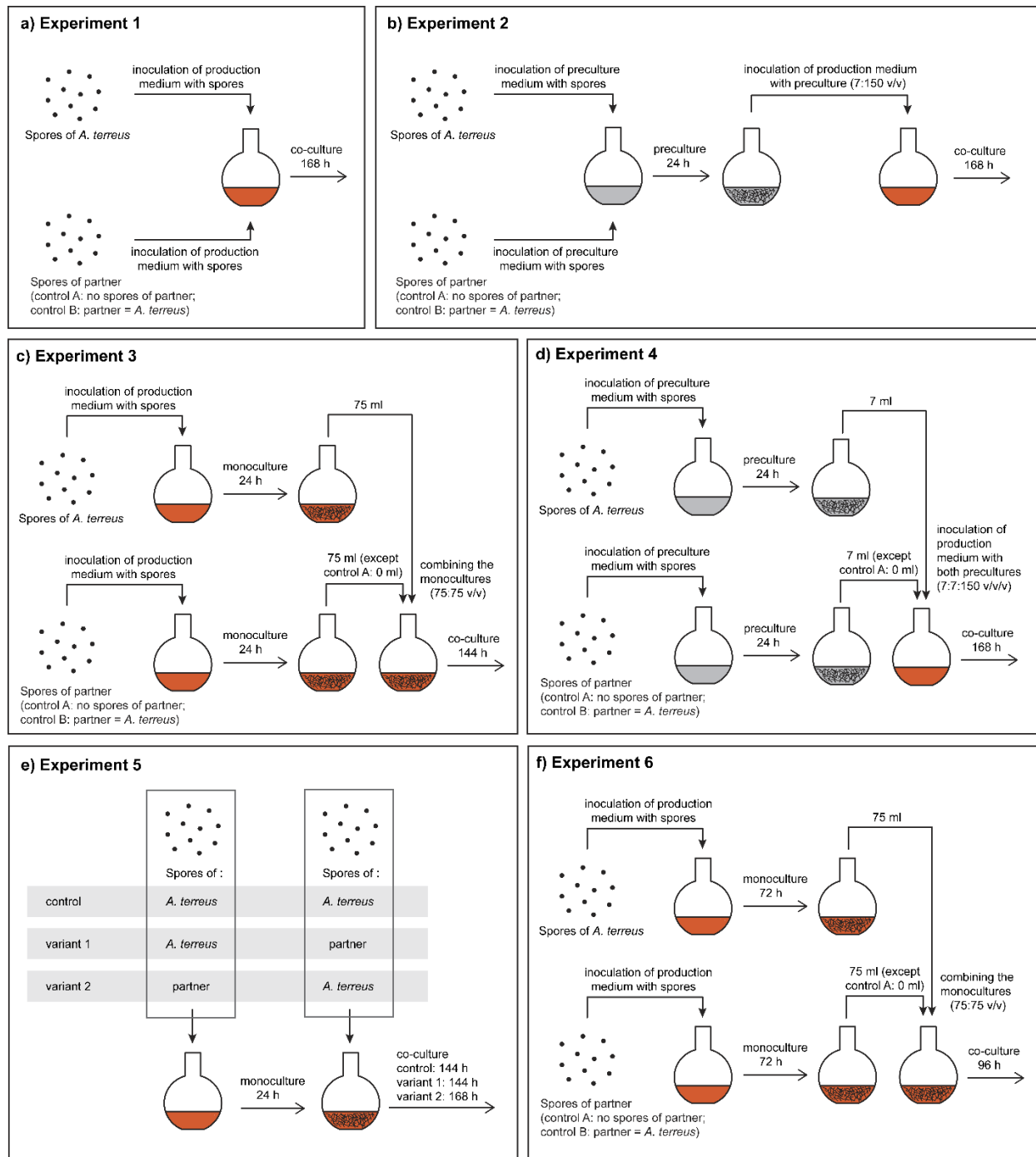
Biorąc pod uwagę sposób prowadzenia hodowli wgłębnej, wśród publikacji przedstawiających oryginalne dane eksperymentalne 4 pozycje (H1, H2, H4, H8) dotyczą badań w kolbach wstrząsanych, natomiast pozostałe 3 artykuły (H5, H6, H7) oparte są na danych uzyskanych dla kokultury prowadzonej w bioreaktorze zbiornikowym z mieszadłem.

**[H1] Boruta T., Milczarek I., Bizukojć M. (2019) Evaluating the outcomes of submerged co-cultivation: production of lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* in fungal co-cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 5593–5605**

Pierwsza z prac dotyczyła metabolizmu wtórnego grzyba strzępkowego *Aspergillus terreus* ATCC 20542, producenta substancji obniżającej poziom cholesterolu znanej jako lowastatyna. Badania przeprowadzone wcześniej w ramach mojej pracy doktorskiej zaowocowały odkryciem szerokiego repertuaru metabolitów wtórnych tego szczepu. Oprócz lowastatyny i jej prekursorów, *A. terreus* ATCC 20542 jest w stanie wytwarzać w warunkach hodowli wgłębnej metabolity biosyntezywane w obrębie szlaku oktaketydowego, takie jak (+)-geodyna i kwas astrowy, metabolity z grupy butyrolaktonów i aspulwinonów, a ponadto dihydroizoflawipucynę i terreinę (Boruta i Bizukojć, 2014; 2016). Z uwagi na moje doświadczenia dotyczące hodowli i metabolizmu wtórnego *A. terreus* ATCC 20542 w monokulturach uznałem, że szczep ten byłby odpowiednim obiektem badawczym w kontekście prowadzenia kokultur drobnoustrojów strzępkowych i właśnie na nim skupiłem się w pierwszej pracy uwzględnionej w niniejszym cyklu. Celem badań było porównanie produkcji

metabolitów wtórnych w mono- i kokulturach szczepu *A. terreus* ATCC 20542. Eksperymenty przeprowadzono w kolbach płaskodennych o całkowitej objętości 500 mL. Partnerami *A. terreus* w kokulturach były grzyby strzępkowe *Penicillium rubens* ATCC 9178, *Chaetomium globosum* ATCC 6205 i *Mucor racemosus* ATCC 7924, które wcześniej zostały zbadane w kontekście ich cech morfologicznych (Kowalska et al. 2018). Większość kokultur opisanych w artykule stanowiły hodowle 2-gatunkowe, w których jednym z grzybów był *A. terreus*. Przeprowadzono również dodatkowy eksperyment obejmujący kokulturę 4-gatunkową. W ramach pracy zaproponowano 6 odrębnych sposobów inicjowania kokultury 2-gatunkowej (rys. 1). Dla każdej kokultury prowadzono równolegle monokultury *A. terreus* jako próby kontrolne.

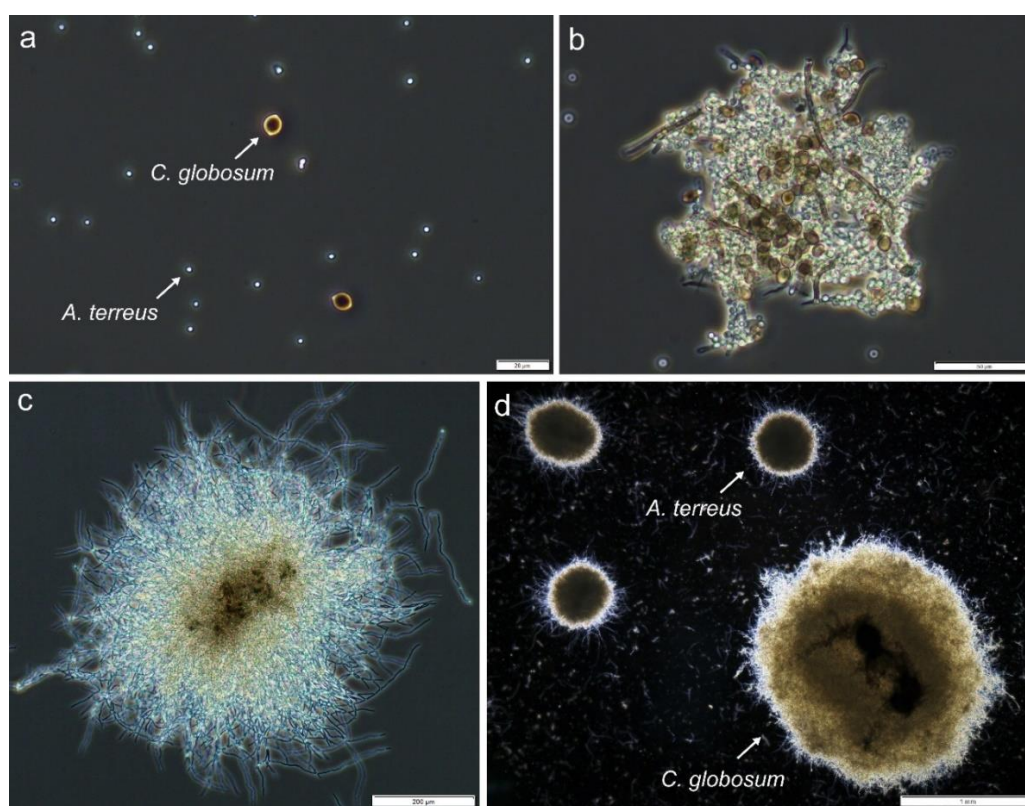
Przeprowadzono analizę ilościową 4 metabolitów wtórnych, dla których możliwy był zakup wzorców analitycznych: lowastatyny (w postaci kwasu mewinolinowego, czyli rozpuszczalnej w wodzie,  $\beta$ -hydroksykwasowej formy lowastatyny), (+)-geodyny, kwasu astrowego oraz butyrolaktonu I. Praca skupiała się wyłącznie na metabolitach wytwarzanych przez *A. terreus* ATCC 20542. Wyniki eksperymentów wyraźnie wskazywały, że poziom danego produktu zależał nie tylko od gatunku obecnego w kokulturze obok *A. terreus*, ale również od sposobu inicjacji kokultury. Nie zaobserwowano stymulacji biosyntezy lowastatyny jako efektu zastosowania kokultur zamiast monokultur, jednak zwrócono uwagę na wyraźne pobudzenie produkcji butyrolaktonu I w kokulturze *A. terreus* z grzybem *C. globosum* w wariacie inicjowanym według schematu przedstawionego na rys. 1b, czyli poprzez jednoczesne wprowadzenie spor obu mikroorganizmów do medium inokulacyjnego i poprowadzenie 24-godzinnej prekultury służącej do zaszczepienia medium produkcyjnego. Wyniki uzyskane wcześniej przez zespół Palonena (2004) wskazywały, że butyrolakton I jest częścią sygnałową zaangażowaną w proces *quorum sensing*, czyli komunikację między komórkami drobnoustrojów. Wariant „*A. terreus/C. globosum*” wyróżniał się również tym, że kokultura zainicjowana poprzez łączenie 72-godzinnych monokultur *A. terreus* i *C. globosum* charakteryzowała się wyraźnym zmniejszeniem poziomu lowastatyny w porównaniu z jej stężeniem w momencie inicjacji. Co więcej, zaobserwowano w tych kokulturach relatywnie silne sygnały (tzn. pola powierzchni piku) odpowiadające masie monakoliny J, jednego z prekursorów lowastatyny w szlaku biosyntetycznym. Zgodnie z literaturą, niektóre grzyby są źródłem enzymu katalizującego hydrolizę lowastatyny do monakoliny J (Chen et al., 2006). Zaproponowano, że obniżenie stężenia lowastatyny przy jednoczesnym wzmocnieniu sygnałów odpowiadającym monakolinie J prawdopodobnie było wynikiem aktywności enzymu wydzielanego do podłoża przez *C. globosum*.



**Rys. 1** Schemat ilustrujący metody inicjacji 2-gatunkowych kokultur, które przeprowadzono w ramach pracy H1. We wszystkich przypadkach jednym z mikroorganizmów w kokulturze był *A. terreus* ATCC 20542. Kokultury rozpoczynano na drodze jednoczesnego zaszczepienia medium produkcyjnego (a) lub inokulacyjnego (b) za pomocą spor obu mikroorganizmów. Innym sposobem inicjowania kokultur było wykorzystanie 24-godzinnych monokultur, które łączono w stosunku 1:1 v/v (c) lub wprowadzano do sterylnego medium produkcyjnego jako inokulum (d). Zgodnie ze schematem (e), do 24-godzinnej monokultury danego gatunku wprowadzano spory innego gatunku. Ostatni z zaproponowanych sposobów oparty był na połączeniu 72-godzinnych monokultur (f) [źródło: fig. 1, artykuł H1]



Kokultura „*A. terreus*/*C. globosum*” była szczególnie interesująca również w kontekście obserwacji morfologicznych. Spory grzybów *A. terreus* i *C. globosum* można z łatwością odróżnić z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego (rys. 2a), co pozwoliło zaobserwować ich wspólną aglomerację we wstępnej fazie hodowli (rys. 2b). Stwierdzono, że rdzenie peletek rozwijających się w trakcie hodowli (rys. 2c) zawierały spory obu gatunków, a aglomeracja spor miała charakter nieselektywny. W przypadku kokultur zainicjowanych przez łączenie 24-godzinnych monokultur widoczne były wyraźne różnice morfologiczne między peletkami *A. terreus*, powstałymi na bazie zaglomerowanych spor, a znacznie większymi peletkami *C. globosum*, które zwykle zawierały w swojej strukturze owocniki (perytecja) tego gatunku (rys. 2d).



**Rys. 2** Obrazy mikroskopowe (a) spor *A. terreus* i *C. globosum*, (b) aglomeratu zawierającego spory *A. terreus* i *C. globosum*, (c) peletki powstałej w kokulturze *A. terreus*/*C. globosum*, (d) peletek *A. terreus* i *C. globosum* ukształtowanych w warunkach monokultury. Skala: (a) 20  $\mu\text{m}$ , (b) 50  $\mu\text{m}$ , (c) 200  $\mu\text{m}$ , (d) 1 mm. [źródło: fig. 7, art. H1]

**Mój wkład (92%):** pomysłodawca i autor planu badań; autor hipotezy badawczej; opracowanie metod analitycznych; przeprowadzenie hodowli w kolbach wstrząsanych (współdział); przeprowadzenie analizy metabolitów wtórnych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (współdział); przeprowadzenie analizy morfologii grzybnii; przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu; poprawa manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów.

Pani inż. Iwona Milczarek brała udział w prowadzeniu hodowli i analizie metabolitów jako dyplomantka w ramach studiów magisterskich.

Prof. dr hab. inż. Marcin Bizukojć pełnił funkcję opiekuna merytorycznego, koordynatora i kierownika projektu NCN OPUS, który stanowił główne źródło finansowania badań opisanych w artykule.

**[H2] Boruta T., Marczyk A., Rychta K., Przydacz K., Bizukojć M. (2020) Confrontation between *Penicillium rubens* and *Aspergillus terreus*: Investigating the production of fungal secondary metabolites in submerged co-cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 130, 503-513**

W badaniach opisanych w artykule H2 skupiono się na wpływie składu podłoża na produkcję metabolitów wtórnych w kokulturze obejmującej 2 gatunki grzybów strzępkowych, *A. terreus* ATCC 20542 oraz *P. rubens* ATCC 28089 (inna stosowana nazwa to *P. rubens* Wisconsin 54-1255). W przeciwieństwie do eksperymentów uwzględnionych wcześniej w pracy H1, wszystkie warianty kokultury scharakteryzowane w H2 inicjowano z wykorzystaniem tej samej metody. Kolejną różnicą było przeprowadzenie analizy produkcji metabolitów nie jednego, a dwóch gatunków w kokulturze. Badania wstępne wykazały, że rozpoczęcie kokultury poprzez połączenie prekultur w stosunku objętościowym 1:1 skutkowało brakiem metabolitów *P. rubens* w brzezce hodowlanej. Powodem była całkowita „dominacja” ze strony *A. terreus*, którego biomasa rozwijała się znacznie szybciej niż biomasa *P. rubens*. Biorąc pod uwagę repertuar metabolitów wtórnych obecnych w brzezce hodowlanej, nie obserwowano w takim przypadku różnic między kokulturą i monokulturą gatunku *A. terreus*. Aby umożliwić wzrost i biosyntezę metabolitów wtórnych u obu gatunków, opracowano w ramach badań wstępnych do pracy H2 metodę polegającą na połączeniu 24-godzinnych prekultur *A. terreus* i *P. rubens* w stosunku objętościowym 1:20. Pozwoliło to uzyskać układ, w którym zachodziła biosynteza metabolitów *A. terreus*, tzn. kwasu mewinolinowego, kwasu 4a,5-dihydromewinolinowego, kwasu 3 $\alpha$ -hydroksy-3,5-dihydromonakoliny L, (+)-geodyny oraz kwasu astrowego, a jednocześnie obserwowano obecność penicyliny G i chryzoginy, cząsteczek wytwarzanych przez *P. rubens*. Praca dotyczyła porównania poziomów metabolitów uzyskanych w mono- i kokulturach prowadzonych w kolbach wstrząsanych z wykorzystaniem pożywek o zróżnicowanym składzie. W pierwszej części skupiono się na wpływie stężenia glukozy, laktozy i ekstraktu drożdżowego, w drugiej zastosowano suplementację złożonymi źródłami substancji odżywczych, tj. świeżym sokiem marchwiowym lub puree warzywno-mięsny, a w trzeciej wykorzystano podłoża różniące się pod względem stężenia kwasu fenyllooctowego. Jest on stosowany w procesach hodowlanych ukierunkowanych na wytwarzanie penicyliny G

jako cząsteczka prekursorowa, która może być wykorzystana w szlaku biosyntezy tego antybiotyku.

Zaobserwowano, że produkcja (+)-geodyny i kwasu astrowego, metabolitów oktaketydowych wytwarzanych przez *A. terreus*, uległa poprawie w kokulturze w porównaniu z monokulturą, ale jedynie w przypadku podłoża zawierającego relatywnie niewielkie stężenie ekstraktu drożdżowego, wynoszące 5 g/L. Wcześniejsze eksperymenty prowadzone w naszym laboratorium wielokrotnie potwierdzały fakt inhibicji szlaku oktaketydowego przy wyższych stężeniach ekstraktu. Można przypuszczać, że w kokulturze doszło do większego zużycia składników ekstraktu niż w monokulturze *A. terreus*, co z kolei doprowadziło do stymulacji szlaku biosyntezy (+)-geodyny i kwasu astrowego. *P. rubens* przyczynił się zatem do osiągnięcia warunków sprzyjających produkcji tych metabolitów w komórkach *A. terreus*. W przypadku pozostałych wykrytych metabolitów wtórnych nie odnotowano efektu pobudzenia biosyntezy w warunkach kokultury. Interesujące spostrzeżenia pojawiły w eksperymencie dotyczącym wpływu stężenia kwasu fenylooctowego na produkcję metabolitów. Obecność w podłożu tego prekursora zadziałała stymulująco na biosyntezę penicyliny G przez *P. rubens*, ale jedynie w przypadku monokultury. W kokulturze odnotowano niskie poziomy penicyliny G mimo suplementacji kwasem fenylooctowym. Wykorzystanie prekursora w kokulturze mogło ulec zablokowaniu z różnych powodów. Pierwszy z nich to większe zużycie substancji odżywczych w kokulturze w porównaniu z monokulturą. Poziom tych substancji w kokulturze mógł być na tyle niski, że wykorzystanie kwasu fenylooctowego w celu produkcji penicyliny G nie było możliwe. Nie można również wykluczyć, że *A. terreus* wykazywał zdolności metabolizowania kwasu fenylooctowego, uniemożliwiając tym samym jego wykorzystanie przez *P. rubens*, lub w pewien sposób blokował jego transport do komórek *P. rubens*. Uwagi te należy jednak traktować jako przypuszczenia, bowiem mechanizm zablokowania wykorzystania kwasu fenylooctowego przez *P. rubens* w kokulturze nie został wyjaśniony. Warto zauważyć, że zwiększenie stężenia kwasu fenylooctowego wpływało negatywnie na produkcję kwasu mewinolinowego przez *A. terreus*, ale zależność taka była widoczna jedynie w przypadku monokultury.

**Mój wkład (79%):** pomysłodawca i autor planu badań; autor hipotezy badawczej; przeprowadzenie hodowli w kolbach wstrząsanych (współdział); opracowanie metod analitycznych; przeprowadzenie analizy metabolitów wtórnych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (współdział); przeprowadzenie analizy morfologii grzybni; przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu; poprawa manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów (współdział).

Panie Anna Marczyk, Katarzyna Rychta i Karolina Przydacz brały udział w prowadzeniu hodowli i analizie metabolitów jako dyplomantki w ramach studiów inżynierskich. Tematem pracy dyplomowej był wpływ źródeł węgla (A. Marczyk), źródeł azotu (K. Rychta) oraz kwasu fenylooctowego (K. Przydacz) na produkcję metabolitów wtórnych w kokulturze *A. terreus* i *P. rubens*.

Prof. dr hab. inż. Marcin Bizukojć pełnił funkcję opiekuna merytorycznego, koordynatora i kierownika projektu NCN OPUS, który stanowił główne źródło finansowania badań opisanych w artykule. Uczestniczył również w korekcie manuskryptu w odpowiedzi na uwagi recenzentów.

**[H3] Boruta T. (2021) A bioprocess perspective on the production of secondary metabolites by *Streptomyces* in submerged co-cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 171**

Artykuły H1 i H2 dotyczyły kokultur grzybów strzępkowych. Artykuł przeglądowy H3 również dotyczył kokultur mikroorganizmów strzępkowych, jednak skupiono się w nim na hodowlach obejmujących promieniowce z rodzaju *Streptomyces*. Jest to rodzaj kojarzony przede wszystkim z wyjątkowo bogatym repertuarem antybiotyków, zarówno tych dobrze scharakteryzowanych i stosowanych w medycynie, jak i tych wciąż nieodkrytych. Artykuł H2 może być traktowany jako wstęp do badań opisanych w publikacjach H4 - H8, w których skupiono się głównie na kokulturach wglębnych typu „promieniowiec/grzyb strzępkowy”.

Zwrócono uwagę na fakt, iż opisane w literaturze kokultury promieniowców były zróżnicowane pod względem zastosowanej aparatury, skali procesu, składu podłoża, warunków prowadzenia hodowli oraz, co szczególnie istotne, sposobu inicjowania kokultury. Prowadzenie kokultur traktowano w tych pracach jak sposób „obudzenia” biosyntezy nieznanego wcześniej metabolitu wtórnego, a warunki prowadzenia hodowli nie zawsze były potraktowane z należytą uwagą. Warto podkreślić, że produkcja metabolitów wtórnych zachodzi w odpowiedzi na ściśle określone sygnały związane np. z dostępnością źródeł węgla, azotu, fosforu i innych pierwiastków, poziomem pH, temperaturą, światłem, stresem komórkowym itd. W tym kontekście, obecność innych mikroorganizmów nie jest jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za uruchomienie szlaku biosyntezy danego metabolitu. Przykładowo, aktywacja „uśpionego” szlaku biosyntezy danego metabolitu w kokulturze może być zahamowana np. z powodu niesprzyjającego stężenia jednego z substratów lub zmian morfologicznych, a nie z powodu braku stymulacji związanej z obecnością innego gatunku. Z tego względu, w pracy przeglądowej H3 skupiono się na aspektach bioprocessowych kokultur, a nie na strukturze

chemicznej metabolitów odkrytych dzięki zastosowaniu tego typu hodowli. Szczególną uwagę poświęcono uporządkowaniu informacji na temat sposobów inicjacji kokultur. Zaproponowano pewne kryteria, według których można pogrupować opisane w literaturze metody rozpoczęcia kokultury. Kryteria te dotyczyły m.in. stadium rozwojowego każdego z mikroorganizmów („Wykorzystano spory czy komórki wegetatywne?”), schematu inokulacji („Czy zaszczerpiono wybraną objętość sterylnego podłoża czy zdecydowano się na połączenie prekultury w określonym stosunku objętościowym?”) oraz techniki wprowadzenia mikroorganizmów do kokultury („Czy komórki wegetatywne były wprowadzone do układu wraz z podłożem hodowlanym z prekultury czy zostały odseparowane od podłoża hodowanego i zawieszono w roztworze soli fizjologicznej?”). Zwrócono uwagę na fakt, że dominującą techniką było połączenie prekultury, czyli zastosowanie komórek wegetatywnych do inokulacji, a wykorzystanie spor w celu zaszczerpienia kokultury było rzadkością. W niektórych pracach autorzy opisali trudności związane z różnymi szybkościami wzrostu wybranych szczepów i „zdominowaniem” wolniej rosnącego i mniej „agresywnego” mikroorganizmu przez szybciej rosnący szczep. W tym celu stosowali odpowiednio dobrane proporcje prekultury, zapewniające przetrwanie szczepu-producenta w kokulturze. Były to jednak przypadki nieczęste, gdyż w większości prac satysfakcjonujące wyniki osiągnęto przy połączeniu prekultury w stosunku objętościowym 1:1. Co ciekawe, jedynie Luti i Mavituna (2011) opisali wykorzystanie bioreaktora zbiornikowego z mieszadłem pod kątem produkcji metabolitów wtórnych w kokulturach promieniowców z rodzaju *Streptomyces* (wykorzystali gatunek *Streptomyces coelicolor*). Pozostałe prace opierały się na hodowlach w kolbach laboratoryjnych, zwykle przy objętościach roboczych nie większych niż 1 L. Dodatkowo, opisane w literaturze eksperymenty dotyczyły najczęściej jedynie wybranego metabolitu docelowego, nie skupiały się natomiast na scharakteryzowaniu szerokiej gamy metabolitów wtórnych powstających w warunkach kokultury. Spostrzeżenia te były pod uwagę podczas planowania badań dotyczących kokultur promieniowców, których opisy uwzględniono w niniejszym cyklu (artykuły H4 – H8).

**[H4] Boruta T., Ścigaczewska A. (2021) Enhanced oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in submerged co-cultures with *Streptomyces noursei*. *Molecules* 26, 6036**

*Streptomyces rimosus* jest promieniowcem wykorzystywanym w biotechnologii pod kątem produkcji oksytetracykliny, antybiotyku stosowanego np. w leczeniu trądziku. Gatunek ten jest również źródłem innych metabolitów wtórnych, m.in. związków z grupy rymocydyn i rymosamidów (Slemc et al., 2022). W pracy H4 zbadano możliwość wykorzystania kokultury wgłębnej w celu stymulacji biosyntezy oksytetracykliny u *S. rimosus*. Przeprowadzono

kokultury 2-gatunkowe obejmujące *S. rimosus* oraz jeden z następujących mikroorganizmów strzępkowych: *Streptomyces noursei*, *Penicillium rubens*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum* lub *Mucor racemosus*. Grzyby strzępkowe *P. rubens*, *C. globosum* oraz *M. racemosus* zostały wcześniej wykorzystane w badaniach dotyczących kokultur (artykuł H2), *A. niger* został wybrany jako dobrze scharakteryzowany, modelowy mikroorganizm strzępkowy, natomiast *S. noursei* wybrano, aby uwzględnić w pracy nie tylko kokultury typu „promieniowiec/grzyb”, ale również zbadać wariant „promieniowiec/promieniowiec”. Kokultury inicjowano z wykorzystaniem zawiesiny spor, a hodowle prowadzone były w kolbach wstrząsanych. Analiza polegała nie tylko na oznaczeniu oksytetracykliny, ale również na zbadaniu poziomu glukozy, wartości pH, parametrów morfologicznych (poła powierzchni rzutu, wydłużenia, szorstkości i tzw. liczby morfologii) oraz pól powierzchni pików reprezentujących metabolity zidentyfikowane jako rymocydyna oraz desferrioksamina E. Kokultura „*S. rimosus/S.noursei*” charakteryzowała się wyraźną poprawą produkcji oksytetracykliny w porównaniu z hodowlą kontrolną, czyli monokulturą *S. rimosus*. Średnie stężenie oksytetracykliny (obliczone na podstawie wyników z 3 niezależnych hodowli) w kokulturze *S. rimosus* z *S. noursei* było 2,9-krotnie wyższe niż wartość odnotowana dla monokultury *S. rimosus*. Zauważono również, że w przypadku kokultury „*S. rimosus/M. racemosus*” stężenie oksytetracykliny w 48 h procesu było wyraźnie niższe niż w innych analizowanych wariantach, ale w kolejnych dniach nie zaobserwowano już takich różnic. W drugiej części pracy skupiono się jedynie na kokulturze „*S. rimosus/S. noursei*”. Przeprowadzono hodowle z wykorzystaniem różnych sposobów inicjacji kokultur, aby sprawdzić, czy efekt stymulacji biosyntezy oksytetracykliny utrzyma się niezależnie od wybranej strategii rozpoczęcia hodowli. Wyniki wyraźnie wskazywały, że intensyfikacja biosyntezy oksytetracykliny miała miejsce jedynie w wariantach inokulacyjnych „spory *S. rimosus*/spory *S. noursei*” oraz „prekultura *S. rimosus*/spory *S. noursei*”. Nie obserwowano efektu pobudzenia produkcji oksytetracykliny w kokulturach, w przypadku których *S. noursei* wprowadzony był do podłoża w postaci prekultur. Należy zaznaczyć, iż analiza ilościowa parametrów morfologicznych nie wskazywała na to, aby efekt poprawy produkcji oksytetracykliny w kokulturach „*S. rimosus/S. noursei*” był związany z wystąpieniem szczególnych cech morfologicznych promieniowców w tych wariantach. Nie zauważono bowiem, aby kokultury te wyróżniały się pod względem morfologicznym na tle innych hodowli.

<b>Mój wkład (85%):</b> pomysłodawca i autor planu badań; autor hipotezy badawczej; przeprowadzenie hodowli w kolbach wstrząsanych (współudział); opracowanie metod analitycznych; przeprowadzenie analizy metabolitów wtórnych z wykorzystaniem
--

chromatografii cieczowej i spektrometrii mas; przeprowadzenie obserwacji mikroskopowych; przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu; poprawa manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów.

Dr inż. Anna Ścigaczewska wykonała ilościową analizę morfologiczną (obliczenie wartości parametrów morfologicznych na podstawie fotografii mikroskopowych), uczestniczyła w prowadzeniu niektórych hodowli.

**[H5] Boruta T., Ścigaczewska A., Bizukojć M. (2021) “Microbial wars” in a stirred tank bioreactor: Investigating the co-cultures of *Streptomyces rimosus* and *Aspergillus terreus*, filamentous microorganisms equipped with a rich arsenal of secondary metabolites. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9, 713639**

Artykuł H5 dotyczył produkcji metabolitów wtórnych przez *A. terreus* i *S. rimosus* w kokulturze prowadzonej w bioreaktorze zbiornikowym z mieszadłem. Zakres pracy znacznie przekraczał analizę biosyntezy kwasu mewinolinowego (lowastatyny) i oksytetracykliny, eksperymenty dotyczyły szerokiego repertuaru metabolitów wytwarzanych przez te mikroorganizmy. Przeanalizowano produkcję ponad 40 metabolitów wtórnych, dokonano analiz poziomu tlenu rozpuszczonego oraz stężenia i szybkości zużycia źródeł węgla. Zgodnie z wiedzą autora wniosku była to pierwsza praca stanowiąca szczegółowy opis produkcji metabolitów wtórnych w kokulturze bioreaktorowej typu „grzyb strzępkowy/promieniowiec”. W ramach pracy wykonano 9 eksperymentów, w każdym z nich prowadzono równolegle 3 hodowle: monokulturę *A. terreus*, monokulturę *S. rimosus* oraz kokulturę „*A. terreus/S. rimosus*”. Jednoczesne wykorzystanie 3 bioreaktorów 5,5-litrowych (Biostat B, Sartorius, Niemcy) pozwoliło na przeprowadzenie analizy porównawczej między produkcją metabolitów kokulturze i dwóch monokulturach. Poszczególne eksperymenty różniły się pod kątem sposobu inicjacji kokultury oraz wybranego podłoża hodowlanego, jednakże w ramach danego eksperymentu stosowano ściśle określony sposób inokulacji i skład podłoża dla wszystkich 3 prowadzonych równolegle hodowli. Zatem, każdy eksperyment stanowił odrębną analizę porównawczą między monokulturami i kokulturą, dzięki której możliwe było zaobserwowanie efektów metabolicznych związanych z obecnością drugiego mikroorganizmu. Wiele uwagi poświęcono identyfikacji metabolitów wtórnych na podstawie widm masowych i literatury, co stanowiło niemałe wyzwanie ze względu na brak dostępności wzorców analitycznych dla większości cząsteczek wykrytych wcześniej u *A. terreus* i *S. rimosus*. Problem ten nie dotyczył najważniejszych produktów tych mikroorganizmów, czyli kwasu mewinolinowego (lowastatyny) i oksytetracykliny, dla których możliwe było wykonanie

krzywych standardowych i określenie stężenia. Potwierdzenie tożsamości metabolitów na podstawie standardów było również możliwe dla (+)-geodyny i butyrolaktonu I, metabolitów wytwarzanych przez *A. terreus*. Pozostałe związki zostały wstępnie zidentyfikowane na podstawie zgodności eksperymentalnej wartości  $m/z$  z wartością teoretyczną, a ich produkcja była analizowana półilościowo w oparciu o pola powierzchni pików odpowiadających jonom  $[M-H]^-$  lub  $[M+H]^+$  tych cząsteczek. W procesie identyfikacji brano również pod uwagę, czy proponowany metabolit był wcześniej potwierdzony u przedstawicieli rodzaju *Aspergillus* (w przypadku analizy metabolitów *A. terreus*) lub *Streptomyces* (w przypadku cząsteczek z repertuaru *S. rimosus*). Podczas prób identyfikacji wykorzystywano specjalistyczne bazy danych, takie jak Antibase (Laatsch, 2014) oraz Natural Products Atlas (van Santen et al., 2021), oraz szczegółowo analizowano literaturę dotyczącą metabolizmu wtórnego promieniowców i grzybów strzępkowych. W podłożach wykryto cząsteczki należące do grupy rymocydyn oraz metabolity zidentyfikowane jako milbemycyny. Uzyskane widma masowe wskazywały również na obecność modyfikowanych (utlenionych) form rymocydyn i milbemycyn, ale te modyfikowane związki wykryto jedynie w kokulturach. Nie zostało wyjaśnione czy ich obecność była efektem aktywacji szlaków metabolicznych uśpionych w warunkach monokultury, czy raczej doszło do biotransformacji z wykorzystaniem enzymów wydzielanych do podłoża przez *A. terreus*. Przykładowo, rymocydyna wykazuje działanie przeciwgrzybicze. Enzymatyczna modyfikacja tej cząsteczki do formy utlenionej może być więc interpretowana jako sposób obrony grzyba *A. terreus* przed „bronią chemiczną” biosyntezowaną przez promieniowca. Przypuszczenia te nie zostały jednak poddane weryfikacji.

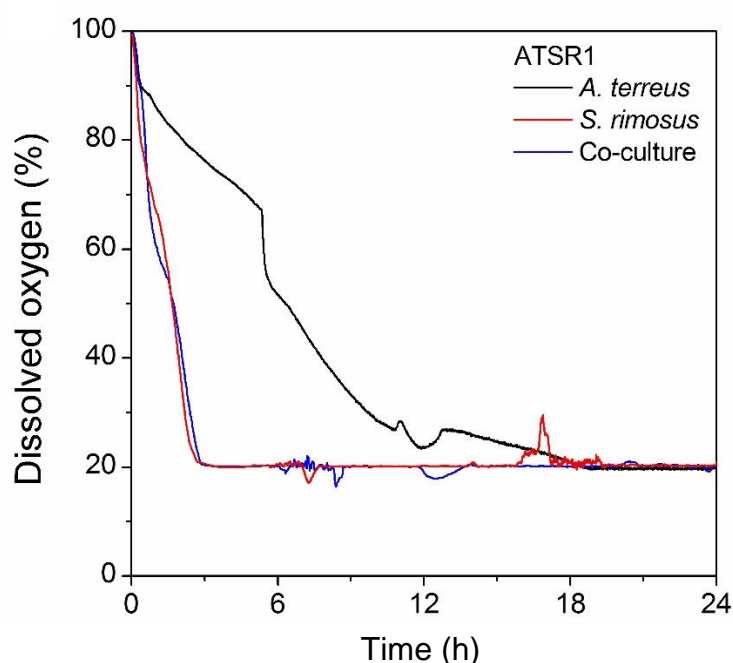
Badania wykazały, iż różnice między monokulturami i kokulturami zależne są od sposobu inicjacji kokultury i składu podłoża. Istotna obserwacja dotyczyła „dominacji” *S. rimosus* nad *A. terreus* w kokulturach. Gdy organizmy te zostały wprowadzone do bioreaktora w tym samym czasie i w tym samym stadium rozwoju (tzn. w formie spor lub prekultury), biomasa *S. rimosus* namnażała się znacznie szybciej niż biomasa *A. terreus*, co prowadziło do blokowania wzrostu *A. terreus* i produkcji jego metabolitów. Co ciekawe, „zdominowany” grzyb *A. terreus* nadal miał wpływ na zdolności produkcyjne „dominującego” promieniowca *S. rimosus*, a kokultury nie można było uznać za tożsamą z monokulturą *S. rimosus* pod względem szybkości zużycia substratów i profili produkcji metabolitów wtórnych.

Jeden z eksperymentów przeprowadzono w taki sposób, aby umożliwić rozwój biomasy *A. terreus* przed konfrontacją z promieniowcem. Przeprowadzono w bioreaktorze 24-godziną monokulturę *A. terreus*, do której następnie wprowadzono prekulturę *S. rimosus*. Wyniki wskazywały, że w tym przypadku to promieniowiec przyjął rolę mikroorganizmu „zdominowanego”, a jego metabolity wtórne były wykrywalne jedynie w śladowych ilościach



lub niewykrywalne. Odnotowano również, że taki sposób rozpoczęcia kokultury pozwolił na poprawę produkcji niektórych metabolitów *A. terreus* w porównaniu z monokulturą, przy jednoczesnym hamowaniu szlaku oktaketydowego będącego źródłem (+)-geodyny.

W ramach pracy stwierdzono, iż monitorowanie profili tlenu rozpuszczonego w pierwszej dobie hodowli pozwala stwierdzić, który z mikroorganizmów przyjął dominującą rolę w kokulturze. Obserwacja ta wynikała z faktu pokrywania się profilu tlenu rozpuszczonego w kokulturze z profilem widocznym w przypadku monokultury szybciej rosnącego, bardziej „agresywnego” szczepu (rys. 3). Jest to szybka i wygodna metoda, która nie wymaga analizy poziomów metabolitów wtórnych w płynie hodowlanym. W przypadku braku podobieństwa profilu tlenu w mono- i kulturach można spodziewać się braku widocznej „dominacji” jednego ze szczepów, co również należy traktować jako cenną obserwację dotyczącą danej kokultury.



**Rys. 3** Zmiany poziomu tlenu rozpuszczonego w monokulturze grzyba *A. terreus* (czarna linia), monokulturze promieniowca *S. rimosus* (czerwona linia) oraz kokulturze *A. terreus/S. rimosus* (niebieska linia). Na wykresie przedstawiono wartości uzyskane w ramach eksperymentu, w którym kokultura i obie monokultury zaszczepiono jednocześnie za pomocą prekultur. Hodowle prowadzono w 5,5-litrowym bioreaktorze zbiornikowym z mieszadłem. Podobieństwo profilu uzyskanego dla kokultury oraz monokultury *S. rimosus* wskazywało, że wzrost *A. terreus* w kokulturze był zahamowany, a *S. rimosus* był mikroorganizmem „dominującym”. Obserwacje te zostały później potwierdzone na podstawie wyników analizy produkcji metabolitów wtórnych [źródło: fig. 11a, artykuł H5].

**Mój wkład (75%):** pomysłodawca badań; autor planu badań (współudział); autor hipotezy badawczej; przeprowadzenie hodowli w bioreaktorach (współudział); opracowanie metod analitycznych; przeprowadzenie analizy metabolitów wtórnych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (współudział); przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu (współudział); poprawa manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów (współudział).

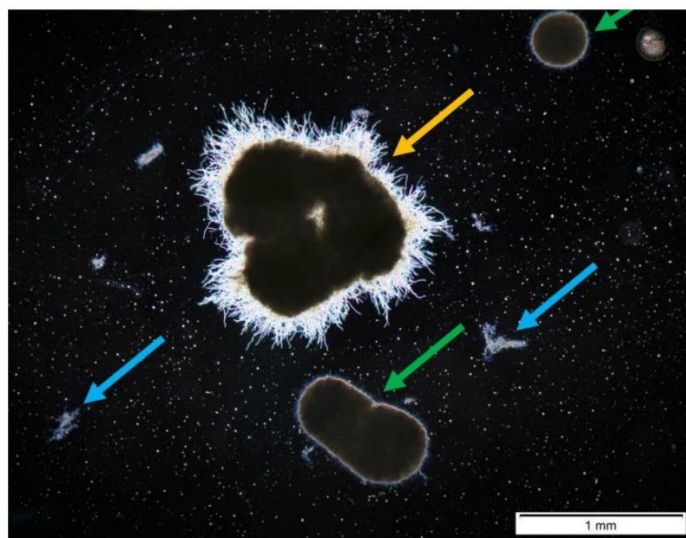
Dr inż. Anna Ścigaczewska brała udział w prowadzeniu hodowli bioreaktorowych, przeprowadziła analizę stężenia cukrów z wykorzystaniem chromatografii cieczowej, uczestniczyła w poprawie manuskryptu.

Prof. dr hab. inż. Marcin Bizukojć pełnił funkcję opiekuna merytorycznego, koordynatora i kierownika projektu NCN OPUS, który stanowił źródło finansowania badań opisanych w artykule. Brał udział w opracowaniu planu badawczego, prowadzeniu hodowli bioreaktorowych, analizie metabolitów wtórnych, przygotowaniu pierwszej oraz poprawionej wersji manuskryptu.

**[H6] Ścigaczewska A., Boruta T., Bizukojć M. (2021) Quantitative morphological analysis of filamentous microorganisms in cocultures and monocultures: *Aspergillus terreus* and *Streptomyces rimosus* warfare in bioreactors. *Biomolecules* 11, 1740**

Praca H6 stanowiła kontynuację rozważań opisanych wcześniej w artykule H5 i oparta była na danych uzyskanych w ramach tych samych 9-ciu eksperymentów bioreaktorowych. Przedstawiono w niej wyniki analizy ilościowej dotyczącej parametrów morfologicznych (pola powierzchni rzutu, wydłużenia i tzw. liczby morfologii) uzyskanych w kokulturach i monokulturach obejmujących promieniowca *S. rimosus* i grzyba strzępkowego *A. terreus*. Wyznaczenie wartości parametrów odbywało się na podstawie fotografii mikroskopowych, które wykonywano co 24 h w trakcie każdego procesu bioreaktorowego (rys. 4).

Fotografie mikroskopowe były analizowane z wykorzystaniem oprogramowania umożliwiającego przeprowadzenie cyfrowej analizy obrazu. W skrócie, spostrzeżenia wynikające z analizy morfologicznej były zgodne z wnioskami przedstawionymi wcześniej w artykule H5, jeśli chodzi o efekt „dominacji” *S. rimosus* w kokulturach rozpoczętych z wykorzystaniem jednoczesnej inokulacji oraz „dominacji” *A. terreus* w przypadku opóźnionej o 24 h inokulacji promieniowca. Wyniki wskazywały, że sposób inicjowania kokultury wpływał na morfologię silniej niż zmiany składu podłoża. Zmiany te dotyczyły rodzaju i stężenia cukrów (glukozy, laktozy) oraz źródeł azotu (ekstraktu drożdżowego, siarczanu amonu).



**Rys. 4** Przykład obrazu mikroskopowego uzyskanego dla bioreaktorowej kokultury *A. terreus* i *S. rimosus* w 24 h procesu. Kokultura była zainicjowana poprzez jednoczesne wprowadzenie do bioreaktora prekultur *A. terreus* i *S. rimosus*. Prekultury te były 24-godzinnymi monokulturami prowadzonymi w kolbach wstrząsanych. Na fotografii widoczna jest peletka *A. terreus* (zaznaczona za pomocą pomarańczowej strzałki), peletki *S. rimosus* (zielone strzałki) oraz strzępki i formy typu *clump* (agregaty strzępek), których przyporządkowanie do danego gatunku nie było możliwe (niebieskie strzałki) [źródło: fig. 1, art. H6]

Na podstawie wyników prac H5 oraz H6 stwierdzono, że produkcja metabolitów wtórnych w kokulturze *A. terreus* i *S. rimosus* wyraźnie różniła się od tej zachodzącej w monokulturach, co wynikało nie tylko z interakcji natury chemicznej, ale również ze zmian morfologicznych. Fakt, iż biosynteza metabolitów wtórnych u grzybów i promieniowców jest ściśle związana z cechami morfologicznymi tych mikroorganizmów leży u podstaw podejścia znanego jako inżynieria morfologiczna. Zgodnie z jej zasadami, kontrola rozwoju morfologicznego danego drobnoustroju jest kluczem do poprawy jego zdolności produkcyjnych. Problem w tym, że związek między preferowaną formą morfologiczną i produktem docelowym należy rozpatrywać indywidualnie dla każdego przypadku, wszelkie uogólnienia są wysoce niewskazane. Co więcej, całkowita kontrola morfologii w warunkach wglębnych pozostaje niezwykle ambitnym i trudnym do osiągnięcia celem. Niemniej, w pracy H6 pojawiła się sugestia, iż prowadzenie kokultur mikroorganizmów może być, przy pewnych założeniach, zaliczone do technik inżynierii morfologii jako sposób wpływania na charakterystykę morfologiczną. Sugestia ta może być przedmiotem uzasadnionej krytyki, gdyż obecnie nie jest możliwe poprowadzenie kokultury w sposób pozwalający na kontrolowanie zmian morfologicznych zachodzących w obrębie hodowli. Nie można jednak wykluczyć, że rozwój wiedzy bioprocessowej na temat kokultur umożliwi takie działania w przyszłości.

**Mój wkład (40%):** pomysłodawca i autor planu badań (współudział); autor hipotezy badawczej (współudział); przeprowadzenie hodowli w kolbach wstrząsanych (współudział); opracowanie metod analitycznych (współudział); przeprowadzenie analizy metabolitów wtórnych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas.

Dr inż. Anna Ścigaczewska brała udział w opracowaniu koncepcji, planu badań oraz hipotezy badawczej, uczestniczyła w prowadzeniu hodowli. Przeprowadziła również analizę morfologiczną oraz przygotowała manuskrypt.

Prof. dr hab. inż. Marcin Bizukojć pełnił funkcję opiekuna merytorycznego, koordynatora i kierownika projektu NCN OPUS, który stanowił źródło finansowania badań opisanych w artykule. Był jednym z twórców koncepcji, planu badań, hipotezy badawczej, brał udział w prowadzeniu hodowli.

**[H7] Boruta T., Ścigaczewska A., Bizukojć M. (2022) Production of secondary metabolites in stirred tank bioreactor co-cultures of *Streptomyces noursei* and *Aspergillus terreus*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10, 1011220**

Praca H7 dotyczyła bioreaktorowych kokultur grzyba *A. terreus* z promieniowcem *Streptomyces noursei*. Wśród metabolitów wtórnych *S. noursei* znaleźć można m.in. nystatynę, związek o działaniu przeciwgrzybiczym. Badania prowadzono w ramach 6 eksperymentów, w każdym z nich wykorzystano 3 bioreaktory zbiornikowe z mieszadłem, zgodnie z koncepcją opracowaną wcześniej w pracy H5. W ramach hodowli wykorzystano różne sposoby inicjacji kokultury: (1) za pomocą zawiesin spor obu szczepów, wprowadzanych jednocześnie do bioreaktora, (2) za pomocą prekultur, jednocześnie wprowadzanych do bioreaktora lub (3) za pomocą prekultur, które były wprowadzane do bioreaktora z 24-godzinnym odstępem czasowym (jeden mikroorganizm rozwijał się przez 24 h w bioreaktorowej monokulturze, a następnie do bioreaktora wprowadzano prekulturę drugiego mikroorganizmu). Dodatkowo, w badaniach zastosowano 2 składy podłoża, tj. (1) zawierające glukozę i laktozę oraz (2) zawierające jedynie laktozę jako źródło węgla.

W ramach badań zidentyfikowano 50 metabolitów wtórnych. Dla każdego z nich przygotowano wykres ilustrujący poziomy metabolitu w płynie hodowlanym w kolejnych dniach procesu. W treści artykułu skupiono się przede wszystkim na opisie metabolitów, w przypadku których kokultura zadziałała stymulująco na ich produkcję w porównaniu z monokulturą. Do tej grupy zaliczały się m.in. butyrolakton I oraz desferrioksamina E. Podobnie, jak w przypadku pracy H5, artykuł H7 zawierał szczegółowe opisy dotyczące zmian stężenia tlenu rozpuszczonego oraz szybkości zużycia źródeł węgla. Podkreślono istotne różnice

między kokulturą „*A. terreus/S. noursei*” i, opisaną wcześniej w artykułach H5 i H6, kokulturą „*A. terreus/S. rimosus*”. W pierwszym przypadku jedynie *A. terreus* był w stanie metabolizować laktozę, natomiast w drugim oba mikroorganizmy wykazywały taką zdolność. Zatem, w kokulturze „*A. terreus/S. noursei*” zmiany stężenia laktozy w trakcie hodowli mogły być wykorzystane jako wskaźnik wzrostu *A. terreus* w kokulturze. Zwrócono uwagę, iż wykorzystane substratów katabolizowanych tylko przez wybrane szczepy wchodzące w skład kokultury jest jednym ze sposobów pozwalających ocenić aktywność tych szczepów, obok monitorowania produkcji metabolitów wtórnych lub profili tlenu rozpuszczonego. Drugą istotną różnicą między kokulturami „*A. terreus/S. noursei*” i „*A. terreus/S. rimosus*” był fakt, iż jedynie w przypadku pierwszej pary uzyskano system, w którym potwierdzono produkcję metabolitów wtórnych pochodzących od obu mikroorganizmów. Oznacza to, że w jednej z badanych kokultur „*A. terreus/S. noursei*” nie powtórzył się scenariusz wyraźnej „dominacji” jednego ze szczepów. W przypadku wszystkich analizowanych kokultur „*A. terreus/ S. rimosus*” produkcja metabolitów jednego z mikroorganizmów była praktycznie zablokowana, wykrywano jedynie śladowe ilości niektórych związków z tej grupy.

**Mój wkład (75%):** pomysłodawca badań; autor planu badań (współdział); autor hipotezy badawczej; przeprowadzenie hodowli w bioreaktorach (współdział); opracowanie metod analitycznych; przeprowadzenie analizy metabolitów wtórnych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (współdział); przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu (współdział); poprawa manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów (współdział).

Dr inż. Anna Ścigaczewska brała udział w prowadzeniu hodowli bioreaktorowych, przeprowadziła analizę stężenia cukrów z wykorzystaniem chromatografii cieczowej, uczestniczyła w poprawie manuskryptu.

Prof. dr hab. inż. Marcin Bizukojć pełnił funkcję opiekuna merytorycznego, koordynatora i kierownika projektu NCN OPUS, który stanowił źródło finansowania badań opisanych w artykule. Brał udział w opracowaniu planu badawczego, prowadzeniu hodowli bioreaktorowych, analizie metabolitów wtórnych, przygotowaniu pierwszej oraz poprawionej wersji manuskryptu.

[H8] Boruta T., Anteck A. (2022) Co-cultivation of filamentous microorganisms in the presence of aluminum oxide microparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 106, 5459–5477

Ostatnia praca dotyczy połączenia dwóch metod stosowanych w celu stymulacji metabolizmu wtórnego u mikroorganizmów strzępkowych, tj. hodowli w obecności mikrocząstek mineralnych (ang. *microparticle-enhanced cultivation*, MPEC) oraz hodowli w warunkach kokultury. MPEC jest techniką inżynierii morfologii polegającą na wymuszaniu zmian morfologicznych poprzez dodawanie do podłoża mikrocząstek mineralnych, np. tlenku glinu lub talku. W pracy H8 wykorzystano podłoża zawierające tlenek glinu jako mikroproszek powodujący zmiany morfologiczne u mikroorganizmów strzępkowych. Badania obejmowały 3 eksperymenty w kolbach wstrząsanych, dotyczące odpowiednio kokultury „*A. terreus*/*P. rubens*”, „*A. terreus*/*S. rimosus*” oraz „*A. terreus*/*Cerrena unicolor*”. Grzyb *C. unicolor*, należący do *Basidiomycetes*, jest producentem lakazy (EC 1.10.3.2), enzymu katalizującego utlenianie szerokiej gamy cząsteczek, np. związków fenolowych i amin aromatycznych. W pracy H8 analizowano poziomy wybranych metabolitów wtórnych w brzezce hodowlanej, zużycie źródła węgla oraz wartości parametrów morfologicznych (pola powierzchni rzutu, wydłużenia i szorstkości). W badaniach uwzględniono liczne hodowle kontrolne, a kompletny zestaw wariantów dla każdej badanej pary mikroorganizmów był następujący: kokultura z proszkiem/bez proszku, monokultura grzyba *A. terreus* z proszkiem/bez proszku oraz monokultura drugiego mikroorganizmu z proszkiem/bez proszku. Wyniki eksperymentów wskazywały, iż efekt metaboliczny związany z obecnością tlenku glinu może mieć zupełnie inny charakter w przypadku mono- i kokultury, nawet w przypadku wyraźniej „dominacji” jednego z mikroorganizmów. Przykładem była biosynteza oksytetracykliny. Gdy porównano monokultury *S. rimosus* prowadzone z proszkiem i bez proszku, nie zauważono statystycznie znaczących różnic stężenia oksytetracykliny. W przypadku kokultury „*S. rimosus*/*A. terreus*” wpływ obecności proszku były wyraźnie negatywny. Była to prawdopodobnie pierwsza praca, która pokazała, iż efekt morfologiczny i metaboliczny w hodowlach typu MPEC jest uzależniony od składu podłoża. Stwierdzono to na podstawie oceny stężenia lowastatyny w monokulturach *A. terreus*, które były hodowlami kontrolnymi w każdym z 3 eksperymentów (w każdym eksperymencie zastosowano inny skład podłoża, który dobrano w sposób umożliwiający wzrost obu mikroorganizmów w kokulturze). Wykazano również, iż wpływ obecności tlenku glinu na produkcję lowastatyny w monokulturze *A. terreus* może zmienić charakter z pozytywnego na negatywny (w odniesieniu do hodowli kontrolnej bez proszku), może również pozostać pozytywny od rozpoczęcia aż do zakończenia hodowli. Zależy to od składu podłoża zastosowanego w danej hodowli.

**Mój wkład (85%):** pomysłodawca i autor planu badań; autor hipotezy badawczej; przeprowadzenie hodowli w kolbach wstrząsanych (współdział); opracowanie metod analitycznych (oprócz analizy lakazy); przeprowadzenie analizy metabolitów wtórnych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas; przeprowadzenie analizy morfologii grzybni; przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu; poprawa manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów.

Dr inż. Anna Antecką brała udział w hodowlach grzyba *Cerrena unicolor* oraz przeprowadziła analizę aktywności lakazy w płynie pohodowlanym.

### **Podsumowanie – wkład w rozwój dyscypliny inżynieria chemiczna**

Produkcja metabolitów wtórnych mikroorganizmów strzępkowych w warunkach wglębnych to jeden z tematów inżynierii biochemicznej, specjalności zaliczanej do dyscypliny inżynieria chemiczna. Mój wkład w rozwój tej dyscypliny jest następujący:

1. Scharakteryzowałem kokultury wglębne *Aspergillus terreus* z promieniowcami *Streptomyces rimosus* i *Streptomyces noursei* oraz z grzybem strzępkowym *Penicillium rubens*.
2. Ustaliłem wpływ sposobu inicjacji kokultury na produkcję metabolitów wtórnych w kokulturach grzyba *A. terreus* z grzybami strzępkowymi *Chaetomium globosum*, *P. rubens*, *Mucor racemosus* oraz z promieniowcami *S. rimosus* i *S. noursei*.
3. Udowodniłem na przykładzie kokultury *A. terreus* i *C. globosum*, że spory 2 różnych gatunków grzybów strzępkowych mogą tworzyć 2-gatunkowe aglomeraty, wokół których rozwijają się peletki.
4. Pokazałem stymulujący wpływ *C. globosum* na biosyntezę butyrolaktonu I u *A. terreus*.
5. Wykazałem możliwość zastosowania kokultury bioreaktorowej w celu biosyntezy nowych metabolitów wtórnych, których produkcja nie zachodzi w warunkach monokultury, np. związków należących do grupy milbemycyn oraz rymocydyn.
6. Pokazałem, że obecność *S. noursei* powoduje stymulację wytwarzania antybiotyku oksytetracykliny u *S. rimosus*.
7. Udowodniłem, że obecność innego grzyba może doprowadzić do zahamowania wykorzystania kwasu fenylooctowego i biosyntezy penicyliny G u grzyba *P. rubens*.
8. Porównałem wpływ mikrocząstek tlenku glinu na monokultury i kokultury w odniesieniu do morfologii oraz metabolizmu wtórnego *A. terreus*, *S. rimosus* i *P. rubens*.
9. Jestem autorem pierwszych szczegółowych opisów bioreaktorowych kokultur

mikroorganizmów strzępkowych prowadzonych pod kątem produkcji metabolitów wtórnych.

### Literatura cytowana w tekście

- Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender JL (2014) Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol Adv* 32:1180–1204
- Boruta T, Bizukojc M (2016) Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:3009–3022
- Boruta T, Bizukojc M (2014) Culture-based and sequence-based insights into biosynthesis of secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *J Biotechnol* 175:53–62
- Carlson S, Tanouye U, Omarsdottir S, Murphy BT (2015) Phylum-specific regulation of resistomycin production in a *Streptomyces* sp. via microbial coculture. *J Nat Prod* 78:381–387
- Chen LC, Lai YK, Wu SC, Lin CC, Guo JH (2016) Production by *Clonostachys compactiuscula* of a lovastatin esterase that converts lovastatin to monacolin. *J Enzyme Microb Technol.* 39:1051–1059
- Demain AL, Fang A (2000) The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 69:1–39
- Ezaki M, Iwami M, Yamashita M, Komori T, Umehara K, Imanaka H (1992) Biphenomycin A production by a mixed culture. *Appl Environ Microbiol* 58:3879–3882
- Kowalska A, Boruta T, Bizukojc M (2018) Morphological evolution of various fungal species in the presence and absence of aluminum oxide microparticles: Comparative and quantitative insights into microparticle-enhanced cultivation (MPEC). *MicrobiologyOpen* 7:e00603
- König CC, Scherlach K, Schroeckh V, Horn F, Nietzsche S, Brakhage AA, Hertweck C (2013) Bacterium Induces Cryptic Meroterpenoid Pathway in the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem* 14:938–942
- Laatsch H (2014) AntiBase 2014: the natural product identifier. Wiley-VCH, Weinheim
- Mavituna F, Luti KJK, Gu L (2016) In Search of the *E. coli* Compounds that Change the Antibiotic Production Pattern of *Streptomyces coelicolor* During Inter-species Interaction. *Enzyme Microb Technol* 90:45–52
- McClure RA, Goering AW, Ju KS, Baccile JA, Schroeder FC, Metcalf WW, Thomson RJ, Kelleher NL (2016) Elucidating the Rimosamide-Detoxin Natural Product Families and Their Biosynthesis Using Metabolite/Gene Cluster Correlations. *ACS Chem Biol* 11:3452–3460
- Netzker T, Fischer J, Weber J, Mattern DJ, König CC, Valiante V, Schroeckh V, Brakhage AA (2015) Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Front. Microbiol.* 6:299
- Ninomiya A, Urayama S ichi, Hagiwara D (2022) Antibacterial diphenyl ether production induced by co-culture of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 106:4169–4185
- Palonen EK, Neffling MR, Raina S, Brandt A, Keshavarz T, Meriluoto J, Soini J (2014) Butyrolactone I Quantification from Lovastatin Producing *Aspergillus terreus* Using Tandem Mass Spectrometry-Evidence of Signalling Functions. *Microorganisms* 2:111–127
- Peng XY, Wu JT, Shao CL, Li ZY, Chen M, Wang CY (2021) Co-culture: stimulate the metabolic potential and explore the molecular diversity of natural products from microorganisms. *Mar Life Sci Technol* 3:363–374
- Ren H, Wang B, Zhao H (2017) Breaking the silence: new strategies for discovering novel natural products. *Curr Opin Biotechnol* 48:21–27
- Seca AML, Pinto DCGA (2019) Biological Potential and Medical Use of Secondary Metabolites. *Medicines* 6:66
- Shin D, Byun WS, Moon K, Kwon Y, Bae M, Um S, Lee SK, Oh DC (2018) Coculture of marine *Streptomyces* sp. with *Bacillus* sp. produces a new piperazic acid-bearing cyclic peptide. *Front Chem* 6:1–12
- Slemc L, Jakše J, Filisetti A, Baranasic D, Rodríguez-García A, Del Carratore F, Marino SM, Zucko J, Starcevic A, Šala M, Pérez-Bonilla M, Sánchez-Hidalgo M, González I, Reyes F, Genilloud O,



- Springthorpe V, Goranovič D, Kosec G, Thomas GH, Lucrezia D De, Petković H, Tome M (2022) Reference-Grade Genome and Large Linear Plasmid of *Streptomyces rimosus*: Pushing the Limits of Nanopore Sequencing. *Microbiol Spectr* 10: e02434-21
- van Santen, JA, Poynton EF, Iskakova D, McMann E, Alsup TA, Clark TN, Fergusson CH, Fewer DP, Hughes AH, McCadden CA, Parra Villalobos J, Soldatou S, Rudolf JD, Janssen EML, Duncan KR, Linington RG (2021) The Natural Products Atlas 2.0: A Database of Microbially-Derived Natural Products", *Nucleic Acids Res* 50: D1317–D1323
- Verheecke C, Liboz T, Anson P, Diaz R, Mathieu F (2015) Reduction of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in interaction with *Streptomyces*. *Microbiology* 161:967–972
- Zuck KM, Shipley S, Newman DJ (2011) Induced production of N-formyl alkaloids from *aspergillus fumigatus* by co-culture with *Streptomyces peucetius*. *J Nat Prod* 74:1653–1657

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

Tematem moich prac badawczych jest metabolizm mikroorganizmów, przede wszystkim w odniesieniu do produkcji metabolitów wtórnych. Pierwsze działania w tym zakresie podjąłem w Technical University of Denmark (DTU) w Kongens Lyngby, gdzie w ramach stypendium dla najlepszych studentów („DTU Student Sponsorship”) miałem okazję podjąć studia magisterskie (MSc in Biotechnology) i uczestniczyć w dwóch inicjatywach badawczych. Pierwsza z nich dotyczyła modelowania glikolizy u *Lactococcus lactis*, natomiast druga skupiała się na modelowaniu sieci metabolicznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Tematyka mojej pracy magisterskiej związana była z konstrukcją i modelowaniem tzw. „chassis cells”, komórek genetycznie modyfikowanych zoptymalizowanych pod kątem wytwarzania określonej rodziny metabolitów. Prace te miałem okazję kontynuować w trakcie 3-miesięcznego stażu badawczego w grupie Dr Kirana Patila w European Molecular Biology Laboratory (EMBL) w Heidelbergu, co zaowocowało wspólną publikacją (Jouhten et al., 2016). W ramach mojej pracy doktorskiej skupiłem się na metabolizmie *Aspergillus terreus*, gatunku grzyba strzępkowego, który produkuje lowastatynę, lek obniżający poziom cholesterolu. Badania obejmowały analizę bioinformatyczną klastrów genów (Boruta i Bizukojć, 2014), indukcję produkcji metabolitów w warunkach hodowli wglębnej (Boruta i Bizukojć, 2016) oraz modelowanie sieci metabolicznej. Efektem mojej pracy doktorskiej było odkrycie repertuaru metabolicznego *A. terreus*, zaproponowanie klastra biosyntezy kwasu terreinowego (który później potwierdzono eksperymentalnie: Guo et al., 2014) oraz genów związanych z wytwarzaniem innych metabolitów wtórnych tego grzyba. Przygotowałem również referencyjny zbiór widm masowych uzyskanych dla metabolitów wtórnych *A. terreus* (Boruta i Bizukojć, 2016). Prace

badawcze w ramach pracy doktorskiej finansowane były głównie w obrębie projektu PRELUDIUM (2013/11/N/ST8/00212), którego byłem kierownikiem. Po obronie doktoratu w 2016 roku (z wyróżnieniem) prowadziłem badania dotyczące produkcji metabolitów wtórnych w odniesieniu do rozwoju morfologicznego mikroorganizmów strzępkowych, tzn. pleśni oraz promieniowców. Uczestniczyłem jako wykonawca w projekcie OPUS (2015/19/B/ST8/02115) dotyczącym ilościowego opisu morfologicznego różnych gatunków grzybów strzępkowych w warunkach hodowli wglębnej prowadzonej w kolbach wstrząsanych (Kowalska et al. 2018) i bioreaktorach (Kowalska et al. 2020). Jako pierwszy opisałem zastosowanie mineralnych nanocząstek w kontekście inżynierii morfologii mikroorganizmów strzępkowych (Boruta i Bizukojć, 2019). Pokazałem, jak wielkie zmiany morfologiczne (przejście od form speletyzowanych do luźniej grzybni) może wywołać zmiana stężenia składników podłoża hodowlanego (Boruta et al., 2020).

Obecnie zajmuję się głównie kokulturami mikroorganizmów strzępkowych prowadzonymi w warunkach wglębnych, co zostało opisane w punkcie 4 niniejszego wniosku.

W moim dorobku znajdują się prace przeglądowe przygotowane w odpowiedzi na zaproszenie (Boruta i Bizukojć, 2017; Boruta, 2021), w tym jeden artykuł o charakterze komentarza (Boruta 2018). Moje wypowiedzi cytowane były w czasopiśmie "Chemical & Engineering News" redagowanym przez American Chemical Society (artykuł „Scientists mine for potential drugs in the Berkeley Pit and other industrial sites”, vol. 97, issue 18).

Moje doświadczenia zdobyte w trakcie identyfikowania metabolitów wtórnych wykorzystuję również w innej tematyce, która dotyczy sposobów degradacji substancji farmaceutycznych, takich jak antybiotyki i leki przeciwbólowe. Nie jestem w tych pracach autorem wiodącym, moje prace mają w tych przypadkach charakter analityczny - identyfikuję cząsteczki za pomocą spektrometrii mas, uczestniczyłem jako wykonawca w projekcie NCN OPUS (2016/21/B/ST8/00982) związanym z tym tematem (Ledakowicz et al., 2019; Żyła et al., 2019). Dodatkowo, prowadzę analizy białek z wykorzystaniem elektroforezy (Antecka et al., 2019; Błatkiewicz et al., 2018). Również i w tym przypadku miałem okazję występować w roli wykonawcy grantu badawczego OPUS (2013/11/B/ST8/00337).

Przygotowałem **34 recenzje** manuskryptów (dla czasopism *Applied Biochemistry and Biotechnology* – 2 recenzje, *Biotechnology and Food Science* – 1 recenzja, *Chemical Papers* – 1 recenzja, *Process Biochemistry* – 2 recenzje, *Annals of Microbiology* – 2 recenzje, *Acta Scientiarum Polonorum – Biotechnologia* - 2 recenzje, *Journal of Bioscience and Bioengineering* – 2 recenzje, *Critical Reviews in Biotechnology* – 1 recenzja, *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2 recenzje, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* – 1 recenzja, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* - 5 recenzji, *Arabian Journal of*

*Science and Engineering* – 1 recenzja, *Genes* – 2 recenzje, *Journal of Fungi* – 2 recenzje, *Toxins* – 2 recenzje, *Microbial Biotechnology* – 1 recenzja, *Frontiers in Fungal Biology* – 1 recenzja, *Biotechnology and Applied Biochemistry* – 1 recenzja, *Applied Sciences* – 1 recenzja, *Frontiers in Microbiology* – 1 recenzja).

W 2022 roku zostałem laureatem Stypendium Ministra Edukacji i Nauki dla Wybitnych Młodych Naukowców.

#### Literatura cytowana w tekście:

- Antecka A, Błatkiewicz M, Boruta T, Górak A, Ledakowicz S (2019) Comparison of downstream processing methods in purification of highly active laccase. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 42:1635–1645
- Błatkiewicz M, Antecka A, Boruta T, Górak A, Ledakowicz S (2018) Partitioning of laccases derived from *Cerrena unicolor* and *Pleurotus sapidus* in polyethylene glycol- phosphate aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry* 67:165-174
- Boruta T (2018) Uncovering the repertoire of fungal secondary metabolites: from Fleming's laboratory to the International Space Station. *Bioengineered* 9:12-16
- Boruta T, Bizukojć M (2017) Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33:34
- Boruta T, Bizukojć M (2016) Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100:3009-3022
- Boruta T, Bizukojć M (2014) Culture-based and sequence-based insights into biosynthesis of secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *Journal of Biotechnology* 175:53-62
- Boruta T, Bizukojć M (2019) Application of aluminum oxide nanoparticles in *Aspergillus terreus* cultivations: Evaluating the effects on lovastatin production and fungal morphology. *BioMed Research International* 5832496
- Boruta T, Górnicka A, Grzybowska I, Stefaniak I, Bizukojć M (2020) Exploring the extremes: applying high concentration of yeast extract leads to drastic morphological changes and elimination of (+)-geodin and asteric acid production in *Aspergillus terreus* submerged cultures. *Biotechnology Letters* 43:61-71
- Guo CJ, Sun WW, Bruno KS, Wang CC (2014) Molecular genetic characterization of terreic acid pathway in *Aspergillus terreus*. *Organic Letters* 16:5250-5253
- Kowalska A, Boruta T, Bizukojć M (2020) Performance of fungal microparticle-enhanced cultivations in stirred tank bioreactors depends on species and number of process stages. *Biochemical Engineering Journal* 161:107696
- Kowalska A, Boruta T, Bizukojć M (2018) Morphological evolution of various fungal species in the presence and absence of aluminum oxide microparticles: Comparative and quantitative insights into microparticle-enhanced cultivation (MPEC). *MicrobiologyOpen* 7:e00603
- Ledakowicz S, Drozdek E, Boruta T, Foszpańczyk M, Olak-Kucharczyk M, Żyła R, Gmurek, M. Impact of hydrogen peroxide on the UVC photolysis of diclofenac and toxicity of the phototransformation products. *International Journal of Photoenergy* 1086704
- Jouhten P, Boruta T, Andrejev S, Pereira F, Rocha I, Patil KR (2016) Yeast metabolic chassis designs for diverse biotechnological products. *Scientific Reports* 6:29694
- Żyła R, Boruta T, Gmurek M, Milala R, Ledakowicz S (2019) Integration of advanced oxidation and membrane filtration for removal of micropollutants of emerging concern. *Process Safety and Environmental Protection* 130:67-76

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

#### Osiągnięcia dydaktyczne

Od czasu podjęcia zatrudnienia w Politechnice Łódzkiej w marcu 2016 roku prowadziłem zajęcia w ramach **18 przedmiotów** o różnorodnej tematyce. Większość godzin dydaktycznych stanowiły zajęcia w formie wykładu. Listę przedmiotów z zaznaczeniem formy prowadzonych zajęć (wykład, laboratorium, ćwiczenia rachunkowe lub seminarium) przedstawiłem poniżej:

#### WYKŁAD:

1. **Inżynieria metaboliczna i wstęp do biologii systemów** (studia magisterskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
2. **Metabolity wtórne** (studia magisterskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
3. **Technologia farmaceutyczna** (studia magisterskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
4. **Przygotowanie bioproduktu** (studia magisterskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
5. **Wyodrębnianie i oczyszczanie bioproduktu** (studia magisterskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
6. **Mikrobiologia** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria bezpieczeństwa pracy)
7. **Technologia chemiczna** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
8. **Technologie chemiczne i biochemiczne** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria biochemiczna)
9. **Czynniki zagrożeń chemicznych i biologicznych** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria bezpieczeństwa pracy)
10. **Podstawy mikrobiologii** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
11. **Biochemia** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
12. **Genetyka** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
13. **Downstream processing** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna; przedmiot prowadzony w jęz. angielskim)

14. **Mikrobiologia przemysłowa** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)

#### LABORATORIUM:

1. **Metabolity wtórne** (studia magisterskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
2. **Mikrobiologia** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria bezpieczeństwa pracy)
3. **Bioprodukty** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
4. **Bioreaktory** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
5. **Podstawy mikrobiologii** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)

#### ĆWICZENIA RACHUNKOWE:

1. **Biochemia** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
2. **Inżynieria bioprosowa** (studia inżynierskie; kierunek: Biotechnologia)

#### PROJEKT:

1. **Inżynieria bioprosowa** (studia inżynierskie; kierunek: Biotechnologia)
2. **Moduł sumatywny** – prowadziłem zajęcia na temat zarządzania projektami (studia inżynierskie; kierunki: Inżynieria chemiczna i biochemiczna; inżynieria środowiska)

#### SEMINARIUM:

1. **Inżynieria metaboliczna i wstęp do biologii systemów** (studia magisterskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)
2. **Technologia chemiczna** (studia inżynierskie; kierunek: Inżynieria chemiczna i biochemiczna)

Samodzielnie przygotowuję treści wykładanych przedmiotów. We wszystkich dotychczasowych ankietach dydaktycznych zostałem pozytywnie oceniony przez studentów. Aktualnie pełnię funkcję kierownika 9 przedmiotów, co wiąże się z przygotowaniem i aktualizacją kart zawierających m.in. treści programowe i sposoby weryfikacji efektów uczenia.

Pełniłem funkcję **promotora pomocniczego** w przewodzie doktorskim dr inż. Anny Kowalskiej (tytuł rozprawy: „Wpływ dodatku mineralnych mikrocząstek na rozwój form morfologicznych grzybów strzępkowych w hodowlach wglębnych”). Obrona pracy doktorskiej miała miejsce w lipcu 2019 roku, praca uzyskała wyróżnienie.

Byłem promotorem **19 prac dyplomowych** (w tym 12 inżynierskich i 7 magisterskich). Dodatkowo, 2 prace magisterskie i 3 prace inżynierskie są obecnie w trakcie realizacji. Kilkanaście razy pełniłem rolę recenzenta prac dyplomowych dotyczących inżynierii bioprosesowej.

Byłem opiekunem pracy magisterskiej mgr inż. Iwony Milczarek, laureatki „Nagrody im. Prof. Serwińskiego za najlepszą pracę magisterską na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej w 2019 roku”.

Byłem autorem zestawów pytań (*case study*) stanowiących podstawę egzaminu kompetencyjnego odbywającego się w ostatnim miesiącu studiów inżynierskich na kierunku „Inżynieria chemiczna i biochemiczna”. Pełniłem również rolę egzaminatora podczas egzaminu kompetencyjnego.

Dwukrotnie (w 2019 i 2023 roku) otrzymałem nominację w plebiscycie na „Nauczyciela Roku” w wyniku głosowania przeprowadzonego wśród studentów z inicjatywy Samorządu Studenckiego Politechniki Łódzkiej.

#### Osiągnięcia dotyczące popularyzacji nauki

Dwukrotnie (w 2018 i 2022 roku) pełniłem rolę prelegenta podczas Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi, przedstawiłem prezentację o charakterze popularnonaukowym na temat wykorzystania grzybów w biotechnologii. O podobne wystąpienie poproszono mnie w związku z obchodami „Dnia Liczby Pi” w 2019 roku.

Uczestniczyłem (jako członek komisji oceniającej prace uczniów oraz jako prelegent) w wydziałowym Seminarium Uczniowsko-Studentckim „Problemy Ochrony Środowiska”. Dodatkowo, podczas studiów doktoranckich brałem udział w pracach związanych z organizacją tego wydarzenia.

Aktywnie uczestniczę w pracach promocyjnych na rzecz uczelni, wydziału i reprezentowanej przeze mnie dyscypliny naukowej. Na koncie mam liczne wystąpienia o charakterze naukowym i promocyjnym, które odbyły się w szkołach ponadpodstawowych na terenie województwa łódzkiego, m.in. w Krośniewicach (trzy wizyty), Kutnie (dwie wizyty), Łasku i Piotrkowie Trybunalskim. Dodatkowo, przeprowadziłem kilkanaście wizyt w łódzkich szkołach średnich w odpowiedzi na zaproszenia ze strony nauczycieli. Typowe wystąpienie trwało 45 minut i obejmowało część naukową związaną z biotechnologią grzybów oraz część informacyjno-promocyjną dotyczącą kierunków studiów. W niektórych przypadkach proszono mnie o dwa lub trzy wystąpienia w ramach jednej wizyty, a niektóre placówki kierowały do mnie wielokrotne zaproszenia.

### Osiągnięcia organizacyjne

Od 2019 roku jestem członkiem uczelnianej Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna.

Od 2023 roku jestem członkiem Zespołu do spraw Promocji Wydziału.

Byłem członkiem komisji egzaminacyjnej kierunku „Inżynieria biochemiczna”.

Aktualnie jestem członkiem komitetu organizacyjnego XIV Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Postępy Inżynierii Bioreaktorowej”.

7. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego (stan na dzień 23.02.2023) - według raportu przygotowanego przez Bibliotekę Politechniki Łódzkiej (załącznik 6)

Sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) z roku publikacji: **100,560**

Sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) z roku 2021: **127,045**

Suma punktów za publikacje w czasopismach według punktacji MNiSW/MEiN z roku publikacji: **1855**

Suma punktów za publikacje w czasopismach według scalonego wykazu MEiN z dnia 21.12.2021 r.: **2300**

#### Dane według bazy Scopus:

Liczba pozycji indeksowanych w bazie: **27**

Liczba cytowań: **282**

Liczba cytowań z wyłączeniem autocytowań Autora: **229**

Index Hirscha: **9**

Indeks Hirscha z wyłączeniem autocytowań Autora: **8**

#### Dane według bazy Web of Science Core Collection:

Liczba pozycji indeksowanych w bazie: **31 (w tym 4 abstrakty)**

Liczba cytowań: **262**

Liczba cytowań z wyłączeniem autocytowań Autora: **210**

Index Hirscha: **9**

.....  
(podpis wnioskodawcy)