

Załącznik nr 3

do wniosku z dnia 1 września 2023 roku
o przeprowadzenie postępowania w sprawie
nadania stopnia doktora habilitowanego

Autoreferat

Dr Tomasz Janek

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław 2023

Spis treści

1. Dane osobowe	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
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.)	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2. Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	4
4.3. Omówienie celu naukowego osiągnięcia	5
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	15
5.1. Aktywność naukowa w jednostkach polskich	18
5.2. Aktywność naukowa w jednostkach zagranicznych	22
Wykaz cytowanej literatury:	23
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	25
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne	25
6.1.1. Prowadzone kursy	25
6.1.2. Opiekun prac dyplomowych	27
6.2. Osiągnięcia organizacyjne	28
6.3. Popularyzacja wiedzy	29
7. Omówienie pozostałych osiągnięć	29
7.1. Badanie mechanizmów kompleksów metali z lipopeptydowymi biosurfaktantami na wirulencję grzyba <i>Candida albicans</i>	29
7.2. Mikrobiologiczna produkcja biologicznie aktywnych związków z odpadów pochodzących z różnych gałęzi przemysłu	30
7.3. Produkcja związków bioaktywnych z wykorzystaniem drożdży z kladu <i>Yarrowia</i>	31
7.4. Plany na przyszłość	33
7.5. Nagrody za działalność naukową i organizacyjną	34
7.6. Podsumowanie dorobku naukowego	34

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Tomasz Janek

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy

14.05.2023 – dyplom ukończenia dwusemestralnych studiów podyplomowych w zakresie: Kierownik zespołu – team leader; Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu;

21.10.2013 – dyplom doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia; Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii;

Promotor: prof. dr hab. inż. Marcin Łukaszewicz

Tytuł rozprawy: *„Izolacja, identyfikacja oraz charakterystyka właściwości biomedycznych biosurfaktantów”*.

14.06.2005 – dyplom magistra chemii; specjalność: informatyka chemiczna; Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii;

Promotor: dr hab. Piotr Solarz, prof. inst.

Tytuł pracy magisterskiej: *„Synteza i właściwości spektroskopowe matryc fluorkowych domieszkowanych jonami lantanowców”*.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1.10.2005 – 28.02.2007; samodzielny biotechnolog w Pracowni Białek Jądrowych, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski;

1.03.2007 – 28.02.2015; starszy specjalista naukowo-techniczny w Zespole Dydaktycznym, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski;

1.03.2015 – 28.02.2018; asystent badawczo-dydaktyczny w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;

1.03.2018 – 30.09.2018; adiunkt badawczo-dydaktyczny w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;

1.10.2018 – 30.09.2020; adiunkt badawczy – Post-doc w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

1.10.2020 – obecnie; adiunkt badawczo-dydaktyczny w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

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.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Potencjał biotechnologiczny oraz charakterystyka oddziaływania związków powierzchniowo czynnych z modelowymi białkami.

4.2. Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi **osiem** oryginalnych publikacji naukowych (**P1-P8**) z listy *Journal Citation Reports* (JCR). W przedstawionych pracach jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem. Sumaryczny *Impact Factor* (IF) prac uwzględnionych w cyklu wynosi **37,89** a suma punktów MEiN (zgodnie z wykazem w roku publikacji) wynosi **705**.

- (P1) **Janek T***, Czyżnikowska Ż, Łuczyński J, Gudiña EJ, Rodrigues LR, Gałęzowska J: Physicochemical study of biomolecular interactions between lysosomotropic surfactants and bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2017; 159:750–758. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.08.046 (IF₂₀₁₇=3,997; IF_{5lat}=5,4; MEiN₂₀₁₇= 35; MEiN₂₀₂₃=100).
- (P2) **Janek T***, Rodrigues LR, Czyżnikowska Ż: Study of metal-lipopeptide complexes and their self-assembly behavior, micelle formation, interaction with bovine serum albumin and biological properties. *Journal of Molecular Liquids*. 2018; 268:743–753. doi:10.1016/j.molliq.2018.07.118 (IF₂₀₁₈=4,561; IF_{5lat}=5,6; MEiN₂₀₁₈=30; MEiN₂₀₂₃=100).
- (P3) **Janek T***, Rodrigues LR, Gudiña EJ, Czyżnikowska Ż: Metal-Biosurfactant Complexes Characterization: Binding, Self-Assembly and Interaction with Bovine Serum Albumin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019a; 20(12):2864. doi:10.3390/ijms20122864 (IF₂₀₁₉=4,556; IF_{5lat}=6,2; MEiN₂₀₁₉=140; MEiN₂₀₂₃=140).
- (P4) **Janek T***, Czyżnikowska Ż, Łukaszewicz M, Gałęzowska J: The effect of *Pseudomonas fluorescens* biosurfactant pseudofactin II on the conformational changes of bovine serum albumin: Pharmaceutical and biomedical applications. *Journal of Molecular Liquids*. 2019b; 288:111001. doi:10.1016/j.molliq.2019.111001 (IF₂₀₁₉=5,065; IF_{5lat}=5,6; MEiN₂₀₁₉=100; MEiN₂₀₂₃=100).
- (P5) **Janek T***, Sałek K, Burger J, Czyżnikowska Ż, Euston SR: Investigating the biomolecular interactions between model proteins and glycine betaine surfactant with reference to the stabilization of emulsions and antimicrobial properties. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2020a; 194:111226. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111226 (IF₂₀₂₀=5,268; IF_{5lat}=5,4; MEiN₂₀₂₀=100; MEiN₂₀₂₃=100).

- (P6) **Janek T***, Rodrigues LR, Gudiña EJ, Burger J: Synergistic effect of hen egg white lysozyme and lysosomotropic surfactants on cell viability and membrane permeability. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2020b; 185:110598. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110598 (IF₂₀₂₀=5,268; IF_{5lat}=5,4; MEiN₂₀₂₀=100; MEiN₂₀₂₃=100).
- (P7) **Janek T***, Czeleń P, Gudiña EJ, Rodrigues LR, Czyżnikowska Ż: Biomolecular interactions of lysosomotropic surfactants with cytochrome c and its effect on the protein conformation: A biophysical approach. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019c; 126:1177–1185. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.024 (IF₂₀₁₉=5,162; IF_{5lat}=7,8; MEiN₂₀₁₉=100; MEiN₂₀₂₃=100).
- (P8) **Janek T***, Mirończuk A, Rymowicz W, Dobrowolski A: High-yield expression of extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica* and its interactions with lipopeptide biosurfactants: A biophysical approach. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2020c; 689:108475. doi:10.1016/j.abb.2020.108475 (IF₂₀₂₀= 4,013; IF_{5lat}= 4,0; MEiN₂₀₂₀=100; MEiN₂₀₂₃=140).

Oznaczenia:

* autor korespondencyjny

4.3. Omówienie celu naukowego osiągnięcia

Wiele układów wykorzystywanych w badaniach biologicznych, biotechnologicznych, przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym to na ogół złożone heterogeniczne systemy zawierające substancje o bardzo zróżnicowanej charakterystyce chemicznej i aktywności biologicznej. Na ich aktywność oraz stabilność decydujący wpływ mają interakcje między białkami, węglowodanami, lipidami, kwasami nukleinowymi, peptydami, związkami powierzchniowo czynnymi oraz składnikami mineralnymi. Spośród nich szczególną rolę odgrywają oddziaływania białek i substancji powierzchniowo czynnych (Randolph i Jones 2002). Nie jest więc zaskakujące, że w odpowiednich warunkach *in vitro* substancje te mogą ze sobą oddziaływać, co daje naukowcom szereg możliwości modyfikowania ich struktury, w celu poprawy ich właściwości fizykochemicznych i możliwości zastosowania w wielu dziedzinach nauki i gałęziach przemysłu.

Przeważająca część surfaktantów będących komponentami produkowanych komercyjnie środków czyszczących, detergentów, kosmetyków, produktów farmaceutycznych, spożywczych, czy preparatów wykorzystywanych w rolnictwie wciąż jest pozyskiwana metodą chemicznej syntezy (Stubbs i wsp., 2022). Zarówno chemiczna synteza związków powierzchniowo czynnych, jak i późniejsze użytkowanie syntetycznych detergentów, niewątpliwie wywiera szkodliwy wpływ na środowisko naturalne (Badmus i wsp., 2021). Związki te są często toksyczne i niedegradowalne, dlatego mogą być niebezpieczne dla środowiska. Szybki rozwój biotechnologii, zielonej chemii oraz wzrost świadomości ludzkiej, co do potrzeby i konieczności ochrony środowiska naturalnego, przyczyniają się do większego zainteresowania biosurfaktantami – naturalnymi surfaktantami pochodzenia mikrobiologicznego (Shekhar i wsp., 2015), oraz nowymi syntetycznymi, które wykazują wysoką podatność na biodegradację (Zhang i wsp., 2021). Wykorzystując wiedzę

z obszaru biotechnologii, biosurfaktanty można w łatwy sposób otrzymać poprzez proces biosyntezy z udziałem mikroorganizmów. Producentami biologicznych surfaktantów są głównie bakterie, drożdże, oraz niektóre gatunki grzybów strzępkowych (Kashif i wsp., 2022). Ponadto, otrzymywanie związków powierzchniowo czynnych metodą syntezy biologicznej z udziałem drobnoustrojów odbywa się w sposób łagodny dla środowiska i stwarza możliwości wykorzystania do tego celu surowców odpadowych (Gaur i wsp., 2022).

Surfaktanty charakteryzuje wysoka aktywność powierzchniowo czynna połączona z różnymi efektami biologicznymi, co jest ściśle uzależnione od ich struktury chemicznej i stężenia. Dla przykładu, ze względu na zdolność biosurfaktantów do uszkodzenia błon komórkowych głównie prokariotycznych organizmów Gram-dodatnich, grzybów i niektórych wirusów związki te charakteryzują się właściwościami o znaczeniu terapeutycznym i biomedycznym (Naughton i wsp., 2019). Właściwości biobójcze surfaktantów czwartorzędowych soli amoniowych są również powszechnie znane. Otóż wykazują one działanie antagonistyczne w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, grzybów oraz drożdży (Kwaśniewska i wsp., 2020). Ponadto, w wielu badaniach *in vitro* wykazano niewątpliwy wpływ biosurfaktantów na komórki nowotworowe, zarówno ludzkie jak i zwierzęce poprzez zahamowanie proliferacji, bądź zaindukowanie apoptozy w zmienionych komórkach (Ukaegbu i wsp., 2023).

Aktywność biologiczna surfaktantów jest powiązana również z ich zdolnością do interakcji z różnymi białkami: enzymatycznymi, receptorowymi czy transportowymi (Otzen 2011). Specyficzna budowa białek i związków powierzchniowo czynnych daje między innymi możliwość oddziaływania, którego efektem jest powstawanie mniej lub bardziej trwałych kompleksów (Bos i van Vliet 2001). Sumaryczny efekt takich interakcji jest wypadkową oddziaływań hydrofobowych, wiązań wodorowych, oddziaływań elektrostatycznych lub sił van der Waalsa (Sharma i wsp., 2020). W środowisku wodnym między grupami niepolarnymi dochodzi głównie do oddziaływań o charakterze hydrofobowym. Znacznie słabsze, ale liczne w układach surfaktant-białko, są wiązania wodorowe. Natomiast, w przypadku sił elektrostatycznych energia takich oddziaływań uzależniona jest od stopnia zjonizowania cząsteczek, zależnego nie tylko od ich budowy i konformacji, ale także od pH i siły jonowej roztworu. Z kolei siły van der Waalsa, będące słabymi przyciągającymi oddziaływaniami o charakterze elektrostatycznym mają zazwyczaj drugorzędny wpływ na interakcje białek z surfaktantami. Na efektywność elektrostatycznego kompleksowania białek i surfaktantów wpływa zarówno rodzaj surfaktantu jak i białka (Otzen 2017). Wykazano bowiem, że rozmaite surfaktanty kompleksowane z tymi samym białkiem tworzą układy o różnej kompatybilności. W przypadku budowy białek, duże znaczenie ma tu dostępność fragmentów biomolekuły tworzących miejsca kontaktu. Dowiedziono, między innymi, że w przypadku białek globularnych w stanie natywnym liczebność dostępnych miejsc kontaktu jest znacznie mniejsza niż w przypadku proteiny o rozwiniętej strukturze (Randolph i Jones 2002). Białka łatwo ulegające zmianom konformacyjnym, takie jak kazeina lub żelatyna, wiążą mocniej surfaktanty niż białka globularne (albumina wołowa, β -laktoglobulina, lizozym).

Bardzo duże zainteresowanie kontaktami związków powierzchniowo czynnych z białkami zaowocowało opracowaniem szeregu metod doświadczalnych pozwalających na badanie oddziaływań ligand-białko na różnym poziomie szczegółowości. Wśród nich możemy wyróżnić metody pozwalające na jakościową identyfikację występowania kontaktu między białkiem a ligandem, ilościowe oznaczenie ich wzajemnego powinowactwa, jak również strukturalne, dzięki

którym możliwe jest wyznaczenie trójwymiarowej struktury tworzonych kompleksów ligand-białko (Li i Lee 2019). Ponadto, komputerowe metody modelowania molekularnego odgrywają coraz większą rolę w badaniu kompleksowych układów biomakromolekularnych. Obecnie metody dynamiki molekularnej, w tym dokowania molekularnego z powodzeniem pozwalają na przewidywanie struktury białek, zmian konformacyjnych w obecności ligandów, jak również dostarczają molekularnej interpretacji dla wyników otrzymywanych przez różnorodne techniki eksperymentalne (Zhao i wsp., 2020).

Większość dotychczasowych badań dotyczących oddziaływania surfaktantów z białkami poświęconych zostało interakcji protein z syntetycznymi anionowymi środkami powierzchniowo czynnymi. Badania te przeprowadzono z użyciem modelowych białek, takich jak lizozym (Mandal i wsp., 2016), albumina (Deep i Ahluwalia 2001) oraz trypsyna (Ghosh 2008). Anionowe środki powierzchniowo czynne w wielu przypadkach prowadzą do denaturacji większości białek. Oddziaływanie anionowych surfaktantów z białkami zachodzi na drodze interakcji hydrofobowych i elektrostatycznych, które są ściśle zależne zarówno od struktury surfaktantów jak i rodzaju białka (Randolph i Jones 2002). Wykazano również, że surfaktanty anionowe znacznie efektywniej wiążą się z białkami o nieuporządkowanej strukturze, ale zależy to również od struktury samych związków powierzchniowo czynnych (Otzen 2017). Najnowsze badania wskazują, że surfaktanty są nie tyle inhibitorami, co modulatorami aktywności struktur enzymów, co niewątpliwie budzi duże zainteresowanie dla medycyny oraz przemysłu farmaceutycznego i spożywczego (Olopoda i wsp., 2022; Shehata i wsp., 2023).

Choć wiadomo, że syntetyczne surfaktanty mają zdolność do silnego oddziaływania z białkami, nadal nie wszystkie aspekty tych interakcji zostały w pełni wyjaśnione. W związku z tym, zrozumienie mechanizmów oddziaływań białek z biosurfaktantami, oraz syntetycznymi kationowymi surfaktantami, które wykazują podatność na biodegradację stanowić może podstawę do podjęcia racjonalnych strategii zastosowań takich układów w wielu dziedzinach nauki, takich jak biotechnologia, biochemia, medycyna, farmacja, czy rolnictwo, przekładając się bezpośrednio na standard życia ludzkiego. Docelowo badania układów biosurfaktant-białko mogą przyczynić się do zastąpienia surfaktantów syntetycznych substancjami naturalnymi, przyjaznymi ludziom oraz środowisku.

Cel badań

W ujęciu ogólnym, za główny cel badań obrano szczegółową charakterystykę molekularnych mechanizmów oddziaływania biosurfaktantów i surfaktantów czwartorzędowych soli amoniowych z białkami ze szczególnym uwzględnieniem roli struktury i dynamiki kompleksów surfaktant-białko w determinowaniu ich aktywności biologicznej, użytkowej i zastosowań w biotechnologii.

Inspiracją do badań były surfaktanty czwartorzędowych soli amoniowych: bromek (2-dodekanoiloksyetylo)trimetyloamoniowy (DMM-11), bromek (2-dodekanoiloksypropylo)trimetyloamoniowy (DMPM-11), oraz bromek (2-pentadekanoiloksymetylo)trimetyloamoniowy (DMGM-14) należące do grupy chemodegradowalnych estrów kationowych, które pozyskałem w ramach współpracy z doktorem Jackiem Łuczyńskim z Politechniki Wrocławskiej. Materiał badawczy stanowiły również lipopeptydowe biosurfaktanty: surfaktyna produkowana przez bakterie *Bacillus subtilis* #309, oraz pseudofaktyna II, wiskozyna i amfizyna produkowana przez

bakterie *Pseudomonas fluorescens*, które wykazują typowe właściwości związków powierzchniowo czynnych. Należy tutaj podkreślić, iż w odróżnieniu od syntetycznych, niedegradowalnych surfaktantów związki te cechują się mniejszą toksycznością, wyższą biodegradowalnością oraz wyższą aktywnością w szerokim zakresie temperatur, pH i zasolenia, oraz lepszą środowiskową kompatybilnością.

Analizie poddano oddziaływania z albuminą surowicy wołowej (ang. *bovine serum albumin*, BSA) i lizozymem z białka jaja kurzego (ang. *hen egg white lysozyme*, HEWL), które posłużyły jako model białek globularnych, ponadto cytochromem c (hemoproteina pełniąca funkcję transportera, model białka biorącego udział w procesie apoptozy) oraz lipazą (model białka enzymatycznego o zastosowaniu przemysłowym).

Uzyskane wyniki zostały opublikowane w ośmiu oryginalnych pracach doświadczalnych. Najważniejsze z uzyskanych wyników opisano poniżej.

Oddziaływanie związków powierzchniowo czynnych z albuminą

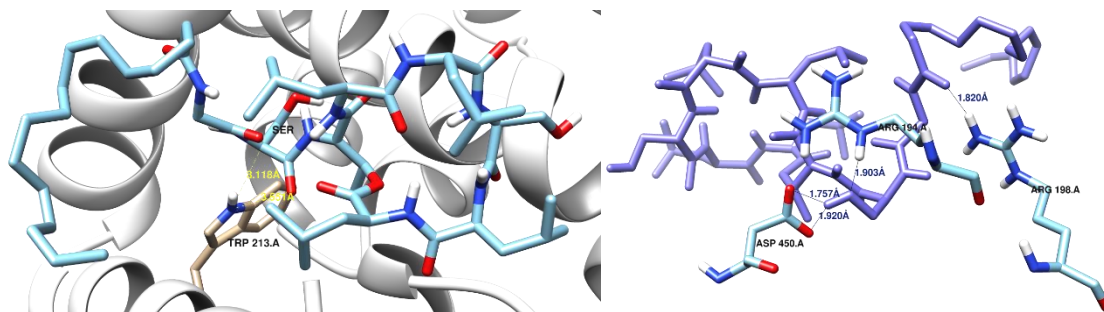
W publikacjach **(P1-P5)** przedstawiono wyniki badań dotyczących oddziaływania związków powierzchniowo czynnych z białkiem globularnym, BSA. Pierwszym etapem badań było wyjaśnienie jak rodzaj cząsteczki związku powierzchniowo czynnego determinuje jego oddziaływanie z albuminą. W tym celu przeprowadzono badania nad oddziaływaniem surfaktantów czwartorzędowych soli amoniowych (DMM-11, DMPM-11 **(P1)**; DMGM-14 **(P5)**, oraz biosurfaktantów, amfizyny **(P2)**, surfaktyny **(P3)** i pseudofaktyny II **(P4)** z BSA. Albumina jest jednym z głównych białek występujących we krwi i ma ona istotny wpływ na transport i biodostępność leków podawanych dożylnie. Zatem jednym z istotnych elementów badania potencjalnych leków jest sprawdzenie ich zdolności do wiązania się z albuminą. Do badań wykorzystano albuminę surowicy wołowej, ze względu na jej niską cenę, wysoką dostępność oraz podobieństwa strukturalne z albuminą surowicy ludzkiej. Od kilku lat prowadzone są badania nad wykorzystaniem biologicznie aktywnych lipopeptydów jako ligandów dla jonu metali dwuwartościowych. Mechanizm działania daptomycyny, naturalnie występującego antybiotyku lipopeptydowego polega na wiązaniu się (w obecności jonów Ca^{2+}) z błonami bakteryjnymi, co wywołuje depolaryzację błony i prowadzi do zahamowania syntezy białek, DNA i RNA (Gregoire i wsp., 2021). Z uwagi na tę aktywność biologiczną przeanalizowałem również kompleksy amfizyny **(P2)** i surfaktyny **(P3)** z jonami Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} i Ca^{2+} .

W wyniku interakcji liganda z białkiem, wewnętrzna właściwość emisji białka zostaje zaburzona w zależności od stężenia liganda. Dlatego też, badanie widm emisji uznaje się za przydatną technikę pomiaru mechanizmu oddziaływań między ligandem a białkiem. Oddziaływania surfaktantów z BSA śledzi się wykorzystując właściwości fluorescencyjne białka, które ze względu na obecność tryptofanu zawierającego w swojej strukturze grupę indolową, wykazuje fluorescencję przy długości fali wzbudzenia 280 nm i długość fali emisji około 340 nm. Wykorzystując do badań metodę spektroskopii fluorescencji wykazano, że zarówno surfaktanty czwartorzędowych soli amoniowych, jak również biosurfaktanty i ich metalokompleksy posiadają zdolność do wiązania się z białkiem globularnym i tworzenia kompleksów z BSA, przy czym najsłabsze wiązanie zaobserwowano dla DMGM-14. Wyniki te wskazują na ścisłą relację pomiędzy hydrofobowością surfaktantu a jego zdolnością do oddziaływania z albuminą. Otrzymane wartości stałych Sterna-Volmera dla wszystkich testowanych surfaktantów rzędu 10^3 - 10^4 M^{-1} , oraz stałych

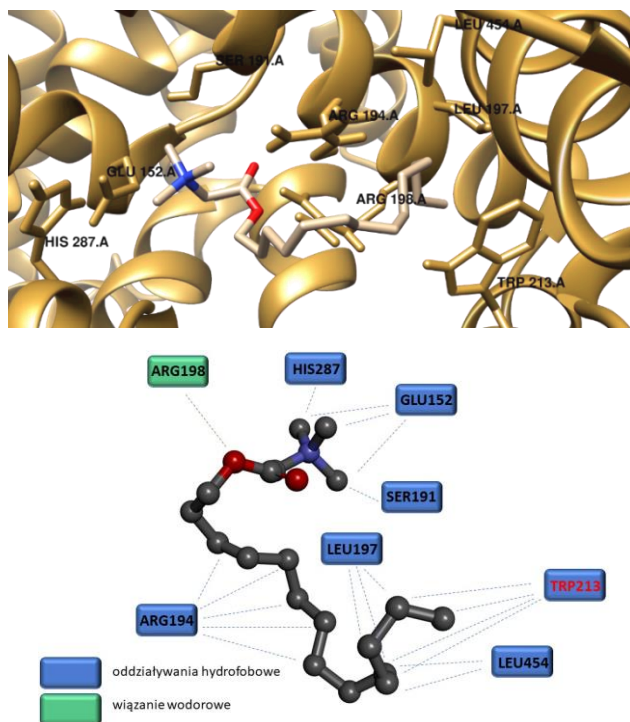
wygaszenia fluorescencji rzędu 10^{11} - 10^{12} $M^{-1} s^{-1}$ wskazują, że związki te wygaszają fluorescencję BSA na drodze statycznej, tworząc niefluoryzujący kompleks BSA-surfaktant. BSA posiada sześć miejsc wiążących, wysoce specyficznych, które mają różną budowę oraz polarność (Spector i wsp., 1969). Najlepiej poznanymi miejscami wiązania są subdomena IIA, oraz subdomena IIIA. Miejsca te wykazują powinowactwo do cząsteczek lipofilowych i kwaśnych. Pierwsze miejsce wiązania, czyli subdomena IIA ma postać elastycznej, dużej kieszeni. W miejscu tym znajduje się jedyny w cząsteczce BSA tryptofan (Trp213). Drugim miejscem wiązania jest subdomena IIIA, do której największe powinowactwo mają małe, aromatyczne ligandy-obojętne lub ujemnie naładowane. Uzyskane zmiany widm dichroizmu kołowego pozwalają stwierdzić, że zarówno syntetyczny surfaktant (DMGM-14), jak i pseudofaktyna II produkowana przez *P. fluorescens* wpływają na dynamikę białka, co wykazano modyfikacjami w strukturze II-rzędowej albuminy. Prawdopodobnie wynika to z dużej elastyczności, dzięki której cząsteczki mogą w łatwiejszy sposób dopasowywać się kształtem do miejsca wiązania w białkach indukując największe zmiany w strukturze II-rzędowej BSA.

Cennym uzupełnieniem badań spektroskopowych było wykorzystanie molekularnego dokowania w ocenie powinowactwa surfaktantów do miejsca wiązania w BSA. Znajomość struktury krystalograficznej BSA, którą pozyskano z bazy RCSB PDB: 3v03 pozwoliła na przygotowanie układów modelowych. Procedurę dokowania molekularnego wykonano w programie AutoDock 4.2, wybierając jako miejsce wiązania – miejsce IIA, w pobliżu aminokwasu Trp213. Analiza energetyczna i strukturalna została przeprowadzona dla konformacji o najniższej energii wiązania. Na podstawie uzyskanych wartości ΔG_{bind} oszacowano, że pseudofaktyna II ma największe powinowactwo do BSA (około -14 kcal/mol, Rycina 1) oddziałując głównie poprzez wiązania wodorowe, oddziaływania van der Waalsa i hydrofobowe, co potwierdzają wyniki eksperymentalne w grupie testowanych związków, a najmniejsze powinowactwo wykazuje DMGM-14 (około -5 kcal/mol, Rycina 2) oddziałując przez siły van der Waalsa przy niewielkim udziale energii elektrostatycznej.

Stosując badania kalorymetryczne potwierdzono hipotezę, że pseudofaktyna II i DMGM-14 wiążą się do BSA na zasadzie spontanicznej reakcji ($\Delta G < 0$). Wykazano, iż mają one duże powinowactwo do BSA (K_{ITC} pseudofaktyna II/BSA = $6,25 \times 10^4 M^{-1}$, K_{ITC} DMGM-14/BSA = $3,11 \times 10^5 M^{-1}$), a siłą napędową obu reakcji są oddziaływania hydrofobowe ($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$).



Rycina 1. Graficzna reprezentacja oddziaływania pseudofaktyny II z BSA.



Rycina 2. Graficzna reprezentacja oddziaływania DMGM-14 z BSA.

Podsumowując, rezultaty badań obliczeniowych opisane w artykułach (P1-P5), które zostały potwierdzone badaniami eksperymentalnymi wskazują, że wszystkie testowane surfaktanty, zarówno pochodne czwartorzędowych soli amoniowych, jak również lipopeptydowe biosurfaktanty i ich kompleksy z jonami Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} i Ca^{2+} preferują główne miejsca wiązania BSA. W odniesieniu do przeprowadzonych i przedstawionych powyżej badań należy podkreślić, że zastosowane techniki dokowania molekularnego potwierdzają jakość zastosowanych technik eksperymentalnych i opracowanej metodologii dla tej grupy syntetycznych i naturalnych surfaktantów, a także pozwoliły na istotne uzupełnienie danych dotyczących określenia oddziaływania związków powierzchniowo czynnych z białkami globularnymi o oczekiwanej aktywności biologicznej, farmakologicznej i zastosowaniach przemysłowych.

Oddziaływanie związków powierzchniowo czynnych z lizozymem

Oporność patogenów na leki i środki dezynfekujące jest od wielu lat ogromnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny i niesie realne zagrożenie dla zdrowia oraz życia pacjentów, dlatego szuka się sposobów, aby problem lekooporności zminimalizować w oparciu o racjonalną antybiotykoterapię (Mancuso i wsp., 2021). Jednym z jej założeń jest wykorzystanie zjawiska synergizmu, które polega na kojarzeniu dwóch lub więcej środków przeciwdrobnoustrojowych o różnych mechanizmach działania, dając silniejszy efekt bójczy niż zastosowanie pojedynczego związku w wyższej dawce (Zhu i wsp., 2022). Grupą związków, która od kilkunastu lat jest badana pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej, są surfaktanty. Dodatkowo, surfaktanty kationowe wykazują powinowactwo do lizosomów, stąd w tej grupie upatruje się nowych, bardziej skutecznych środków w walce z drobnoustrojami. Związki lizosomotropowe, do których należą czwartorzędowe sole amoniowe dzięki amfifilowej budowie, wnikają do światła komórki i oddziałują z błoną komórkową lizosomu. Fragment hydrofilowy

o charakterze słabej aminy jest biernie transportowany do światła lizosomu, gdzie – ze względu na niskie pH środowiska – pełni rolę akceptora protonów. W ten sposób utworzony związek w formie zjonizowanej nie jest w stanie przejść przez błonę lizosomu i gromadzi się wewnątrz niego. Aminy akumulują się w ten sposób do osiągnięcia stężenia wystarczającego do solubilizacji błony i uszkodzenia struktury lizosomu (Kwaśniewska i wsp., 2020).

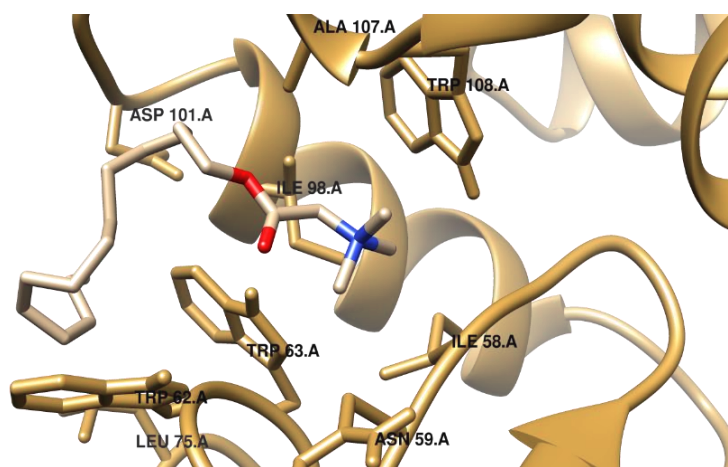
Lizozym, inaczej muramidaza lub N-acetylmuramylohydrolaza, jest globularnym białkiem kationowym będącym enzymem należącym do klasy hydrolaz o masie cząsteczkowej 14,4 kDa. Występuje powszechnie w przyrodzie: u zwierząt, roślin, bakterii i grzybów. Lizozym z białka jaja kurzego (ang. *hen egg white lysozyme*, HEWL) jest często obiektem analizy interakcji ligand-białko. Działa przeciwdrobnoustrojowo poprzez hydrolizę wiązania glikozydowego pomiędzy składnikami NAG (N-acetylglikozaamina) i NAM (kwas N-acetylmuraminowy) łańcuchów polisacharydowych ścian komórkowych niektórych bakterii. Dwoma resztami aminokwasowymi zaangażowanymi w reakcje enzymatyczne jest kwas glutaminowy (Glu35) oraz asparaginowy (Asp52), które zlokalizowane są po przeciwnych stronach szczeliny wiążącej substrat (Nawaz i wsp., 2022).

Zasadniczym celem badań ujętych w pracach (P5-P6) było zrozumienie specyfiki oddziaływań między surfaktantami czwartorzędowych soli amoniowych, a lizozymem, oraz określenie i porównanie właściwości bakterioobójczych surfaktantów w skojarzeniu surfaktantu z białkiem. W pierwszym etapie badań związanych z analizą oddziaływania lizosomotropowych surfaktantów z lizozymem wykorzystano właściwości fluorescencyjne białka wynikające z obecnych w jego strukturze reszt aminokwasów aromatycznych. Lizozym zawiera sześć reszt tryptofanu w pozycjach Trp28, Trp62, Trp63, Trp108, Trp111 i Trp123. Najbardziej dominującymi aminokwasami aromatycznymi w cząsteczce lizozymu są reszty Trp62, Trp63 i Trp108 – zlokalizowane w miejscu wiązania substratu (Shanmugaraj i wsp., 2015). W toku prowadzenia badań wykazano, że ze wszystkich trzech testowanych surfaktantów czwartorzędowych soli amoniowych, tylko DMGM-14 posiada zdolność wygaszania fluorescencji lizozymu. Otrzymana wartość stałej Sterna-Volmera wynosi $7,39 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, natomiast wartość stałej wygaszenia fluorescencji wynosi $1,48 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Na skutek oddziaływania DMM-11 i DMPM-11 z lizozymem nastąpił wzrost intensywności fluorescencji. Jest to efekt rozwinięcia trzeciorzędowej struktury lizozymu spowodowanej oddziaływaniami hydrofobowymi. Lizozym jest naładowany dodatnio ze względu na obecność 17 protonowanych reszt zasadowych i 9 deprotonowanych reszt kwasowych przy pH 7,4, a DMM-11 i DMPM-11 również są naładowane dodatnio; w konsekwencji możliwe są tylko oddziaływania o charakterze hydrofobowym. Obserwację tę potwierdzono metodą dichroizmu kołowego. Uzyskując widma dichroizmu kołowego dla lizozymu i lizozymu w układzie z surfaktantami, wykazujące minima przy długości fal 208 i 222 nm, zaobserwowano, że w wyniku dodatku DMM-11 w zakresie stężeń od 0,35 mM do 1,4 mM zawartość α -helisy lizozymu wzrosła z 43,25 do 58,25%. Dla DMPM-11 stosowanego w tych samych stężeniach zawartość α -helisy lizozymu wzrosła z 43,25 do 62,80%, podczas gdy, dla DMGM-14 w stężeniu 2 mM wzrosła do 67,4%.

Stosując badania kalorymetryczne potwierdzono hipotezę, że surfaktanty DMM-11 i DMPM-11 wiążą się do lizozymu na zasadzie spontanicznej reakcji ($\Delta G < 0$). Wykazano, iż mają niskie powinowactwo do białka ($K_{ITC} \text{ DMM-11/lizozym} = 2,81 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_{ITC} \text{ DMPM-11/lizozym} = 1,10 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$), a siłą napędową reakcji są oddziaływania hydrofobowe ($\Delta H > 0$,

$\Delta S > 0$) (P6). W przypadku DMGM-14 również surfaktant ten ma niskie powinowactwo do lizozymu, natomiast w tym przypadku siłą napędową reakcji są siły elektrostatyczne (P5).

Uzupełnieniem badań eksperymentalnych dla oddziaływania DMGM-14 z lizozymem były przeprowadzone symulacje dokowania molekularnego, które wskazały, iż surfaktant ma największe powinowactwo do hydrofobowej kieszeni wiążącej tworzonej przez reszty tryptofanu (Trp62, Trp63 i Trp108). Analiza strukturalna konformacji o najniższej energii wiązania (około -4 kcal/mol) wykazuje, że badany układ jest również stabilizowany przez siły van der Waalsa przy niewielkim udziale energii elektrostatycznej. Hydrofilowa część DMGM-14 jest otoczona głównie przez hydrofobowe i polarne reszty aminokwasowe (Ile58, Asn59, Trp63, Ile58, Trp108), podczas gdy hydrofobowy fragment oddziałuje bezpośrednio z resztami Trp62, Trp63, Leu75, Asp101 i Ala107 (Rycina 3).



Rycina 3. Graficzna reprezentacja oddziaływania DMGM-14 z lizozymem.

Przeprowadzone testy *in vitro* dla surfaktantów czwartorzędowych soli amoniowych wykazały ich wysoką aktywność przeciwbakteryjną. Aktywność przeciwbakteryjną DMGM-14 (P5), DMPM-11 i DMGM-11 (P6) w skojarzeniu z lizozymem przetestowano przeciw szczepom bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych: *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 10536 i *Proteus mirabilis* ATCC 21100. Rozwój bakterii był silnie lub całkowicie hamowany przy stężeniach 2,5-20 μM dla surfaktantów oraz w stężeniach 1,5-10 μM w skojarzeniu surfaktantów z lizozymem. Wyniki te potwierdzają ogólną obserwację, że kojarzenie dwóch środków przeciwdrobnoustrojowych o różnych mechanizmach działania daje silniejszy efekt bójczy. Interesujące jest, że różną aktywność, w zależności od rodzaju bakterii, wykazują testowane surfaktanty. Nie bez znaczenia w aktywności mikrobiologicznej jest budowa cząsteczek omawianych związków powierzchniowo czynnych. Otóż związki posiadające łańcuch alkilowy o długości 10-12 atomów węgla wykazują największą aktywność biobójczą w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i drożdży. Przeciw bakteriom Gram-ujemnym najefektywniej działają surfaktanty czwartorzędowych soli amoniowych o 14-16 atomach węgla w łańcuchu alkilowym (Buffet-Bataillon i wsp., 2012).

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski: badane surfaktanty oddziałują z lizozymem, wpływając na jego strukturę drugorzędową. Rodzaje oddziaływań to głównie, oddziaływania hydrofobowe, siły van der Waalsa i siły elektrostatycznego

odpychania. Badane surfaktanty wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko bakteriom *E. hirae*, *E. faecalis*, *E. coli* i *P. mirabilis*, a siła działania rośnie wraz z charakterem hydrofobowym związku. Dodatkowo wykazano, że badane mieszaniny surfaktantów z lizozymem wykazują synergizm działania przeciwdrobnoustrojowego.

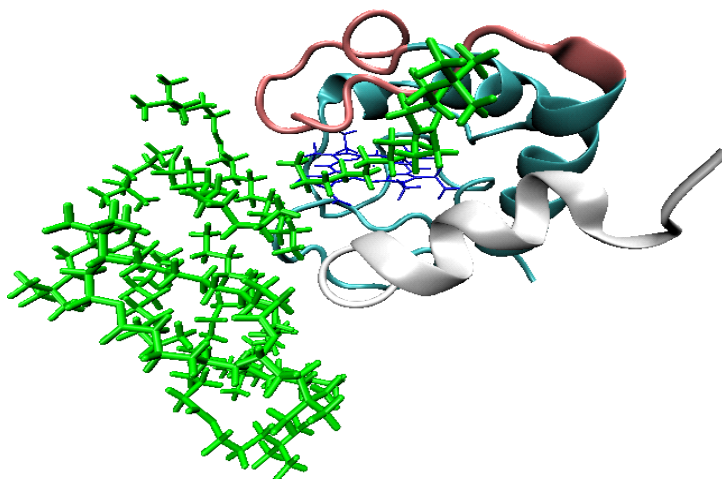
Oddziaływanie związków powierzchniowo czynnych z cytochromem c

Hemoproteiny to białka, których cechą wspólną jest obecność hemu – grupy prostetycznej, złożonej z pierścienia tetrapirolowego (protoporfiryny IX), połączonego z centralnie umiejscowionym, sześciokoordynacyjnym kationem żelaza. Przykładem hemoproteiny jest cytochrom c, białko mitochondrialne, przenoszące elektrony pomiędzy III a IV kompleksem łańcucha oddechowego (Santucci i wsp., 2019). Cytochrom c jest wykorzystywany jako model dla szeregu innych hemoprotein. W kolejnych badaniach (P7), zaliczanych do osiągnięcia naukowego skupiłem się na wyjaśnieniu idei kompleksowania związków powierzchniowo czynnych z cytochromem c. W toku realizowanych badań, przedstawiono komplementarne podejście, oparte na wykorzystaniu technik spektroskopowych, dynamiki rozpraszania światła (ang. *dynamic light scattering*, DLS), pomiaru napięcia powierzchniowego, oraz referencyjnej metody dynamiki molekularnej, do przeprowadzenia analizy strukturalnej kompleksów surfaktant-cytochrom c. W realizowanych badaniach użyłem komercyjnie dostępnego cytochromu c izolowanego z serca konia.

W celu określenia liczby miejsc wiążących dla oddziaływania cytochromu c z dwoma wariantami surfaktantów (DMM-11 i DMPM-11) wykonano serię pomiarów napięcia powierzchniowego. W obu przypadkach można stwierdzić, że stechiometria wiązania jest bliska 9:1 (surfaktant:białko). Do określenia wielkości cząstek agregatów zastosowano metodę DLS, która pozwoliła na wyznaczenie promieni hydrodynamicznych (R_h) kompleksów surfaktant-cytochrom c. Wyznaczone promienie hydrodynamiczne wynoszą odpowiednio 1,45 dla cytochromu c, 4,12 dla układu DMM-11/cytochrom c i 3,98 dla układu DMPM-11/cytochrom c, co świadczy o oddziaływaniu i wiązaniu się surfaktantów do powierzchni białka. Ponadto, w celu określenia mechanizmu oddziaływania surfaktantów z cytochromem c wykonano serię miareczkowań spektrofluorymetrycznych, wykorzystując wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanowych białka pod wpływem wiązania surfaktanta. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano liniowy wzrost maksimum fluorescencji pasma 326 nm po dodaniu submicelnego stężenia testowanych surfaktantów, którego wynikiem jest zwiększenie odległości pojedynczej reszty tryptofanu (Trp59), który związany jest z grupą hemową. Podobne rezultaty uzyskano w wyniku rozwinięcia trzeciorzędowej struktury lizozymu spowodowanej oddziaływaniami hydrofobowymi z DMM-11 i DMPM-11 (P6).

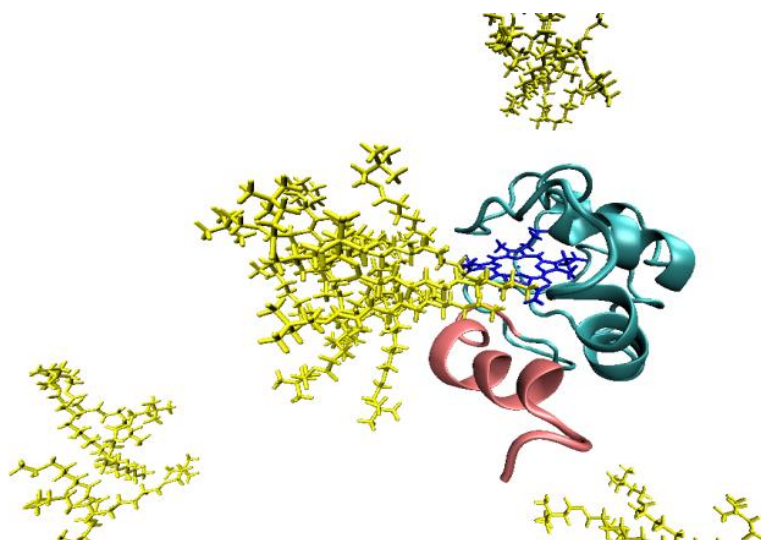
W dalszym etapie badań uzyskano widmo dichroizmu kołowego natywnego cytochromu c, wykazujące minima przy długości fal 208 i 222 nm, charakterystyczne dla struktury α -helisy. W obecności surfaktantów (DMM-11 i DMPM-11) kształt widm uległ zmianie, a na podstawie uzyskanych krzywych wyliczono zawartości procentowe poszczególnych struktur drugorzędowych. Procentowa zawartości struktury α -helisy dla natywnego białka wynosi 42,8%, natomiast dodatek 5 mM DMM-11 i DMPM-11 spowodował odpowiednio modyfikację konformacyjną cytochromu do 32,1% i 34,0% struktury α -helisy.

Interesujące rezultaty z punktu widzenia mechanizmów molekularnego oddziaływania uzyskano w oparciu o dynamikę molekularną, które wskazują, iż oba testowane surfaktanty (DMM-11 i DMPM-11) wpływają na strukturę natywnego białka. Amfifilowy charakter łańcucha polipeptydowego cytochromu c, z dużym udziałem łatwo dostępnych niepolarnych reszt aminokwasowych powoduje, że wykazuje on silną tendencję do wiązania surfaktantów do fragmentów hydrofobowych (Bushnell i wsp., 1990). Poniżej krytycznego stężenia micelizacji, najsilniejsze oddziaływania zachodzą w obrębie białka między pozycją 14 a 26 oraz 72 i 90 (Rycina 4).



Rycina 4. Graficzna reprezentacja oddziaływania 8 cząsteczek DMM-11 z cytochromem c.

Powyżej krytycznego stężenia micelizacji wpływ ten ściśle zależy od rodzaju cząsteczki środka powierzchniowo czynnego. W przypadku DMM-11, główne zmiany zachodzą wokół fragmentów białka między pozycją 1 i 25, natomiast obecność DMPM-11 wpływa na strukturę fragmentu białka między pozycją 100 a 105 (Rycina 5). Dodatkowo, wykazano, że niektóre cząsteczki surfaktantów mogą oddziaływać częścią polarną z powierzchnią białka, jednak w większości przypadków oddziałują poprzez ugrupowanie hydrofobowe. Powyżej krytycznego stężenia micelizacji, oba surfaktanty (DMM-11 i DMPM-11) mają zdolność do samoorganizacji poprzez hydrofobowe oddziaływania z białkiem. Zmiany strukturalne łańcucha polipeptydowego wywołane oddziaływaniem z surfaktantami wpływają na właściwości strukturalne w pobliżu miejsca aktywnego, w którym znajduje się cząsteczka hemu. Jednakże, w toku prowadzonych analiz wykazano, że grupa hemowa charakteryzowała się wysoką stabilnością strukturalną w obecności testowanych surfaktantów.



Rycina 5. Graficzna reprezentacja oddziaływania 30 cząsteczek DMM-11 z cytochromem c.

Na podstawie przeprowadzonych studiów literaturowych mogę stwierdzić, że: dotychczas, nikt nie przedstawił wyjaśnienia mechanizmów molekularnego oddziaływania surfaktantów czwartorzędowych soli amoniowych z cytochromem c. Zatem, uzyskane przeze mnie wyniki badań uzupełniają tę lukę i mogą być przydatne do opracowywania zastosowań pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych, mających właściwości lizosomotropowe w medycynie, jako substancje o aktywności przeciwnowotworowej.

Oddziaływanie związków powierzchniowo czynnych z lipazami

Lipazy (acylohydrolazy triacyloglicerolu, EC 3.1.1.3) to jedna z ważniejszych grup enzymów, mająca wszechstronne zastosowania przemysłowe, wynikające z ich unikatowych właściwości. Lipazy są enzymami szeroko rozpowszechnionymi w świecie organizmów żywych ze względu na ich podstawowe znaczenie we wszystkich etapach metabolizmu tłuszczów (Sarmah i wsp., 2018). Lipazy pochodzenia mikrobiologicznego stanowią klasę enzymów najszerzej stosowaną w aplikacjach biotechnologicznych i syntezie organicznej. Do mikroorganizmów wytwarzających lipazy należą bakterie, drożdże i grzyby. Ponadto, dokonujący się szybki postęp naukowy w biologii molekularnej oraz w inżynierii genetycznej, umożliwia tworzenie nowych mikrobiologicznych szczepów produkujących ściśle określone, komercyjnie użyteczne enzymy lipolityczne (Contesini i wsp., 2020). Dzięki inżynierii genetycznej stała się możliwa poprawa właściwości funkcjonalnych enzymów, jak również znaczne obniżył się koszt ich produkcji i oczyszczania (Vieira Gomes i wsp., 2018). Wysoka czystość preparatu pozwala na użycie go w mniejszych ilościach podczas procesu technologicznego. Cechą charakterystyczną tej grupy białek odróżniającą je od innych enzymów jest działanie na substraty nierozpuszczalne w wodzie. W środowisku wodnym lipazy katalizują reakcję hydrolizy triacylogliceroli, podczas gdy w środowisku rozpuszczalników organicznych enzymy te wykorzystywane są do tworzenia wiązań estrowych pomiędzy alkoholem (glicerolem) i resztami kwasów tłuszczowych.

Stosowanie lipaz w różnych gałęziach przemysłu znane jest od kilkudziesięciu lat. Enzymy te znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, mleczarskim, kosmetycznym, oleochemicznym oraz produkcji ochrony roślin (Akram i wsp., 2023).

Najważniejsze i najbardziej komercyjne zastosowanie właściwości hydrolitycznych lipaz to dodawanie ich do surfaktantów, które głównie wykorzystuje się w środkach piorących, czyszczących oraz w płynach do zmywania. Zapotrzebowanie na enzymy usuwające tłuste plamy już w niskich temperaturach przyczynia się do tworzenia nowych preparatów enzymatycznych.

Zgodnie z powyższym, wybór lipopeptydowych biosurfaktantów produkowanych przez bakterie *P. fluorescens* do badań nad wykorzystaniem w przemyśle środków piorących nie był przypadkowy, a studia literaturowe doprowadziły mnie do skonstruowania szczepu z nadprodukcją lipazy (YLip2) w drożdżach *Yarrowia lipolytica*, a wyniki badań zostały ujęte w osiągnięciu naukowym (P8).

Celem badań opisanych w publikacji (P8) była funkcjonalna nadekspresja genu *YAL10A20350g* odpowiedzialnego za syntezę lipazy (YLip2) w drożdżach *Y. lipolytica*. Biorąc pod uwagę liczne zalety *Y. lipolytica*, gatunek ten jest zaskakująco rzadko stosowany do nadprodukcji białek na dużą skalę. Za ten stan odpowiada głównie produkcja zewnątrzkomórkowych proteaz degradujących białko transportowane do pożywki hodowlanej. W celu pokonania tej przeciwności skonstruowano szczep, w którym gen *YAL10B05654g* kodujący kwaśną zewnątrzkomórkową proteazę (ang. *acid extracellular protease*, AXP) oraz gen *YAL10F31889g* kodujący alkaliczną zewnątrzkomórkową proteazę (ang. *alkaline extracellular protease*, XPR2) poddano delecji. W toku prowadzonych prac uzyskano konstrukt genetyczny, zawierający gen *YAL10A20350g* pod promotorem UAS_{B16} -TEF, w celu nadekspresji enzymu, w wyniku czego powstał szczep o nazwie AJD $\Delta X\Delta A$ -Lip2. W toku prowadzonych doświadczeń wykazano, że usunięcie obu proteaz (AXP i XPR2) znacząco wpływa na stabilność sekrecyjnej lipazy (YLip2) wydzielanej przez *Y. lipolytica*, nie przyczyniając się jednocześnie do zmiany żywotności czy tempa wzrostu komórek. YLip2 sekrecyjnie wydzieloną do podłoża oczyszczono, a następnie dokonano charakterystyki substratowej dla tego enzymu, również w obecności biosurfaktantów. Uzyskane wyniki wskazują, że lipaza (YLip2) wykazuje maksymalną wydajność katalityczną dla krótkołańcuchowego kaprylanu p-nitrofenylu (C8), podczas gdy wydajność katalityczna zmniejsza się wraz ze wzrostem długości łańcucha substratu, stosując laurylan p-nitrofenylu (C12) i palmitylan p-nitrofenylu (C16). Badany enzym osiąga maksymalną aktywność w temperaturze 37°C. W zakresie 25-45°C aktywność enzymu prawie się nie zmienia. Podobną optymalną temperaturę działania mają lipazy pochodzące z drożdży *Candida rugosa* (35°C), *Candida intermedia* (40°C), *Candida parapsilosis* (40°C) oraz *Pichia guilliermondii* (35°C) (Wang i wsp., 2007; Huang i wsp., 2008). Optymalne pH hydrolizy kaprylanu p-nitrofenylu, katalizowanej przez YLip2 wynosi 8,0 i w zakresie pH od 6,5 do 9,0 enzym zachowuje połowę aktywności maksymalnej. Pod względem optymalnych parametrów reakcji podobne właściwości wykazują wymienione wcześniej lipazy pochodzące z *C. rugosa* oraz *C. intermedia*, których najaktywniejsze działanie odnotowane jest odpowiednio w pH 7,7 i 7,5 (Wang i wsp., 2007; Huang i wsp., 2008). Z przeprowadzonych badań wynika, że aktywność enzymu zależy od obecności lipopeptydowych biosurfaktantów, co zostało potwierdzone wzrostem aktywności 2- i 1,6-krotnie w obecności odpowiednio 0,15 mM wiskozyny i 0,2 mM amfizyny.

Oddziaływanie biosurfaktantów (wiskozyny i amfizyny) z YLip2 analizowano wykorzystując właściwości fluorescencyjne enzymu, który ze względu na obecność w swojej strukturze reszt tryptofanu (Trp233, Trp271 i Trp285) wykazuje znaczną fluorescencję po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 280 nm. Podczas miareczkowania YLip2 badanymi

związkami, wyraźne maksimum fluorescencji przy 337 nm, ulega wyfłaszczeniu co świadczy o selektywnym wygaszaniu reszt tryptofanowych, które są bardziej eksponowane do środowiska polarnego, a więc łatwiej dostępne. W toku prowadzenia badań wykazano, że wiskozyzna posiada większą zdolność wygaszania fluorescencji YLLip2 niż amfizyna. Otrzymane stałe Sterna-Volmera wynoszą odpowiednio $6,40 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ dla wiskozyzny i $5,66 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ dla amfizyny, natomiast stałe wygaszenia fluorescencji wynoszą $1,28 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dla wiskozyzny i $1,13 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dla amfizyny. Tak duże wartości stałych wygaszenia fluorescencji wskazują, że związki te wygaszają fluorescencję YLLip2 na drodze statycznej (tj. tworzenia niefluoryzującego kompleksu YLLip2-biosurfaktant), a nie dynamicznej (na skutek zderzeń) (Brown i Royer 1997). Silniejsze oddziaływanie wiskozyzny od amfizyny może być podyktowane zarówno jej większą hydrofobowością, jak i lepszym dopasowaniem ze względu na jej wielkość. Z przeprowadzonych badań wynika, że na jedną cząsteczkę enzymu przypadają dwie cząsteczki lipopeptydu, co zostało potwierdzone badaniami napięcia powierzchniowego. Dodatkowo z uzyskanych parametrów termodynamicznych dla obu biosurfaktantów wnioskuje się, że najważniejszą rolę w stabilizacji układu będą odgrywały oddziaływania van der Waalsa oraz wiązania wodorowe.

Na podstawie przeprowadzonych studiów literaturowych mogę stwierdzić, że: dotychczas, nikt nie przedstawił wyjaśnienia mechanizmów molekularnych oddziaływania lipaz z lipopeptydowymi biosurfaktantami. Uzyskane rezultaty wskazują, iż wykorzystanie zjawiska wygaszania fluorescencji YLLip2 przez biosurfaktanty jest stosunkowo szybką i dokładną metodą badania zdolności wiązania się związków powierzchniowo czynnych z enzymami. Dodatkowo, mogą być one przydatne do opracowywania zastosowań zarówno lipopeptydów, jak i lipaz w biotechnologii, jak również w wielu gałęziach przemysłu, w tym w produkcji detergentów, kosmetyków, farmaceutyków i żywności.

Przeprowadzone badania były finansowane w ramach grantu SONATA BIS 7 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Badanie wpływu alternatywnych źródeł węgla na proces biosyntezy lipidów w drożdżach *Yarrowia lipolytica*”, którego kierownikiem jest doktor Adam Dobrowolski (Załącznik 4, II.9.2.4).

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć badawczych opisanych w cyklu prac habilitacyjnych i ich potencjalne zastosowania

Celem przedstawionego cyklu prac było zrozumienie specyfiki oddziaływań związków powierzchniowo czynnych z modelowymi białkami: albuminą surowicy wołowej, lizozymem z białka jaja kurzego, cytochromem c oraz lipazą z drożdży *Y. lipolytica*. Specyfika ta przekłada się bezpośrednio na molekularne mechanizmy sterujące oddziaływaniami międzycząsteczkowymi w wielu układach wykorzystywanych w badaniach biologicznych, biotechnologicznych, przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym. Zdobywana w tym obszarze wiedza daje perspektywy pełnego zrozumienia fizykochemicznych podstaw aktywności powierzchniowo czynnej naturalnych lipopeptydowych biosurfaktantów oraz pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych. Przedstawione badania niewątpliwie wpisują się w nurt badań podstawowych, wynikają bowiem z chęci budowania wiedzy i zrozumienia złożoności procesów zachodzących przede wszystkim w układach surfaktant – białko. W ramach przeprowadzonych analiz pokazuje, że badane przeze mnie związki powierzchniowo czynne są obiecującą i rozwojową grupą o potencjale aplikacyjnym w naukach biologicznych, biotechnologii, jak również zastosowaniach

przemysłowych. Cele szczegółowe przedstawionego cyklu prac były ukierunkowane na wyjaśnienie strukturalnych aspektów oddziaływania w nie do końca poznanych układach surfaktant – białko. Zdobyta wiedza przekłada się na zastosowania w projektowaniu nowych rozwiązań terapeutycznych i przemysłowych, w oparciu o biosurfaktanty, którymi zainteresowanie nie słabnie, mimo iż są znane od wielu lat.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych przedstawionych w cyklu 8 prac należy zaliczyć:

1. Zaproponowanie i empiryczna weryfikacja metodologii służącej do oceny charakteru oddziaływań lipopeptydowych biosurfaktantów, ich metalokompleksów z jonami (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} i Ca^{2+}) oraz surfaktantów czwartorzędowych soli amoniowych z BSA, lizozymem, cytochromem c oraz lipazą na podstawie modelowej struktury;
2. Zaproponowanie metodyki analizy molekularnych podstaw oddziaływania lipopeptydowych biosurfaktantów, ich metalokompleksów z jonami i surfaktantów czwartorzędowych soli amoniowych, która pozwala określić typ oddziaływań tych związków z modelowymi białkami.
3. Wyznaczenie niezdefiniowanych do tej pory parametrów opisujących zdolność wiązania związków powierzchniowo czynnych pochodzenia mikrobiologicznego z modelowymi białkami o znaczeniu biologicznym, medycznym, biotechnologicznym i przemysłowym;
4. Wykazanie, że analiza interakcji surfaktantów, różniących się budową molekularną, z modelowymi białkami, pozwala ustalić, że wielkość cząsteczki i jej hydrofobowość są niezwykle istotnym czynnikiem regulującym oddziaływanie surfaktant-białko;
5. Wykazanie, że na oddziaływanie surfaktant-białko wpływ mają nie tylko hydrofobowość i wielkość, ale również struktura czy sekwencja aminokwasowa białek. Porównanie danych doświadczalnych i literaturowych prowadzi do wniosku, że przy tak dużej liczbie zmiennych, zarówno po stronie surfaktantów jak i białek mało prawdopodobne jest stworzenie jednego i ujednoczonego mechanizmu opisującego oddziaływanie pomiędzy surfaktantami a białkami.
6. Wykazanie, że surfaktanty czwartorzędowych soli amoniowych uznawane za skuteczne środki przeciwdrobnoustrojowe mogą w połączeniu z lizozymem wykazywać synergiczne działanie, co wykazano na przykładzie testowanych związków.
7. Ponadto przeprowadzone badania ujawniły duży potencjał aplikacyjny biosurfaktantów i surfaktantów czwartorzędowych soli amoniowych, wskazując na możliwości ich praktycznego wykorzystania m.in. w biotechnologii, medycynie, ochronie środowiska, czy produkcji żywności.

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

5.1. Aktywność naukowa w jednostkach polskich

W latach 2005-2015 byłem zatrudniony na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego (szczegółowy wykaz zatrudnienia został wskazany w punkcie nr 3 tego Autoreferatu). Badania prowadzone w tym okresie były ściśle związane z poszukiwaniem nowych

związków o charakterze powierzchniowo czynnym syntetyzowanych przez bakterie arktyczne, które stały się tematem mojej pracy doktorskiej obronionej w roku 2013. Promotorem mojej pracy doktorskiej był Profesor Marcin Łukasiewicz z Zakładu Biotransformacji Uniwersytetu Wrocławskiego.

Głównym celem prowadzonych przez mnie badań było ustalenie, czy wyselekcjonowane z gleby i wody Spitsbergenu izolaty bakteryjne są zdolne do syntezy biosurfaktantów, oraz w jaki sposób warunki prowadzenia hodowli wpływają na produkcję tych związków. Kolejnym celem moich badań było oczyszczenie biosurfaktantów, oznaczenie struktury chemicznej i zbadanie właściwości wyizolowanych związków. W badaniach wykorzystałem trzy szczepy bakterii arktycznych: *P. fluorescens* BD5, *Pseudomonas putida* BD2 oraz *Rhodococcus fascians* BD8. Dla wszystkich otrzymanych biosurfaktantów o oznaczonej strukturze prowadziłem badania, których celem było określenie ich podstawowych właściwości fizykochemicznych i użytkowych takich jak: napięcie powierzchniowe, krytyczne stężenie micelizacji, wielkość miceli oraz właściwości emulgujące. Szerokie spektrum aktywności biologicznej biosurfaktantów było podstawą do przeprowadzenia badań biologicznych w kierunku aktywności cytotoksycznej i proapoptotycznej wyizolowanych związków wobec komórek nowotworowych, oraz zbadanie ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec ludzkich patogenów bakteryjnych i drożdżowych.

Niezwykle ważnym wynikiem badań było wykazanie, że biosurfaktanty produkowane przez szczep *P. fluorescens* BD5 to dwa nowe cykliczne lipopeptydy, które nazwano pseudofaktyna I i II (Janek i wsp., 2010). Biosurfaktanty produkowane przez bakterie *P. putida* BD2 to diramnilipidy oraz fosfatydyloetanoloaminy (Janek i wsp., 2013b), podczas gdy biosurfaktanty syntetyzowane przez szczep *R. fascians* BD8 to trehalozolipidy (Janek i wsp., 2018). Podsumowując wyniki badań dotyczących właściwości fizykochemicznych testowanych biosurfaktantów, można stwierdzić, że wszystkie testowane związki powierzchniowo czynne posiadały wysoką zdolność obniżania napięcia powierzchniowego wody oraz zwilżania powierzchni szkła i plastiku. Z uwagi na bardzo dobre właściwości fizykochemiczne, biosurfaktanty syntetyzowane przez bakterie arktyczne mogą znaleźć szerokie zastosowanie przemysłowe. Dzięki doskonałym właściwościom emulgującym, związki te mogą być potencjalnie wykorzystywane w przemyśle biotechnologicznym, farmaceutycznym, kosmetycznym, w produkcji detergentów, w przemyśle spożywczym oraz petrochemicznym.

W trakcie realizacji badań udowodniłem również, że biosurfaktanty pochodzenia arktycznego osłabiają adhezję komórek i utrudniają tworzenie biofilmu przez pięć gatunków patogennych bakterii oraz grzyba *Candida albicans*. Na podstawie przeprowadzonych analiz zahamowania adhezji patogenów do powierzchni polistyrenowej wyznaczyłem optymalne stężenia biosurfaktantów dla procesu tworzenia biofilmu na powierzchniach szkła, plastiku i silikonu (Janek i wsp., 2012; Janek i wsp., 2013b; Janek i wsp., 2018). Ważnym z terapeutycznego punktu widzenia jest fakt, że pseudofaktyna II produkowana przez szczep *P. fluorescens* BD5, jak również trehalozolipid syntetyzowany przez bakterie *R. fascians* BD8 wykazały znacznie większą cytotoksyczność wobec komórek linii nowotworowej czerniaka A375, w stosunku do prawidłowych linii komórek fibroblastów (ang. *Normal Human Dermal Fibroblasts*, NHDF) oraz keratynocytów (ang. *Normal Human Epidermal Keratinocytes*, NHEK) (Janek i wsp., 2013a). W przypadku dwóch testowanych biosurfaktantów udowodniono szereg mechanizmów aktywacji procesu apoptozy poprzez szlak wewnętrzny związany bezpośrednio z udziałem mitochondriów.

Mechanizm działania pseudofaktyny II jak i trehalozolipidu polega na wiązaniu się biosurfaktantu z błoną komórkową, czego następstwem jest depolaryzacja błony. W komórkach linii czerniaka A375 traktowanych pseudofaktyną II i trehalozolipidem obserwowano typowe dla apoptozy zmiany w wyglądzie jąder komórkowych (kondensacja i fragmentacja chromatyny, prowadzące do powstawania tzw. ciałek apoptotycznych). Poprzez dalsze badania zjawiska apoptozy w oparciu o szereg typowych dla tego procesu znaczników biochemicznych, takich jak: wzrost poziomu Ca^{2+} , translokacja fosfatydyloseryny, fragmentacja DNA czy aktywacja kaspazy-3 wykazałem, że apoptoza odgrywa główną rolę w eliminacji komórek czerniaka A375 poddanych działaniu biosurfaktantów syntezowanych przez bakterie arktyczne.

Przeprowadzone badania opisano w czterech pracach opublikowanych w międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (Załącznik 4, od II.4.1 do II.4.4). Dodatkowo, część wyników otrzymanych w toku prac badawczych związanych z pracą doktorską zostało zaprezentowanych w formie plakatów na sześciu konferencjach naukowych (Załącznik 4, od II.7.1.1 do II.7.1.6), jak również w formie prezentacji ustnej na konferencji - *Central European Symposium on Antimicrobials and Antimicrobial Resistance CESAR 2012* (Załącznik 4, II.7.1.7). Dodatkowo w roku 2011, komunikat pt. „Antiadhesive activity of biosurfactant pseudofactin II secreted by *Pseudomonas fluorescens* BD5 against several pathogenic microorganisms” został wyróżniony przez Komitet Międzynarodowej Konferencji - *4th Polish-Ukrainian Weigl Conference on Microbiology "From microbiology to synthetic biology"* (Załącznik 4, II.7.1.4). Przeprowadzone badania były finansowane m.in. przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu na lata 2011-2013 pt. „Biomedyczne zastosowania biosurfaktantów syntetyzowanych przez mikroorganizmy pochodzenia arktycznego”, w którym byłem głównym wykonawcą (Załącznik 4, II.9.2.5).

Podsumowaniem tego okresu pracy, był artykuł przeglądowy opublikowany w renomowanym czasopiśmie *Critical Reviews in Biotechnology* pt. „Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review”. Szeroki zakres tematyczny publikacji obejmował przegląd metod produkcji, izolacji, badań przesiewowych, jak również metod oczyszczania i charakterystyki strukturalnej lipopeptydowych biosurfaktantów przy użyciu technik chromatograficznych i spektroskopowych (Załącznik 4, II.4.36).

Po obronie pracy doktorskiej, w 2015 roku zostałem zatrudniony jako asystent, a od roku 2018 jako adiunkt na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (szczegółowy wykaz zatrudnienia został wskazany w punkcie nr 3 tego Autoreferatu).

W roku 2015 podjąłem współpracę naukową z doktorem habilitowanym Przemysławem Krawczykiem z Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy, która dotyczyła projektowania nowych sond fluorescencyjnych o potencjalnym zastosowaniu w obrazowaniu medycznym. Poszukiwanie nowych znaczników jest ważnym nurtem naukowym, ponieważ ich zastosowanie w naukach biologicznych i medycznych jest niedocenione i nie w pełni wykorzystane. Realizowane przez mnie badania *in vitro* na komórkach eukariotycznych miały na celu potwierdzenie słuszności wyboru struktury chemicznej sond fluorescencyjnych oraz wskazanie ich potencjalnego zastosowania w obrazowaniu komórkowym. Przeprowadzone przeze mnie badania na drożdżach (modelowym przykładzie komórek

eukariotycznych) pozwoliły wnioskować, że wybarwienie komórek jest wynikiem interakcji koniugatu konkanawaliny A (ConA) znakowanej fluorochromami (4-dimetyloamino-3'-izotiocyjanianem chalkonu, PKA; 4-(1H-fenantro[9,10-d]-imidazol-2-ilo)-benzaldehyd, PB1; 4'-(1H-fenantro[9,10-d]-imidazol-2-ilo)-bifenilo-4-karboaldehyd, PB2; oraz 4-{N,N-Bis[4-benzylideno-2-fenylo-1,3-oksazol-5(4H)-ono]amino}benzaldehydu, PB3) z polisacharydami obecnymi w ścianie komórkowej drożdży. Ponadto, właściwości spektralne otrzymanych koniugatów z ConA powodują, że barwniki PKA, PB1, PB2 oraz PB3 są znacznikami konkurencyjnymi dla dostępnych na rynku komercyjnym Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, izotiocyjanianu fluoresceiny (FITC) oraz jodku propidyny. Z kolei przeprowadzone testy cytotoksyczności wobec komórek gruczolaka okrężnicy linii HT-29 w hodowlach *in vitro* udowodniły, że zarówno PB3, jak i koniugat ConA-PB3 nie wykazują wyraźnej cytotoksyczności przy stężeniach poniżej 20 μM , utrzymując żywotność komórek na poziomie powyżej 85%. Ponadto, widma dichroizmu kołowego koniugatu ConA-PB3 nie wykazywały różnic względem widm natywnej lektyny (ConA), wskazując, że barwnik PB3 nie wpływa na strukturę drugorzędową białka, a tym samym na interakcje ConA z resztami mannozowymi oligosacharydów występujących w ścianie komórkowej drożdży. W związku z tym istnieje możliwość zastosowania tych sond, jako fluoroforów w znakowaniu lektyn do wykrywania specyficznych ugrupowań węglowodanowych, a także znakowania przeciwciał do testów immunofluorescencyjnych.

Wyniki uzyskanych badań dla nowych fluorochromów o potencjalnym zastosowaniu w obrazowaniu medycznym opisano w czterech pracach opublikowanych w międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (Załącznik 4, od II.4.6 do II.4.9). Dodatkowo, część wyników otrzymanych w toku realizacji badań zaprezentowano w formie komunikatów zjazdowych na trzech konferencjach naukowych (Załącznik 4, II.7.2.3, II.7.2.12 oraz II.7.2.14).

Poza moimi głównymi zainteresowaniami naukowymi angażowałem się w projekty prowadzone w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej. Wzięłem udział w badaniach dotyczących analizy oddziaływań polihistydynowych cyklopeptydów z jonami Cu^{2+} i Zn^{2+} w aspekcie projektowania mimetyków dysmutazy ponadtlenkowej (SOD z ang. *SuperOxide Dismutase*). W wyniku tej współpracy powstała publikacja naukowa w czasopiśmie *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* (Załącznik 4, II.4.13).

Ponadto, we współpracy z doktor habilitowaną Joanną Burger w ramach projektu dotyczącego analizy oddziaływań ligandów aminofosfonowych z jonami metali w aspekcie zastosowań biomedycznych, wykazaliśmy iż modyfikowane strukturalnie ligandy aminodifosfonowe wywodzące się od kwasu nitrylotrimetylenofosfonowego wykazują selektywny efekt cytotoksyczny wobec ludzkich linii komórek nowotworowych (gruczolaka okrężnicy i czerniaka złośliwego skóry), natomiast związane w wapniowe lub magnezowe kompleksy efekt ten tracą. Jednocześnie zauważyliśmy, że aminobisfosfoniany wykazują tendencję odwrotną; wzmocnienie zdolności antyproliferacyjnych następowało po związaniu się do twardego jonu metalu. Modyfikowane ligandy aminodifosfonowe w formie niezwiązanej wykazały także silne działanie hamujące migrację komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*. Nasze badania to pierwszy opisany w literaturze przykład analizy modyfikowanych ligandów aminodifosfonowych pod względem efektu antyproliferacyjnego. W wyniku tej współpracy

powstały dwie publikacje naukowe w czasopiśmie *New Journal of Chemistry* (Załącznik 4, II.4.11 oraz II.4.14).

Dodatkowo, we współpracy z doktor Anną Janicką-Kłós realizowałem badania dotyczące projektowania peptydomimetyków mucyny 7 (MUC7), białka które jest częścią nieimmunologicznego systemu obronnego śliny. MUC7 wiąże się bezpośrednio z mikroorganizmami, aby ułatwić ich usunięcie z jamy ustnej. W ramach realizowanych badań określono termodynamikę, strukturę i zdolności koordynacyjne peptydomimetyków MUC7 z jonami cynku i miedzi, i porównano je z ich aktywnością przeciwdrobnoustrojową, wyciągając wnioski na temat związku między strukturą kompleksów metal-peptyd a ich sposobem działania i skutecznością. Wyniki uzyskanych badań dla peptydomimetyków MUC7 dają dużą nadzieję w walce z patogenami opornymi na antybiotyki. Ponadto, wykazano, że zaprojektowane peptydy potrzebują biologicznie niezbędnych jonów metali, takich jak Zn^{2+} i Cu^{2+} do wzmocnienia ich działania przeciwdrobnoustrojowego. W wyniku tej współpracy powstały dwie publikacje naukowe w czasopiśmie *Journal of Inorganic Biochemistry* (Załącznik 4, II.4.17) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (Załącznik 4, II.4.29).

5.2. Aktywność naukowa w jednostkach zagranicznych

W roku 2015 zainicjowałem współpracę z grupą kierowaną przez Profesor Ligię Rodrigues. Umożliwiło mi to realizację szesnastotygodniowego stażu badawczego w Centrum Inżynierii Biologicznej Uniwersytetu Minho w Portugalii, a opiekunem mojego stażu był doktor Eduardo Gudiña. W związku z kierowaniem działaniem naukowym Miniatura 2 oraz pełnieniem funkcji wykonawcy w projektach finansowanych z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju oraz Narodowego Centrum Nauki (Projekty wykazane w Załączniku 4; II.9.2.2, II.9.2.4 oraz II.9.2.5) staż był realizowany w etapach. Profesor Lígia Rodrigues (h-index=55) jest cenioną naukowczynią, która jest szczególnie zaangażowana w rozwój technologii związanych z zastosowaniem biosurfaktantów w medycynie, w tym badań nad wykorzystaniem ich jako substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz przeciwnowotworowych (przykłady zrealizowanych projektów: BIOCLEAR, BIOSURFA, MEDSURF). Należy dodać, że Profesor Lígia Rodrigues współpracuje w zakresie badań naukowych dotyczących biosurfaktantów z jednostkami zarówno w kraju, jak i za granicą. Ponadto, Zespół Profesor Rodrigues specjalizuje się w waloryzacji odpadów pochodzących z przemysłu rolno-spożywczego, przy udziale mikroorganizmów, w substancje powierzchniowo czynne. Z uwagi na charakter moich głównych zainteresowań naukowych oraz prac badawczych realizowanych przeze mnie w ramach grantów, moim zadaniem podczas stażu było opanowanie nowych metod umożliwiających realizację badań aktywności biologicznej i właściwości funkcjonalnych biosurfaktantów.

W trakcie stażu zrealizowałem dwa tematy projektowe. Bazą proponowanego pierwszego projektu były badania skierowane na aspekt właściwości fizykochemicznych, biomedycznych oraz aktywności biologicznej nowych synergicznych kompleksów lipopeptydowego biosurfaktantu, pseudofaktyny II z jonami metali dwuwartościowych. Badania właściwości adsorpcyjnych oraz biomedycznych dla mieszanin pseudofaktyny II z jonami metali miały na celu przede wszystkim wytypowanie układów wykazujących synergizm w obniżaniu napięcia powierzchniowego, jak również posiadających zwiększoną aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciw wybranym, standardowym patogennym szczepom bakteryjnym. Ponadto, znalezienie nowych kompleksów

metali z pseudofaktyną II, aktywnych biologicznie przeciwko *Staphylococcus epidermidis* oraz *Proteus mirabilis* oprócz aspektu naukowego, ma niewątpliwie aspekt praktyczny i może w przyszłości zaowocować wdrożeniem uzyskanych kompleksów do przemysłu medycznego i farmaceutycznego. Całość badań opublikowano w czasopiśmie *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Załącznik 4, II.4.5). Badania zrealizowane w ramach tej części stażu były finansowane z Programu Wymiany Osobowej (polsko-portugalskiej), finansowanej przez MEiN oraz Portugalską Fundację Nauki i Technologii, w którym pełniłem rolę kierownika polskiego zespołu (Załącznik 4, II.9.2.3).

Kolejny temat badawczy realizowany w ramach stażu dotyczył ekonomicznej produkcja ramnolipidów przez bakterie *Burkholderia thailandensis* E264 przy użyciu produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego. Badania te pozwoliły wykazać, że namok kukurydziany i wyłoki oliwne są perspektywicznym induktorem syntezy ramnolipidów w hodowlach bakterii. Dodatkowo, ze względu na znaczącą aktywność powierzchniową i emulgującą ramnolipidy produkowane przez *B. thailandensis* E264 wydają się być doskonałymi związkami do zastosowań *ex situ* jako czynnik intensyfikujący wydobycie ropy naftowej ze złóż oraz zanieczyszczonych gleb. Wyniki tych badań zostały uwzględnione w publikacji w czasopiśmie *Applied Microbiology and Biotechnology* (Załącznik 4, II.4.30).

Współpraca z zespołem kierowanym przez Profesor Rodrigues oraz doktora Eduardo Gudiñę jest przeze mnie kontynuowana w ramach projektu OPUS 19, którego jestem kierownikiem i głównym wykonawcą (Załącznik 4, II.9.2.6), oraz badań nad aktywnością biologiczną i mechanizmami działania nowych kompleksów metali z lipopeptydowymi biosurfaktantami produkowanymi na hydrolizatach odpadów z przemysłu rolno-spożywczego. Dalsze plany naukowe obejmują realizację projektów opartych o chemoenzymatyczną syntezę i aktywność biologiczną nowych estrów polioliowych kwasów tłuszczowych.

Wykaz cytowanej literatury:

- Akram F, Mir AS, Haq I ul, Roohi A (2023) An Appraisal on Prominent Industrial and Biotechnological Applications of Bacterial Lipases. *Mol Biotechnol* 65:521–543. doi.org/10.1007/s12033-022-00592-z
- Badmus SO, Amusa HK, Oyehan TA, Saleh TA (2021) Environmental risks and toxicity of surfactants: overview of analysis, assessment, and remediation techniques. *Environmental Science and Pollution Research* 28:62085–62104.
- Bos M, van Vliet T (2001) Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Adv Colloid Interface Sci* 91:437–471.
- Brown MP, Royer C (1997) Fluorescence spectroscopy as a tool to investigate protein interactions. *Curr Opin Biotechnol* 8:45–49.
- Buffet-Bataillon S, Tattevin P, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A (2012) Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review. *Int J Antimicrob Agents* 39:381–389.
- Bushnell GW, Louie G V., Brayer GD (1990) High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *J Mol Biol* 214:585–595.
- Contesini FJ, Davanço MG, Borin GP, Vanegas KG, Cirino JPG, Melo RR de, Mortensen UH, Hildén K, Campos DR, Carvalho P de O (2020) Advances in Recombinant Lipases: Production, Engineering, Immobilization and Application in the Pharmaceutical Industry. *Catalysts* 10:1032.
- Deep S, Ahluwalia JC (2001) Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants. *Physical Chemistry Chemical Physics* 3:4583–4591.

- Gaur VK, Sharma P, Sirohi R, Varjani S, Taherzadeh MJ, Chang J-S, Yong Ng H, Wong JWC, Kim S-H (2022) Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview. *Bioresour Technol* 343:126059.
- Ghosh S (2008) Interaction of trypsin with sodium dodecyl sulfate in aqueous medium: A conformational view. *Colloids Surf B Biointerfaces* 66:178–186.
- Gregoire N, Chauzy A, Buyck J, Rammaert B, Couet W, Marchand S (2021) Clinical Pharmacokinetics of Daptomycin. *Clin Pharmacokinet* 60:271–281.
- Huang X, Yu A, Ge D, Xu Z (2008) Immobilization and Properties of Lipase from *Candida rugosa* on Electrospun Nanofibrous Membranes with Biomimetic Phospholipid Moieties. *Chem Res Chin Univ* 24:231–237.
- Janek T, Krasowska A, Czyżnikowska Z, Łukaszewicz M (2018) Trehalose lipid biosurfactant reduces adhesion of microbial pathogens to polystyrene and silicone surfaces: An experimental and computational approach. *Front Microbiol* 9:1–14.
- Janek T, Krasowska A, Radwańska A, Łukaszewicz M (2013a) Lipopeptide Biosurfactant Pseudofactin II Induced Apoptosis of Melanoma A 375 Cells by Specific Interaction with the Plasma Membrane. *PLoS One* 8:e57991.
- Janek T, Łukaszewicz M, Krasowska A (2013b) Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids Surf B Biointerfaces* 110:379–386.
- Janek T, Łukaszewicz M, Krasowska A (2012) Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. *BMC Microbiol* 12:24.
- Janek T, Łukaszewicz M, Rezanka T, Krasowska A (2010) Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour Technol* 101:6118–6123.
- Kashif A, Rehman R, Fuwad A, Shahid MK, Dayarathne HNP, Jamal A, Aftab MN, Mainali B, Choi Y (2022) Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review. *Adv Colloid Interface Sci* 306:102718.
- Kwaśniewska D, Chen Y-L, Wiczorek D (2020) Biological Activity of Quaternary Ammonium Salts and Their Derivatives. *Pathogens* 9:459.
- Li Y, Lee J-S (2019) Staring at protein-surfactant interactions: Fundamental approaches and comparative evaluation of their combinations - A review. *Anal Chim Acta* 1063:18–39.
- Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C (2021) Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens* 10:1310.
- Mandal B, Ghosh S, Moulik SP (2016) Detailed characterization of lysozyme (Lyz)–surfactant (SDDS) interaction and the structural transitions. *New Journal of Chemistry* 40:4617–4624.
- Naughton PJ, Marchant R, Naughton V, Banat IM (2019) Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *J Appl Microbiol* 127:12–28.
- Nawaz N, Wen S, Wang F, Nawaz S, Raza J, Iftikhar M, Usman M (2022) Lysozyme and Its Application as Antibacterial Agent in Food Industry. *Molecules* 27:6305.
- Olopoda IA, Lawal OT, Omotoyinbo O V., Kolawole AN, Sanni DM (2022) Biochemical characterization of a thermally stable, acidophilic and surfactant-tolerant xylanase from *Aspergillus awamori* AFE1 and hydrolytic efficiency of its immobilized form. *Process Biochemistry* 121:45–55.
- Otzen D (2011) Protein-surfactant interactions: A tale of many states. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1814:562–591.
- Otzen DE (2017) Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859:639–649.
- Randolph TW, Jones LS (2002) Surfactant-Protein Interactions. pp 159–175.
- Santucci R, Sinibaldi F, Cozza P, Polticelli F, Fiorucci L (2019) Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *Int J Biol Macromol* 136:1237–1246.
- Sarmah N, Revathi D, Sheelu G, Yamuna Rani K, Sridhar S, Mehtab V, Sumana C (2018) Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol Prog* 34:5–28.
- Shanmugaraj K, Anandakumar S, Ilanchelian M (2015) Probing the binding interaction of thionine with lysozyme: A spectroscopic and molecular docking investigation. *Dyes and Pigments* 112:210–219.

- Sharma V, Yañez O, Zúñiga C, Kumar A, Singh G, Cantero-López P (2020) Protein-surfactant interactions: A multitechnique approach on the effect of Co-solvents over bovine serum albumin (BSA)-cetyl pyridinium chloride (CPC) system. *Chem Phys Lett* 747:137349.
- Shehata M, Ünlü A, Iglesias-Fernández J, Osuna S, Sezerman OU, Timucin E (2023) Brave new surfactant world revisited by *thermoalkalophilic lipases: computational insights into the role of SDS as a substrate analog*. *Physical Chemistry Chemical Physics* 25:2234–2247.
- Shekhar S, Sundaramanickam A, Balasubramanian T (2015) Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review. *Crit Rev Environ Sci Technol* 45:1522–1554.
- Spector AA, John K, Fletcher JE (1969) Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin. *J Lipid Res* 10:56–67.
- Stubbs S, Yousaf S, Khan I (2022) A review on the synthesis of bio-based surfactants using green chemistry principles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 30:407–426.
- Ukaegbu CI, Shah SR, Alara RO, Thonda OA (2023) Biosurfactants as Potential Antitumor Agents. In: *Advancements in Biosurfactants Research*. Springer International Publishing, Cham, pp 439–460.
- Vieira Gomes A, Souza Carmo T, Silva Carvalho L, Mendonça Bahia F, Parachin N (2018) Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms* 6:38.
- Wang L, Chi Z, Wang X, Liu Z, Li J (2007) Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. *Ann Microbiol* 57:495–501.
- Zhang X, Kong H, Zhang X, Jia H, Ma X, Miao H, Mu Y, Zhang G (2021) Design and production of environmentally degradable quaternary ammonium salts. *Green Chemistry* 23:6548–6554.
- Zhao J, Cao Y, Zhang L (2020) Exploring the computational methods for protein-ligand binding site prediction. *Comput Struct Biotechnol J* 18:417–426.
- Zhu Y, Hao W, Wang X, Ouyang J, Deng X, Yu H, Wang Y (2022) Antimicrobial peptides, conventional antibiotics, and their synergistic utility for the treatment of drug-resistant infections. *Med Res Rev* 42:1377–1422.

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

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

6.1.1. Prowadzone kursy

Jestem autorem i współautorem opracowań kursów realizowanych dla studentów Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz studentów Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Przygotowałem i prowadzę/prowadziłem następujące kursy:

Mikrobiologia ogólna i żywności dla studentów kierunku Technologia i organizacja gastronomii - studia stacjonarne, I stopnia. Przedmiot jest prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2020/2021 do chwili obecnej. Przedmiot realizowany jest przeze mnie w formie wykładów i ćwiczeń praktycznych. Jestem autorem sylabusu do tego przedmiotu.

GMO-advantages and disadvantages dla studentów z programu ERASMUS+. Przedmiot jest prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2020/2021 do chwili obecnej. Przedmiot realizowany jest przeze mnie w formie wykładów. Jestem autorem sylabusu do tego przedmiotu.

Biotechnologia drobnoustrojów dla studentów kierunku Biotechnologia - studia stacjonarne, II stopnia. Przedmiot jest prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2021/2022 do chwili obecnej. Przedmiot realizuję w formie ćwiczeń praktycznych. Jestem współautorem sylabusu do tego przedmiotu.

Współczesne metody analizy substancji biologicznie aktywne dla studentów kierunku Biotechnologia - studia stacjonarne, II stopnia. Przedmiot jest prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2022/2023 do chwili obecnej. Przedmiot realizuję w formie wykładów. Jestem autorem aktualnie obowiązującego sylabusu do tego przedmiotu.

Aktywne metabolity drobnoustrojów dla studentów kierunku Biotechnologia - studia stacjonarne, II stopnia. Przedmiot jest prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2022/2023 do chwili obecnej. Przedmiot realizuję w formie wykładów. Jestem współautorem sylabusu do tego przedmiotu.

Współczesne metody projektowania i analizy leków dla studentów kierunku Farmacja – studia stacjonarne, jednolite magisterskie, w roku akademickim 2016/2017 oraz 2017/2018. Przedmiot fakultatywny realizowałem w formie wykładów. Byłem współautorem sylabusu do tego przedmiotu.

Modern methods in drug design and analysis dla studentów z programu ERASMUS+ w roku akademickim 2016/2017. Przedmiot fakultatywny realizowałem w formie wykładów. Byłem współautorem sylabusu do tego przedmiotu.

Dodatkowo prowadziłem zajęcia w ramach następujących kursów:

- (1) Chemia ogólna i nieorganiczna dla studentów kierunku Farmacja i Analityka Medyczna (w roku akademickim 2015/2016, 2016/2017 oraz 2017/2018). Przedmiot realizowałem w formie ćwiczeń praktycznych;
- (2) Szybkie metody mikrobiologicznej analizy żywności dla studentów kierunku Biotechnologia, I stopnia (w roku akademickim 2020/2021, 2021/2022 oraz 2022/2023). Przedmiot realizowałem w formie wykładów;
- (3) Szybkie metody mikrobiologicznej analizy żywności dla studentów kierunku Technologia żywności i żywienie człowieka oraz Zarządzanie jakością i analiza żywności, II stopnia (w roku akademickim 2020/2021 oraz 2021/2022). Przedmiot realizowałem w formie wykładów;
- (4) Biochemia dla studentów kierunku Technologia żywności i żywienie człowieka, I stopnia (w roku akademickim 2020/2021); Przedmiot realizowałem w formie ćwiczeń praktycznych;
- (5) Biochemia dla studentów kierunku Biotechnologia, I stopnia (w roku akademickim 2020/2021 oraz 2021/2022); Przedmiot realizowałem w formie ćwiczeń praktycznych;
- (6) Biochemia dla studentów kierunku Zarządzanie jakością i analiza żywności, I stopnia (w roku akademickim 2022/2023); Przedmiot realizowałem w formie ćwiczeń praktycznych;
- (7) Biochemia dla studentów kierunku Technologia i organizacja gastronomii, I stopnia (w roku akademickim 2022/2023); Przedmiot realizowałem w formie ćwiczeń praktycznych;
- (8) Znaczenie gospodarcze GMO dla studentów kierunku Biotechnologia, II stopnia (w roku akademickim 2020/21); Przedmiot realizowałem w formie wykładów.

6.1.2. Opiekun prac dyplomowych

Prace inżynierskie

- (1) **Aleksandra Grzywacz:** „Projekt immobilizacji kolagenu w bakteryjnej celulozie jako biomateriału w inżynierii tkankowej”. Data egzaminu dyplomowego: 7 luty 2023;
- (2) **Krzystian Wojciechowski:** „Projekt biosyntezy γ -dekalaktonu przez drożdże *Yarrowia yakushimensis* z wykorzystaniem immobilizowanych enzymów lipolitycznych”. Data egzaminu dyplomowego: 7 luty 2023;
- (3) **Sylwia Lenze:** „Projekt procesu otrzymywania bakteryjnych biosurfaktantów w skali bioreaktorowej” Planowana data egzaminu dyplomowego: luty 2024;
- (4) **Kamila Pietrzak:** „Projekt procesu otrzymywania drożdżowych biosurfaktantów w skali bioreaktorowej” Planowana data egzaminu dyplomowego: luty 2024.

Prace magisterskie

- (1) **Piotr Wójcik:** „Zastosowanie metod spektroskopowych i dokowania molekularnego w badaniach właściwości fizykochemicznych i strukturalnych IV-rzędowych związków amoniowych z albuminą”. Data egzaminu dyplomowego: 20 czerwca 2018;
- (2) **Katarzyna Hyjek:** „Od fizykochemicznych badań oddziaływania surfaktantów lizosomotropowych z lizozymem do skuteczniejszych leków przeciwbakteryjnych”. Data egzaminu dyplomowego: 20 czerwca 2018;
- (3) **Daniel Drzewiecki:** „Produkcja biosurfaktantów przez drożdże *Yarrowia lipolytica*”. Data egzaminu dyplomowego: 13 lipca 2020;
- (4) **Natalia Nieborak:** „Wykorzystanie odpadów pochodzących z przemysłu rolno-spożywczego do produkcji bakteryjnych biosurfaktantów”. Data egzaminu dyplomowego: 29 czerwca 2022;
- (5) **Karolina Salomońska:** „Optymalizacja produkcji biosurfaktantów przez drożdże z kladu *Yarrowia*”. Data egzaminu dyplomowego: 7 września 2022;
- (6) **Kamil Zagrodny:** „Ocena aktywności przeciwnowotworowej liposomowych formułacji glikolipidów”. Data egzaminu dyplomowego: 4 lipca 2023;
- (7) **Aleksandra Zimnicka:** „Wpływ bakteryjnych surfaktantów na wybrane właściwości emulsji”. Data egzaminu dyplomowego: 13 lipca 2023;
- (8) **Maciej Szwechłowicz:** „Evaluation of antitumor activity of lipopeptide biosurfactant with resveratrol”. Data egzaminu dyplomowego: 14 lipca 2023; praca w języku angielskim;
- (9) **Kinga Hyla:** „Evaluation of the antitumor activity of liposomal formulations of lysosomotropic surfactants”. Data egzaminu dyplomowego: 14 lipca 2023; praca w języku angielskim;
- (10) **Krzystian Wojciechowski:** „Badanie wpływu biosurfaktantów na produkcję lipidów z odpadowego glicerolu przez wybrane gatunki należące do kladu *Yarrowia*”. Planowana data egzaminu dyplomowego: lipiec 2024;
- (11) **Aleksandra Grzywacz:** „Ocena aktywności przeciwgrzybowej lipopeptydowych biosurfaktantów syntetyzowanych przez bakterie *Pseudomonas fluorescens*”. Planowana data egzaminu dyplomowego: lipiec 2024.

Pełniłem również funkcję **recenzenta**, oceniając łącznie 10 prac dyplomowych – pięć prac inżynierskich oraz pięć prac magisterskich.

Prace doktorskie

Pełnię funkcję **promotora pomocniczego** w przewodzie doktorskim magister Dominiki Ciuurko, dla którego w dniu 20 czerwca 2023 roku została powołana komisja doktorska do przeprowadzenia czynności w postępowaniu doktorskim przez Radę Dyscypliny Nauki Biologicznej na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Planowana data obrony pracy doktorskiej: październik 2023 roku.

Byłem również opiekunem **wolontariatów** realizowanych przez studentów Wydziału Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności – łącznie 5 osób.

6.2. Osiągnięcia organizacyjne

- (1) Członkostwo w Komisjach Rekrutacyjnych na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego w roku akademickim 2011/2012, 2012/2013, 2013/2014 oraz 2014/2015; pełniłem funkcję sekretarza Komisji Rekrutacyjnej;
- (2) Członek zespołu ds. opracowanie ankiet ewaluacyjnych oraz przygotowanie raportów z realizacji projektu „Uatrakcyjnienie i wzbogacenie kształcenia oraz zwiększenie liczby absolwentów kierunku Biotechnologia I stopnia” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego; od 2013 do 2015 roku;
- (3) Członek Zespołu ds. strategii Centrum Biologii Doświadczalnej oraz Innowacyjnych Technologii Produkcji Żywności utworzonego w ramach projektu „Regionalne Centrum Innowacyjnych Technologii Produkcji, Przetwórstwa i Bezpieczeństwa Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu”, w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego dla Województwa Dolnośląskiego na lata 2014-2020; od 2019 – obecnie;
- (4) Członek Komisji Konkursowej powołanej do przeprowadzenia postępowania konkursowego na stanowisko: doktorant stypendysta w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności UPWr (cztery postępowania w roku 2021, jedno postępowanie w roku 2023);
- (5) Członek Zespołu ds. współpracy z firmą świadczącą usługę przeprowadzenia szczegółowej analizy zasobów ludzkich oraz opracowania systemu wartościowania stanowisk pracy, systemu motywowania pracowników i systemu oceniania pracowników niebędących nauczycielami akademickimi Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu; od 2023 – obecnie
- (6) Recenzent publikacji w zagranicznych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports* (JCR) (81 recenzji; Załącznik 4, II.13.2) oraz pełnienie funkcji członka komitetu redakcyjnego oraz edytora gościnnego w czterech zagranicznych czasopismach naukowych (Załącznik 4, II.12.2).

6.3. Popularyzacja wiedzy

- (1) W latach 2014-2017 prowadziłem zajęcia w ramach Dolnośląskiego Festiwalu Nauki. W ramach tej inicjatywy współorganizowałem następujące warsztaty: „Biotechnologiczny zawrót głowy” (2014, 2015) oraz „Tęczowa chemia” (2016, 2017).
- (2) W latach 2015-2016 brałem czynny udział w prowadzeniu warsztatów z chemii nieorganicznej w ramach Dni Otwartych Wydziału Farmaceutycznego organizowanych przez Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu.

7. Omówienie pozostałych osiągnięć

7.1. Badanie mechanizmów kompleksów metali z lipopeptydowymi biosurfaktantami na wirulencję grzyba *Candida albicans*

Inwazyjne zakażenia grzybicze, wywołane zwłaszcza przez drożdże *C. albicans*, stanowią istotny problem terapeutyczny ostatnich lat. Zwiększająca się oporność na leki antygrzybicze wiąże się ze zwiększoną zachorowalnością, śmiertelnością, a także zwiększeniem kosztów opieki zdrowotnej. Współczesna medycyna w walce z *C. albicans* posługuje się jedynie terapią z wykorzystaniem amfoterycyny B, czy flukonazolu. Ten sposób leczenia nie przynosi całkowitego ustąpienia infekcji. Często u pacjentów kandydozy są przewlekłe i nawracające. Dodatkowo stosowane obecnie leki stają się przyczyną zaburzenia naturalnej mikroflory bakteryjnej oraz powstawania nowych, bardziej opornych na antybiotyki populacji mikroorganizmów, także grzybów. Z tego powodu poszukiwane są nowe, alternatywne rozwiązania w leczeniu, co skłania naukowców do ciągłych poszukiwań nowych środków zwalczających infekcje grzybicze.

Głównym celem projektu było zbadanie wpływu nowych kompleksów lipopeptydowych biosurfaktantów z jonami metali (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} oraz Cu^{2+}) na główne czynniki wirulencji *C. albicans*: filamentację, adhezję oraz tworzenie biofilmu. Równie istotnym stało się określenie wpływu kompleksów lipopeptydowych biosurfaktantów na zainfekowane *C. albicans* linie komórkowe nabłonka jelita. Poznanie wpływu kompleksów metal-lipopeptyd na ekspresję genów związanych z wirulencją *C. albicans* posłużyło do wyjaśnienia mechanizmu działania badanych związków.

Wyniki uzyskane w ramach projektu wskazują na hamujący wpływ surfaktyny, amfizyny oraz ich kompleksów metali na główne czynniki wirulencji *C. albicans*. Obecność testowanych kompleksów w podłożu RPMI-1640, znacząco redukowało tworzenie filamentów przez drożdże *C. albicans*. W toku prowadzonych badań wykazałem również hamujący wpływ kompleksów metal(II)-surfaktyna oraz metal(II)-amfizyna na tworzenie filamentów *C. albicans*, prowadząc obserwacje w warunkach tlenowych i z obniżoną zawartością tlenu, ponieważ mikroorganizm ten może zasiedlać nie tylko powłoki ciała, ale także narządy wewnętrzne. Obserwowany hamujący wpływ kompleksów metal(II)-surfaktyna oraz metal(II)-amfizyna na proces tworzenia filamentów nie był związany z zabijaniem komórek *C. albicans*, jak wykazały doświadczenia badające przeżywalność tego patogenu. W ramach projektu wykazano również hamujący wpływ na adhezję *C. albicans* do polistyrenowej powierzchni. Dodanie kompleksów metal(II)-surfaktyna oraz metal(II)-amfizyna spowodowało zaburzenie tworzenia biofilmu złożonego z komórek w formie drożdżowej, strzępek, jak i pseudostrzępek, tworzonych na podłożu RPMI-1640. Mikroskopowy

obraz biofilmów mieszanych przypominał raczej komórki w fazie adhezji, niż dojrzały strukturalnie biofilm. W toku badań wykazano również, że zastosowanie surfaktyny i amfizyny znacząco obniżyło adhezję *C. albicans* do ludzkich linii komórek jelita CCD 841 oraz HT29, przy czym dodanie kompleksów metal(II)-surfaktyna oraz metal(II)-amfizyna wykazało silniejszy efekt niż użycie tylko biosurfaktantów. Wyniki RT-qPCR pozwoliły na analizę zmian ekspresji genów związanych z wirulencją *C. albicans*, po ekspozycji komórek na kompleksy metal(II)-surfaktyna oraz metal(II)-amfizyna. Stwierdzono znaczącą zmianę w ekspresji pięciu genów: Hwp1 (ang. *hyphal wall protein*), Als1 (ang. *agglutinin-like sequence*), Als3, Ece1 (ang. *extent of cell elongation*) oraz Sap4 (ang. *secreted aspartyl proteinases*). Geny te biorą udział w tworzeniu filamentów, adhezji oraz formowaniu biofilmów. Obniżenie transkryptu Hwp1, Als1 oraz Als3 jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, gdzie stwierdzono, że zarówno biosurfaktanty jak i ich kompleksy z metalami powodują zahamowanie filamentacji oraz redukują przyleganie i tworzenie biofilmu przez *C. albicans*. Wyniki analizy ekspresji genów za pomocą RT-qPCR nie pozwoliły na jednoznaczne wykazanie szlaku sygnałnego cAMP-PKA (ang. *cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A*). W związku z tym, zjawisko to wymaga dalszego wyjaśnienia w ramach kontynuowanych przeze mnie badań naukowych.

Realizowane przeze mnie badania miały charakter poznawczy i stanowiły kontynuację pracy dotyczącej badania aktywności biologicznej lipopeptydów. Badania zmierzały do oceny roli dwuwartościowych jonów metali, jako dodatków do biosurfaktantów zaangażowanych w dynamiczne procesy hamowania adhezji oraz tworzenia biofilmów. Zrealizowane badania mają też aspekt medyczny – ich wyniki wskazują na możliwości wykorzystania preparatów naturalnych surfaktantów z jonami metali, jako leków biorących udział w terapiach przeciwgrzybiczych.

Niniejsze badania zrealizowałem w ramach projektu Miniatura 2, pt. „Badanie mechanizmów kompleksów metali z lipopeptydowymi biosurfaktantami na wirulencję grzyba *Candida albicans*”, w którym byłem kierownikiem i głównym wykonawcą (Załącznik 4, II.9.2.5). Wyniki otrzymane w trakcie realizacji tej części badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Biofouling* (Załącznik 4, II.4.21). Dodatkowo, część wyników otrzymanych w toku prac badawczych zostało zaprezentowanych w formie plakatu na międzynarodowej konferencji – Biosurfactants2022 (Załącznik 4, II.7.2.38).

7.2. Mikrobiologiczna produkcja biologicznie aktywnych związków z odpadów pochodzących z różnych gałęzi przemysłu

Kluczowym etapem procesów związanych z wykorzystaniem mikroorganizmów do produkcji cennych metabolitów jest dobór substratu. Głównym problemem są koszty mikrobiologicznej syntezy, wynikające z użycia drogich surowców oraz niskiej wydajności i efektywności mikroorganizmów. W związku z powyższym nacisk położony jest na wykorzystywanie substratów tanich i odnawialnych, będących często odpadem z innych gałęzi przemysłu. Obiecującym źródłem węgla w procesach biotechnologicznych są zatem produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego oraz glicerole odpadowe pochodzące z produkcji biodiesla. Obecnie, pełnię funkcję kierownika i głównego wykonawcy w projekcie pt. „Potencjał biotechnologiczny oraz aktywność przeciwdrobnoustrojowa nowych koniugatów biosurfaktant-lipaza immobilizowanych na powierzchni biopolimerów”, programu OPUS 19, finansowanym

przez Narodowe Centrum Nauki (Załącznik 4, II.9.2.6). Jednym z głównych celów niniejszego projektu jest wykazanie roli surowców odpadowych w wydajnej biosyntezie biosurfaktantów przez bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*. Badania wykonane w ramach niniejszego projektu, wyznaczyły kierunek racjonalnego zagospodarowania makuchów roślin oleistych oraz gliceroli odpadowych w produkcji mikrobiologicznych związków powierzchniowo czynnych. Udowodniono potencjał bakterii *B. subtilis*, *P. fluorescens* oraz *Pseudomonas antarctica* do produkcji lipopeptydów. Przez wzgląd na skład chemiczny gliceroli odpadowych oraz makuchów uzyskano istotną wydajność produkcji.

Dotychczasowe wyniki otrzymane w trakcie realizacji tej części badań zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR (Załącznik 4, II.4.26, II.4.31, II.4.33, II.4.35). Dodatkowo, w toku realizacji badań powstał artykuł przeglądowy opublikowany w czasopiśmie *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* pt. „Phase Behaviour, Functionality, and Physicochemical Characteristics of Glycolipid Surfactants of Microbial Origin” w ramach współpracy międzynarodowej z grupą Profesora Stephena Eustona, z Uniwersytetu Heriot-Watt w Wielkiej Brytanii (Załącznik 4, II.4.37).

7.3. Produkcja związków bioaktywnych z wykorzystaniem drożdży z kladu *Yarrowia*

Obecnie jestem zaangażowany w badania realizowane w ramach Wiodącego Zespołu Badawczego BioTech@Life – Biotechnologia dla życia i przemysłu, którego liderem jest Profesor Zbigniew Lazar. Jednym z nurtów realizowanych w zespole jest wykorzystywanie metod biotechnologicznego pozyskiwania cennych związków bioaktywnych przy użyciu niekonwencjonalnych drożdży charakteryzujących się różnorodnością uzdolnień fizjologicznych i biochemicznych. Najlepiej poznanym przedstawicielem tej grupy są drożdże z gatunku *Y. lipolytica*, które posiadają status GRAS (ang. *Generally Recognize as Safe*) nadany przed Amerykańską Agencją ds. Żywności i Leków. Wśród drożdży niekonwencjonalnych wyróżniono grupę zwaną kładem *Yarrowia*, do której poza wspomnianym szczepem drożdży należy również 14 innych gatunków. Celem prowadzonych badań jest między innymi wykorzystanie drożdży z kladu *Yarrowia* do produkcji cennych metabolitów o wysokiej wartości dodanej (biosynteza: kwasów organicznych (cytrynowego, izocytrynowego, bursztynowego, α -ketoglutarynowego, pirogronowego), polioli (mannitolu, erytrytolu), pochodnych lipidów i lipidów. W obszarze zainteresowań Wiodącego Zespołu Badawczego BioTech@Life wyróżnić można waloryzację odpadów pochodzących z przemysłu rolno-spożywczego, przy udziale niekonwencjonalnych drożdży, w substancje mogące znaleźć zastosowanie w różnych gałęziach gospodarki i życia społecznego.

Badania takie realizuję między innymi w ramach projektu OPUS 19 pt. „Wykorzystanie lotnych kwasów tłuszczowych do biosyntezy wosków przez drożdże *Yarrowia lipolytica*”, którego kierownikiem jest Profesor Zbigniew Lazar (Załącznik 4, II.9.2.7). Wychodząc naprzeciw oczekiwaniom rynku, celem niniejszego projektu jest biosynteza wosków przez olejogenne drożdże *Y. lipolytica*. Przeprowadzone badania wykazały, że wklonowanie syntaz *AWAT2*, *XtWS1* oraz *MhWS* do genomu drożdży *Y. lipolytica* pozwoliło na uzyskanie transformantów *Y. lipolytica* zdolnych do biosyntezy wosków. Uzyskane badania wskazują na duży potencjał tych mikroorganizmów do biosyntezy wosków z wykorzystaniem lotnych kwasów tłuszczowych,

i stanowią niezwykle cenny wkład w ochronę środowiska oraz poprawę jakości życia społeczeństwa. Dotychczasowe wyniki otrzymane w trakcie realizacji tej części badań zostały zaprezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych (Załącznik 4, II.7.2.20, II.7.2.30, II.7.2.34, II.7.2.39, II.7.2.40, II.7.2.46).

Kolejne badania będące przedmiotem mojego zainteresowania dotyczyły charakterystyki reduktazy erytrozy, enzymu katalizującego ostatni etap syntezy erytrytolu w drożdżach *Y. lipolytica*. W toku prowadzonych prac uzyskano konstrukt genetyczny, zawierający gen *YALIOF18590g* z fuzją hist-tag na N-końcu, pod promotorem UAS_{B16} -TEF, w celu nadekspresji enzymu. Reduktazę erytrozy sekrecyjnie wydzieloną do podłoża oczyszczono, a następnie dokonano pełnej charakterystyki biochemicznej. Wykonano analizę specyfiki substratowej w zakresie różnych wartości pH oraz temperatury. Uzyskane wyniki wskazują, że optimum aktywności reduktazy erytrozy przypada na pH 3.0, co tłumaczy wydajną produkcja erytrytolu przez drożdże *Y. lipolytica* w warunkach niskiego odczynu środowiska. Optimum temperatury dla tego enzymu wynosi 37 °C. Wykazano również, że obecność jonów metali dwuwartościowych w środowisku reakcji enzymatycznej wpływa na aktywność reduktazy erytrozy. Z przeprowadzonych badań wynika, że aktywność enzymu zależy od obecności jonów Zn^{2+} , co zostało potwierdzone wzrostem produkcji erytrytolu o 15% w podłożu suplementowanym 0,25 mM Zn^{2+} w porównaniu do hodowli kontrolnej. Ponadto, przeprowadzając badania metodą dichroizmu kołowego oraz spektroskopii fluorescencyjnej potwierdziłem, że jony Zn^{2+} mają wpływ na strukturę drugorzędową enzymu, a co za tym idzie, zmiany strukturalne w obecności jonów cynku zwiększają jego aktywność. Przeprowadzone badania były finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach grantu LIDER pt. „Doskonalenie procesu biosyntezy naturalnych substancji słodzących z surowców odpadowych przez drożdże *Yarrowia lipolytica*”, którego kierownikiem była Profesor Aleksandra Mirończuk (Załącznik 4, II.9.2.2). Całość badań opublikowano w czasopiśmie *Microbial Cell Factories* (Załącznik 4, II.4.12).

Kolejnym problemem naukowym, który znalazł się w kręgu moich zainteresowań, jest produkcja oraz charakterystyka enzymów proteolitycznych. Badania te realizowałem z doktorantką Dominiką Ciuurko, jak również we współpracy międzynarodowej z Profesorem Cécile Neuvéglise z Univ Montpellier, INRA we Francji. W pierwszym etapie badań, z uwagi na niski stan wiedzy w temacie enzymów proteolitycznych drożdży kładu *Yarrowia*, wykonano analizę bioinformatyczną, obejmującą analizę filogenetyczną oraz badania syntenii. Badano poziom ekspresji genów potencjalnie kodujących proteazy alkaliczne *in silico*, w różnych warunkach hodowlanych oraz eksperymentalnie w podłożu wzbogaconym w młoto browarniane, które jest głównym produktem ubocznym produkcji piwa. W kolejnych etapach badań charakteryzowano białka zaangażowane w proteolizę młota browarnianego oraz wykonano analizę proteomiczną, oraz wyznaczono aktywność proteolityczną enzymów kładu *Yarrowia*. Na podstawie analizy bioinformatycznej wyróżniono trzynaście grup domniemanych proteaz alkalicznych kładu *Yarrowia*, a wśród nich grupę *XPR2*, stanowiącą zbiór enzymów homologicznych względem zewnątrzkomórkowej proteazy alkalicznej (ang. *alkaline extracellular protease*, AEP). Na podstawie analizy proteomicznej wykazano wysoką homologię enzymów względem AEP *Y. lipolytica* E150 (CLIB122), potwierdzając jednocześnie ścisłe pokrewieństwo drożdży kładu *Yarrowia*. Dotychczasowe wyniki otrzymane w trakcie realizacji tej części badań opublikowano w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (Załącznik 4, II.4.34).

Ponadto, we współpracy z członkami Wiodącego Zespołu Badawczego BioTech@Life byłem współuczestnikiem badań dotyczących, zwiększenia produkcji fosfolipidów i kwasu α -ketoglutarowego przez transformanty drożdży *Y. lipolytica* z substratów odpadowych. Dodatkowo, realizowałem badania dotyczące biosyntezy kwasu cytrynowego, polioli (mannitolu, erytrytolu i arabitolu), oraz lipidów przez drożdże z kladu *Yarrowia*. W projektach tych zajmowałem się opracowaniem metodologii i prowadzeniem badań dotyczących analizy ilościowej i jakościowej frakcji lipidowej. Wyniki uzyskanych badań opisano w trzech pracach opublikowanych w międzynarodowych czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (Załącznik 4, od II.4.27, II.4.28, II.4.32).

7.4. Plany na przyszłość

Obecnie pełnię funkcję kierownika zadania badawczego realizowanego w ramach projektu OPUS 24, pt. "Badania wpływu nowych lipopeptydowych biosurfaktantów na trwałość cienkiego filmu cieczy i tworzenie kontaktu trójfazowego w aspekcie ich wykorzystania w procesie flotacji" zaplanowanego na lata 2023-2026 w ramach konsorcjum Politechnika Wrocławska - Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu. Projekt ten kierowany jest przez Panią Profesor Izabelę Polowczyk z Politechniki Wrocławskiej. Interdyscyplinarny charakter projektu, wiąże się ze współpracą z wiodącymi ośrodkami w tym: Uniwersytetem Chemiczno-Technologicznym w Pradze oraz Uniwersytetem Heriot-Watt w Wielkiej Brytanii.

Flotacja jest selektywnym procesem separacji cząstek stałych, dzięki czemu znajduje zastosowanie w wielu różnych gałęziach przemysłu. Proces ten wykorzystuje się między innymi w oczyszczaniu ścieków, recyklingu tworzyw sztucznych, jednak swoje najszersze zastosowanie znajduje w przemyśle wydobywczym, do separacji cząstek mineralnych. Dodatek odczynników flotacyjnych, do których należą głównie związki powierzchniowo czynne (surfaktanty) jest kluczowy dla zwiększenia wydajności tego procesu. Od pewnego czasu prowadzone są badania nad zastąpieniem syntetycznych odczynników flotacyjnych produktami naturalnymi. Szybki rozwój biotechnologii, inżynierii genetycznej oraz wzrost świadomości ludzkiej, co do potrzeby i konieczności ochrony środowiska naturalnego, przyczyniają się do większego zainteresowania naturalnymi surfaktantami przejawiającymi podatność na biodegradację.

Innowacyjnym aspektem projektu jest zastosowanie nowej klasy związków powierzchniowo czynnych pochodzenia biologicznego, niestosowanych wcześniej we flotacji cząstek naturalnie hydrofilowych i siarczków metali. Biosurfaktanty wykorzystane w badaniach stanowić będą lipopeptydy produkowane przez nowe szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Dodatkowo sam proces produkcji biosurfaktantów zostanie zoptymalizowany z wykorzystaniem statystycznego projektowania eksperymentu. Szczególną wartością dodaną projektu jest kompleksowe podejście do korelacji wyników eksperymentalnych z wynikami symulacji podstawowego aktu flotacji, przy wykorzystaniu nowej klasy biomolekuł, które dopiero zaczynają być stosowane w układach flotacyjnych. Ponadto, badania eksperymentalne wsparte będą metodami obliczeniowymi, które umożliwiają dokładne określenie charakteru oddziaływań.

Zadania badawcze zaplanowane w ramach niniejszego projektu, choć mają charakter badań podstawowych, mają na celu uzyskanie wyników o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym. Zastosowanie biosurfaktantów w procesie flotacji może być uznane za przyjazne środowisku

i może zwiększyć efektywność ekonomiczną przeróbki rud oraz stanowić bardziej ekologiczną alternatywę dla już stosowanych surfaktantów syntetycznych.

Ponadto, mój rozwój naukowy związany jest z zaangażowaniem w realizację aktualnych projektów badawczych realizowanych w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności oraz Wiodącym Zespole Badawczym BioTech@Life, uwzględniając pozyskiwanie finansowania na nowe projekty, inicjację współpracy wielozespołowej, zarówno z zespołami badawczymi w kraju jak i zagranicą.

7.5. Nagrody za działalność naukową i organizacyjną

- (1) Dwie Indywidualne Nagrody Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego za wyróżniające się wyniki w pracy zawodowej – 2009, 2010;
- (2) Zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego za wyróżniające się wyniki w pracy zawodowej – 2011;
- (3) II wyróżnienie im. Rudolfa Weigla za komunikat pt. „Antiadhesive activity of biosurfactant pseudofactin II secreted by *Pseudomonas fluorescens* BD5 against several pathogenic microorganisms” przedstawiony podczas 4th Polish-Ukrainian Weigl Conference on Microbiology, Wrocław – 2011;
- (4) Wyróżnienie pracy doktorskiej przez Radę Naukową Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego – 2013;
- (5) Dwa stypendia naukowe dla młodych doktorów i doktorantów Uniwersytetu Wrocławskiego w ramach projektu "Rozwój potencjału i oferty edukacyjnej Uniwersytetu Wrocławskiego szansą zwiększenia konkurencyjności Uczelni" – 2014, 2015;
- (6) Indywidualna naukowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu – 2018;
- (7) Zespołowa naukowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu – 2019;
- (8) Trzy indywidualne naukowe Nagrody Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu – 2021, 2022, 2023.

7.6. Podsumowanie dorobku naukowego

Podsumowując mój dorobek naukowy (dane na dzień 1 września 2023 roku), łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego wymienionego w punkcie 4 Autoreferatu, obejmuje 37 publikacji z listy *Journal Citation Reports* (JCR), (w tym 35 prac oryginalnych i 2 artykuły przeglądowe). Sumaryczny *Impact Factor* (IF) publikacji wynosi 158,271, łączna liczba punktów MEiN za publikacje wynosi 2792. Szczegółowy wykaz mojego dorobku naukowego zawiera Załącznik 4, a jego podsumowanie z wydzieleniem okresu po uzyskaniu stopnia doktora, przedstawiają poniższe Tabele 1 i 2.

Tabela 1. Podsumowanie efektów działalności naukowo-badawczej

Kategorie opracowań	Przed doktoratem			Po doktoracie			Łącznie		
	Liczba	Pkt. MEiN	Impact Factor	Liczba	Pkt. MEiN	Impact Factor	Liczba	Pkt. MEiN	Impact Factor
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z IF	4	132	15,29	31	2515	132,042	35	2647	147,332
Artykuły przeglądowe	-	-	-	2	145	10,939	2	145	10,939
RAZEM liczba opracowań; punkty MEiN oraz IF	4	132	15,29	33	2660	142,981	37	2792	158,271

Tabela 2. Liczba cytowań oraz indeks Hirscha

Baza danych	Web of Science	Scopus	Google Scholar
Liczba cytowań	742	845	1126
Liczba cytowań bez autocytowań	650	761	-
Indeks Hirscha	13	15	16

(podpis wnioskodawcy)