

Autoreferat

przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

***Intensyfikacja procesów produkcji wysokooczyszczonych preparatów
wybranych produktów białkowych pochodzenia mikrobiologicznego***

dr inż. Anna Antecka

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

Łódź, lipiec 2026 r.

1. Imię i nazwisko: Anna Antecka (z d. Michniewicz).
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- 15.10.2023 ukończenie kursu Advanced Programme: Advanced Teaching & Tutoring w ramach programu MNiSW „Mistrzowie Dydaktyki” organizowanego przez Uniwersytet w Groningen, Holandia
- 10.01.2020 ukończenie kursu Fundamentals of University Teaching and Tutoring programme w ramach programu MNiSW „Mistrzowie Dydaktyki” organizowanego przez Uniwersytet w Groningen, Holandia
- 19.12.2008 uzyskanie z wyróżnieniem stopnia doktora nauk technicznych w zakresie inżynierii środowiska na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej, tytuł pracy: *Model kinetyczny biosyntezy lakazy przez Cerrena unicolor oraz zastosowanie tego enzymu do degradacji wybranych struktur aromatycznych*, promotor: prof. dr hab. inż. Stanisław Ledakowicz
- 10.10.2008 ukończenie Poddyplomowych Studiów Pedagogicznych, Politechnika Łódzka, Wydział Organizacji i Zarządzania
- 30.09.2007 ukończenie dwusemestralnego Studium Doskonalenia Pedagogicznego *Kurs Doskonalenia Pedagogicznego dla asystentów Politechniki Łódzkiej*, Politechnika Łódzka, Wydział Organizacji i Zarządzania
- 27.09.2002 uzyskanie z wynikiem celującym tytułu magistra inżyniera inżynierii środowiska na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej, tytuł pracy: *Odbarwianie wodnych roztworów wybranych barwników za pomocą kompleksu enzymatycznego lakazy z Cerrena unicolor*, promotor: prof. dr hab. inż. Stanisław Ledakowicz
- 16.08.2002 ukończenie letniego kursu *Chemical Engineering International Summer School 2002* organizowanego przez Uniwersytet w Dortmundzie, Niemcy
- 10.04.2002 uzyskanie dyplomu międzynarodowego telewizyjnego kursu *A Sustainable Baltic Region*, koordynowanego przez Baltic University, Uppsala, Szwecja

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

od 01.02.2010 adiunkt w Katedrze Inżynierii Bioprocessowej PŁ – pełny etat
01.10.2009 – 31.01.2010 asystent (dr) w Katedrze Inżynierii Bioprocessowej PŁ – pełny etat
16.08. 2008 – 30.09.2009 starszy chemik w Katedrze Inżynierii Bioprocessowej PŁ – pełny etat

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.).

Osiągnięcia, które wskazuję jako podstawę mojego wniosku habilitacyjnego stanowią:

2 cykle powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych, które w roku opublikowania artykułu w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. b Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Wszystkie wybrane publikacje zostały wydane w latach 2016 – 2026, tj. po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora nauk technicznych (19.12.2008 r.).

Przedmiotowe dwa ciągi powiązanych tematycznie publikacji zatytułowałam:

1. Intensyfikacja procesów biosyntezy i oczyszczania lakaz grzybowych

2. Innowacyjne metody oczyszczania fikobiliprotein

W poniższych tabelach zestawiono publikacje wchodzące w skład omawianych osiągnięć naukowych:

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego pt.:		IF	Pkt.
Lp	„Intensyfikacja procesów biosyntezy i oczyszczania lakaz grzybowych”	r. publikacji aktualny	MNiSW
Antecka A., Błatkiewicz M., Bizukoje M., Ledakowicz S. (2016) <i>Morphology engineering of basidiomycetes for improved laccase biosynthesis</i> . Biotechnology Letters 38: 667–672 DOI 10.1007/s10529-015-2019-6 Mój udział procentowy szacuję na 70%		1,730 2,100	70

P1.2	Antecka A., Bizukojc M., Ledakowicz S. (2016) Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures. World J Microbiol Biotechnol (2016) 32: 193. DOI: 10.1007/s11274-016-2148-7 Mój udział procentowy szacuję na 80%	1,658 4,200	70
P1.3	Antecka A., Błatkiewicz M., Głuszc P., Ledakowicz S. (2021) <i>Improvement of laccase biosynthesis by various feeding strategies and in situ integration of biomass separation.</i> Chemical Engineering and Processing - Process Intensification 159: 108237, ISSN 0255-2701 DOI: 10.1016/j.cep.2020.108237 Mój udział procentowy szacuję na 50%	4,264 3,900	140
P1.4	Błatkiewicz M., Antecka A., Górak A., Ledakowicz S (2017) <i>Laccase concentration by foam fractionation of Cerrena unicolor and Pleurotus sapidus culture supernatants.</i> Chemical and Process Engineering 38(3): 455-464 DOI: 10.1515/cpe-2017-0035 Mój udział procentowy szacuję na 35%	0,892 0,700	100
P1.5	Błatkiewicz M., Antecka A., Boruta T, Gorak A., Ledakowicz S (2018) <i>Partitioning of Cerrena unicolor and Pleurotus sapidus laccases in polyethylene glycol - phosphate aqueous two-phase systems.</i> Process Biochemistry 67: 165-174 DOI: 10.1016/j.procbio.2018.01.011 Mój udział procentowy szacuję na 15%	2,883 4,000	70
P1.6	Antecka A., Błatkiewicz M., Boruta T., Górak A., Ledakowicz S (2019) <i>Comparison of downstream processing methods in purification of highly active laccase.</i> Bioprocess Biosyst Eng. 42: 1635-1645 DOI: 10.1007/s00449-019-02160-3 Mój udział procentowy szacuję na 65%	2,419 3,600	70

	Antecka A., Ślęzak R., Ledakowicz S (2018) Liofilizacja lakazy z <i>Cerrena unicolor</i> . Acta Scientiarum Polonorum		
P1.7	(Biotechnologia) 17 (4): 23-28, DOI: 10.30825/5.biot.70.2018.17.4 Mój udział procentowy szacuję na 75%	-	5
	Olczyk J., Sójka-Ledakowicz J., Kudzin M., Antecka A. (2021) The Eco-Modification of Textiles Using Enzymatic Pretreatment and New Organic UV Absorbers, Autex Research Journal	1,944	
P1.8	21(3):242-251, DOI: 10.2478/aut-2019-0081 Mój udział procentowy szacuję na 30%	1,600	140
	SUMA	15,79	
		20,10	665

Wskazany przeze mnie cykl publikacji ukazuje ścieżkę zmierzającą do otrzymania wysokoaktywnego preparatu lakazowego od biosyntezy poprzez procesy zateżniania, oczyszczania i liofilizacji aż do zastosowania enzymu w technologiach przemysłu włókienniczego. Zebrane publikacje można tematycznie podzielić na trzy łączące się ze sobą etapy, pierwszy zaprezentowany w publikacjach (P1.1-P1.3) dotyczy intensyfikacji hodowli grzybowej ukierunkowanej na produkcję cennego białka, drugi (P1.4-P1.6) badania procesów jego zateżniania i separacji, a trzeci (P1.7-P1.8) badania możliwości jego liofilizacji oraz praktycznego zastosowania.

Powyższy cykl tematyczny dopełnia udział w 14 konferencjach naukowych, z których część materiałów została wydana w formie następujących opracowań:

K1.1: Błatkiewicz M., **Antecka A.**, Gorak A., Ledakowicz S. (2016) Differences in *Cerrena unicolor* and *Pleurotus sapidus* laccase partitioning in polyethylene glycol – phosphate aqueous twophase systems. **Abstracts / New Biotechnology** 33S: 528;

K1.2: **Antecka A.**, Błatkiewicz M., Gluszczyk P., Ledakowicz S., Gorak A (2017) Upstream and downstream processing of fungal laccase. **J Biotechnol Biomater** 2017, 7:1(Suppl) p. 71;

K1.3: Błatkiewicz M., **Antecka A.**, Ledakowicz S., Gorak A (2017) Continuous methods of fungal laccase concentration. **J Biotechnol Biomater** 2017, 7:1(Suppl) p. 72.

Lp	Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego pt.: „Innowacyjne metody oczyszczania fikobiliprotein”	IF r. publikacji aktualny	Pkt. MNiSW
P2.1	Antecka A., Klepacz-Smółka A., Szeląg R., Pietrzyk D., Ledakowicz S. (2022) <i>Comparison of three methods for thermostable C-phycocyanin separation and purification. Chemical Engineering and Processing - Process Intensification</i> 171: 108563 https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108563 Mój udział procentowy szacuję na 55%	4,3 3,9	140
P2.2	Antecka A., Szeląg R., Ledakowicz S. (2024) Separation and purification of phycobiliproteins from <i>Thermosynechococcus</i> PCC 6715 by foam fractionation and aqueous two-phase extraction. Chemical and Process Engineering: New Frontiers 45(2) https://doi.org/10.24425/cpe.2024.149457 Mój udział procentowy szacuję na 60%	0,7	100
P2.3	Antecka A., Szeląg R., Ledakowicz S. (2026) Isolation of Phycobiliproteins from <i>Thermosynechococcus</i> PCC 6715 by Foam Fractionation in Batch and Continuous Modes, Marine Drugs 24(1): 33 https://doi.org/10.3390/md24010033 Mój udział procentowy szacuję na 60%	5,4	100
P2.4	Antecka A., Szeląg R., Ledakowicz S. (2025) A novel two-step purification process for highly stable C-phycocyanin of analytical grade purity and its properties, Applied Microbiology and Biotechnology 109: 72 https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-025-13458-6 Mój udział procentowy szacuję na 65%	4,3	100
SUMA		14,7 14,3	440

PATENT Nr 248320 przyznany przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej w dniu 21.11.2025 na wynalazek pt.: „**Sposób oczyszczania C-fikocyjaniny z ekstraktu biomasy cyjanobakterii**”.

Udzielony na rzecz: Politechnika Łódzka, Łódź, Polska.

Twórcy wynalazku: **Anna Antecka**, Stanisław Ledakowicz, Rafał Szela, Anna Klepacz-Smółka, Damian Pietrzyk.

Wskazany drugi cykl publikacji zakończony patentem ukazuje badania dotyczące doboru najbardziej korzystnej metody zateżania i separacji fikobiliprotein, głównie C-fikocyjaniny, oraz częściową fizykochemiczną charakterystykę uzyskanych wysokooczyszczonych preparatów. Oczyszczany pigment C-fikocyjanina uznawany jest za bardzo cenny bioprodukt mający liczne zastosowania przemysłowe i prozdrowotne działanie.

Powyższy cykl tematyczny dopełnia udział w 7 konferencjach naukowych. Materiały z jednej z nich zostały wydane w formie następującego opracowania:

K2.1. **Antecka A.**, Szela R., Ledakowicz S. (2022) Storage conditions of C-phyococyanin from *Synechococcus* sp. PCC6715, **Chemie Ingenieur Technik** 94 (9): 1272

<https://doi.org/10.1002/cite.202255139>.

Wstęp

Obecny poziom rozwoju nauki i niepokojący stan środowiska skłaniają do świadomego wyboru produktów naturalnych oraz rozwiązań bazujących na naturalnych procesach zachodzących w przyrodzie w jak najszerszym zakresie. Konsekwencją tego jest potrzeba rozwoju nowoczesnych, przyjaznych środowisku technologii wytwórczych wykorzystujących systemy i produkty biologiczne w produkcji przemysłowej dążącej do zrównoważonego przetwarzania surowców odnawialnych, produktów chemicznych, materiałów i paliw. Zastąpienie procesów tradycyjnych przez bioprocessy pozwala na ukierunkowanie przemysłu na nowe produkty bądź na zmianę procesów technologicznych w kierunku zapewnienia realizacji celów gospodarki obiegu zamkniętego. Jednym z narzędzi tu wykorzystywanych są wytwarzane przez żywe organizmy produkty białkowe regulujące przebieg procesów biologicznych. Przykładami takich substancji są badane i stosowane przeze mnie bioprodukty: enzym lakaza i pigment C-fikocyjanina.

Lakazy (EC 1.10.3.2, oksydazy p-dwufenolowe) są enzymami należącymi do klasy oksydoreduktaz, które posiadają zdolność do bezpośredniego utleniania fenoli i innych związków aromatycznych. Wytwarzane głównie przez grzyby zgnilizn drewna, ale także bakterie, rośliny, czy owady. W warunkach naturalnych lakazy grzybowe, wraz z całą grupą enzymów ligninolitycznych, prowadzą rozkład drewna, a w nim głównie ligniny. Zdolność ta świadczy o możliwości zastosowania tych enzymów jako katalizatorów rozkładu wielu skomplikowanych związków organicznych. Okazuje się, że biokatalizatory lakazowe dzięki swojej niskiej specyficzności substratowej, niskim wymaganiom energetycznym i biodegradowalności bardzo dobrze spełniają wymogi produkcji zrównoważonej i przyjaznej środowisku. W związku z tym, w wielu ośrodkach na świecie prowadzone są badania nad biosyntezą lakazy przez grzyby i jej zastosowaniem (Yang et al., 2017; Zhai et al., 2024). Główne gałęzie gospodarki to przemysł celulozowo-papierniczy, tekstylny, spożywczy, farmaceutyczny oraz chemiczny (Chaudhary et al., 2022; Imran et al., 2012). Niestety niska wydajność biosyntezy enzymów w warunkach naturalnych uniemożliwia ich praktyczne zastosowanie w skali przemysłowej. Do badań nad zastosowaniem enzymów w wyżej wspomnianych procesach przemysłowych niezbędne jest uzyskanie wysoce aktywnych preparatów zapewniających otrzymanie powtarzalnych wyników. Dobór odpowiednich warunków hodowli jest tu szczególnie istotny, gdyż od niego zależy wzrost biomasy i aktywność metabolitów. Dlatego, oprócz badań aplikacyjnych, wciąż trwają prace nad poprawą wydajności i obniżeniem kosztów biosyntezy, poszukiwaniem bardziej wydajnych producentów enzymu, jego oczyszczaniem i separacją oraz wyznaczeniem fizykochemicznych właściwości. Wiele uwagi poświęca się również warunkom przechowywania i stabilności produktów białkowych, co prowadzi do uzyskania trwałego i sprawnego preparatu.

Procesy biosyntezy z udziałem mikroorganizmów stanowią zespół złożonych reakcji biochemicznych, związanych ze zużywaniem substratów z podłoża, przyswajaniem tlenu, wzrostem biomasy i wytwarzaniem bioproduktów. Tymi zagadnieniami zajmowałam się między innymi podczas realizacji mojej pracy doktorskiej. Wyniki przedstawione w publikacji (Antecka et al., 2009) dotyczą badania kinetyki wzrostu grzybni *Cerrena unicolor* i biosyntezy lakazy przy zmiennym składzie podłoża hodowlanego oraz zaproponowanego dwusubstratowego modelu kinetycznego procesu. Przeprowadzone bilanse obejmują: źródła węgla i azotu, produkt i biomasę. W badaniach zwrócono uwagę na istnienie negatywnego związku pomiędzy biosyntezą enzymu a wzrostem biomasy, objawiającym się jej ubytkiem w momencie pojawienia się produktu. W momencie całkowitego zużycia glukozy z podłoża przyswajanie L-asparaginy zostawało zatrzymane, a grzyb rozpoczynał wydzielanie

zewnątrzkomórkowej lakazy. Zaproponowany model dobrze opisuje wyniki doświadczone wszystkich przeprowadzonych hodowli, a dobrane parametry kinetyczne okazały się niezależne od warunków procesowych, co potwierdziło słuszno c przyjętych zało en i wiarygodno c otrzymanych równań (Antecka et al., 2009). Jednakże, mając na uwadze powiększenie skali procesu, w hodowli mikroorganizmów bardzo istotny jest także dobór ilości inokulum oraz wybór typu i trybu pracy bioreaktora. Taka zmiana wymaga zawsze zwiększenia nakładu środków, ale umożliwia większą kontrol  procesu (monitoring on-line), wyższą wydajno c produkcji oraz powtarzalno c wyników zarówno dla hodowli okresowych, jak i ciągłych, a w szczególności takich, które umożliwiają integrację biosyntezy i dalszych procesów oczyszczania. Poza metodami klasycznymi, wyr  ni c należy także tzw. podejście inżynierii morfologii, które dotyczy  może: zmiany osmolarności brzo ki hodowlanej, modyfikacji genetycznych, czy wreszcie dodatku mineralnych mikrocząstek (Krull et al., 2013), czyli innowacyjnej metody zwanej microparticle-enhanced cultivation (MPEC). Metoda polega na wprowadzeniu do podłoża mineralnych mikrocząstek, których działanie wpływa na produktywno c mikroorganizmu spowodowaną zmian  w morfologii grzybni (Driouch et al., 2010a). Zmiana morfologii prowadzi do lepszego transportu tlenu i substancji odżywczych, co skutkuje wyższym st eniem biomasy i zwiększoną produkcj  po adanych metabolitów, np. antybiotyków czy enzymów. Pozytywny wpły  mineralnych cząstek w podłożu na morfologię grzybni i aktywno c enzymatyczną zosta  potwierdzony badaniami eksperymentalnymi, szczególnie dla grzybów str pkowych (Bizukojc and Ledakowicz, 2010; Kaup et al., 2008). Zaobserwowano, iż dodatek nieorganicznych mikrocząstek umożliwia sterowanie wielkością peletek, powodując zmniejszenie ich średnicy oraz popraw  produktywności (Gonciarz and Bizukojc, 2014).

Kolejnym zagadnieniem generującym potrzeb  poszukiwania nowych rozwiązań technologicznych jest ryzyko utraty bioproduktu podczas jego zatężania i oczyszczania (ang. downstream processing, DSP). Z przeglądu literatury wynika, iż etap ten pochłania nawet do 80% kosztów produkcji (Lowe et al., 2001), a w przypadku wybranych białek temat ten nie jest jeszcze wystarczająco zbadany. Najczęściej stosowane metody to filtracja, wirowanie, odparowanie oraz techniki chromatograficzne, zapewniające co prawda otrzymanie wysoce zatężonego i czystego produktu, ale kosztowne i długotrwałe. Przykładowi alternatywnych metod DSP są frakcjonowanie pianowe (ang. foam fractionation, FF) i wodna ekstrakcja dwufazowa (ang. aqueous two-phase extraction, ATPE). Pierwsza z nich należy do procesów separacji pęcherzykowej, w której częśc składek mieszaniny, w tym białka, migruje do powierzchni miedzyfazowej pomiędzy cieczą a gazem (Lemlich, 1968). W rezultacie powstały

kondensat piany (ang. foamate) zawiera podwyższone stężenie składników powierzchniowo czynnych, takich jak białka, ewentualnie surfaktanty (Gerken et al., 2006). Proces prowadzi się w kolumnie zawierającej rozpuszczony produkt zasilanej inertnym gazem, najczęściej powietrzem lub azotem. W wyniku tego wytwarza się pianę, która migruje w górę kolumny, a następnie jest odbierana w fazie ciekłej w postaci kondensatu (Burghoff, 2012). Dodatkową zaletą metody jest łatwość odzysku produktu z bardzo rozcieńczonych roztworów, co powoduje, że jest ona wygodnym pierwszym etapem w wielostopniowych procesach oczyszczania (Merz et al., 2011). Druga z metod, wodna ekstrakcja dwufazowa, jest procesem separacji cząstek, który oparty jest na takich samych zasadach, co ekstrakcja z użyciem rozpuszczalników organicznych. Do utworzenia układu dwufazowego używane są najczęściej dwa polimery lub roztwór polimeru i soli, w zależności od używanej substancji (Grilo et al., 2016). Niezależnie od składu, zawartość wody w ATPE wynosi zazwyczaj 70 - 90%, dzięki czemu układy te nie powodują denaturacji białek i mogą być stosowane przy ich rozdziale (Iqbal et al., 2016). Mechanizm procesu oparty jest na selektywnym rozpuszczaniu się separowanej substancji w zastosowanych fazach układu, co spowodowane jest różnicą powinowactwa do faz (Wu et al., 2017). Złożoność procesu powoduje jednak wiele trudności w trakcie jego modelowania i na etapie planowania eksperymentu. Według literatury (Azevedo et al., 2009) na podział substancji między fazami ma wpływ wiele czynników, tj. rozmiar cząsteczki, konformacja molekularna, rodzaj zastosowanego polimeru, pH, temperatura i siła jonowa. Wszystkie te czynniki powodują, że dla każdego białka wodna ekstrakcja dwufazowa musi być rozpatrywana jako unikalny proces, wymagający szeregu danych eksperymentalnych. Drugim z obiektów zastosowania różnych technik DSP w moich badaniach był pigment C-fikocyjanina (ang. C-phycoerythrin, C-PC). Należy ona do rodziny fikobiliprotein będących jednostkami białkowymi, znajdującymi się w aparacie fotosyntetycznym cyjanobakterii i absorbującymi promienie świetlne. C-PC przy długości fali około 620 nm wykazuje charakterystyczny pojedynczy pik absorpcji, a fluorescencję emituje przy około 642 nm. Jest kompleksem białka i pigmentu o głębokim, intensywnym niebieskim kolorze, dzięki czemu znajduje szereg zastosowań w barwieniu kosmetyków lub jako dodatek do żywności. Ponadto, z uwagi na jej właściwości przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i przeciwutleniające jest pożądana w przemyśle farmaceutycznym i medycynie (da Silva Figueira et al., 2018). C-PC jest wytwarzana przez wiele fotoautotroficznych cyjanobakterii, sinic, z których najbardziej popularna jest *Spirulina platensis*. Niestety, ta izolowana z organizmów mezofilnych posiada wysoką wrażliwość na czynniki fizyczne, takie jak światło, temperatura, czy odczyn pH środowiska i w szerokim zakresie tych parametrów ulega rozkładowi. Zastosowanie takiej C-

PC w przemyśle będzie zatem ograniczone ze względu na np. obróbkę cieplną, która powoduje wytrącanie i blaknięcie niebieskiego pigmentu (Pan-utai et al., 2018). *Thermosynechococcus* to rodzaj termofilnych, jednokomórkowych cyjanobakterii zasiedlających alkaliczne gorące źródła o temperaturze 50 - 65°C. Mechanizmy adaptacji termofilnych sinic do różnych stresujących warunków gorących źródeł powodują, że takie organizmy i ich bioprodukty stanowią ogromną wartość dla biotechnologii i różnych zastosowań przemysłowych (Cheng et al., 2020; Liang et al., 2018). Kluczowym parametrem określającym zakres zastosowań bioproduktu jest jego czystość, która zależy od zastosowanej metody oczyszczania. Dla C-fikocyjaniny przyjmuje się następującą klasyfikację stopnia czystości:

- C-PC o czystości 0,7 - czystość spożywcza
- C-PC o czystości 3,9 - czystość reaktywna
- 4,0 i wyżej - czystość analityczna (Patil et al., 2006).

lub:

- C-PC o czystości 0,5-1,5 - barwnik spożywczy
- C-PC o czystości 1,5-2,5 - barwnik kosmetyczny
- C-PC o czystości 2,5-3,5 – biomarkery
- C-PC o czystości >4 - zastosowania biomedyczne oraz jako środki terapeutyczne (da Silva Figueira et al., 2018).

Główne cele i obszary badawcze

W związku z wyżej zarysowaną problematyką celem moich badań naukowych, opisanych w pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego (P1.1 – P1.8 oraz P2.1 – P2.4), było zbadanie możliwości intensyfikacji procesów biosyntezy i oczyszczania produktów białkowych na przykładzie enzymu lakaza i pigmentu C-fikocyjanina, opracowanie strategii ich prowadzenia oraz produkcja wysokooczyszczonych preparatów. Oba bioprodukty budzą duże zainteresowanie i są pożądane ze względu na ich prozdrowotne właściwości oraz możliwości zastosowania w wielu gałęziach przemysłu. Zakres tematyczny przeprowadzonych prac stanowi połączenie badań podstawowych i aplikacyjnych w dziedzinie inżynierii chemicznej, gdzie zagadnienia związane z otrzymywaniem, zatężaniem i oczyszczaniem produktów (up- and downstream- processing) zajmują istotne miejsce. Przeprowadzone badania bardzo dobrze wpisują się w ideę poszukiwania nowych rozwiązań i sposobów

przewodzenia wspomnianych procesów, także w trybie ciągłym mającym szereg zalet w porównaniu z procesami periodycznymi.

Cykl I

„Intensyfikacja procesów biosyntezy i oczyszczania lakaz grzybowych”

Intensyfikację procesu hodowli i biosyntezy lakazy prowadzono z wykorzystaniem dwóch szczepów grzybowych. Pierwszy, *Cerrena unicolor*, należący do grzybów białej zgnilizny drewna, pochodzi z kolekcji Zakładu Biochemii UMCS w Lublinie i był także przedmiotem badań mojej pracy doktorskiej. Mikroorganizm ten wyróżnia się spośród innych producentów lakaz tym, że wydziela jej znaczne ilości bez użycia dodatkowych induktorów (Gianfreda et al., 1998). Cecha ta czyni go atrakcyjnym gatunkiem do badań związanych z produkcją enzymu. Drugi szczep, *Pleurotus sapidus*, pochodzi z bazy Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Należy on do rodziny boczniakowatych i jest często wykorzystywany do badań laboratoryjnych.

W eksperymentach zastosowano unikalną metodę microparticle-enhanced cultivation, która, według mojej wiedzy, nie była wcześniej stosowana do grzybów Basidiomycetes oraz dla *C. unicolor* nowatorski sposób prowadzenia hodowli bioreaktorowej w trybie pół-ciągłym z równoczesnym odbiorem płynu pohodowlanego bez biomasy gwarantującym integrację procesów biosyntezy i oddzielenia biomasy w jednym aparacie.

Badanymi metodami zateżniania i separacji uzyskanego w płynie pohodowlanym enzymu były klasyczna ultrafiltracja i chromatografia oraz dwie mniej znane metody alternatywne frakcjonowanie pianowe i wodna ekstrakcja dwufazowa. Wszystkie cztery metody przebadano pod kontem doboru najbardziej korzystnych warunków ich prowadzenia w celu osiągnięcia końcowego produktu o jak najwyższej aktywności.

Jako efekty przeprowadzonych badań udało się uzyskać pozytywne rezultaty w następujących obszarach:

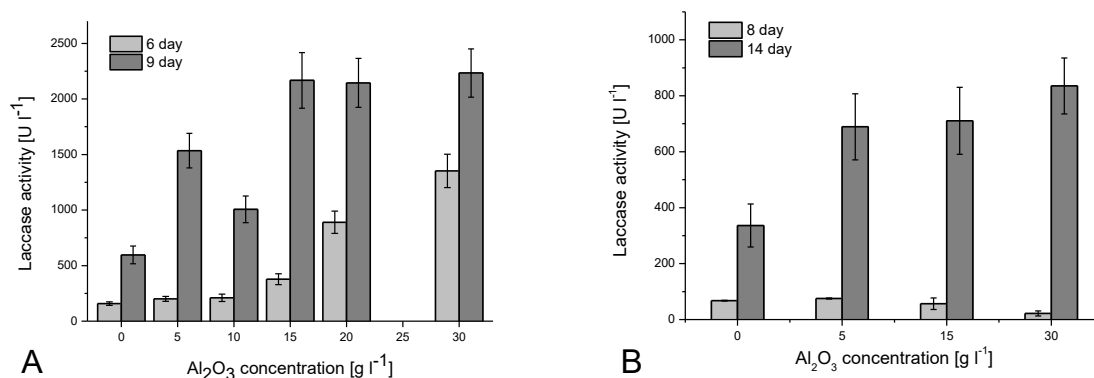
- uzyskanie zwiększenia produkcji enzymu oraz zmiany morfologii grzybni *C. unicolor* i *P. sapidus* poprzez zastosowanie innowacyjnej techniki microparticle-enhanced cultivation (MPEC), scharakteryzowanie grzybni oraz określenie wpływu mikrocząstek na ich morfologię (P1.1);

- opracowanie przeglądu literatury dotyczącego zastosowania metody MPEC do grzybów strzępkowych, ze szczególnym uwzględnieniem grzybów podstawkowych (P1.2);
- poprawa wydajności biosyntezy lakazy z *C. unicolor* poprzez zastosowanie różnych strategii prowadzenia hodowli oraz integracja procesów hodowli i oddzielenia biomasy w jednym aparacie (P1.3);
- zastosowanie innowacyjnej metody frakcjonowania pianowego do zateżniania i separacji lakazy z płynów pohodowlanych *C. unicolor* i *P. sapidus*, wraz z doбором warunków prowadzenia procesu (P1.4);
- zastosowanie wodnej ekstrakcji dwufazowej, jako kolejnej alternatywnej metody do zateżniania i separacji lakazy z płynów pohodowlanych *C. unicolor* i *P. sapidus* (P1.5);
- porównanie metod stosowanych do oczyszczania lakazy z płynu pohodowlanego *C. unicolor*, ustalenie najbardziej efektywnego sposobu i uzyskanie wysokooczyszczonego preparatu enzymatycznego (P1.6);
- ustalenie warunków prowadzenia procesu liofilizacji lakazy z *C. unicolor* oraz określenie stabilności liofilizatu (P1.7);
- zastosowanie lakazy z *C. unicolor* do modyfikacji naturalnych włókien celulozowych w technologiach wytwarzania innowacyjnych materiałów barierowych, wykorzystywanych w tekstyliach odzieżowych i technicznych, chroniących osoby narażone na szkodliwe działanie promieniowania UV (P1.8).

Omówienie poszczególnych publikacji z cyklu I:

Pierwsza z prac pt.: *Morphology engineering of basidiomycetes for improved laccase biosynthesis* (P1.1) dotyczyła badania możliwości intensyfikacji biosyntezy lakazy poprzez zastosowanie pionierskiej wówczas metody dodatku mikrocząstek do podłoża hodowlanego zwanej microparticle-enhanced cultivation (MPEC) oznaczającą w dosłownym tłumaczeniu hodowlę wspomaganą mikrocząstkami. Sama tematyka stanowiła kontynuację moich wcześniejszych prac naukowych, jednakże uwaga została przeniesiona z metod klasycznych w kierunku poszukiwania innych, bardziej innowacyjnych metod. Technika ta była wówczas badana w Katedrze Inżynierii Bioprocessowej przez zespół pod kierownictwem prof. Marcina Bizukoja do grzybów z rodzaju *Aspergillus*, dla których uzyskiwano pozytywne rezultaty (Bizukoja and Ledakowicz, 2010; Kaup et al., 2008). Zaobserwowano, iż dodatek nieorganicznych mikrocząstek umożliwia sterowanie wielkością peletek, powodując zmniejszenie ich średnicy oraz poprawę produktywności (Gonciarz and Bizukoja, 2014).

W przypadku grzybów Basidiomycota trudno było odszukać doniesienia literaturowe odnośnie stosowania metody. Jednakże prace prowadzone przez Tisma i in. (Tišma et al., 2012) dotyczące optymalizacji produkcji lakazy przez *Trametes versicolor* na podłożu składającym się z różnych odpadów przemysłowych, gdzie najlepsze rezultaty otrzymano na podłożu z odpadów z przemysłu papierniczego, które zawierały duże ilości CaCO_3 , wskazywały na jej zasadność. W związku z tym rozpoczęłam prace dotyczące badania wpływu obecności mineralnych cząstek tlenku glinu w podłożu hodowlanym na morfologię grzybni i produkcję lakazy początkowo przez grzyb *Cerrena unicolor*, a po otrzymaniu pozytywnych wyników także *Pleurotus sapidus*. Hodowle wgłębne prowadzone były w kolbach wstrząsanych, z dodatkiem do podłoża hodowlanego tlenku glinu (Al_2O_3) o średnicy mikrocząstek 10 μm w zakresie stężeń 5 - 30 g/L. W pierwszym etapie eksperymentów wykazano, że proces wzrostu grzybni w hodowlach z dodatkiem tlenku glinu, szczególnie dla stężeń powyżej 15 g/L, zachodzi szybciej a zatem i produkcja lakazy rozpoczyna się wcześniej niż w próbach kontrolnych. W próbach z mniejszą ilością tlenku glinu, stężenie do 15 g/L, zauważono całkowite wbudowanie cząstek mineralnych przez biomasę grzybni, natomiast w stężeniach 20 oraz 30 g/L obserwowano w podłożu pozostały, niewbudowany proszek. Dla stężenia tlenku glinu 15 g/L uzyskano 3,5-krotny wzrost aktywności lakazy w przypadku *C. unicolor* i 2-krotny dla *P. sapidus*, co obrazują poniższe wykresy (Rys.1).

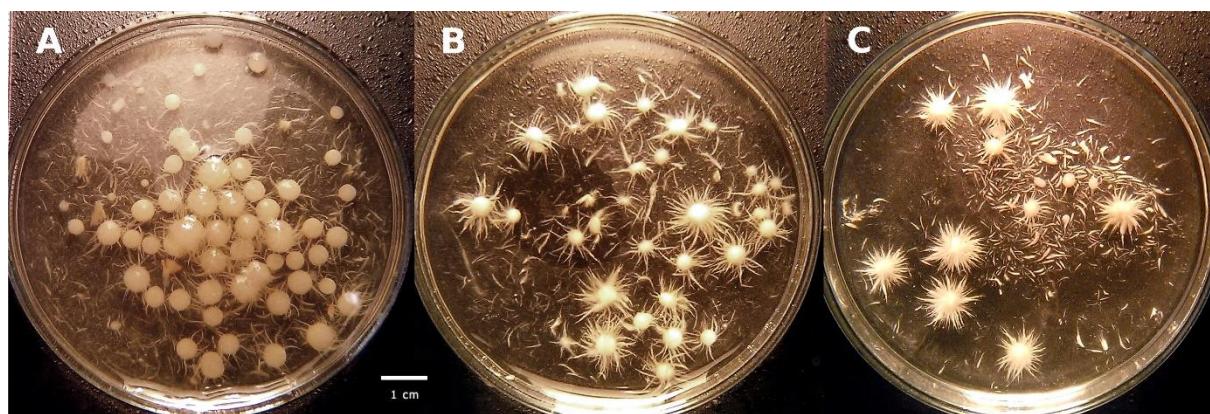


Rysunek 1. Zależność aktywności lakazy od stężenia tlenku glinu w podłożu A) dla szczepu *C. unicolor*, B) dla szczepu *P. sapidus*

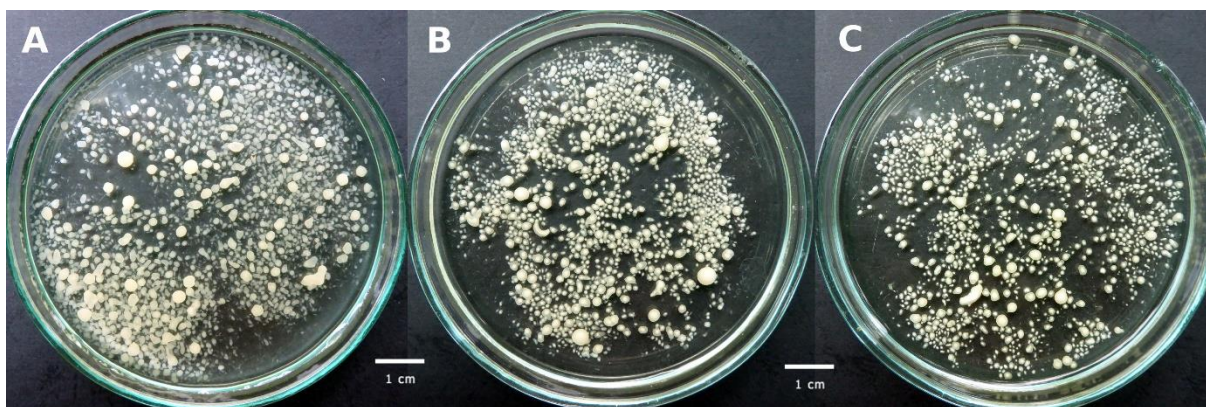
Pozytywny wpływ mikrocząstek na aktywność lakazy z *C. unicolor* zaobserwowano już w 6. dniu hodowli (Rys. 1A) dla wszystkich badanych stężeń Al_2O_3 , przy czym wartość aktywności rosła wraz ze wzrostem stężenia Al_2O_3 . Natomiast w 9. dniu procesu zaobserwowano znacznie wyższą aktywność, osiągającą dla stężenia Al_2O_3 wynoszącym 30 g/L wartość równą 2233 U/L. Jednakże podobny wzrost aktywności nastąpił już przy

stężeniu 15 g/L, dlatego stwierdzono, że powyżej tej wartości dalsze zwiększanie stężenia tlenku glinu nie powoduje już wzrostu aktywności lakazy. Odm inną sytuację zaobserwowano w przypadku hodowli *P. sapidus* (Rys. 1B), gdzie do 8. dnia hodowli aktywność enzymu nie była wykrywalna, co wskazywało na co najmniej dwudniowe opóźnienie w stosunku do poprzedniego szczepu. W 14. dniu hodowli aktywność lakazy z *P. sapidus* osiągnęła najwyższą wartość równą 835 U/L i niezależnie od stężenia mikrocząstek Al_2O_3 wszystkie wartości aktywności lakazy były mniej więcej dwukrotnie wyższe niż w serii kontrolnej. Oznacza to, że w przypadku tego szczepu zmiana stężenia mikrocząstek Al_2O_3 nie wpływa na produkcję lakazy w takim stopniu, jak ma to miejsce dla *C. unicolor*. Kolejna seria eksperymentów kinetycznych, dotycząca obserwacji zmian aktywności lakaz w czasie trwania procesów potwierdziła wcześniejsze rezultaty. W hodowlach *C. unicolor* we wszystkich próbach aktywność lakazy pojawiła się 6. dnia hodowli, ale znaczące różnice obserwowano od 7. dnia. I tak dla hodowli ze stężeniem tlenku glinu 30 g/L następował bardzo szybki wzrost produkcji enzymu. W hodowli o stężeniu 15 g/L podobny, szybki wzrost aktywności nastąpił pomiędzy 7 a 8 dniem hodowli. Maksymalna wartość aktywności lakazy wynosząca 2523 U/L została osiągnięta 9. dnia hodowli i była to zarazem najwyższa aktywność zanotowana w całym eksperymencie.

Równolegle podczas trwania hodowli prowadzono obserwacje makroskopowe rozwijającej się grzybni, co obrazują zdjęcia przedstawione na rysunkach 2 i 3.



Rysunek 2. Wpływ mikrocząstek Al_2O_3 na morfologię grzybni *C. unicolor*: A) kontrola; B) 15 g Al_2O_3 /L oraz C) 30 g Al_2O_3 /L; skala: 1 cm



Rysunek 3. Wpływ mikrocząstek Al_2O_3 na morfologię grzybnia *P. sapidus*: A) kontrola; B) 15 g $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{L}$ oraz C) 30 g $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{L}$; skala: 1 cm

Obserwowany wzrost aktywności lakazy był spowodowany działaniem mikrocząstek na aglomerację grzybnia, co doprowadziło do zmniejszenia rozmiaru powstałych peletek (średnio o 2 mm dla *C. unicolor*), zmiany ich kształtu (peletki w kształcie gwiazdy dla *C. unicolor*) i zmianę ich struktury (bardziej zwarte peletki w przypadku *P. sapidus*). Dla hodowli bez dodatku tlenku glinu obserwowano gładkie, ewentualnie słabo owłosione peletki oraz nieliczne fragmenty grzybnia rozproszonej. Dla hodowli ze stężeniem tlenku glinu 15 g/L peletki grzybnia *C. unicolor* posiadały silnie owłosioną powierzchnię (hairy pellets, star-shaped pellets), średnica ich była wyraźnie mniejsza i wynosiła od 1 do 4 mm a w próbie kontrolnej od 2 do 6 mm. Grzybnia hodowli *C. unicolor* ze stężeniem tlenku glinu 30 g/L rosła częściowo w postaci tzw. grzybnia rozproszonej, powstałe peletki były najbardziej rozgałęzione, posiadały charakterystyczną gwiazdzistą strukturę a ich średnica wynosiła od 1 do 3 mm (Rys. 2B,C).

Podsumowując, w publikacji P1.1 po raz pierwszy opisano zastosowanie techniki MPEC do hodowli podstawczaków. Wykazano, że zastosowanie metody inżynierii morfologii typu MPEC pozwala na zmianę morfologii badanych grzybów oraz poprawę wydajności produkcji lakazy niezależnie od stężenia mikrocząstek w podłożu. Stężenie tlenku glinu 5 g/L uznano jako stężenie efektywne, natomiast stężenie 15 g/L za stężenie optymalne, ponieważ dalszy dodatek tlenku glinu nie powodował wzrostu aktywności lakazy a w płynie pohodowlanym obserwowano niewbudowany proszek. Otrzymane wyniki potwierdziły jednocześnie pozytywny wpływ mikrocząstek obecnych w podłożu na wzrost i produkcję metabolitów przez grzyby Basidiomycota.

Mój wkład: współtwórca hipotezy badawczej, pomysłodawca i wiodący autor planu badań, udział w realizacji eksperymentów i wykonaniu analiz, opracowanie i dyskusja wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

Otrzymane, bardzo obiecujące wyniki badań z zastosowaniem metody MPEC skłoniły mnie do bardziej wnikliwego jej poznania i dalszej analizy mechanizmów nią rządzących. Efektem tego jest publikacja pt.: „*Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures*” (P1.2). W pracy zebrano i usystematyzowano wiedzę dotyczącą mechanizmów i zastosowania techniki MPEC do hodowli grzybów strzępkowych w hodowlach wglębnych. Praca zawiera przegląd publikacji zaczynając od najczęściej opisywanych gatunków z rodzaju *Aspergillus*, poprzez inne gatunki Ascomycetes, takie jak *Penicilium*, *Emmericella* czy *Rhizopus*. Aż do badanych przez nasz zespół grzybów zgnilizn drewna *C. unicolor* i *P. sapidus*. Ustalono, że najczęściej opisywanymi rezultatami metody są: zmiany w morfologii grzybni, zmiany w warunkach transportu tlenu i lepkości, zmiany w szybkości zużycia substratów, oraz zmiany w produkcji metabolitów czy enzymów. W większości cytowanych prac nie zajmowano się samym mechanizmem działania mikrocząstek. Jedynie (Driouch et al., 2010a) przedstawili krótki opis interakcji pomiędzy mikrocząstkami a komórkami grzybów na podstawie obserwacji mikroskopowych. W związku z tym pytanie, dlaczego metabolity lub enzymy wykazywały zwiększoną produktywność w MPEC niż w hodowlach kontrolnych, pozostało otwarte. Zgodnie z literaturą metoda wydaje się być szczególnie przydatna przy hodowli grzybów mających aglomeracyjny charakter tworzenia peletek. Badania potwierdzają, że działa ona poprzez zmniejszenie średnicy makropeletek, co ostatecznie zmienia morfologię w rozproszone strzępki. Brakuje jednak danych ilościowych opisujących to zjawisko. Wiadomo natomiast, że skład chemiczny cząstek ma tutaj niewielki wpływ. W przeglądzie uwzględniono także najnowsze przeprowadzone przez nasz zespół badania potwierdzające pozytywny wpływ mikrocząstek na szczepy grzybów podstawkowych. Podkreślono, iż mimo zupełnie odmiennej morfologii grzybów *C. unicolor* i *P. sapidus*, w obu przypadkach aktywność lakazy była odpowiednio 3,5-krotnie i 2-krotnie wyższa. W poniższej tabeli (Tab. 1) zebrano wszystkie najlepsze wyniki zastosowania metody MPEC w odniesieniu do grzybów strzępkowych.

Tabela 1. Przykłady pozytywnego wpływu metody MPEC na biomasę grzybową i wydajność bioproduktu

Organism	Bioproduct	Microparticle optimal concentration (g l ⁻¹)	Biomass morphology	Effect (productivity increase)	References
<i>Caldariomyces fumago</i> DSM 1256	Chloroperoxidase	talc (10)	loosely packed mycelia with single hyphae	10-fold	Kaup et al. 2008
		aluminum oxide (15)		6-fold	
<i>Aspergillus niger</i> AB1.13	α -glucoamylase	talc (10)	up to free mycelium	4-fold	Driouch et al. 2010a
<i>Aspergillus niger</i> SKAn 1015	β -fructofuranosidase	talc (5)	freely dispersed mycelium	10-fold	Driouch et al. 2010b
<i>Aspergillus niger</i> SKAn 1015	β -fructofuranosidase	titanium silicate oxide (25)	core-shell pellets	3.7-fold	Driouch et al. 2012
<i>Aspergillus niger</i> ANip7-MCS-gfp2	α -glucoamylase			9.5-fold	
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	lovastatin	talc (12)	smaller pellets	1.6-fold	Gonciarz and Bizukojc 2014
<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	6-pentyl- α -pyrone	iron oxide (II,III) (20)	pellets of various sizes	2-fold	Etschmann et al. 2015
<i>Aspergillus niger</i> DSM 821	2-phenylethanol	talc (20)	homogeneous cultures	1.3-fold	
<i>Aspergillus ficuum</i> NRRL 3135	phytase	talc (15)	smaller pellets	3-fold	Coban et al. 2015a
		aluminum oxide (15)		2-fold	
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	lovastatin	talc (12)	smaller pellets	3.5-fold	Gonciarz et al. 2016
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	lactic acid	talc (10)	smaller pellets	4-fold	Coban and Demirci 2016
		aluminum oxide (15)		2,3-fold	
<i>Cerrena unicolor</i> (Bull. Ex Fr) Murr. 137	laccase	aluminum oxide (15)	star-shaped pellets	3,5-fold	Antecka et al. 2016
<i>Pleurotus sapidus</i> DSM 8266			core-shell pellets	2-fold	
<i>Aspergillus sojae</i> AsT1	β -mannanase	talc (5)	smaller pellets	1,8-fold	Yatmaz et al. 2016
		Aluminum oxide (1)		2,5-fold	

Podsumowując, stwierdzono za Etschmannem (Etschmann et al., 2015), iż trudno jest ustalić jakiegokolwiek ogólne zasady dotyczące grzybów strzępkowych, stosowanych mikrocząstek i wynikającej z tego wydajności syntezy bioproduktów. Każdy gatunek grzyba, mikrocząstki i produkt należy analizować indywidualnie w danych warunkach hodowli. Ponadto, z przemysłowego punktu widzenia ważne jest, że koncepcja inżynierii morfologicznej została z powodzeniem przeniesiona z kolb do bioreaktora (Coban et al., 2015; Driouch et al., 2012, 2010a, 2010b; Gonciarz et al., 2016). Stosunkowo niskie koszty tej metody (niedrogie mikrocząstki dodawane w niewielkich ilościach) mają duże znaczenie dla przyszłych zastosowań na większą skalę.

Mój wkład: zebranie i usystematyzowanie wiedzy dotyczącej zastosowania techniki MPEC do hodowli grzybów strzępkowych w hodowlach wgłębnych, pomysłodawca i autor planu opracowania, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy szacuję na 80%.

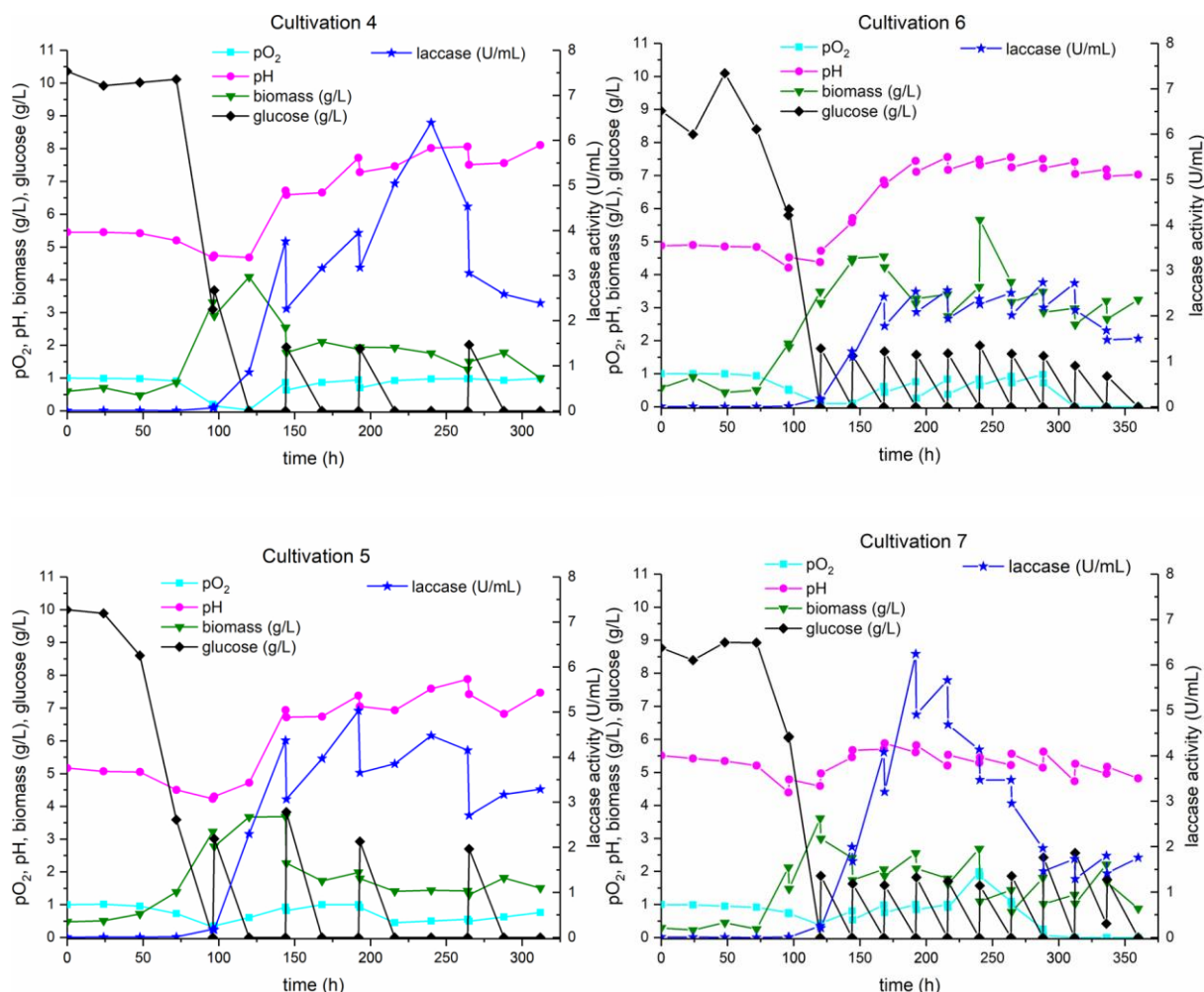
Celem kolejnych badań była dalsza intensyfikacja produkcji lakazy oraz powiększenie skali prowadzonych hodowli z kolb do hodowli bioreaktorowych. Na producenta lakazy wybrano szczep *Cerrena unicolor*, dla którego w hodowlach wgłębnych w kolbach otrzymywano znacznie wyższe aktywności enzymu niż dla szczepu *Pleurotus sapidus*. Badania dotyczyły poprawy warunków biosyntezy lakazy przez szczep *C. unicolor* poprzez zmiany w trybie prowadzenia hodowli oraz integrację procesu hodowli z separacją biomasy *in situ* bez przerywania hodowli. Zastosowane strategie prowadzenia hodowli bioreaktorowych oraz uzyskane wyniki opisano szczegółowo w publikacji pt.: ***Improvement of laccase biosynthesis by various feeding strategies and in situ integration of biomass separation (P1.3)***. Badania prowadzono w bioreaktorze zbiornikowym BIOSTAT ED firmy B-Braun (Niemcy) o objętości roboczej 15 litrów sterowanym komputerowo. Hodowle wgłębne prowadzono na zmodyfikowanym podłożu wg. Lindeberg i Holm (Janusz et al., 2007) z glukozą jako głównym źródłem węgla i L-asparaginą jako głównym źródłem azotu i zaszczepiano homogenizowaną grzybnią w ilości 240 mL. Bioreaktor wyposażony był w płaszcz grzejny, połączony z układem termostatującym, pozwalający na utrzymywanie stałej temperatury procesu wynoszącej 28°C. Mieszanie w bioreaktorze zachodziło z użyciem mieszadła łopatkowego przy 200 obrotach na minutę. Sterylne powietrze o natężeniu 2 Ndm³ na minutę wprowadzane było za pomocą belkotki przy dnie bioreaktora. Dodatkowo, bioreaktor wyposażony był w zespół czujników pozwalających na monitorowanie parametrów procesu w trakcie jego trwania: elektrodę pH,

elektrodę tlenową, wskaźnik ciśnienia i wskaźnik temperatury. Realizację prac rozpoczęto od hodowli *C. unicolor* w trybie okresowym, podczas których w 10. dniu hodowli otrzymywano wysokie aktywności lakazy wynoszące do 1,3 U/mL. Wprowadzone w kolejnych etapach modyfikacje doprowadziły do opracowania strategii prowadzenia hodowli w trybie pół-ciągłym tzw. powtarzanym okresowym (ang. repeated discontinuous fed-batch) z równoczesnym odbiorem płynu pohodowlanego bez biomasy. Testowanie takiego układu umożliwiło zastosowanie zamontowanego w bioreaktorze specjalnie skonstruowanego filtra obrotowego (SPIN filter), dzięki któremu można było pobrać płyn pohodowlany bez biomasy uzyskując integrację procesów biosyntezy i oddzielenia biomasy w jednym aparacie. Proces hodowli grzybni prowadzono w sześciu różnych wariantach stosując dodatek podłoża początkowo co 4 i co 2 dni, a następnie codziennie oraz z odbiorem bądź bez odbioru biomasy (Tab. 2).

Tabela 2. Strategie prowadzenia hodowli bioreaktorowych

Cultivation 1	Batch mode		
Cultivation 2	Fed-batch mode with one feeding		
Cultivation 3	Fed-batch mode with two feedings		
	Repeated fed-batch mode	Feeding	Spin-filter
Cultivation 4		Every second day	Yes
Cultivation 5		Every second day	No
Cultivation 6		Every day	Yes
Cultivation 7		Every day	No

W wyniku zmiany prowadzenia hodowli na tryb pół-ciągły, tzw. powtarzany okresowy, uzyskano przedłużenie żywotności grzybni oraz jej zdolności do wytwarzania enzymu. Profile zmian parametrów procesowych w trakcie trwania hodowli dolewowych znajdują się na poniższych wykresach (Rys. 4).



Rysunek 4. Zmiany parametrów procesowych w trakcie trwania poszczególnych hodowli bioreaktorowych

Maksymalną aktywność wynoszącą 6,4 U/mL osiągnięto w hodowli prowadzonej z dolewkami co drugi dzień z zastosowaniem filtra wirowego (Cultivation 4). Dla hodowli prowadzonej w tym reżimie, ale z odbiorem biomasy (Cultivation 5) uzyskano bardziej stabilny, ale niższy poziom aktywności w zakresie 3 - 5 U/mL, co sugerowało, że biomasa pozostająca w układzie sprzyja produkcji enzymu. Każdemu dodaniu pożywki towarzyszył wzrost stężenia biomasy, skokowy wzrost poboru tlenu, niewielki spadek pH i obniżenie aktywności lakazy, której wartość w kolejnych godzinach hodowli stopniowo rosła do poprzednich bądź coraz wyższych poziomów. Przy codziennym uzupełnianiu podłoża i odbiorze płynu pohodowlanego bez biomasy (Cultivation 6) efekt przedłużonego wzmocnienia aktywności lakazy nie był już tak widoczny. Prawdopodobnie, zastosowanie filtra spowodowało nadmierną akumulację biomasy, powodującą trudności z mieszaniem i brak widocznego wzrostu aktywności, której wartość utrzymywała się cały czas na poziomie do 3 U/mL. Natomiast dla hodowli bez użycia filtra

(Cultivation 7) uzyskany maksymalny poziom aktywności lakazy wynosił 6,2 U/mL, czyli był zbliżony do wartości uzyskanej w hodowli z dolewkami co drugi dzień z odbiorem płynu pohodowlanego bez biomasy. Jednakże, aby uzyskać pełny obraz wydajności danego procesu, należy wziąć pod uwagę całkowity bilans odzysku lakazy w poszczególnych procesach. W tabeli poniżej (Tab. 3) przedstawiono wyniki obliczeń bilansowych uwzględniając osobno odbiór w trakcie hodowli dolewowych, jak i ostateczną wartość aktywności lakazy po skończonej hodowli w przeliczeniu na całkowitą pojemność bioreaktora, 14 litrów.

Tabela 3. Bilans odzysku lakazy w przeprowadzonych hodowlach

	Amount of laccase collected during cultivation (U)	Final amount of laccase collected in the bioreactor (U)	Total laccase recovery (U)
Cultivation 1	-	19560	19560
Cultivation 2	8970	44710	53680
Cultivation 3	23270	4018	27288
Cultivation 4	36940	33440	70380
Cultivation 5	41240	46010	87250
Cultivation 6	62800	21000	83800
Cultivation 7	94030	24620	118650

Okazuje się, że w hodowli okresowej, mimo bardzo wysokiej aktywności w jej trakcie, realny całkowity odzysk lakazy, którą odbieramy dopiero pod koniec hodowli jest stosunkowo niski. W hodowli nr 1, gdzie teoretycznie można było uzyskać około 35000 U, końcowy odzysk enzymu wynosił niecałe 20000 U. Następnie, w hodowli nr 2, gdzie maksymalna aktywność lakazy przekroczyła 12 U/ml, co odpowiada wartości z całej objętości bioreaktora 168000 U, odzyskano tylko 53680 U. Jest to spowodowane faktem, iż bardzo trudno jest wcześniej przewidzieć moment maksymalnej aktywności enzymu i zakończyć hodowlę okresową. Natomiast, już na przykładzie hodowli nr 3 było widoczne, że nawet w przypadku braku wyraźnego piku związanego z bardzo wysoką aktywnością enzymu, dzięki odbiorowi podłoża w trakcie hodowli udaje się uzyskać jego znaczną ilość (23270 U). Największą wydajność produkcji lakazy uzyskano w procesie z codziennym uzupełnianiem podłoża, gdzie w porównaniu z hodowlą prowadzoną w trybie okresowym całkowity odzysk enzymu był ponad 6 razy wyższy. Przeprowadzone bilanse ukazują, jak ważny jest moment odbioru lakazy

oraz właściwa strategia prowadzenia procesu dolewowego, gdyż aktywność enzymu znacznie spada pod koniec hodowli. Zarówno dla hodowli przy dolewkach co drugi dzień jak i przy dolewkach codziennych więcej lakazy pozyskiwano z hodowli bez użycia SpinFiltru, największą ilość enzymu w przeprowadzonych badaniach pozyskano w hodowli nr 7.

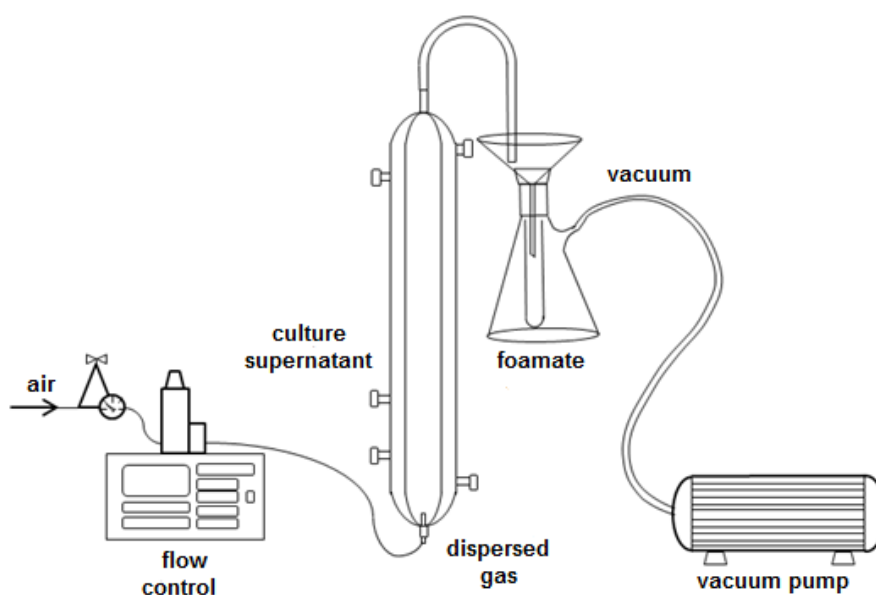
Podsumowując, należy stwierdzić, że prowadzenie hodowli w trybie z okresowym zasilaniem nieciągłym pozwala na otrzymywanie zwiększonych ilości płynu pohodowlanego o wysokiej aktywności lakazy oraz znaczne przedłużenie aktywności biologicznej grzybni *C. unicolor*. Zastosowanie filtra, umożliwiającego odbiór samego płynu pohodowlanego, zapewnia integrację procesów hodowli i oddzielenia biomasy, jednakże całkowita wartość odzysku lakazy jest wtedy nieco niższa. Biorąc pod uwagę wszystkie uzyskane wyniki, można postawić hipotezę, że najlepszą strategią zapewniającą wysokie wartości pozyskiwanej lakazy jest częste częściowe usuwanie płynu hodowlanego wraz z biomasą, któremu towarzyszy taki dodatek pożywki, aby poziom stężenia glukozy w układzie był stosunkowo niski. Taka strategia powinna zapobiegać nadmiernemu wzrostowi biomasy, a jednocześnie stymulować biosyntezę enzymu. Rozwijając tę koncepcję w zakresie zwiększania częstotliwości dodawania substratu w coraz mniejszych porcjach, można by doprowadzić do ciągłego procesu rozpoczynającego się od momentu pojawienia się enzymu w płynie pohodowlanym.

Mój wkład: współtwórca hipotezy badawczej, udział w opracowaniu koncepcji i planu badań oraz realizacji eksperymentów, opracowanie i dyskusja wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

Po etapach hodowli i intensyfikacji biosyntezy lakazy przystąpiłam do badań poświęconych jej zateżaniu i separacji (ang. downstream processing, DSP). Zgodnie z literaturą (Roque et al., 2004) jest to najbardziej energochłonny i kosztowny etap produkcji, a w przypadku składników pochodzenia biologicznego obarczony dodatkowo licznymi ograniczeniami. Białka, w tym enzymy, są bardzo nietrwałe i wrażliwe na wiele czynników środowiskowych, jak podwyższona temperatura, ekstremalne wartości pH, czy niektóre odczynniki chemiczne (Eijsink et al., 2005), przez co standardowo używane metody, takie jak ekstrakcja czy destylacja mają tu ograniczone zastosowanie. Dlatego też, poza stosowanymi przeze mnie uprzednio i często opisywanymi w literaturze metodami takimi jak ultrafiltracja czy chromatografia, uczestniczyłam w badaniach dotyczących rzadziej spotykanych i mniej poznanych procesów, do których należą frakcjonowanie pianowe i wodna ekstrakcja dwufazowa.

Fracjonowanie pianowe (foam fractionation, FF) będące przedmiotem czwartej publikacji z cyklu pt.: *Laccase concentration by foam fractionation of Cerrena unicolor and Pleurotus sapidus culture supernatants* (P1.4) jest innowacyjną metodą, która może być wykorzystana do bezpiecznego odzyskiwania produktów biologicznych z ich zanieczyszczonych mieszanin. Dobór odpowiednich parametrów procesu, takich jak pH, temperatura, czy odpowiednie detergenty, pozwala na selektywne oczyszczanie pożądaných składników z mieszanin. Celem pracy było zbadanie możliwości zastosowania procesu frakcjonowania pianowego do oczyszczania lakazy z płynów pochodzących z dwóch badanych dotychczas szczepów *Cerrena unicolor* i *Pleurotus sapidus*. Układ, w którym prowadzone były badania stanowiły: szklana kolumna o długości 56 cm i średnicy 3 cm wyposażona u dołu w element rozpraszający gaz wykonany ze szkła spiekanego, układ do kontroli przepływu gazu oraz odbieralnik piany, tak jak przedstawiono na poniższym schemacie (Rys. 5).



Rysunek 5. Schemat układu do frakcjonowania pianowego

Proces prowadzono w różnych warunkach pH w zakresie od 3 do 10, ze szczególnym uwzględnieniem pH 4, które jest zbliżone do pI enzymu oraz z dodatkiem bądź bez dodatku środków powierzchniowo czynnych, kationowego bromku cetrymonium (CTAB) i niejonowego Polisorbat 80 w zakresie stężeń od 0,2 do 1,5 mM. Eksperymenty rozpoczynano od włączenia przepływu gazu i ustalenia jego natężenia na poziomie 2,4 L/h. Następnie napełniano kolumnę roztworem płynu pochodzącego zawierającego lakazę w objętości 100 mL, co rozpoczynało proces tworzenia piany i jej wznoszenie w górę kolumny.

Wytworzoną pianę odbierano u szczytu kolumny za pomocą kolby ssawkowej wyposażonej w lejek. Takie połączenie prowadziło do rozbicia piany do fazy ciekłej i zebranie otrzymanego, zatężonego roztworu enzymu w probówce umieszczonej wewnątrz kolby ssawkowej. Proces prowadzono do chwili, w której piana ulegała rozpadowi przed dotarciem do odbieralnika. Wszystkie eksperymenty prowadzono w temperaturze pokojowej. Procesy opisywano na podstawie dwóch głównych parametrów: wydajności (yield, Y) oraz współczynnika podziału aktywności (activity partitioning coefficient, k_{act}), które wyznaczano z następujących wzorów:

$$Y = \frac{V_{foam} \cdot act_{foam}}{V_{ini} \cdot act_{ini}}$$

$$k_{act} = \frac{act_{foam}}{act_{ret}}$$

gdzie: V – objętość [mL], act – aktywność lakazy [U/mL], indeks $foam$ – kondensat piany, indeks ini – roztwór płynu pochodowlanego, indeks ret – retentat.

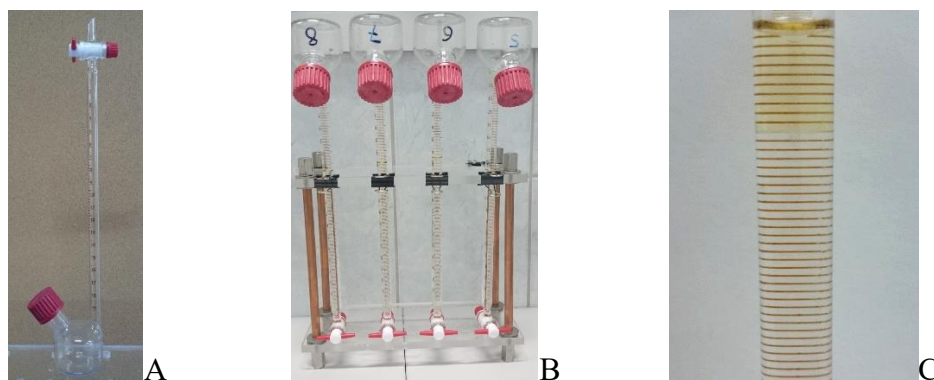
Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że wydajność procesu frakcjonowania pianowego lakazy jest zależna od producenta enzymu. W przypadku lakazy z *C. unicolor* osiągnięto bardzo wysokie współczynniki podziału aktywności między fazy kondensatu i retentatu wynoszące prawie 200 podczas gdy dla lakazy z *P. sapidus* wynosiły one około 8. Najwyższą wydajność procesu dla lakazy z *C. unicolor* sięgającą 50% uzyskano w pH 7,5 i przy stężeniu CTAB równym 0,5 mM. Dla lakazy z *P. sapidus* wydajność procesu wynosiła jedynie 25% przy najbardziej korzystnej wartości pH równej 4 i stężeniu CTAB wynoszącym 0,5 mM. Drugi, stosowany jako środek spieniający, detergent, Polisorbat 80, okazał się znacznie mniej skuteczny.

Podsumowując, stwierdzono, że mimo, iż w eksperymentach z lakazą z *C. unicolor* uzyskano współczynniki podziału wynoszące prawie 200, to nie udało się osiągnąć odzysku powyżej 50%. Oznacza to, że chociaż możliwe jest zadowalające zagęszczenie enzymu, to nadal duża jego ilość pozostaje w retentacie. Dlatego przy stosowaniu procesu do oczyszczania lakaz z ich płynów pochodowlanych zaleca się stosowanie także innych metod separacji. Ponadto, należy uwzględnić, że frakcjonowanie pianowe jest jedynie metodą zatężania enzymu, a nie jego oczyszczania. Aby uzyskać czysty produkt, konieczne jest zastosowanie dalszych metod separacji w celu oddzielenia enzymu od innych białek oraz pozostającego w kondensacie piany środka powierzchniowo czynnego.

Mój wkład: udział w opracowaniu hipotezy badawczej, planu badań oraz przygotowaniu stanowiska eksperymentalnego, nadzór nad pracami laboratoryjnymi, korekta manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 35%.

Wyniki z zastosowania kolejnego procesu tj. wodnej ekstrakcji dwufazowej (aqueous two-phase extraction, ATPE) opisano w kolejnej publikacji pt.: *Partitioning of *Cerrena unicolor* and *Pleurotus sapidus* laccases in polyethylene glycol - phosphate aqueous two-phase systems (P1.5)*. Dotyczyły one doboru najbardziej skutecznego układu ekstrakcyjnego biorąc pod uwagę podział enzymu pomiędzy dwie fazy w czterech różnych układach dwufazowych zawierających glikol polietylenowy (PEG) o następujących masach cząsteczkowych: 400, 1500, 3000, 6000 g/mol i sól fosforanową o pH 7,0. Ponownie przebadano zachowanie lakaz pochodzących z dwóch źródeł grzybowych: *Cerrena unicolor* i *Pleurotus sapidus*. Wybór tych dwóch gatunków grzybów był tu szczególnie wskazany, ponieważ z badań wstępnych przeprowadzonych na Uniwersytecie w Dortmundzie (Dortmund University of Technology), wynikało, iż lakazy wytwarzane przez wspomniane dwa szczepy grzybowe różnią się między sobą zachowaniem podczas procesu ATPE. Lakaza pochodząca z *C. unicolor* pozostawała w fazie solnej, natomiast lakaza z *P. sapidus* przechodziła do fazy organicznej zawierającej PEG. Badania prowadzono w specjalnie do tego celu zaprojektowanych kolbach ekstrakcyjnych (Rys. 6) wzorowanych na tych opisanych przez Prinza (Prinz et al., 2012) składających się z części mieszalnikowej, części biuretovej z podziałką oraz zaworu.



Rysunek 6. A) Kolba ekstrakcyjna; B) Kolby po inkubacji i rozdzieleniu się faz; C) Rozdzielone fazy układu

W pierwszym etapie kolby napełniane były roztworami tworzącymi układ ekstrakcyjny oraz płynem pH-owalnym, tak, żeby całkowita masa każdej próby wynosiła 15 g. Następnie próby poddawane były mieszaniu za pomocą mieszadła magnetycznego w temperaturze 25°C przy

prędkości mieszania wynoszącej 300 obr/min w ciągu godziny w celu osiągnięcia stanu równowagi międzyfazowej. Po tym etapie kolby ostrożnie odwracano celem przelania mieszaniny do części biurowej i inkubowano w temperaturze 25°C przez około 20 godzin do rozdzielenia się faz. Proces ten odbywał się w termostacie Sartorius Stadim CERTOMAT BS-T. Długi czas rozdziału wynikał z małej różnicy gęstości i niskiego napięcia powierzchniowego pomiędzy fazami. W badaniach uwzględniono wpływ masy cząsteczkowej PEG i stosunku objętości faz na podział i odzysk lakaz oraz wpływ poszczególnych składników tworzących fazy na aktywność enzymu. Stwierdzono, że masa cząsteczkowa PEG ma znaczący wpływ na podział lakazy. Im wyższa była jej wartość tym podział enzymu między fazy był bardziej wyraźny. Potwierdzono znaczne różnice w zachowaniu lakaz pochodzących od różnych gospodarzy. Lakaza z *C. unicolor* wykazywała znacznie wyższe powinowactwo do fazy bogatej w sól niż lakaza z *P. sapidus*. W układach zawierających PEG 1500, 3000 oraz 6000 lakaza z *C. unicolor* zatężała się w fazie solnej, podczas gdy w układzie zawierającym PEG 400 dzieliła się pomiędzy fazę solną i PEGową. Natomiast lakaza z *P. sapidus*, niezależnie od stosowanego rodzaju glikolu polietylenowego, wykazywała powinowactwo do fazy górnej, bogatej w polimer, co zasadniczo odróżnia ją od lakazy z *C. unicolor*. Obserwowane różnice są najprawdopodobniej spowodowane różnym stopniem glikozylacji enzymów. Ustalono, że najlepsze warunki prowadzenia procesu ATPE lakazy z *C. unicolor* zapewnia układ PEG 6000 – fosforan. Uzyskiwano wtedy siedmiokrotne zatężenie enzymu, odzysk równy 90% oraz współczynnik podziału aktywności pomiędzy fazy solną i PEGową wynoszący 2200. Natomiast dla lakazy z *P. sapidus* był to układ PEG 400 – fosforan z trzykrotnym zatężeniem enzymu, odzyskiem równym 90% oraz współczynnikiem podziału aktywności pomiędzy fazy PEGową i solną dążącym do nieskończoności.

Podsumowując, w badaniach wykazano, że w procesie ATPE mechanizm zgodnie, z którym następuje podział enzymu pomiędzy dwie fazy nie jest związany z występowaniem w układzie różnych frakcji enzymu, ale jest związany z jego producentem. Potwierdzono dezaktywujący wpływ soli fosforanowej na aktywność lakazy z *P. sapidus*. Dla lakazy z *C. unicolor* wpływ ten był nieznaczny. Ponadto, nie stwierdzono istotnego wpływu glikolu polietylenowego na aktywność obu enzymów.

Mój wkład: udział w opracowaniu koncepcji badań i przygotowaniu stanowiska badawczego, nadzór nad pracami laboratoryjnymi, korekta manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 15%.

Prace nad poszukiwaniem najbardziej korzystnej metody oczyszczania lakazy dopełniły badania z zastosowaniem ultrafiltracji i chromatografii preparatywnej. Obie te metody stosowałam uprzednio w ramach badań do pracy doktorskiej i zostały one przedstawione w artykule pt.: „*The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties*” opublikowanym w Applied Microbiology and Biotechnology (2006) 69: 682-688. Jednakże obecnie przy zastosowaniu nowszej aparatury i innej kolumny chromatograficznej uzyskano znacznie wyższe wartości stopni oczyszczenia i aktywności specyficznych oczyszczonych lakaz. Otrzymane wyniki zawierające zestawienie i porównanie wszystkich czterech badanych metod zateżania i separacji lakazy przedstawiono w publikacji pt.: ***Comparison of downstream processing methods in purification of highly active laccase*** (P1.6). Opisane w niej badania miały na celu uzyskanie możliwie najwyższej aktywności lakazy w hodowli bioreaktorowej, porównanie metod jej separacji i oczyszczania oraz końcowe oczyszczenie enzymu do uzyskania wysokoaktywnego preparatu. Na producenta lakazy wybrano szczep *Cerrena unicolor*, dla którego opracowano uprzednio innowacyjną metodę hodowli bioreaktorowej w trybie pół-ciągłym tzw. powtarzanym okresowym opisaną w publikacji P1.3. Hodowlę prowadzono z zastosowaniem specjalnie skonstruowanego filtra pozwalającego na oddzielenie biomasy wewnątrz reaktora. Takie rozwiązanie umożliwiało integrację biosyntezy enzymu i filtracji biomasy w jednym aparacie. Do hodowli zastosowano opisywany uprzednio wariant z uzupełnianiem podłoża co drugi dzień, który poskutkował otrzymaniem lakazy o wysokiej aktywności specyficznej wynoszącej 204,1 U/mg. Pozyskana z przesączu pohodowlanego lakaza została oczyszczona przy wykorzystaniu trzech niezależnych metod: frakcjonowania pianowego (FF), wodnej ekstrakcji dwufazowej (ATPE) i ultrafiltracji (UF). Dwa pierwsze procesy prowadzono zgodnie z warunkami określonymi w poprzednich publikacjach. Proces FF w układzie przedstawionym w publikacji P1.4 z dodatkiem do płynu pohodowlanego środka powierzchniowo czynnego CTAB o stężeniu 0,5 mM i pH mieszaniny ustalonym na 7. ATPE w układzie glikol polietylenowy (PEG) o masie cząsteczkowej 6000 oraz sól fosforanowa o pH równym 7 w kolbach ekstrakcyjnych opisanych w publikacji P1.5. Natomiast proces UF prowadzono jedno i/lub dwuetapowo przy użyciu membrany polietylosulfonowej (PES) Vivaflow 50 o powierzchni efektywnej wynoszącej 0,005 m² i punktach odcięcia 10 i 30 kDa. W skład układu eksperymentalnego wchodziła pompa Masterflex, wspomniane membrany Vivaflow 50 oraz naczynia na permeat i retentat. Proces prowadzono do momentu 20-krotnego zmniejszenia objętości retentatu zawierającego wysoce aktywny enzym, który następnie

równoważono 10 mM octanem sodu o pH 5. Otrzymane wyniki zebrane w poniższej tabeli (Tab. 4) pozwoliły na porównanie i ocenę skuteczności zastosowanych procesów.

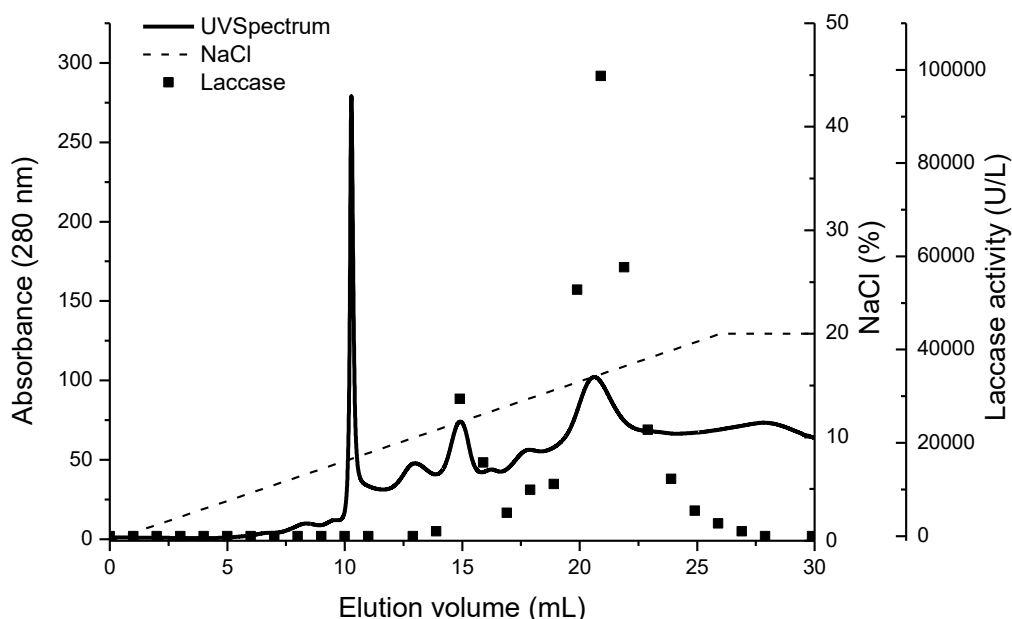
Tabela 4. Porównanie wyników oczyszczania lakazy za pomocą trzech różnych metod DSP

	Volume (mL)	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Culture liquid	1000	35.74	7295	204.1	100	1
Ultrafiltration cut-off 10 kDa	50	7.63	7112	932.1	97.5	4.6
Ultrafiltration cut-off 10, 30 kDa	50	3.98	5379	1352	73.7	6.6
Foam fractionation	61	6.31	1818	288.1	24.9	1.4
ATPE	980	8.33	7105	852.9	97.4	4.2

gdzie: Yield (odzysk, wydajność) jest to procent całkowitej aktywności lakazy pozostającej po procesie; Purification fold (stopień oczyszczenia) jest to stosunek aktywności specyficznej lakazy po danym etapie oczyszczania do jej początkowej wartości. Aktywność specyficzna to stosunek całkowitej aktywności do zawartości białka (U/mg).

Wszystkie badane metody okazały się przydatne do zateżniania/oczyszczania lakazy, jednak w różnych zakresach. Zastosowanie ATPE w układzie PEG 6000 - fosforan poskutkowało zaskakująco wysoką wydajnością. Otrzymana wartość odzysku enzymu w fazie solnej wynosiła ponad 97% i była znacznie wyższa niż po dwuetapowej ultrafiltracji, gdzie wartość odzysku wynosiła średnio 74%. W porównaniu do UF i ATPE wydajność procesu FF z odzyskiem 24,9% i stopniem oczyszczenia 1,4 była raczej niska. Należy jednak uwzględnić, iż jest to metoda tania i nie wymagająca zastosowania odczynników chemicznych, przez co rekomendowana jako pierwszy etap procesu służący do zateżniania znacznie rozcieńczonych roztworów. Ostatecznie, z uwagi na najwyższą wartość stopnia oczyszczenia oraz zanieczyszczenie ekstraktu po ATPE fazą solną, co stanowiłoby konieczność zastosowania dodatkowych procesów oczyszczania, do dalszych etapów separacji lakazy wybrano kondensat otrzymany po procesie dwuetapowej ultrafiltracji. Tak zateżniony enzym poddano dalszemu oczyszczaniu za pomocą szybkiej chromatografii cieczowej białek z wykorzystaniem systemu ÄKTA Pure 25 z kolumną jonowymienną Q Resource. Białka wymywano przy użyciu liniowego gradientu 0-0,2 M NaCl w 10 mM buforze octanu sodu (pH 5,0) przy prędkości przepływu 1 mL/min. Po przeprowadzeniu rozdziału chromatograficznego frakcje zawierające lakazę zidentyfikowano w dwóch głównych obszarach (objętości elucji wynoszące 15 i 21 mL), które zinterpretowano

jako dwie izoformy enzymu (Rys. 7). Zostały one oddzielnie zebrane, poddane dializie przy użyciu filtrów 5 kDa i przechowywane w temperaturze 4°C.



Rysunek 7. Oczyszczanie lakazy z *C. unicolor* za pomocą chromatografii jonowymiennej

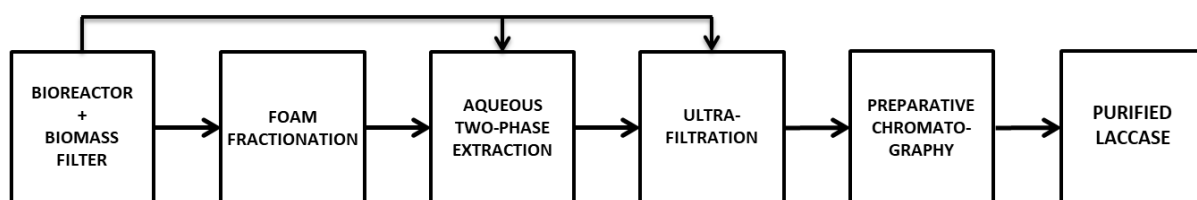
Na przedstawionym chromatogramie zauważyć można jeszcze dwa mniej wyraźne piki przy objętościach elucji wynoszących około 13 i 18 mL, jednakże z powodu niskiej absorbancji i odpowiadającej jej niskiej aktywności enzymu nie zostały one dalej analizowane. Odpowiedni dobór metody rozdzielu chromatograficznego spowodował uzyskanie efektu rozdzielania izoform lakazy, którego nie udało się uzyskać za pomocą wszystkich badanych uprzednio metod. W poniższej tabeli (Tab. 5) zamieszczono rezultaty uzyskane po kolejnych procesach przeprowadzonej dwuetapowej metody oczyszczania.

Tabela 5. Dwuetapowe oczyszczanie lakazy z *C. unicolor*

Purification step	Volume [mL]	Protein [mg]	Total activity [U]	Specific activity [U/mg]	Yield [%]	Purification fold
Culture liquid	1000	35.74	7295	204.1	100	1
Ultrafiltration cut-off 10, 30 kDa	50	3.98	5379	1352	73.7	6.6
Isoform I Resource Q	1.812	0.175	411	2349	5.63	11.51
Isoform II Resource Q	2.234	0.516	1741	3374	23.87	16.53

Otrzymane objętości rozdzielonych izoform lakazy wynosiły odpowiednio 1,812 i 2,234 mL, przy całkowitej aktywności wynoszącej 411 i 1741 U. Obie frakcje miały niebieskawy odcień, co było także widoczne na ich widmach. Wyznaczone masy cząsteczkowe lakaz wynosiły około 57 i 64 kDa, a ich wartości pI odpowiednio około 3,6 i 3,7, co jest zgodne z danymi literaturowymi dla enzymu. Rozdzielone dwie izoformy lakazy charakteryzowały się wysokimi wartościami aktywności specyficznej wynoszącej odpowiednio 2349 i 3374 U/mg, co w porównaniu z poprzednio uzyskanymi wynikami (Michniewicz et al., 2006) stanowi około 4,8 i 16 razy wyższe wartości. Cały proces oczyszczania składał się jedynie z dwóch etapów, po których dla izoformy II uzyskano wysoką wartość odzysku równą 23,9% oraz stopień oczyszczenia 16,5.

Podsumowując, zaproponowana dwuetapowa metoda oczyszczania składająca się z procesów UF i rozdziału chromatograficznego okazała się skuteczna i doprowadziła do uzyskania produktu zarówno o wysokiej aktywności, jak i czystości. Ponadto, przeprowadzone badania pozwoliły na zaproponowanie zintegrowanego procesu produkcji, zateżniania i separacji lakazy z *C. unicolor* przedstawionego na schemacie poniżej:



Rysunek 8. Proponowane sekwencje biosyntezy i oczyszczania lakazy

Otrzymane wyniki mogą zatem posłużyć jako podstawa do zaprojektowania rzeczywistego procesu zintegrowanego, łączącego zaproponowane metody intensywnej biosyntezy, zateżniania oraz oczyszczania lakaz grzybowych.

Mój wkład: wiodący twórca hipotezy badawczej, opracowanie koncepcji i planu badań, udział w realizacji eksperymentów, szczególnie UF i rozdziału chromatograficznego, opracowanie metody rozdziału chromatograficznego i dobór kolumny, opracowanie i dyskusja wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

Po otrzymaniu wysokoaktywnych preparatów lakazowych, kolejnym wyzwaniem stało się bezpieczne przechowywanie bioproduktu, bez utraty jego cennych właściwości. Wysokie temperatury tradycyjnych metod suszenia uniemożliwiają ich zastosowanie do produktów

po pochodzenia biologicznego, w tym enzymów. Rozwiązaniem może być proces suszenia sublimacyjnego, liofilizacja, który wykorzystując znacznie niższe temperatury sprawia, iż w wielu produktach nie zauważa się modyfikacji. Proces polega na usuwaniu rozpuszczalnika w obniżonej temperaturze i pod zmniejszonym ciśnieniem. Gdy rozpuszczalnikiem jest woda następuje wówczas sublimacja lodu, czyli jego bezpośrednie przejście w stan pary. Cały proces liofilizacji jest złożony i wieloetapowy. Rozpoczyna się od wstępnego zamrożenia materiału pod ciśnieniem atmosferycznym, następnie prowadzona jest próżniowa sublimacja lodu oraz dosuszanie materiału do żądanej wilgotności końcowej (Witrowa-Rajchert and Samborska, 2002). Usunięcie wody z materiału przy jego temperaturze niższej niż 6°C powoduje, że większość reakcji chemicznych i mikrobiologicznych zostaje zahamowana, a uzyskany produkt charakteryzuje się bardzo wysoką jakością i trwałością (Ratti, 2001). Ta właściwość powoduje rosnące zainteresowanie procesem przemysłu biotechnologicznego oraz farmaceutycznego. Metoda jest także coraz częściej wykorzystywana przy produkcji komercyjnych preparatów enzymatycznych, ponieważ pozwala na uzyskanie aktywnej, sproszkowanej formy enzymu, co jest niezwykle dużym ułatwieniem w ich przechowywaniu, czy transporcie. Z danych literaturowych dotyczących badania procesu liofilizacji lakazy wynikało, że w niektórych przypadkach enzym tracił znaczną część swojej aktywności (Jarosz-Wilkołazka et al., 2004; Velázquez-Cedeño et al., 2002), jednak u innych autorów (Shleev et al., 2007) lakaza zachowywała nawet do 90% swojej aktywności wyjściowej. Wydawało się zatem, że aktywność liofilizowanych preparatów enzymatycznych jest związana z warunkami prowadzenia procesu, co potwierdzały także doniesienia literaturowe (Stepanova et al., 2003). W związku z powyższym, celem badań przedstawionych w kolejnej publikacji pt.: **”Liofilizacja lakazy z *Cerrena unicolor*” (P1.7)** było ustalenie najbardziej korzystnych warunków prowadzenia procesu liofilizacji lakazy z *Cerrena unicolor*, ze szczególnym uwzględnieniem zależności czasu trwania procesu od wielkości stosunku powierzchni do objętości badanej próbki. Ponadto, celem dodatkowym było sprawdzenie i porównanie trwałości lakazy po liofilizacji podczas przechowywania w różnych warunkach: w formie rozpuszczonej w warunkach chłodniczych oraz w formie liofilizatu w eksykatorze. Proces liofilizacji prowadzono w suszarce liofilizacyjnej ALPHA-2.4 firmy CHRIST w temperaturze -20°C, dla etapu sublimacji właściwej ciśnienie wynosiło 1 mbar, a w dosuszaniu 0,044 mbar. Próbkę umieszczano w szklanych naczyniach - płytkach Petriego o średnicy 50 bądź 150 mm. Początkowo przyjęto czas trwania procesu równy 24 godz. dla wyjściowej wartości stosunku S/V wynoszącej 0,88 cm²/mL. A następnie dla próbek o proporcjonalnie większych wartościach stosunku S/V badano możliwość skrócenia czasu trwania procesu do 12 i 6 godz.

Otrzymane wyniki wskazały na istnienie zależności pomiędzy czasem trwania liofilizacji a wartością stosunku powierzchni do objętości liofilizowanej próbki. Po przeprowadzeniu pierwszego eksperymentu, gdzie stosunek S/V wynosił $0,88 \text{ cm}^2/\text{mL}$, stwierdzono, iż warunki prowadzenia procesu, takie jak temperatura i podciśnienie, są odpowiednie, a założony czas liofilizacji wynoszący 24 godz. wystarczający, aby uzyskać liofilizaty o niskiej zawartości wilgoci, bez widocznego lodu. W drugim eksperymencie sprawdzano, czy zwiększenie wartości stosunku S/V do $1,76 \text{ cm}^2/\text{mL}$ umożliwi skrócenie czasu procesu do 12 godz. Niestety dla tak dobranych warunków proces się w tym czasie nie zakończył, w próbkach nie osiągnięto całkowitego odparowania wody, a obserwowano pozostałość lodu. Dopiero przy kolejnym podwojeniu wartości stosunku powierzchni do objętości liofilizowanej próbki ($S/V=3,52 \text{ cm}^2/\text{mL}$) udało się skrócić czas procesu do 12 godz. Ostatni etap badań potwierdził, iż dalsze skrócenie czasu do 6 godz. przy zachowaniu tych samych warunków nie jest możliwe. A zatem do zajścia liofilizacji niezbędne jest znalezienie optymalnego czasu dla badanej próbki. Biorąc pod uwagę fakt, iż proces liofilizacji zachodzi w warstwach powierzchniowych, zalecane jest przeprowadzanie go na próbkach o dużej wartości stosunku S/V, czyli o małej warstwie grubości zamrożenia. Istotnym elementem warunków prowadzenia procesu było także wcześniejsze schłodzenie metalowego statywu, na którym umieszczano próbki. Dzięki temu podczas trwającego na samym początku procesu nagrzewania pompy i wytwarzania próżni, próbki nie pobierały ciepła z pólek statywu, a tym samym nie ogrzewały się. Takie zjawisko, byłoby silnie niewskazane, ze względu na roztopianie się próbki, co z kolei mogłoby powodować wrzenie.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów i wyznaczone wartości aktywności enzymatycznych bezpośrednio przed i po procesach liofilizacji pozwoliły na stwierdzenie, że sam proces liofilizacji lakazy powoduje niewielki, około 10%, spadek jej aktywności enzymatycznej. Otrzymane w kolejnych liofilizacjach wartości odzysków były zbliżone, najwyższą wartość równą 92,93% uzyskano w liofilizacji pierwszej prowadzonej przy stosunku powierzchni do objętości próbki wynoszącym $0,88 \text{ cm}^2/\text{mL}$ w czasie 24 godz. Uzyskano zatem znacznie lepsze rezultaty niż w przypadku *Coriolus hirsutus* i *Coriolus zonatus*, gdzie ubytek aktywności wynosił odpowiednio 44 i 48% (Stepanova et al., 2003).

Bardziej problematyczne okazało się zagadnienie dalszego przechowywania uzyskanych próbek. Stwierdzono, że liofilizaty przechowywane w formie uwodnionej w warunkach chłodniczych nie zmieniały swojej aktywności, natomiast te w postaci suchych liofilizatów umieszczonych w eksykatorze ją traciły. Wartość aktywności liofilizowanej lakazy przechowywanej w eksykatorze spadała o 50 i 67% odpowiednio po 8 i 11 tygodniach. Taka

sytuacja była także obserwowana przez inne zespoły (Jarosz-Wilkołazka et al., 2004; Shleev et al., 2007) i jest najprawdopodobniej spowodowana częściową denaturacją enzymu, bądź zmianami w jego strukturze. Trwałość liofilizatów można zwiększyć przechowując je z dodatkiem substancji konserwujących bądź liofilizować próbki rozpuszczone w buforze. Aktywność katalityczną enzymu można także poprawić dodając podczas liofilizacji specyficznych substancji pomocniczych, takich jak węglowodory, polimery czy kwasy tłuszczowe (Bancerz and Ginalska, 2009). Co więcej, badane liofilizaty przechowywane były w plastikowych, przezroczystych pojemniczkach. Podejrzewa się, że ciemne, nieprzepuszczalne dla światła opakowanie, pozwoliłoby na lepsze utrzymanie aktywności w przechowywanych liofilizatach.

Mój wkład: wiodący twórca hipotezy badawczej, opracowanie koncepcji i planu badań, udział w realizacji eksperymentów, opracowanie i dyskusja wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy szacuję na 75%.

Zwieńczeniem całości badań poświęconych lakazie, od hodowli grzybnii do uzyskania jej wysoce aktywnych preparatów enzymatycznych, było jej zastosowanie. Zarówno przemysł włókienniczy, jak i celulozowo-papierniczy wykorzystuje w swoich technologiach przetwórczych związki chemiczne, często alkaliczne, silnie zanieczyszczające środowisko. Wykorzystanie lakazy jako środka do rozkładu ligniny, odbarwiania ścieków przemysłowych, czy modyfikacji włókien lnianych wydaje się być rozwiązaniem, które podpowiada sama natura. Jednakże, mimo jej ogromnego potencjału jako „zielonego katalizatora” zastosowanie enzymu w przemyśle, napotyka na szereg trudności technicznych i ekonomicznych. Do najważniejszych należą: niska stabilność operacyjna, wysokie koszty produkcji i oczyszczania, wrażliwość na inhibitory, czy wyzwania związane z immobilizacją w celu wielokrotnego zastosowania. Dlatego potrzebne i cenne są badania zmierzające do pokonania wspomnianych trudności i ukazujące konkretne rozwiązania i możliwości aplikacyjne.

Produkowana w moich badaniach lakaza z *Cerrena unicolor* została parokrotnie zastosowana w technologiach związanych z przemysłem włókienniczym. Najpierw, jeszcze w ramach realizowanej przeze mnie pracy doktorskiej, gdzie badałam możliwości zastosowania enzymu do biotransformacji barwników oraz badane w Instytucie Włókiennictwa zastosowanie do wstępnej bioobróbki tkanin z włókien lnu. Uzyskane wyniki zostały opisane i opublikowane w Dyes and Pigments (2008) 77: 295-302, pt.: „*Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from Cerrena unicolor*” oraz w Fibres and Textiles in EE (2007) 63: 86-

89, pt.: *“Bio-scouring of linen fabrics with laccase complex from *Cerrena unicolor*”*. Stwierdzono w nich, że lakaza może mieć szerokie zastosowanie w procesach odbarwiania ścieków pochodzących z przemysłu włókienniczego lub pokrewnego. Enzym zachowywał wysoką aktywność działania nawet przy wysokich stężeniach barwnika. Na tej podstawie stwierdzono, że wdrożenie technologii odbarwiania ścieków za pomocą enzymów może być alternatywnym rozwiązaniem w stosunku do konwencjonalnych metod odbarwiania, przynoszącym równie skuteczne działanie, a nie ingerującym w środowisko. W przeciwieństwie do odbarwiania użycie lakazy do wstępnej bioobróbki tkanin z włókien lnu jest nadal zagadnieniem nowym, rzadko spotykanym w literaturze. Lakaza z *C. unicolor* okazała się i tu obiecującym rozwiązaniem. W badaniach stwierdzono porównywalną chłonność, dla tkaniny lnianej po wstępnej obróbce enzymatycznej w odniesieniu do obróbki alkalicznej oraz uzyskano dobre efekty wybielenia. Wykonane badania aplikacyjne pozwoliły na stwierdzenie, że zarówno odbarwianie ścieków pofarbiarskich, jak i obróbka tkaniny lnianej za pomocą lakazy z *C. unicolor*, może prowadzić do zastąpienia konwencjonalnych, często szkodliwych procesów chemicznych, biotechnologiami bardziej nowoczesnymi i ekologicznymi. W związku z tym dalsze moje działania koncentrowały się na sprawdzeniu innych możliwości aplikacyjnych otrzymywanej wysokoaktywnej lakazy. Po raz kolejny taką możliwość uzyskałam w Instytucie Włókiennictwa w Łodzi. Tym razem wytworzony preparat lakazowy został zastosowany do oczyszczania włókien naturalnych przy ich wstępnej obróbce. Zastosowanie obróbki enzymatycznej w przemyśle tekstylnym wiąże się przede wszystkim z poprawą wyglądu i jakości produktów poprzez usuwanie krótkich włókien z ich powierzchni lub nadanie tkaninie modnego wyglądu poprzez biopolerowanie oraz usuwanie z niej przed barwieniem resztek nadtlenu wodoru, które pozostały po wybieleniu. Na szczególną uwagę zasługują w tym zakresie kompleksy wieloenzymatyczne zawierające celulazy, pektynazy, a także oksydoreduktazy i hydrolazy. Liczne opublikowane prace naukowe potwierdzają znaczenie udziału procesów enzymatycznych w technologiach wykańczania tekstyliów (Sójka-Ledakowic et al., 2006; Sreenath et al., 1996).

Wyniki przeprowadzonych badań opisano w publikacji *„The Eco-Modification of Textiles Using Enzymatic Pretreatment and New Organic UV Absorbers”* (P1.8), gdzie głównym celem było opracowanie technologii wytwarzania materiałów tekstylnych wykonanych z naturalnych włókien celulozowych, głównie lnu lub jego mieszanek z bawełną, charakteryzujących się właściwościami barierowymi chroniącymi przed promieniowaniem UV. W badaniach tkaniny tekstylne poddano wstępnej bioobróbce przy użyciu wysoce aktywnej lakazy z *Cerrena unicolor* oraz, dla porównania, standardowemu czyszczeniu

alkalicznemu, a następnie modyfikacji za pomocą organicznego absorbera promieniowania UV opartego na pochodnych 1,3,5-triazyny. Zastosowany preparat enzymatyczny zawierający lakazę pochodził z dwuetapowego procesu. Pierwszy etap stanowiła jego biosynteza przez szczep *Cerrena unicolor* prowadzona w sterowanym komputerowo bioreaktorze BIOSTAT ED firmy B-Braun o pojemności roboczej równej 15 litrów na zmodyfikowanym podłożu wg. Lindeberg i Holm (Janusz et al., 2007) w stałej temperaturze 28°C przez 10 dni, opisane w publikacji P1.3. Tak, jak opisano poprzednio hodowle prowadzono w trybie pół-ciągłym, tzw. powtarzanym okresowym z codziennym dodatkiem sterylnego podłoża i równoczesnym odbiorem płynu pohodowlanego. Taki układ umożliwiało zastosowanie obrotowego filtra zamontowanego w bioreaktorze, dzięki któremu można było pobrać płyn pohodowlany bez biomasy. W trakcie hodowli pobierano próbki co 22 - 24 godz. w ilości 50 mL. Próbkę w pierwszej kolejności filtrowano na filtrach bibułowych 389 firmy Sartorius w celu oddzielenia resztek grzybni, a następnie zatężano/oczyszczano poprzez ultrafiltrację przy użyciu membrany Vivaflow 50 PES (Sartorius) o punkcie odcięcia 30 kDa. Proces ten prowadzono do momentu dziesięciokrotnego zmniejszenia objętości retentatu zawierającego wysoce aktywny enzym. W wyniku tego uzyskiwano preparat enzymatyczny z lakazą o aktywnościach 10 - 14 U/mL względem syryngaldazyny i około 26 U/mL względem ABTS. W celu uzyskania większych wydajności i otrzymania bardziej trwałego preparatu enzymatycznego część próbek poddawanych ultrafiltracji przepłukiwano dodatkowo 10 mM buforem octanowym o pH 5. W wyniku tego zabiegu uzyskano większe niż dziesięciokrotne zatężenie i wartości aktywności lakazy w preparacie rzędu 17 U/mL względem syryngaldazyny i 45 U/mL względem ABTS. W wyniku przeprowadzonych badań aplikacyjnych stwierdzono, iż kontrolowane stosowanie enzymatycznej obróbki wstępnej tkanin wykonanych z naturalnych włókien celulozowych pozwala na skuteczne usuwanie zanieczyszczeń z tych włókien, co skutkuje poprawą właściwości sorpcyjnych oraz dobrym wnikaniem środków barwiących, organicznych filtrów UV i innych modyfikatorów chemicznych do struktury tkaniny. Dzięki temu, uzyskuje się produkty o właściwościach chroniących przed promieniowaniem UV (UPF > 40, przepuszczalność w całym zakresie promieniowania UVA i UVB < 3%) – tzw. innowacyjne materiały barierowe, które mogą być stosowane w tekstyliach przeznaczonych do użytku na zewnątrz, chroniących osoby narażone zawodowo na szkodliwe działanie promieniowania UV. Ponadto stwierdzono, iż ścieki, powstałe w wyniku dwuetapowej obróbki, przy zastosowaniu kompleksu enzymatycznego w pierwszym etapie obróbki wstępnej, charakteryzują się znacznie niższą wartością ChZT niż w przypadku obróbki alkalicznej. Co więcej, ze względu na znacznie niższą temperaturę procesu enzymatycznego (60°C) w porównaniu z procesem chemicznym

(98°C) zaproponowana obróbka enzymatyczna jest bardziej energooszczędna niż tradycyjna metoda alkaliczna.

Mój wkład: współtwórca hipotezy badawczej, przygotowanie wysokoaktywnego kompleksu enzymatycznego zawierającego lakazę, przygotowanie manuskryptu w części dotyczącej hodowli, biosyntezy i przygotowania preparatu enzymatycznego, korekta manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 30%.

Cykl II

„Innowacyjne metody oczyszczania fikobiliprotein”

Materiał badawczy będący przedmiotem opisywanych poniżej prac stanowił ekstrakt fikobiliprotein, zawierający przede wszystkim C-fikocyjaninę (C-PC) oraz allofikocyjaninę (APC), uzyskiwany w Katedrze Inżynierii Bioprosesowej PŁ w wyniku dezintegracji biomasy termofilnego szczepu cyjanobakterii *Synechococcus* PCC 6715. Przeprowadzone badania odbywały się w ramach grantu NCN pt.: „Foto-biosynteza, wydzielanie i oczyszczanie termostabilnej fikocyjaniny”.

Stworzone zaplecze laboratoryjne z aparaturą do badania różnych metod zateżniania i oczyszczania bioproduktów dawało możliwość zmiany podmiotu zainteresowania i rozpoczęcia prac eksperymentalnych z wykorzystaniem wspomnianego ekstraktu. Podstawowym celem niniejszych badań było pozyskanie pigmentu C-fikocyjanina o jak najwyższej klasie czystości – czystości analitycznej. Zastosowane metody stanowiły: frakcjonowanie pianowe, wodna ekstrakcja dwufazowa, ultrafiltracja oraz chromatografia preparatywna. Początkowo procesy prowadzono osobno i w trybie okresowym, tak, żeby ustalić najbardziej korzystne warunki ich prowadzenia. A następnie wprowadzano tryb ciągły oraz badano możliwość łączenia metod w procesy wieloetapowe. Warto wspomnieć, że zastosowanie metody frakcjonowania pianowego do oczyszczania C-PC nie było wcześniej opisywane, także całość tych badań stanowi nowość w literaturze przedmiotu.

Jako efekty przeprowadzonych badań udało się osiągnąć zakładane cele w postaci następujących rezultatów:

- ustalenie warunków prowadzenia procesów frakcjonowania pianowego i wodnej ekstrakcji dwufazowej do separacji C-fikocyjaniny z cieczy po dezintegracji biomasy i porównanie wyników z metodą ultrafiltracji (P2.1);

- uzyskanie rozdziału fikobiliprotein: C- i allofikocyjaniny w wyniku zastosowania dwuetapowego procesu: frakcjonowania pianowego i wodnej ekstrakcji dwufazowej (P2.2);
- ustalenie warunków prowadzenia procesu frakcjonowania pianowego C-fikocyjaniny w trybie ciągłym, porównanie jego przebiegu z trybem okresowym oraz ustalenie warunków rozdziału fikobiliprotein pomiędzy fazę kondensatu a retentatu (P2.3);
- otrzymanie wysoce stabilnej C-fikocyjaniny o najwyższej klasie czystości analitycznej w wyniku zastosowania dwuetapowej metody oczyszczania, określenie warunków stabilności i częściowa charakterystyka rozdzielonych fikobiliprotein (P2.4);
- uzyskanie patentu na wynalazek pt.: „Sposób oczyszczania C-fikocyjaniny z ekstraktu biomasy cyjanobakterii”.

Pierwsza publikacja, pt.: ***“Comparison of three methods for thermostable C-phycoerythrin separation and purification”*** (P2.1), dotyczy opisu i porównania wstępnych wyników z zastosowania trzech metod DSP: frakcjonowania pianowego, wodnej ekstrakcji dwufazowej i ultrafiltracji. Przedmiotem badań były dwa ekstrakty otrzymane po dezintegracji biomasy *Thermosynechococcus* sp. PCC 6715 różniące się poziomem stężenia białka i stopniem czystości C-fikocyjaniny. Do procesu frakcjonowania pianowego zastosowano układ eksperymentalny opisany w publikacji P1.4. W tych badaniach początkowo nie regulowano odczynu pH badanych ekstraktów, a natężenie przepływu powietrza ustalono na 2,4 L/h. Natomiast, w celu zintensyfikowania procesu, zbadano wpływ dodatku dwóch różnych środków powierzchniowo czynnych: kationowego bromku cetylotrimetyloamoni (CTAB) o stężeniu 0,2 mM oraz niejonowego Polisorbat 80 o stężeniu 0,5 mM. Następnie sprawdzono wpływ zmiany pH na 5,0, która to wartość odpowiada punktowi izoelektrycznemu C-PC. Eksperymenty przeprowadzono w temperaturze 25°C. Kolejny proces, wodnej ekstrakcji dwufazowej, prowadzono w kolbach opisanych w publikacji P1.5. Wszystkie układy, ATPSystems, składały się z glikolu polietylenowego (PEG) o jednej z trzech różnych mas cząsteczkowych: 400, 1500 i 6000, roztworu buforu fosforanowego o pH 7 oraz surowego ekstraktu. Badane układy zostały dobrane w taki sposób, aby całkowity udział masowy składników tworzących fazy (ang. phase forming component, PFC) wynosił około 60% w/w. Każda mieszanina zawierała określoną ilość roztworu podstawowego PFC, 4 g surowego ekstraktu oraz wodę dejonizowaną w ilości uzupełniającej masę mieszaniny do 15 g. Ostatni z badanych, proces ultrafiltracji, prowadzono z wykorzystaniem urządzenia SARTOFLOW

Smart firmy Sartorius. System wyposażony jest w skalowany zbiornik recyrkulacyjny oraz trzy czujniki ciśnienia, umieszczone odpowiednio w przewodach zasilającym, retentatu i permeatu, umożliwiające pracę systemu zgodnie z wartościami zadanymi przez użytkownika. Do układu dołączona jest perystaltyczna pompa do diafiltracji, umożliwiająca wprowadzanie produktu lub buforu oraz elektroniczna waga do monitorowania permeatu. Procesy ultrafiltracji prowadzono w temperaturze otoczenia. 200 mL surowego ekstraktu wprowadzano do naczynia recyrkulacyjnego i podawano przy pomocy pompy do modułu filtracyjnego. Zastosowano dwa rodzaje membran: polietylenosulfonową Sartocon Slice 50 PESU oraz Hydrosart opartą na stabilizowanej celulozie zoptymalizowanej do zastosowań w procesach biofarmaceutycznych. Obie membrany charakteryzowały się powierzchnią efektywną 0,005 m² i punktem odcięcia 10 kDa. Proces prowadzono do momentu, aż objętość retentatu o wysokim stężeniu C-PC zmniejszyła się 2-u i 10-cio krotnie.

Do opisu stosowanych procesów służyły następujące parametry:

- odzysk (Yield, Y) oznaczający ilość zatężonego/oczyszczonego bioproduktu w danym procesie w stosunku do ilości w roztworze wejściowym, wyznaczany ze wzoru:

$$Y = \frac{C_p \cdot V_p}{C_c \cdot V_c}$$

gdzie: C oznacza stężenie bioproduktu [mg/mL], V oznacza objętość, indeks p odnosi się do fazy, w której bioprodukt jest zatężany, a indeks c odnosi się do surowego ekstraktu wprowadzonego do układu.

- współczynnik podziału (K) informujący o stosunku stężeń bioproduktu w poszczególnych fazach:

$$K = \frac{C_p}{C_s}$$

gdzie indeks p odnosi się do fazy z zatężonym/oczyszczonym bioproduktem, a indeks s odnosi się do drugiej fazy analizowanego układu.

- stopień czystości określany jako stosunek absorbancji roztworu przy długości fali charakterystycznej dla danego bioproduktu (616 nm dla C-fikocyjaniny) do absorbancji przy długości fali 280 nm oznaczającej wszystkie inne białka zawarte w roztworze.
- stopień oczyszczenia (Purification factor, PF) będący stosunkiem stopni czystości bioproduktu po i przed procesem oczyszczania:

$$PF = \frac{P_p}{P_c}$$

gdzie P_p to czystość danej fazy po procesie oczyszczania, a P_c to czystość surowego ekstraktu.

Parametry Y i K są ze sobą powiązane, ale każdy z nich wskazuje na inne cechy procesu. Natomiast parametr PF jest od nich niezależny, jego wartość wiąże się ze wzrostem czystości bioproduktu wskazując, czy w wyniku danego procesu czystość bioproduktu uległa zwiększeniu, czy też nie. Otrzymane wyniki zbiorcze przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 6).

Tabela 6. Porównanie stosowanych metod DSP do oczyszczania C-PC

Purification step	Time	Yield (%)	K	Purification factor
FF Flow rate 2.4 L/h	40 min	48.81	12.92	1.472
ATPE PEG 6000-phosphate salt	24 h	97.81	28.15	1.466
UF Hydrosart 10 kDa	25 min	92.00	-	1.123

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że proces frakcjonowania pianowego ekstraktu zawierającego fikobiliproteiny zachodzi samoistnie bez dodatku środków powierzchniowo czynnych i nie wymaga regulacji pH. Otrzymywane odzyski C-PC podczas procesu FF są rzędu 49%, a stopień oczyszczenia utrzymuje się na poziomie 1,5. Wyższe wartości parametrów, takich jak odzysk i współczynnik podziału, uzyskiwano dla procesu ATPE. Najbardziej skuteczny układ ATPE, składający się z glikolu polietylenowego 6000 i soli fosforanowej zapewniał odzysk C-PC w fazie polimerowej na poziomie 98%, współczynnik podziału około 28 i stopień oczyszczenia 1,47. Natomiast w procesie ultrafiltracji otrzymywane odzyski wynosiły średnio 92%, a stopień oczyszczenia jedynie 1,12. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów zaproponowano dwa możliwe sposoby oczyszczania C-PC w zależności od czystości i stężenia surowego ekstraktu. W pierwszym wariantcie byłaby to metoda dwuetapowa z procesem ATPE w układzie PEG 6000 – fosforan, zapewniająca wysoki odzysk i współczynnik podziału, po czym usunięcie PEGu z roztworu i dalszy wzrost czystości C-PC uzyskiwano by w procesie ultrafiltracji z zastosowaniem membrany Hydrosart. Stopień zateżenia i czas trwania drugiego procesu byłyby zależne od pożądanego efektu, biorąc pod uwagę, iż wydłużenie czasu trwania ultrafiltracji powoduje wzrost czystości pigmentu, ale równocześnie następuje spadek wartości odzysku. W drugim wariantcie, gdy stężenie C-PC w surowym ekstrakcie jest niskie, proponowana jest trzyetapowa kombinacja, obejmująca sekwencję FF, ATPE i UF. Zastosowanie w pierwszym etapie metody frakcjonowania pianowego umożliwi wzrost stężenia C-PC i zmniejszy całkowity koszt procesu.

Mój wkład: wiodący udział w opracowaniu hipotezy badawczej i planu badań, udział i nadzór nad pracami eksperymentalnymi, opracowanie wyników i przygotowanie manuskryptu w części poświęconej zatężaniu i oczyszczaniu fikobiliprotein, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy szacuję na 55%.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na określenie dalszej ścieżki badawczej, która obejmowała między innymi bardziej dogłębne zbadanie procesów frakcjonowania pianowego i wodnej ekstrakcji dwufazowej, możliwości ich uciągnięcia, bądź powiększenia skali oraz w końcu połączenia stosowanych metod w procesy dwuetapowe.

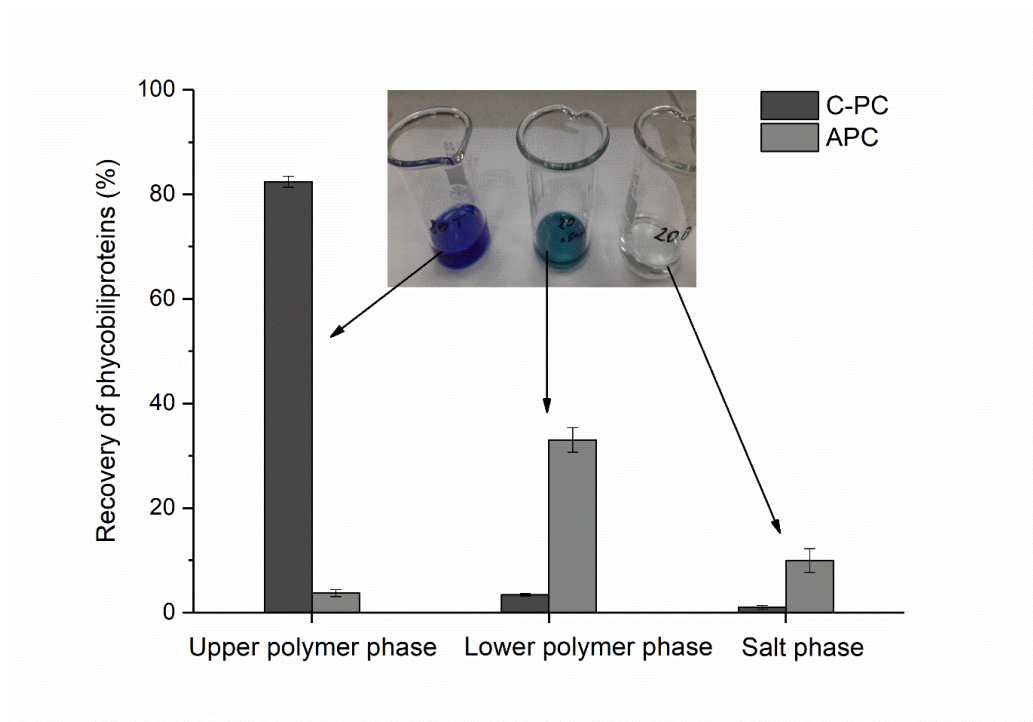
W pierwszej kolejności przystąpiono do badań zatężania i separacji fikobiliprotein z zastosowaniem metod frakcjonowania pianowego i wodnej ekstrakcji dwufazowej. Wyniki zawarte w publikacji pt.: *“Separation and purification of phycobiliproteins from *Thermosynechococcus* PCC 6715 by foam fractionation and aqueous two-phase extraction”* (P2.2) związane są z pogłębionym badaniem i doбором najbardziej korzystnych warunków prowadzenia obu procesów oraz ich nowatorskie połączenie w proces dwuetapowy. Dla metody frakcjonowania pianowego zakres eksperymentów uwzględniał bardziej wnikliwe niż uprzednio badania wpływu dodatku detergentów (CTAB w stężeniu 0,2 mM i Polisorbat 80 w trzech stężeniach 0,5; 1,0; 2,0 mM), badanie wpływu temperatury w pełnym zakresie od 15 do 50°C, odczynu pH w zakresie 4 - 10 oraz dobór wartości natężenia przepływu gazu w kolumnie. Dla danej kolumny o określonej geometrii i na podstawie wyników wcześniejszych badań (publikacja P1.4) wybrano natężenia przepływu w zakresie 2,4 - 6,0 L/h. Przy badaniach wpływu pH surowy ekstrakt regulowano do zadanej wartości przy pomocy 0,1 M wodorotlenku sodu lub 53% kwasu cytrynowego. Eksperymenty wymagające różnych temperatur przeprowadzono wykorzystując płaszczyznę grzejną kolumny połączony z termostatem wodnym umożliwiającym utrzymanie stałej zadanej temperatury podczas trwania procesu. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów potwierdzono, że ze względu na dobre właściwości roztworu fikobiliprotein do pienienia się proces można prowadzić bez dodatku surfaktantów. Dodatek Polisorbatu 80 nie przynosił widocznej poprawy procesu, a CTAB powodował szybką denaturację białka. Zwiększenie temperatury prowadzenia procesu przynosiło jedynie niewielką poprawę jego wydajności, a najwyższą wartość czystości C-PC w kondensacie równą 1,2 uzyskano dla temperatury 25°C. Ustalono, że pH roztworu fikobiliprotein, wynoszące ok. 7,5, jest odpowiednie dla procesu, co potwierdziło, iż regulacja pH nie jest konieczna. Natężenie przepływu powietrza, badane w zakresie od 2,4 do 6 L/h,

okazało się być zależne od stężenia C-PC w surowym ekstrakcie. Jednakże, przy natężeniu równym 2,4 L/h uzyskiwano najmniejszą objętość kondensatu oraz najwyższe wartości współczynników podziału i stopni oczyszczenia. Uzyskiwane wartości odzysków C-PC w kondensacie piany były na poziomie 50%, a czystość pigmentu była niższa niż 1,5, co klasyfikuje ją do zastosowania jako barwnik spożywczy (da Silva Figueira et al., 2018). Stwierdzono, że w kondensacie piany oprócz C-PC występują również inne fikobiliproteiny, tj. allofikocyjanina, co oznacza, że proces nie jest specyficzny w stosunku do C-PC.

Drugi z procesów, ATPE, badano w układach sól - glikol polietylenowy z zastosowaniem buforu fosforanowego i cytrynowego oraz PEGów o następujących masach cząsteczkowych: 400, 1500, 3000, 6000, w sumie 20 różnych układów. We wszystkich przebadanych wariantach C-fikocyjanina i inne fikobiliproteiny dyfundowały do fazy górnej, wykazując większe powinowactwo do fazy polimerowej. Najwyższą czystość C-PC wynoszącą 2,72 oraz najwyższy stopień oczyszczenia równy 2,31 uzyskano w układzie PEG 1500 – cytrynian, co kwalifikuje ją jako barwnik spożywczy, kosmetyczny oraz jako biomarker (da Silva Figueira et al., 2018). Z układów PEG – fosforan najkorzystniejszy okazał się układ z PEG 1500, dla którego odzysk wynosił około 80%, współczynniki podziału 2416, a stopień oczyszczenia równy 2. Uzyskany wynik był inny niż w dotychczasowych doświadczeniach, gdzie najlepsze rezultaty otrzymywano dla układu z PEG 6000. W tym układzie (PEG 6000 - fosforan) faza PEGowa rozdzieliła się na dwie fazy, tworząc dodatkową fazę pośrednią, która znajdowała się pomiędzy fazami polimerową i solną. Przeprowadzone pomiary spektrofotometryczne wykazały obecność w niej allofikocyjaniny (APC). W układach PEG – cytrynian również obserwowano to zjawisko. Układy o niższej masie cząsteczkowej PEG 1500 i 3000 charakteryzowały się wyraźnie wyższymi odzyskami i współczynnikami podziału niż układy z PEG 6000.

W celu intensyfikacji oczyszczania C-PC w ostatnim etapie badań zaproponowano proces dwuetapowy, łączący frakcjonowanie pianowe z wodną ekstrakcją dwufazową. W tym procesie kondensat piany zawierający zatężoną i częściowo oczyszczoną C-PC podawano jako substrat do procesu ATPE. Takie rozwiązanie procesowe nie zostało dotychczas opisane w literaturze, a zastosowanie zatężonej C-PC w postaci kondensatu pozwoliło na znaczne zmniejszenie objętości roztworu kierowanego na ATPE. W przeprowadzonych eksperymentach, przede wszystkim w obecności PEGów 3000 i 6000, ponownie zaobserwowano podział układów nie na dwie, ale na trzy fazy – jedną fazę solną i dwie polimerowe. W tym doświadczeniu obserwowany efekt dodatkowego podziału fazy polimerowej był nawet bardziej widoczny. Po ich dokładnej analizie okazało się, że górna faza polimerowa zawierała prawie samą C-

fikocyjaninę, a dolna faza polimerowa - allofikocyjaninę. Dzięki temu, poprzez wydzielenie się dodatkowej trzeciej fazy widocznej na granicy międzyfazowej, uzyskano efekt podziału fikobiliprotein. Otrzymane wyniki przedstawiono na wykresie poniżej (Rys. 9).



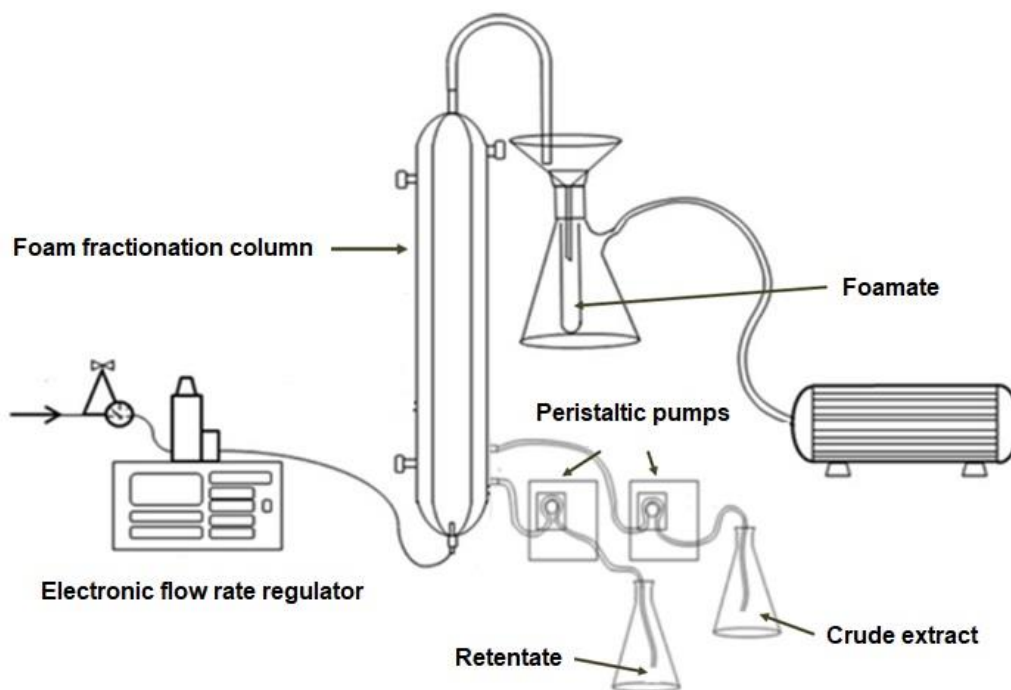
Rysunek 9. Odzysk C-PC i APC w trzech otrzymanych fazach w układzie PEG 6000–cytrynian wraz ze zdjęciem trzech oddzielnie zebranych faz

Na załączonym zdjęciu widać fazę polimerową, nazwaną górną, o widocznym intensywnym zabarwieniu niebieskim zawierającą głównie C-PC, dodatkową fazę polimerową, o mniejszej objętości i o kolorze zielononiebiesko – turkusowym zawierającą głównie APC, nazwaną roboczo fazą polimerową dolną oraz bezbarwną fazę solną. Uzyskany efekt daje możliwość rozdzielania fikobiliprotein, co w przypadku trzech badanych dotychczas metod nie było możliwe i nie zostało uprzednio opisane w literaturze. Wprawdzie Suarez Ruiz i in. (Suarez Ruiz et al., 2020) wykazali obecność fazy na granicy międzyfazowej w procesie ATPE z wykorzystaniem PEG i cieczy jonowych, w której zidentyfikowali głównie skrobię i lipidy z dezintegrowanej przez mielenie biomasy, jednak nie traktowali tej fazy jako części układu. Otrzymane wyniki są zatem bardzo obiecujące, gdyż wskazują na możliwość rozdzielania fikobiliprotein w zaproponowanej dwuetapowej metodzie łączącej procesy FF i ATPE.

Mój wkład: współtwórca hipotezy badawczej i planu badań, udział i nadzór nad pracami laboratoryjnymi, udział w opracowaniu i interpretacji wyników, dyskusja wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

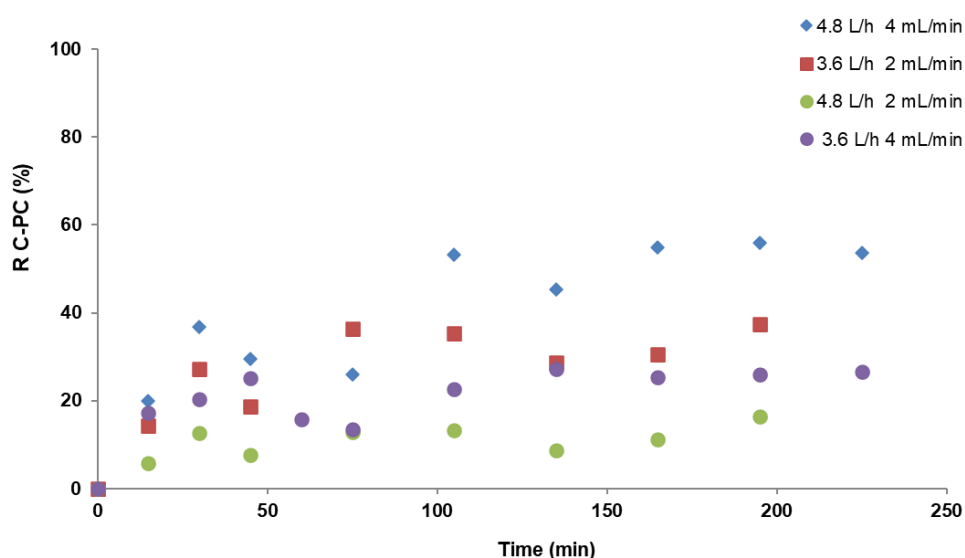
Kolejna publikacja z cyklu, pt.: „*Isolation of Phycobiliproteins from Thermosynechococcus PCC 6715 by Foam Fractionation in Batch and Continuous Modes*” (P2.3), dotyczy dalszego badania procesu frakcjonowania pianowego, a w szczególności możliwości jego prowadzenia w trybie ciągłym. Wcześniejsze badania potwierdziły zasadność stosowania metody frakcjonowania pianowego do rozdzielania fikobiliprotein. Jednakże dotyczyły one wyłącznie procesu prowadzonego w trybie okresowym. Natomiast, zwłaszcza na etapie przetwarzania końcowego, to procesy ciągłe są uznawane za docelowe i skutkujące intensyfikacją produkcji (Gerstweiler, 2023). Zastosowanie operacji ciągłych pozwala obniżyć koszty produkcji, w tym nakłady kapitałowe i koszty eksploatacyjne, poprzez zmniejszenie przestrzeni zajmowanej przez urządzenia i bardziej efektywne ich wykorzystanie. Dlatego głównym celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie możliwości prowadzenia procesu frakcjonowania pianowego ekstraktu fikobiliprotein w trybie ciągłym.

Wyniki uzyskane dla eksperymentów przeprowadzonych w trybie okresowym stanowiły podstawę do planowania i prowadzenia procesów w trybie ciągłym. Stanowisko laboratoryjne, opisywane uprzednio w publikacji P1.4, zostało wyposażone w dwie dodatkowe pompy perystaltyczne. Pierwsza z nich zapewniała stały dopływ surowego ekstraktu (substratu), a druga – ciągle usuwanie nadmiaru retentatu. Schemat aparatury przedstawiono na rysunku poniżej (Rys. 10).

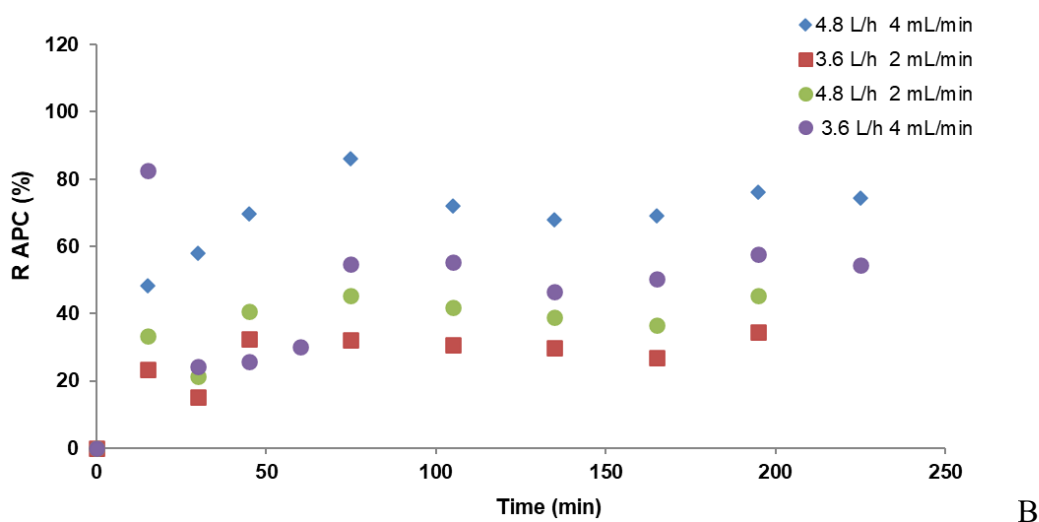


Rysunek 10. Układ do frakcjonowania pianowego prowadzonego w trybie ciągłym

Proces rozpoczynano w ten sam sposób jak w trybie okresowym, a po dotarciu piany do szczytu kolumny uruchamiano pompy, powstały kondensat odbierano cyklicznie co 15 - 30 min. Wszystkie eksperymenty prowadzone były w temperaturze pokojowej i pH natywnym. Eksperymenty przeprowadzono przy trzech różnych wartościach natężenia przepływu powietrza, 2,4, 3,6 i 4,8 L/h, oraz dwóch eksperymentalnie określonych natężeniach przepływu surowego ekstraktu wpływającego do kolumny i retentatu odbieranego podczas procesu, ustalonych na 2 i 4 mL/min. W tym trybie natężenie przepływu powietrza oraz strumienie ekstraktu fikobiliprotein i retentatu musiały być starannie dobrane, aby zapewnić doprowadzanemu ekstraktowi fikobiliprotein wystarczająco długi czas przebywania w kolumnie umożliwiając jego wypienienie. Procesy prowadzono przez 3 godziny, chyba że wcześniej nastąpiło jego samoistne zatrzymanie poprzez brak wystarczającej ilości piany w kolumnie. Pomimo korzystnych rezultatów otrzymanych dla procesu okresowego przepływ powietrza wynoszący 2,4 L/h, okazał się niewystarczający do utrzymania procesu w trybie ciągłym. Dla pozostałych parametrów wymiana całej objętości retentatu w kolumnie następowała w ciągu 25 minut dla przepływu roztworów ekstraktu i retentatu 4 mL/min oraz 50 minut przy przepływach 2 mL/min. Stabilizacja procesów następowała po upływie około 100 minut od ich rozpoczęcia. Najwyższe wartości odzysku (recovery, R) C-PC w kondensacie wynoszące około 60% (Rys. 11A) odnotowano dla procesu o parametrach natężenia przepływu powietrza 4,8 L/h i wartości natężenia przepływu na pompach 4 mL/min, podczas gdy przy tym samym natężeniu przepływu powietrza, ale dwa razy mniejszym przepływie ustawionym na pompach odzysk C-PC był najmniejszy i nie przekraczał 20% (Rys. 11A). Potwierdzono zatem, że przy wyższych wartościach natężenia przepływu powietrza otrzymuje się wyższe wartości odzysku, ale równocześnie maleją wartości współczynnika podziału.



A



Rysunek 11. Uzyskiwane odzyski: A) C-fikocyjaniny w kondensatach piany;
B) allofikocyjaniny w retentatach dla 4 badanych układów

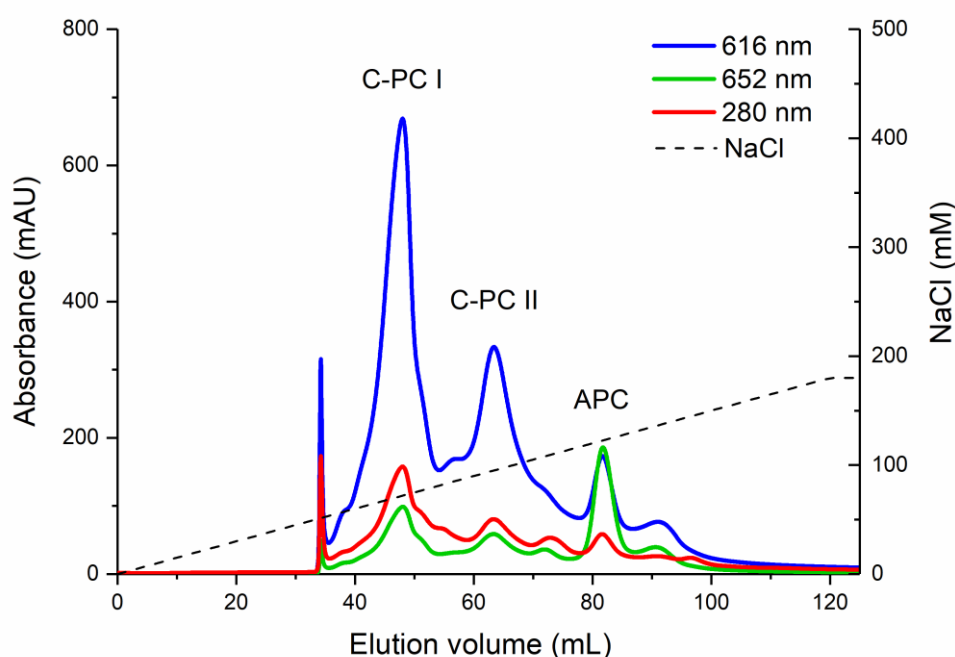
W prowadzonych procesach, podobnie jak w tych prowadzonych w trybie okresowym, uzyskiwano efekt częściowego podziału fikobiliprotein pomiędzy frakcje kondensatu i retentatu. C-PC w większej ilości dyfundowała do granicy faz, ostatecznie tworząc kondensat, a APC pozostawała w retentacie (Rys. 11B). Efekt rozdziału fikobiliprotein był szczególnie widoczny w procesie z przepływem powietrza 4,8 L/h i pompach ustawionych na przepływ 4 mL/min, podczas którego zanotowano najwyższy odzysk APC w odbieranym retentacie sięgający 90%, podczas gdy najwyższa wartość w procesie okresowym wynosiła 60%. Oznacza to, że metoda FF daje możliwość rozdzielenia fikobiliprotein od siebie, co wcześniej nie było stwierdzone, ani opisywane w literaturze.

Podsumowując, przeprowadzone badania potwierdziły skuteczność metody frakcjonowania pianowego jako alternatywnej metody oczyszczania fikobiliprotein, zwłaszcza C-fikocyjaniny i allofikocyjaniny, zarówno w trybie okresowym, jak i ciągłym. Udowodniono, że układ stosowany uprzednio w trybie okresowym można łatwo przekształcić w układ do trybu ciągłego, co zapewnia wyższą wydajność produktu końcowego. Średnie wartości odzysku C-PC przy natężeniach przepływu powietrza od 2,4 do 4,8 L/h wynoszą do 60%. Uzyskiwany docelowy produkt zawiera C-PC o czystości wynoszącej około 1,3 z procesu okresowego oraz do 1,5 z procesu ciągłego, co w obu przypadkach pozwala na jej zastosowanie jako barwnik spożywczy. Dlatego też, biorąc pod uwagę prostotę, energooszczędność i brak zapotrzebowania na odczynniki chemiczne, metoda frakcjonowania pianowego jest zdecydowanie zalecana do dalszych badań i zastosowań, zwłaszcza jako pierwszy etap procesu oczyszczania.

Mój wkład: współtwórca hipotezy badawczej, udział w opracowaniu planu badań, nadzór nad pracami laboratoryjnymi, udział w opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy szacuję na 60%.

Prowadzone z pigmentem C-fikocyjanina badania zwieńczono doborem kolumny i układu chromatograficznego zapewniających jej oczyszczenie do najwyższej klasy czystości analitycznej. Otrzymane wyniki uzupełnione o częściową fizykochemiczną charakterystykę otrzymanych produktów zamieszczono w publikacji pt.: „*A novel two-step purification process for highly stable C-phycoerythrin of analytical grade purity and its properties*” (P2.4). Zaproponowano proces dwuetapowy, w którym jako pierwszy zastosowano proces frakcjonowania pianowego dedykowany do rozcieńczonych roztworów, a następnie preparatywną chromatografię cieczową, jako najbardziej efektywną metodę oczyszczania. W pierwszym etapie otrzymywano przeszło 6-cio krotne zmniejszenie objętości roztworu, przeszło 3-krotne zatężenie C-PC oraz wzrost jej czystości 1,36 razy. Otrzymany kondensat piany poddawano rozdzielaniu chromatograficznemu, w wyniku którego uzyskiwano rozdzielanie fikobiliprotein. Badania prowadzono na aparacie ÄKTA pure 25 z zastosowaniem następujących kolumn anionowymiennych: HiTrap FF, ResourceQ o objętościach 1 i 5 mL oraz MonoQ. Najwyższą czystość C-PC i jej całkowity rozdział od allofikocyjaniny uzyskano na kolumnie QResource w układzie z 10 mM buforem octanowym o pH 5,0 i elucją 0,1 M NaCl w gradiencie 0 - 20%. Uzyskiwany odzysk wynosił około 79% a stopień oczyszczenia 3,3. W wyniku rozdziału chromatograficznego przedstawionego na wykresie poniżej (Rys. 12) otrzymywano dwie wyraźne frakcje C-fikocyjaniny o czystościach 4,66 i 4,25 oraz jedną frakcję allofikocyjaniny o czystości 3,23.



Rysunek 12. Chromatogram ukazujący rozdział fikobiliprotein: Absorbancja przy 280, 616 i 652 nm (linie ciągłe), gradient NaCl (linia przerywana)

Uzyskane frakcje zostały osobno zebrane oraz poddane analizie elektroforezy SDS-PAGE i badaniom stabilności temperaturowej, pH oraz odporności na światło. Obie frakcje C-PC zawierały podjednostki α o masie cząsteczkowej równej 15 kDa i β o masie 16,4 kDa, natomiast masa cząsteczkowa allofikocyjaniny wynosiła 15,4 kDa. Obie frakcje oczyszczonej C-fikocyjaniny (C-PC I i C-PC II) były odporne na zmiany temperatury w zakresie od 4 do 50°C podczas 5-cio godzinnej inkubacji, a ich stężenie resztkowe nie spadło poniżej 92%. Frakcja C-PC I wykazywała nieznacznie większą stabilność - jej stężenie resztkowe w temperaturze 64°C po 5 godzinach wynosiło 79%, podczas gdy dla frakcji C-PC II tylko 72%. Porównując z danymi literaturowymi, uzyskane wyniki były nawet nieco lepsze niż przedstawione uprzednio dla tego samego szczepu (Liang et al., 2018), gdzie w temperaturze 50°C uzyskano jedynie 90% stężenia początkowego. Allofikocyjanina wykazywała zdecydowanie mniejszą termostabilność, w temperaturze 50°C po 5-ciu godzinach inkubacji następował spadek jej stężenia resztkowego do 71%, natomiast powyżej 60°C następowała jej całkowita denaturacja. Przeprowadzone testy stabilności termicznej długoterminowej polegające na inkubacji próbek w temperaturach 4, 25 i 45°C trwającej 28 dni wykazały, iż C-PC przechowywana w warunkach chłodniczych i temperaturze pokojowej (4 i 25°C) była stabilna a jej stężenie resztkowe nie spadło poniżej 90%. Stopniowy spadek stężenia obu frakcji C-PC wynoszący blisko 50%

nastąpił dopiero w temperaturze 45°C. Podobny ubytek białka odnotowano dla allofikocyjaniny przechowywanej w temperaturze 4 i 25°C, natomiast w 45°C ulegała ona całkowitej denaturacji po upływie 8 dni od początku inkubacji. Stwierdzono zatem, że najbardziej odpowiednimi warunkami do przechowywania bioproduktu są temperatury 4°C lub -20°C i pH = 4. Badana C-fikocyjanina zachowywała swoje właściwości przy pH w zakresie 4 - 8, natomiast pH zasadowe powodowało jej szybką degradację. Przy wartości pH 11 następował spadek stężenia C-PC do 50%, natomiast w pH 12 pigment ulegał całkowitemu odbarwieniu. Optymalnym pH dla allofikocyjaniny była wartość 5 i 9, w roztworze o pH 3, 11 oraz 12 uległa ona rozkładowi i utracie barwy. C-fikocyjanina w postaci obu frakcji C-PC I i C-PC II wykazywała bardzo podobną odporność na działanie promieniowania UV. Obie frakcje charakteryzowały się stosunkowo wysoką stabilnością - w warunkach naświetlania ich stężenie resztkowe po 10-ciu godzinach spadło jedynie do około 90%, a czystość do wartości 3,7 i 3,4 odpowiednio dla C-PC I i C-PC II. Allofikocyjanina okazała się znacznie bardziej wrażliwa na działanie światła i ulegała stopniowej degradacji fotochemicznej. W porównaniu do otrzymanych frakcji C-PC, fikocyjanina pozyskiwana ze *Spiruliny platensis* (Jespersen et al., 2005) była znacznie mniej odporna na działanie światła.

Podsumowując, głównym osiągnięciem niniejszej pracy było opracowanie innowacyjnego procesu: wstępnego zatężenia ekstraktu fikobiliprotein metodą frakcjonowania pianowego oraz dalszej ich separacji za pomocą jednostopniowej chromatografii jonowymiennej. W efekcie uzyskano C-fikocyjaninę o najwyższej klasie czystości analitycznej, co pozwala na jej zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym oraz zapewnia stabilność produktu w szerokim zakresie temperatur i wartości pH bez konieczności dodawania środków stabilizujących. Otrzymany produkt zaleca się przechowywać w temperaturze 4°C i pH 4 – 5, co zapewni utrzymanie stężenia i czystości na niezmiennym poziomie przez okres co najmniej 30 dni.

Mój wkład: wiodący udział w opracowaniu hipotezy badawczej i planu badań, udział w wykonaniu eksperymentów i analiz, nadzór nad pracami laboratoryjnymi, wiodący udział w opracowaniu metody rozdziału chromatograficznego oraz opracowaniu i interpretacji wyników badań, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy szacuję na 65%.

Na opisywany dwuetapowy proces oczyszczania C-fikocyjaniny z roztworu Urząd Patentowy RP udzielił **patentu na wynalazek pt.: „Sposób oczyszczania C-fikocyjaniny z ekstraktu biomasy cyjanobakterii”**. Uzyskiwany odzysk z całego procesu wynosi średnio 24%, stopień oczyszczenia 3,6, a końcowy produkt posiada czystość równą 4,45, co stanowi najwyższą klasę czystości analitycznej (czystość > 4) i pozwala na szerokie zastosowanie pigmentu w medycynie, przemyśle farmaceutycznym oraz jako środka terapeutycznego (da Silva Figueira et al., 2018; Wu et al., 2016).

Mój wkład: Jako pierwszy autor wynalazku i jego opisu jestem głównym pomysłodawcą metody, szczególnie etapu związanego z rozdziałem chromatograficznym, doбором kolumny i warunków analizy.

Podsumowanie - wkład w rozwój dyscypliny inżynieria chemiczna

Jako główne osiągnięcia naukowe wynikające z przedstawionych dwóch cykli publikacji, a stanowiące mój znaczny wkład w rozwój dyscypliny inżynieria chemiczna, wskazuję:

- a) Stwierdzenie, iż zastosowanie metody inżynierii morfologii typu microparticle-enhanced cultivation pozwala na zmianę morfologii grzybów *Cerrena unicolor* i *Pleurotus sapidus* oraz znaczną poprawę wydajności produkcji lakazy;
- b) Ustalenie optymalnej strategii prowadzenia hodowli bioreaktorowej *Cerrena unicolor* oraz uzyskanie integracji procesów hodowli i separacji biomasy w jednym aparacie. Zaproponowana metoda hodowli z okresowym zasilaniem nieciągłym pozwala na poprawę wydajności produkcji lakazy przedłużając żywotność grzybni oraz jej zdolność do wytwarzania enzymu;
- c) Stwierdzenie możliwości częściowego zastąpienia tradycyjnych metod separacji enzymu metodami alternatywnymi, takimi jak frakcjonowanie pianowe i wodna ekstrakcja dwufazowa oraz dobranie najbardziej korzystnych warunków prowadzenia obu z nich;
- d) Opracowanie dwuetapowej metody oczyszczania lakazy z *Cerrena unicolor* skutkującej otrzymaniem jej wysokooczyszczonych izoform o aktywnościach specyficznych wynoszących 2349 i 3374 U/mg;
- e) Uzyskanie wysokoaktywnego preparatu enzymatycznego zawierającego lakazę, który zastosowany w technologiach przemysłu włókienniczego stanowi proekologiczną alternatywę dla konwencjonalnych metod alkalicznych;

- f) Stwierdzenie możliwości zastosowania alternatywnych metod: frakcjonowania pianowego oraz wodnej ekstrakcji dwufazowej do zatężania i oczyszczania fikobiliprotein z ekstraktu po dezintegracji biomasy *Thermosynechococcus* oraz dobór warunków prowadzenia obu procesów;
- g) Stwierdzenie możliwości częściowego rozdziału fikobiliprotein: C- i allofikocyjaniny w wyniku zastosowania dwuetapowego procesu: frakcjonowania pianowego i wodnej ekstrakcji dwufazowej oraz ustalenie warunków prowadzenia procesu;
- h) Określenie warunków prowadzenia procesu frakcjonowania pianowego ekstraktu fikobiliprotein w trybie ciągłym oraz uzyskanie wyższych wartości czystości C-fikocyjaniny w kondensatach i odzysków allofikocyjaniny w retentatach niż w trybie okresowym;
- i) Opracowanie metod otrzymywania preparatu zawierającego C-fikocyjaninę o różnych klasach czystości aż do uzyskania najwyższej klasy czystości – czystości analitycznej oraz wyznaczenie jego częściowej fizykochemicznej charakterystyki (odporności na światło, pH i temperaturę).

Literatura

- Antecka, A., Bizukojć, M., Ledakowicz, S., 2009. The kinetic model of laccase biosynthesis by *Cerrena unicolor*. *Chem. Process Eng. - Inz. Chem. i Proces.* 30, 403–416.
- Azevedo, A.M., Rosa, P.A.J., Ferreira, I.F., Aires-barros, M.R., 2009. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.01.004>
- Bancerz, R., Ginalska, G., 2009. Środowisko Niewodne-Miejsce Katalizy Enzymatycznej. *Biotechnologia* 4, 168–182.
- Bizukojć, M., Ledakowicz, S., 2010. The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. *World J Microbiol Biotechnol* 41–54.
<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0140-1>
- Burghoff, B., 2012. Foam fractionation applications 161, 126–137.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.008>
- Chaudhary, S., Singh, A., Varma, A., Porwal, S., 2022. Recent Advancements in Biotechnological Applications of Laccase as a Multifunctional Enzyme 16, 1479–1491.
<https://doi.org/10.22207/JPAM.16.3.72>

- Cheng, Y.I., Chou, L., Chiu, Y.F., Hsueh, H.T., Kuo, C.H., Chu, H.A., 2020. Comparative Genomic Analysis of a Novel Strain of Taiwan Hot-Spring Cyanobacterium *Thermosynechococcus* sp. CL-1. *Front. Microbiol.* 11, 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00082>
- Coban, H.B., Demirci, A., Turhan, I., 2015. Enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production in fed-batch and continuous fermentations in the presence of talcum microparticles. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1384-9>
- da Silva Figueira, F., Moraes, C.C., Kalil, S.J., 2018. C-phycocyanin purification: Multiple processes for different applications. *Brazilian J. Chem. Eng.* 35, 1117–1128.
<https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170160>
- Driouch, H., Hänsch, R., Wucherpfennig, T., Krull, R., Wittmann, C., 2012. ARTICLE Improved Enzyme Production by Bio-Pellets of *Aspergillus niger*: Targeted Morphology Engineering Using Titanate Microparticles. *Biotechnol. Bioeng* 109, 462–471.
<https://doi.org/10.1002/bit.23313>
- Driouch, H., Roth, A., Dersch, P., 2010a. Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011–2024. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2661-9>
- Driouch, H., Sommer, B., Wittmann, C., 2010b. Morphology Engineering of *Aspergillus niger* for Improved Enzyme Production. *Biotechnol. Bioeng* 105, 1058–1068.
<https://doi.org/10.1002/bit.22614>
- Eijssink, V.G.H., GÅseidnes, S., Borchert, T. V., Van Den Burg, B., 2005. Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* 22, 21–30.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOENG.2004.12.003>
- Etschmann, M.M.W., Huth, I., Walisko, R., Schuster, J., Krull, R., Holtmann, D., Wittmann, C., Schrader, J., 2015. Improving 2-phenylethanol and 6-pentyl- α -pyrone production with fungi by microparticle-enhanced cultivation (MPEC). *Yeast* 32, 145–157.
<https://doi.org/10.1002/YEA.3022>
- Gerken, B.M., Nicolai, A., Linke, D., Zorn, H., Berger, R.G., Parlar, H., 2006. Effective enrichment and recovery of laccase C using continuous foam fractionation. *Sep. Purif. Technol.* 49, 291–294. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.09.015>
- Gerstweiler, L., 2023. Continuous Bioprocessing for Downstream, in: Pörtner, R. (Eds) *Biopharmaceutical Manufacturing. Cell Engineering.*
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-031-45669-5_5
- Gianfreda, L., Sannino, F., Filazzola, M.T., Leonowicz, A., 1998. Catalytic behavior and

- detoxifying ability of a lactase from the fungal strain *Cerrena unicolor* 4, 13–23.
- Gonciarz, J., Bizukojc, M., 2014. Adding talc microparticles to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 preculture decreases fungal pellet size and improves lovastatin production. *Eng. Life Sci.* 14, 190–200. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300055>
- Gonciarz, J., Kowalska, A., Bizukojc, M., 2016. Application of microparticle-enhanced cultivation to increase the access of oxygen to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mycelium and intensify lovastatin biosynthesis in batch and continuous fed-batch stirred tank bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 109, 178–188. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2016.01.017>
- Grilo, A.L., Aires-Barros, M.R., Azevedo, A.M., 2016. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. *Sep. Purif. Rev.* 45, 68–80. <https://doi.org/10.1080/15422119.2014.983128>
- Imran, M., Asad, M.J., Hadri, S.H., 2012. Production and industrial applications of laccase enzyme Lakkaz enziminin üretimi ve endüstriyel uygulamaları 10, 1–11.
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M.A.B., Hussain, H.I., Ahmed, S., Yuan, Z., 2016. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biol. Proced. Online* 18, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>
- Janusz, G., Rogalski, J., Szczodrak, J., 2007. Increased production of laccase by *Cerrena unicolor* in submerged liquid cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1459–1464. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9390-y>
- Jarosz-Wilkolazka, A., Janusz, G., Ruzgas, T., Gorton, L., Malarczyk, E., Leonowicz, A., 2004. Development of a laccase-modified electrode for amperometric detection of mono- and diphenols. The influence of enzyme storage method. *Anal. Lett.* 37, 1497–1513. <https://doi.org/10.1081/AL-120037583>
- Jespersen, L., Strømdahl, L.D., Olsen, K., 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *Eur. Food Res. Technol.* 220, 261–266. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1062-7>
- Kaup, B.-A., Ehrich, K., Pescheck, M., Schrader, J., 2008. Microparticle-Enhanced Cultivation of Filamentous Microorganisms: Increased Chloroperoxidase Formation by *Caldariomyces fumago* as an Example. *Biotechnol. Bioeng* 99, 491–498. <https://doi.org/10.1002/bit.21713>
- Krull, R., Wucherpennig, T., Esfandabadi, M.E., Walisko, R., Melzer, G., Hempel, D.C., Kampen, I., Kwade, A., Wittmann, C., 2013. Characterization and control of fungal

- morphology for improved production performance in biotechnology. *J. Biotechnol.* 163, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.024>
- Lemlich, R., 1968. Fractionation and Allied. *Ind. Eng. Chem.*
- Liang, Y., Kaczmarek, M.B., Kasprzak, A.K., Tang, J., Shah, M.M.R., Jin, P., Klepacz-Smółka, A., Cheng, J.J., Ledakowicz, S., Daroch, M., 2018. Thermosynechococcaceae as a source of thermostable C-phycocyanins: properties and molecular insights. *Algal Res.* 35, 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.037>
- Lowe, C.R., Lowe, A.R., Gupta, G., 2001. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 561–574.
- Merz, J., Zorn, H., Burghoff, B., Schembecker, G., 2011. Purification of a fungal cutinase by adsorptive bubble separation: A statistical approach. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 382, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.007>
- Michniewicz, A., Ullrich, R., Ledakowicz, S., Hofrichter, M., 2006. The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 682–688. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0015-9>
- Pan-utai, W., Kahapana, W., Iamtham, S., 2018. Extraction of C-phycocyanin from *Arthrospira* (Spirulina) and its thermal stability with citric acid. *J. Appl. Phycol.* 30, 231–242. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1155-x>
- Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A.S., Raghavarao, K.S.M.S., 2006. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *J. Chromatogr. A* 1127, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.073>
- Prinz, A., Zeiner, T., Vössing, T., Schüttmann, I., Zorn, H., Górak, A., 2012. Experimental investigation of laccase purification using aqueous two-phase extraction. *Chem. Eng. Trans.* 27, 349–354. <https://doi.org/10.3303/CET1227059>
- Ratti, C., 2001. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *J. Food Eng.* 49, 311–319. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00228-4)
- Roque, A.C.A., Lowe, C.R., Taipa, M.Â., 2004. Antibodies and genetically engineered related molecules: Production and purification. *Biotechnol. Prog.* <https://doi.org/10.1021/bp030070k>
- Shleev, S., Klis, M., Wang, Y., Rogalski, J., Bilewicz, R., Gorton, L., 2007. Comparative spectroelectrochemical studies of lyophilized and nonlyophilized laccases from *Cerrena unicolor* basidiomycete. *Electroanalysis* 19, 1039–1047.

<https://doi.org/10.1002/elan.200603841>

- Sójka-Ledakowicz, J., Lichawska, J., Pyć, R., 2006. Integrated enzymatic pre-treatment of cotton fabrics. *J. Nat. Fibers* 3, 199–207. https://doi.org/10.1300/J395v03n02_13
- Sreenath, H.K., Shah, A.B., Yang, V.W., Gharia, M.M., Jeffries, T.W., 1996. Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics. *J. Ferment. Bioeng.* 81, 18–20. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)83113-8](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)83113-8)
- Stepanova, E. V., Koroleva, O. V., Gavrilova, V.P., Landesman, E.O., Makower, A., Papkovskii, D.B., 2003. Comparative stability assessment of laccases from the basidiomycetes *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus* in the presence of effectors. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 39, 549–554.
- Suarez Ruiz, C.A., Kwaijtaal, J., Peinado, O.C., Van Den Berg, C., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., 2020. Multistep Fractionation of Microalgal Biomolecules Using Selective Aqueous Two-Phase Systems. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06379>
- Tišma, Marina, Žnidaršič-Plazl, Polona, Vasić-Rački, Đurđa, Zelić, Bruno, Tišma, M, Žnidaršič-Plazl, P, Vasić-Rački, Đ, Zelić, B, 2012. Optimization of Laccase Production by *Trametes versicolor* Cultivated on Industrial Waste. *Appl Biochem Biotechnol* 166, 36–46. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9401-1>
- Velázquez-Cedeño, M.A., Mata, G., Savoie, J.M., 2002. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: Changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 201–207. <https://doi.org/10.1023/A:1014999616381>
- Witrowa-Rajchert, D., Samborska, K., 2002. Metody suszenia mikroorganizmów i produktów syntezy mikrobiologicznej. *Żywność Nauk. Technol. Jakość* 09, 5–15.
- Wu, H.L., Wang, G.H., Xiang, W.Z., Li, T., He, H., 2016. Stability and Antioxidant Activity of Food-Grade Phycocyanin Isolated from *Spirulina platensis*. *Int. J. Food Prop.* 19, 2349–2362. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1038564>
- Wu, Z., Hu, G., Wang, K., Zaslavsky, B.Y., Kurgan, L., Uversky, V.N., 2017. What are the structural features that drive partitioning of proteins in aqueous two-phase systems? *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1865, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.09.010>
- Yang, J., Li, W., Ng, T.B., Deng, X., Lin, J., Ye, X., 2017. Laccases : Production , Expression Regulation , and Applications in Pharmaceutical Biodegradation 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832>
- Zhai, T., Wang, H., Dong, X., Wang, S., Xin, X., Du, J., Guan, Q., Jiao, H., Yang, W., Dong,

R., 2024. Laccase: A Green Biocatalyst Offers Immense Potential for Food Industrial and Biotechnological Applications. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c06669>

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

Moja współpraca z innymi instytucjami naukowymi rozpoczęła się już przy realizacji pracy magisterskiej, w której prowadziłam badania nad możliwościami zastosowania lakazy do dekoloryzacji roztworów barwnych, głównie z punktu widzenia oczyszczania ścieków włókienniczych. Ośrodkiem zajmującym się intensywnie tematyką enzymów ligninolitycznych, był **Zakład Biochemii** znajdujący się na **Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie**, którego zespołem kierował doceniany na świecie prof. Andrzej Leonowicz współpracujący z ówczesnie dr inż. Anną Jarosz-Wilkołazką. Efektem współpracy jest publikacja: Michniewicz A., Ledakowicz S., Jamroz T., Jarosz-Wilkołazka A., Leonowicz A. (2003) *Odbarwianie wodnych roztworów wybranych barwników za pomocą kompleksu enzymatycznego lakazy z Cerrena unicolor*. Biotechnologia 4 (63): 194-203 oraz udział w II Krajowym Kongresie Biotechnologii, gdzie miałam przyjemność zaprezentować otrzymane wyniki już jako doktorantka I-szego roku studium doktoranckiego.

W międzyczasie w lecie 2002 r. po raz pierwszy byłam na **Uniwersytecie w Dortmundzie, Niemcy**, gdzie spędziłam pięć tygodni i ukończyłam letni kurs *Chemical Engineering International Summer School 2002*.

W 2003 roku zostałam laureatką konkursu na najlepszą pracę magisterską Fundacji im. Nowickiego i programu stypendialnego prowadzonego przez Deutsche Bundesstiftung Umwelt, niemiecką fundację zajmującą się ochroną środowiska. To wyróżnienie umożliwiło mi odbycie rocznego stażu na **Międzynarodowym Uniwersytecie w Zittau, Niemcy**, będącego obecnie częścią **Uniwersytetu w Dreźnie**. Podczas pobytu kontynuowałam prace badawcze dotyczące enzymu lakaza będące przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej. Przy współpracy z prof. Martinem Hofrichter i dr Rene Ullrich udało mi się przeprowadzić badania poświęcone oczyszczaniu i charakterystyce enzymu. Rezultatem współpracy są dwie publikacje: Michniewicz A., Ullrich R., Ledakowicz S., Hofrichter M. (2006) *The white-rot fungus Cerrena unicolor strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-*

chemical and catalytic properties. Applied Microbiology and Biotechnology 69: 682-688 oraz Michniewicz A., Ledakowicz S., Ullrich R., Hofrichter M. (2008) *Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from Cerrena unicolor*. Dyes and Pigments 77: 295-302, a także publikacja w języku polskim: Michniewicz A., Ledakowicz S., Ullrich R., Hofrichter M. (2005) *Biosynteza i separacja kompleksu lakazowego na dwa izoenzymy z Cerreny unicolor*. Inżynieria i Aparatura Chemiczna 4s 44: 56-57. Otrzymane wyniki były prezentowane na dwóch konferencjach: 4th International Conference on Textile Biotechnology, Seoul, Korea (2006) *Kinetics of enzymatic decolorization of textile dyes by laccase* oraz Postępy Inżynierii Bioreaktorowej, Łódź (2005) *Biosynteza i separacja kompleksu lakazowego na dwa izoenzymy z Cerreny unicolor*.

Po powrocie do kraju kontynuowałam studium doktoranckie, podczas których naukowo skupiałam się na poszerzeniu spektrum zastosowania lakazy do degradacji innych struktur aromatycznych niż barwniki. Efektem było podjęcie współpracy z dawnym Instytutem Włókiennictwa w Łodzi (obecnie **Sieć Badawcza ŁUKASIEWICZ – Łódzki Instytut Technologiczny**), gdzie przeprowadzone zostały badania nad zastosowaniem lakazy do wstępnej bioobróbki tkanin z włókien lnu. W przeciwieństwie do odbarwiania temat ten był zagadnieniem nowym, rzadko dotychczas spotykanym w literaturze. Stanowił zatem szeroki zakres możliwości badawczych. Wyniki przedstawiono w publikacji: Sójka-Ledakowicz J., Lichawska-Olczyk J., Ledakowicz S., Michniewicz A. (2007) *Bio-scouring of linen fabrics with laccase complex from Cerrena unicolor*. Fibres and Textiles in EE 63: 86-89. Dalsza współpraca z tą jednostką już po uzyskaniu stopnia doktora zaowocowała kolejnymi badaniami i publikacjami: Olczyk, J.; Sójka-Ledakowicz, J.; Walawska, A.; Antecka, A.; Siwińska-Ciesielczyk, K.; Zdarta, J.; Jesionowski, T. (2020) *Antimicrobial Activity and Barrier Properties against UV Radiation of Alkaline and Enzymatically Treated Linen Woven Fabrics Coated with Inorganic Hybrid Material*. Molecules 25: 5701 oraz Olczyk J., Sójka-Ledakowicz J., Kudzin M., Antecka A. (2021) *The Eco-Modification of Textiles Using Enzymatic Pretreatment and New Organic UV Absorbers*, Autex Research Journal 21(3):242-251. W ramach tej współpracy udało się także zrealizować zlecenie na wykonanie pracy pt.: „Biosynteza i zateżnianie enzymów grzybowych – lakazy z *Cerrena unicolor*”.

Kolejnym ośrodkiem, z którego naukowcami miałam możliwość współpracować jest **The Council for Scientific and Industrial Research z Republiki Południowej Afryki**. Nawiązanie współpracy między ośrodkami WIPOŚ PŁ i CSIR miało miejsce w latach 2007-2009, kiedy to w ramach współpracy bilateralnej pod kierownictwem prof. Stanisława Ledakowicza i dr Petrusa Van Zyl realizowano projekt pt.: „Enzymes for industrial application”.

W ramach projektu zrealizowane zostały dwie wizyty, podczas których przeprowadzono hodowle grzybowe i zaprezentowano referaty. Moim udziałem były wizyta na **School of Chemical Engineering, University of Natal w Durbanie** oraz wizyta i wygłoszenie referatu pt.: „The kinetic model of laccase biosynthesis by *Cerrena unicolor*; enzyme characteristics and application” w **CSIR Pretoria**. Niestety z przyczyn formalnych nie udało się kontynuować współpracy i złożyć w 2015 r. przygotowanego już projektu europejskiego pt.: „Development of laccase production and application, DeLaPa”. W toku badań dotyczących lakazy miałam także wizyty konsultacyjne w **Instytucie Celulozowo-Papierniczym w Łodzi** odnośnie metodyki oznaczania ligniny oraz na **Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej** odnośnie możliwości immobilizacji enzymu.

W drugiej połowie 2008 r., po zakończeniu badań do pracy doktorskiej, oraz przez pierwszą połowę 2009 r. miałam możliwość realizacji badań odbiegających tematyką i metodyką od głównego nurtu mojej działalności naukowej. W tym czasie w ramach realizacji projektu europejskiego w ramach 6PR: REduction, MOdification & VALorisation of sludge (REMOVALS) zajmowałam się prowadzeniem procesu zgazowania i pirolizy osadów ściekowych prowadzonego na aparacie Netzsch STA 409 PG. Otrzymane i opracowane wyniki zostały opublikowane: Nowicki L., Anteck A., Bedyk T., Stolarek P., Ledakowicz S. (2011) *The kinetics of gasification of char derived from sewage sludge*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 104: 693-700 oraz przedstawione w formie plakatu podczas European Conference on Sludge Management, Liege, Belgia.

Po tym czasie mam tzw. „lukę publikacyjną” wynikającą z urodzenia i wychowywania dwójki dzieci. Okres, w którym nie pracowałam wynosił 2 lata, więc nie był specjalnie długi, jednak powrót do aktywności publikacyjnej nie był łatwy. Po powrocie z urlopu wychowawczego przy współpracy z prof. Marcinem Bizukojcem podjęłam nową w naszej katedrze tematykę badawczą dotyczącą enzymu inulinaza. Niestety na te badania trzykrotnie nie udało się otrzymać finansowania z NCN. Zaplanowane prace zostały jednak przeprowadzone w mniejszym zakresie dzięki uzyskanemu przeze mnie grantowi na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich Wydziału Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej w roku 2013 pt.: „Dobór szczepu z rodzaju *Aspergillus* do produkcji inulinaz”. Efektem tych działań jest publikacja: Kowalska A., Anteck A., Owczarz P., Bizukoje M. (2017) *Inulinolytic activity of broths of Aspergillus niger ATCC 204447 cultivated in shake flasks and stirred tank bioreactor*. Eng. Life Sci. 17 (9): 1006-1020.

Równolegle, prowadziłam prace kontynuujące tematykę lakaz grzybowych. Pod kierownictwem prof. Stanisława Ledakowicza podjęłam współpracę z zespołem z **Instytutu Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ**, gdzie pod kierownictwem prof. Tadeusza Antczaka prowadzone były badania nad biosyntezą lakaz z wykorzystaniem szczepu grzyba nitkowatego *Mucor hemalis*. Celem była wymiana doświadczeń oraz połączenie naukowych osiągnięć i umiejętności obu zespołów w celu realizacji wspólnych badań. Okazało się, iż obie otrzymywane przez nas, z różnych źródeł, lakazy poza cechami wspólnymi, wykazują różnice w specyficzności działania i aktywności katalitycznej dostrzeganej w obecności lignin zawartych w biomasie. Była zatem duża szansa, iż właściwości katalityczne tych enzymów w mieszaninie mogą być komplementarne w reakcji depolimeryzacji substancji ligninowych. Właściwość taka mogłaby być cennym punktem wyjścia w rozwiązywaniu problemu zagospodarowania odpadowej biomasy na cele przemysłowe. Ten projekt nie doczekał się niestety realizacji. Jednakże, w 2014 r. udało się podjąć współpracę z naukowcami z **Wydziału Inżynierii Biochemicznej i Chemicznej (Department of Biochemical and Chemical Engineering) znajdującym się na Uniwersytecie w Dortmundzie (TUD)**. W ramach realizacji grantu NCN pt. "Integracja procesów otrzymywania i oczyszczania lakaz grzybowych", którego kierownikiem był prof. Stanisław Ledakowicz, a ja byłam głównym wykonawcą, miałam możliwość współpracy z prof. Andrzejem Górakiem zatrudnionym na wyżej wspomnianym wydziale Uniwersytetu Technicznego w Dortmundzie. Głównym efektem tej współpracy była adaptacja w Katedrze Inżynierii Bioprosesowej PŁ dwóch nowatorskich metod: frakcjonowania pianowego i wodnej ekstrakcji dwufazowej do zateżnienia i separacji produkowanej przez nas lakazy. W badaniach tych znaczny udział miał ówczesny doktorant mgr inż. Michał Błatkiewicz, dla którego byłam promotorem pomocniczym. Uzyskane wyniki przedstawiono w publikacjach P1.3 – P1.6 z przedstawionego cyklu I oraz publikacje A11, A13, A16, A17, A19 z wykazu. Głównym moim udziałem w tym projekcie były: organizacja i koordynacja prac badawczych zgodnie z harmonogramem, udział w pracach laboratoryjnych i przygotowaniu stanowisk badawczych, obsługa aparatu do preparatywnej chromatografii cieczowej białek, planowanie i udział w prowadzeniu hodowli bioreaktorowych w trybie powtarzanym okresowym, opracowanie wyników eksperymentalnych oraz przygotowanie publikacji. Po zakończeniu realizacji grantu planowaliśmy kontynuować badania przy współpracy z Uniwersytetem w Dortmundzie i rozwijać metodę wodnej ekstrakcji dwufazowej, która przez naukowców z TUD została zmodyfikowana do technologii nazwanej Tunable Aqueous Polymer-Phase Impregnated Resins (TAPPIR®). Jednak tym razem nie udało się uzyskać finansowania.

W 2019 roku dołączyłam do zespołu, w którym dr inż. Anna Klepacz-Smółka zajmowała się fotobiosyntezą pigmentu C-fikocyjanina produkowanym przez cyjanobakterie. Moją rolą było zateżanie i separacja otrzymywanej przez moich współpracowników C-fikocyjaniny z wykorzystaniem opracowanych wcześniej metod, w taki sposób, żeby otrzymany produkt charakteryzował się jak najwyższą klasą czystości. Badania prowadzone były w ramach finansowanego przez NCN projektu pt.: „Foto-biosynteza, wydzielanie i oczyszczanie termostabilnej fikocyjaniny”, którego kierownikiem był prof. Stanisław Ledakowicz, a ja byłam jednym z wykonawców głównych. Zakres moich działań obejmował: organizację i koordynację prac w projekcie, udział w pracach laboratoryjnych i przygotowaniu stanowisk badawczych dla procesów frakcjonowania pianowego, wodnej ekstrakcji dwufazowej i ultrafiltracji oraz prowadzenie procesu chromatograficznego rozdziału. Ponadto, nadzorowałam badania stabilności otrzymywanych fikobiliprotein, opracowywaniu wyników eksperymentalnych oraz przygotowywałam materiały do publikacji. Realizowane badania były prowadzone we współpracy z prof. Maurycym Darochem, będącym przedstawicielem **Peking University - Shenzhen Graduate School w Chinach**. Publikacje i wyniki otrzymane podczas realizacji grantu będące moim udziałem zostały opisane w pkt. 4 niniejszego autoreferatu w cyklu II oraz w publikacji A29 przedstawionej w wykazie. Prowadzone badania i otrzymane wyniki zaowocowały powstaniem dwóch rozpraw doktorskich; pierwsza mgr inż. Damiana Pietrzyka dotycząca optymalizacji hodowli cyjanobakterii w fotobioreaktorach, a druga mgr inż. Rafała Szeląga dotycząca izolacji i oczyszczania fikobiliprotein, w tym głównie C-fikocyjaniny. W tej pracy po raz drugi pełniłam rolę promotora pomocniczego, praca została obroniona w 2024 r. w dyscyplinie inżynieria chemiczna.

W międzyczasie w 2018 r. uczestniczyłam w badaniach prowadzonych przez dr inż. Tomasza Borutę dotyczących kokultur grzybowych, gdzie badana przeze mnie grzybnia *Cerrena unicolor* została w różnych konfiguracjach połączona ze szczepem *Aspergillus terreus*. Według mojej wiedzy była to pierwsza próba wspólnej hodowli wspomnianych szczepów grzybowych. Zbadano możliwości wzrostu tych dwóch gatunków w kokulturze oraz biosyntezę charakterystycznych dla ich hodowli monokulturowych produktów. Wyniki badań zawarte zostały w publikacji: Boruta T., Antecka A. (2022) *Co-cultivation of filamentous microorganisms in the presence of aluminum oxide microparticles*, Applied Microbiology and Biotechnology 106:5459–5477.

Ponadto, w 2019 r. w ramach realizacji grantu NCBiR pt.: „Innowacyjne urządzenia do zintensyfikowanego usuwania CO₂ z gazów odlotowych (INVITES)” podjęłam się zadania

opracowania rutynowej metody określania stopnia aktywności enzymów w wodnych roztworach amin. Przeprowadzone badania pozwoliły na wstępne opracowanie metody określania aktywności anhidrazy węglanowej w roztworze N – Metylodietanoloaminy (MDEA). W badaniach uwzględniono wpływ takich parametrów jak czas inkubacji, długość fali, czas pomiaru, stężenie i pH buforu Tris – HCl oraz jakość substratu (octanu paranitrofenylu, p – NPA) na otrzymywane wartości aktywności badanego roztworu. W wyniku badań ustalono wartości badanych parametrów, sprawdzono selektywność metody w odniesieniu do poszczególnych składników roztworu oraz określono wpływ dwutlenku węgla na aktywność roztworu.

W latach 2024-2025 byłam jednym z wykonawców grantu NCN pt: „Badania mechanizmu i kinetyki zintegrowanych procesów fermentacji ciemnej i hydrotermicznej karbonizacji mokrych odpadów spożywczych”, w którym pod kierownictwem dr inż. Radosława Ślęzaka z mojej katedry brałam udział w prowadzeniu procesu hydrotermicznej karbonizacji (HTC – hydrothermal carbonisation) zawiesiny powstałej po procesie ciemnej fermentacji (DF – dark fermentation) odpadów kuchennych. Badania prowadzono w reaktorze ciśnieniowym typu 4563 M o całkowitej objętości 0,4 dm³ (Parr Instrument), w temperaturze 215°C przez 2h. Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane na 51th International Conference of SSCHE (Słowacja) w postaci plakatu pt. „Hydrothermal carbonisation of slurry after dark fermentation”.

Obecnie, w ramach współpracy z zespołem pod kierownictwem dr hab. Michała Puchalskiego z **Instytutu Włókiennictwa na Wydziale Włókiennictwa i Wzornictwa PŁ** uczestniczę w badaniach dotyczących doboru warunków hodowli grzybów podstawkowych w celu zastosowania ich biomasy w technologiach przemysłu włókienniczego. Część mikrobiologiczna badań ma na celu znalezienie optymalnej metody hodowli grzybni o wysokiej zawartości chityny oraz jej trwałe unieruchomienie na warstwie celulozowej. Spodziewanym efektem jest wytworzenie przez grzybnię struktury przypominającej skórę.

Odbyte staże naukowe i praktyki

- dwudniowa wizyta konsultacyjna w celu nawiązania współpracy odnośnie nowatorskiej metody TAPPIR w Instytucie Fluid Separation Processes TU, Uniwersytet w Dortmundzie, Niemcy, (03.2019 r.);

- dwudniowa wizyta konsultacyjna odnośnie prowadzenia procesu wodnej ekstrakcji dwufazowej w Instytucie Fluid Separation Processes TU, Uniwersytet w Dortmundzie, Niemcy, (06.2016 r.);
- dziesięciodniowa wizyta studyjna w Republice Południowej Afryki: School of Chemical Engineering, University of Natal, Durban, RSA oraz Council for Scientific and Industrial Research (CSIR) - Pretoria, South Africa. Cel: nawiązanie współpracy i wygłoszenie referatu na CSIR-Pretoria pt.: „The kinetic model of laccase biosynthesis by *Cerrena unicolor*; enzyme characteristics and application”, (07.2008 r.);
- roczny staż naukowy w Internationales Hochschulinstitut Zittau (Niemcy), Lehrstuhl für Umweltbiotechnologie, finansowane przez Deutsche Bundesstiftung Umwelt oraz Fundację im. Nowickiego. Cel: realizacja badań naukowych, nawiązanie współpracy, (03.2004 –02.2005 r.);
- pięciodniowy pobyt na Uniwersytecie w Dortmundzie (Niemcy) w celu odbycia kursu Chemical Engineering International Summer School 2002, (07-08.2002 r.);
- dwutygodniowa praktyka studencka w Instytucie Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi (2000 r.).

Udział jako wykonawca przy realizacji projektów badawczych

Projekty międzynarodowe:

- Projekt europejski w ramach 6PR: REduction, MOdification & VALorisation of sludge (REMOVALS) FP6-018525, European Union Research, Sixth framework Programme, Priority 1.1.6.3: Global change and ecosystems (08.2008 – 06.2009 r.);
- Projekt w ramach umowy między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej a Rządem Republiki Południowej Afryki o współpracy naukowej i technicznej pt.: Enzymy o zastosowaniu przemysłowym *Enzymes for industrial application (SA/Poland Bilateral)*, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Departament Współpracy Międzynarodowej (2008 r.).

Projekty krajowe:

- Grant NCN nr UMO-2021/43/B/ST8/00298 pt: „Badania mechanizmu i kinetyki zintegrowanych procesów fermentacji ciemnej i hydrotermicznej karbonizacji mokrych odpadów spożywczych” (01.2024 – 02.2026 r.);
- Grant NCN nr UMO-2018/31/B/ST8/00822 pt.: „Foto-biosynteza, wydzielanie i oczyszczanie termostabilnej fikocyjaniny” (07.2019 – 01.2023 r.);

- Grant NCBiR pt.: Innowacyjne urządzenia do zintensyfikowanego usuwania CO₂ z gazów odlotowych (INVITES) (11.2019 r.);
- Grant NCN nr UMO-2013/11/B/ST8/00337 pt. "Integracja procesów otrzymywania i oczyszczania lakaz grzybowych" (08.2014 – 08.2017 r.);
- Grant promotorski nr N207 030 31/1435 pt.: Model kinetyczny procesu biosyntezy lakazy przez *Cerrena unicolor* oraz zastosowanie enzymu do degradacji wybranych struktur aromatycznych, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Nr umowy: 1435/H03/2006/31. (09.2006 – 09.2008 r.).

Projekty uczelniane:

- Grant na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich Wydziału Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej w roku 2013 pt.: „Dobór szczepu z rodzaju *Aspergillus* do produkcji inulinaz”.

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

Działalność dydaktyczna

Podczas mojej ponad dwudziestoletniej pracy dydaktycznej starałam się pogłębiać i kształtować swoje umiejętności poprzez udział w licznych dodatkowych kursach i szkoleniach dedykowanych pedagogom. Między innymi były to:

- Szkolenie „Asertywność i komunikacja interpersonalna”, grudzień 2014;
- Szkolenie "Aktywizujące metody nauczania w pracy nauczyciela akademickiego z elementami autoprezentacji", grudzień 2014;
- Kurs Design Thinking, grudzień 2017;
- Warsztaty „Efektywna komunikacja w zespole” organizowanego przez Biuro Karier Politechniki Łódzkiej, sierpień 2018;
- Warsztaty „Różnice indywidualne w zespole” organizowanego przez Biuro Karier Politechniki Łódzkiej, październik 2018;
- Warsztaty „Zarządzanie czasem i organizacja pracy” organizowanego przez Biuro Karier Politechniki Łódzkiej, listopad 2018;

- Warsztaty „Asertywność” organizowanego przez Biuro Karier Politechniki Łódzkiej, styczeń 2019;
- Szkolenie z zakresu e-learningu organizowanego w ramach projektu „Zintegrowany Program Politechniki Łódzkiej”, październik 2021;
- Kurs „Zarządzanie emocjami w miejscu pracy realizowanego w ramach Projektu „Centrum Rozwoju Kompetencji”, wrzesień 2023
- Szkolenie „Narzędziownik pracownika uczelni – jak ułatwić sobie pracę przy użyciu narzędzi cyfrowych” w ramach projektu „Dostępna Politechnika Łódzka”, październik 2023;
- Kurs z języka angielskiego realizowanego w ramach Projektu „Centrum Rozwoju Kompetencji”, październik 2023;
- Kurs „Odwrócona klasa (flipped classroom): współczesne podejście do procesu edukacyjnego” w ramach projektu „Podniesienie kwalifikacji i kompetencji kadry prowadzącej dydaktykę w Politechnice Łódzkiej”, luty 2025;
- Kurs „Kształcenie przez wyzwania – CBL w praktyce” w ramach projektu „Podniesienie kwalifikacji i kompetencji kadry prowadzącej dydaktykę w Politechnice Łódzkiej”, lipiec 2025;
- Warsztaty „Zrozum. Poczuj. Zmień. O emocjach, różnorodności i współpracy na uczelni”. Zorganizowane przez Politechnikę Łódzką w dniu 17 listopada 2025 r;
- Szkolenie „Zastosowanie metody case teaching w egzaminach kompetencyjnych” w ramach projektu „Podniesienie kwalifikacji i kompetencji kadry prowadzącej dydaktykę w Politechnice Łódzkiej”, luty 2026;
- Szkolenie „Tworzenie dostępnych materiałów cyfrowych zgodnych z zasadami projektowania uniwersalnego” w ramach projektu „Podniesienie kwalifikacji i kompetencji kadry prowadzącej dydaktykę w Politechnice Łódzkiej”, marzec 2026.

Ponadto, celem poszerzenia wiedzy merytorycznej odnośnie prowadzonych przedmiotów, ukończyłam następujące kursy/szkolenia:

- Szkolenie „Czystość mikrobiologiczna kosmetyków w obszarach produkcyjnych zg. z systemem GMP” organizowanego przez Biotechnologia.pl, styczeń 2016;
- Kurs „Zagrożenia biologiczne w środowisku pracy” organizowanego przez Centrum Edukacyjne Centralnego Instytutu Ochrony Pracy – Państwowego Instytutu Badawczego, październik 2016;

- AKTA User Day 2018 „Pure proteins today. Powerful results tomorrow“ Serock k/Warszawy, 24-25.10.2018;
- AKTA User Day 2019 „Trends in protein purification“ Warszawa, 24-25.10.2019;
- Szkolenie „Dezynfekcja powierzchni w laboratorium i obszarze produkcji. Dostępne metody i strategie działania”, organizowanego przez Biotechnologia.pl, styczeń 2022;
- Szkolenie „Praktyczne aspekty chromatografii cieczowej” organizowanego w ramach MERCK DAY, maj 2024;
- Szkolenie „Praktyczne umiejętności z GOZ dla początkujących” organizowanego w ramach projektu „Podniesienie kwalifikacji i kompetencji kadry prowadzącej dydaktykę w Politechnice Łódzkiej”, listopad 2024;
- Kurs „Zagrożenie czynnikami chemicznymi w środowisku pracy” organizowanego przez Centrum Edukacyjne Centralnego Instytutu Ochrony Pracy – Państwowego Instytutu Badawczego, listopad 2024;
- Kurs „Edukacja dla zrównoważonego rozwoju” w ramach projektu „Podniesienie kwalifikacji i kompetencji kadry prowadzącej dydaktykę w Politechnice Łódzkiej”, lipiec 2025;
- Kurs „Edukacja dla zrównoważonego rozwoju w praktyce akademickiej: od teorii do zastosowań w sali dydaktycznej” w ramach projektu „Podniesienie kwalifikacji i kompetencji kadry prowadzącej dydaktykę w Politechnice Łódzkiej”, lipiec 2026.

Wymienione przedsięwzięcia umożliwiały mi poznanie programów i praktycznych narzędzi pozwalających na doskonalenie umiejętności dydaktycznych i podwyższanie poziomu i atrakcyjności prowadzonych zajęć, głównie wykładowych i ćwiczeniowych. Wiedzę i umiejętności zdobyte podczas kursów starałam się wdrażać na wszystkich prowadzonych przeze mnie przedmiotach, było to m.in.: włączanie różnych metod aktywizujących do zajęć wykładowych, kontakt ze studentami poprzez platformę WIKAMP, indywidualne podejście do studenta, czy organizowanie dodatkowych spotkań w ramach tutoringu. Merytoryczne szkolenia umożliwiały mi poszerzenie wiedzy z danego zakresu i lepsze przygotowanie do prowadzenia zajęć wykładowych, jak i laboratoryjnych. W przyszłości chciałabym jeszcze udoskonalić system stosowanego oceniania, tak żeby zachęcał studentów do systematycznej pracy w trakcie semestru.

W czasie mojej działalności dydaktycznej prowadziłam zajęcia dla studentów na dwóch uczelniach państwowych z następujących przedmiotów:

Politechnika Łódzka, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska:

- Technologie oczyszczania ścieków, zajęcia laboratoryjne;
- Gospodarka odpadami, zajęcia projektowe;
- Gospodarka odpadami komunalnymi, zajęcia wykładowe;
- Unieszkodliwianie odpadów stałych, zajęcia wykładowe i projektowe;
- Czynniki zagrożeń biologicznych, wykład i laboratorium;
- Zagrożenia i bezpieczeństwo mikrobiologiczne, wykład i laboratorium;
- Czynniki zagrożeń chemicznych i biologicznych, wykład i laboratorium;
- Technologie uzdatniania wody, wykład i laboratorium;
- Downstream processing, wykład w języku angielskim;
- Chemia fizyczna, laboratorium;
- Chemia środowiskowa, laboratorium;
- Zarządzanie projektami w ramach modułu sumatywnego, wykład, warsztaty;
- Technologie uzdatniania wody i oczyszczania ścieków, wykład;
- Toksykologia i higiena przemysłowa, wykład, laboratorium.

Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności:

- Inżynieria bioprosesowa, ćwiczenia;
- Inżynieria procesowa, ćwiczenia.

Politechnika Łódzka, Wydział International Faculty of Engineering:

- Biotechnological Equipment, zajęcia laboratoryjne w języku angielskim.

Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny:

- Inżynieria chemiczna, ćwiczenia;

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska:

- Zagospodarowanie odpadów, wykład i ćwiczenia;
- Technologie w ochronie środowiska, wykład i ćwiczenia

Jako dodatkowe osiągnięcia związane z dydaktyką mogę wymienić:

- Opracowanie zadania i udział w komisji egzaminu kompetencyjnego dla kierunku inżynieria biochemiczna s2 (2023 r.) oraz inżynieria bezpieczeństwa pracy s1 (2026r.);

- Udział w komisji egzaminu kompetencyjnego dla kierunku inżynieria ochrony środowiska, s2, 2025 r.;
- Prowadzenie zajęć tutoringu dla studentów chcących poszerzyć swoje zainteresowania w ramach programu „Mistrzowie Dydaktyki” w latach 2020-2021;
- Tutor w pilotażowym programie tutoringowym realizowanym w Politechnice Łódzkiej w semestrze letnim 2024/2025 w zakresie tutoringu akademickiego i personalnego.

Działalność organizacyjna

Podczas pracy na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska PŁ pełniłam następujące funkcje organizacyjne:

- Pełnomocnik ds. jakości;
- Społeczny Inspektor Pracy;
- Wieloletni członek Uczelnianej Komisji Rekrutacyjnej,
- Członek Rady Kierunku Studiów Inżynieria Ochrony Środowiska – funkcja sekretarza;
- Przewodniczący Komisji Egzaminacyjnej na kierunku Inżynieria bezpieczeństwa pracy;
- Członek komisji rekrutacyjnej do przeprowadzania postępowania kwalifikacyjnego do Interdyscyplinarnej Szkoły Doktorskiej PŁ – funkcja sekretarza;
- Osoba odpowiedzialna za organizację praktyk studenckich dla kierunku inżynieria biochemiczna;
- Osoba odpowiedzialna za organizację i rozliczanie praktyk na kierunku inżynieria ochrony środowiska;
- Członek komisji likwidacyjnej;
- Osoba odpowiedzialna za wprowadzanie informacji/danych do Rejestratora Umów PŁ.

Popularyzacja nauki

Podczas pracy na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska PŁ brałam udział w wielu zdarzeniach przyczyniających się do popularyzacji nauki, m.in. były to:

- Udział w konferencjach naukowych zagranicznych (16) i krajowych (7);
- Udział w spotkaniu „Kadry przyszłości” organizowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego;
- Kilukrotny udział w Komitecie organizacyjnym konferencji Postępy Inżynierii Bioreaktorowej;

- Przewodnicząca sesji referatowej „Enzymology in Drug Discovery” na 2nd International Conference on Enzymology and Molecular Biology, Rzym, 2017;
- Udział w organizacji Seminarium Studencko-Uczniowskiego odbywającego się co roku na WIPOŚ PŁ;
- Udział w akcjach promocyjnych organizowanych przez WIPOŚ PŁ, m.in. Dni otwarte, czy „Tydzień z Matematyką i Fizyką”;
- Przygotowanie i prowadzenie warsztatów dla licealistów pt.: „Monitoring czystości mikrobiologicznej środowiska” cieszące się dużym zainteresowaniem;
- Wieloletni członek Stowarzyszenia Środowisko dla Środowiska.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.

Otrzymane nagrody i wyróżnienia

- Nagrody wspierające doskonałość naukową w ramach programu „Inicjatywa doskonałości – uczelnia badawcza” (2021-2026 r.);
- Medal brązowy za długoletnią służbę (31.08.2021 r.);
- Nagroda Rektora PŁ za osiągnięcia naukowe (20.11.2009 r.);
- Nagroda Bayer Technology Services za najlepszą pracę doktorską na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska PŁ (24.05.2009 r.);
- Stypendium motywacyjne nr WIDDOK/SM/2006/26 w ramach realizacji projektu Mechanizm Wspierania Innowacyjnej Działalności Doktorantów WIDDOK, finansowane przez Europejski Fundusz Społeczny oraz Budżet Państwa (03.2006 r.);
- laureatka VII edycji ogólnopolskiego konkursu na najlepszych absolwentów wyższych uczelni w dziedzinie ochrony środowiska organizowanego przez Fundację im. Nowickiego (12.2003 r.);
- laureatka konkursu o nagrodę im. dr inż. Ewy Mitury pt.: Postępy w pracy doktorskiej (05.2003 r.).

Promotorstwo prac naukowych

- Promotorstwo pomocnicze przewodu doktorskiego pt.: „Integracja metod otrzymywania i oczyszczania lakaz grzybowych” zakończonego uzyskaniem tytułu: dr inż. Michał Błatkiewicz (12.2017 r.);

- Promotorstwo pomocnicze przewodu doktorskiego pt.: „Opracowanie metod oczyszczania surowej fikocyjaniny do poziomu czystości farmaceutycznej” zakończonego uzyskaniem tytułu: dr inż. Rafał Szelaǵ (12.2024 r.);
- Promotorstwo prac inżynierskich i magisterskich: łącznie 44 prace.

Wykonane recenzje prac naukowych

- Recenzje prac naukowych publikowanych w czasopismach międzynarodowych: zrecenzowanie około 30 publikacji w takich czasopismach, jak:
 - Applied Biochemistry and Biotechnology,
 - Applied Microbiology and Biotechnology;
 - Biocatalysis and Biotransformation,
 - Biochemical Engineering Journal (2),
 - Bioprocess & Biosystems Engineering (3),
 - Biotechnology for Biofuels,
 - Chemical and Process Engineering: New Frontiers,
 - Chemical Engineering and Processing - Process Intensification,
 - Chemosphere,
 - Dyes & Pigments (2),
 - Energy and Fuels (2),
 - Environmental Technology,
 - Enzyme and Microbial Technology,
 - International Journal of Biological Macromolecules,
 - Journal of Basic Microbiology,
 - Marine Drugs,
 - Scientific Reports,
 - Separation and Purification Technology,
 - Water, Air, & Soil Pollution,
 - World Journal of Microbiology and Biotechnology (2),
- Recenzje prac naukowych publikowanych w czasopismach krajowych:
 - Acta Scientiarum Poloniarum,
- Recenzje prac dyplomowych:
 - łącznie 39 prac magisterskich i inżynierskich na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska PŁ.

Analiza bibliometryczna dorobku naukowego

- na podstawie bazy Scopus (stan na dzień 21.05.2026 r.):

Analiza wszystkich cytowań

Liczba publikacji indeksowanych w bazie:	22
Liczba publikacji cytowanych:	21
Liczba cytowani:	568
Index Hirscha:	12
Sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) z roku publikacji:	51.367
Sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) z roku 2024:	62.7
Suma punktów za publikacje w czasopismach wg punktacji MNiSW/MEiN z roku publikacji:	1358
Suma punktów za publikacje w czasopismach wg wykazu MNiSW z dn. 05.01.2024 r.:	2090

- na podstawie bazy Web of Science Core Collection (stan na dzień 22.05.2026 r.):

Analiza wszystkich cytowań

Liczba publikacji indeksowanych w bazie:	22 (w tym 1 Meeting Abstract)
Liczba publikacji cytowanych:	20
Liczba cytowani:	494
Index Hirscha:	11
Sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) z roku publikacji:	51.367
Sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) z roku 2024:	62.7
Suma punktów za publikacje w czasopismach wg punktacji MNiSW/MEiN z roku publikacji:	1354
Suma punktów za publikacje w czasopismach wg wykazu MNiSW z dn. 05.01.2024 r.:	2020

.....

(podpis wnioskodawcy)