

Dr inż. Radosław Drozd

Autoreferat

Szczecin 2023

1. Imię i nazwisko Radosław Drozd.

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

19. 01. 2010 Uzyskanie stopnia doktora nauk biologicznych specjalność: bioinformatyka, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Biotechnologii i Biologii, tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza struktury i wybranych właściwości katalitycznych homodimerycznych beta-D-fruktofuranazy z rodziny GH 32 z wykorzystaniem modelowania molekularnego”. **Praca otrzymała wyróżnienie.**

1. 11. 2003 - Studium doktoranckie Zachodniopomorskiego Uniwersytetu

1.10.2008 Technologicznego w Szczecinie.

1. 03. 2002- Międzywydziałowe Studium Pedagogiczne, Akademii Rolnicza w Szczecinie.

15. 06. 2003

1. 10. 1998- Studia Magisterskie, Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, kierunek biotechnologia, Magister inżynier biotechnologii. Tytuł pracy „Badanie właściwości molekularnych wydzielniczej formy β -D-fruktofuranazy (E.C. 3.2.1.26) z zastosowaniem technik bioinformatycznych”. **Praca została nagrodzona I miejscem w konkursie na najlepszą pracę dyplomową w Akademii Rolniczej w Szczecinie w roku 2003.**

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

Od **01. 04. 2010** Adiunkt w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie (zatrudnienie etatowe).

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/artystycznego;

**„Inżynieria celulozy bakteryjnej jako nośnika do immobilizacji biokatalizatorów:
badania nad charakterystyką syntezy biopolimeru i efektywną funkcjonalizacją”**

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

[H1] Drozd, R., Rakoczy, R., Konopacki, M., Frąckowiak, A., Fijałkowski, K. (2017). Evaluation of usefulness of 2DCorr technique in assessing physicochemical properties of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 161, pp. 208-218.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki badań, planowaniu i udziale w wykonaniu badań, analizie i dyskusji wyników, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu. **Autor korespondencyjny.**

IF₂₀₁₇: 5,158 IF₅: 5,326 (MEiN₂₀₁₇ 40 pkt)

[H2] Fijałkowski, K., Zywicka, A., **Drozd, R.,** Kordas, M., Rakoczy, R. Effect of *Gluconacetobacter xylinus* cultivation conditions on the selected properties of bacterial cellulose. *Polish Journal of Chemical Technology*, 2016, 18(4), pp. 117-123.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wiodącym współudziale w opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki i analiz biochemicznych, oznaczeniu parametrów materiałowych celulozy bakteryjnej, analizie statystycznej i dyskusji wyników, udziale w przygotowaniu manuskryptu.

IF₂₀₁₇: 0,550 IF₅: 0,655 (MEiN₂₀₁₇ 15 pkt)

[H3] Fijałkowski, K., **Drozd, R.**, Żywicka, A., Junka, A., Kordas, M., Rakoczy, R. (2017). Biochemical and cellular properties of *Glucanacetobacter xylinus* cultures exposed to different modes of rotating magnetic field. Polish Journal of Chemical Technology, 19 (2), pp. 107-114.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wiodącym udziale w opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz biochemicznych, analizie statystycznej i dyskusji wyników, udziale w przygotowaniu manuskryptu.

IF₂₀₁₇: 0,550 IF₅: 0,655 (MEiN₂₀₁₇ 15 pkt)

[H4] **Drozd, R.**, Szymańska, M., Żywicka, A., Kowalska, U., Rakoczy, R., Kordas, M., Konopacki, M., Junka, A.F., Fijałkowski, K. (2021). Exposure to non-continuous rotating magnetic field induces metabolic strain-specific response of *Komagataeibacter xylinus*. Biochemical Engineering Journal, 166, art. no. 107855.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki badań, udziale w wykonaniu badań oraz ich nadzorowaniu, analizie i dyskusji wyników, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu. **Autor korespondencyjny.**

IF₂₀₂₁: 4,446 IF₅: 4,455 (MEiN₂₀₂₁ 100 pkt)

[H5] **Drozd, R.**, Rakoczy, R., Wasak, A., Junka, A., Fijałkowski, K. (2018). The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase. International Journal of Biological Macromolecules, 108, pp. 462-470.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki badań, udziale w wykonaniu badań oraz ich nadzorowaniu, analizie i dyskusji wyników, udziale w przygotowaniu manuskryptu. **Autor korespondencyjny.**

IF₂₀₁₈: 4,784 IF₅: 4,731 (MEiN₂₀₁₇, 25 pkt)

[H6] Drozd, R., Szymańska, M., Rakoczy, R., Junka, A., Szymczyk, P., Fijałkowski, K. (2019). Functionalized magnetic bacterial cellulose beads as carrier for Lecitase®Ultra immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187 (1), pp. 176-193.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki badań, udziale w wykonaniu badań oraz ich nadzorowaniu, analizie i dyskusji wyników, udziale w przygotowaniu manuskryptu. **Autor korespondencyjny.**

IF₂₀₁₉: 2,277 IF₅: 2,135 (MEiN₂₀₁₇ 20 pkt)

[H7] Drozd, R., Szymańska, M., Przygrodzka, K., Hoppe, J., Leniec, G., Kowalska, U. (2021). The simple method of preparation of highly carboxylated bacterial cellulose with Ni- and Mg-ferrite-based versatile magnetic carrier for enzyme immobilization. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (16), art. no. 8563.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki badań, udziale w wykonaniu badań oraz ich nadzorowaniu, analizie i dyskusji wyników, udziale w przygotowaniu manuskryptu. **Autor korespondencyjny.**

IF₂₀₂₁: 6,208 IF₅: 6,628 (MEiN₂₀₂₁ 140 pkt)

Sumaryczny IF 22,873, Punkty MEiN: 355, w tym 115 pkt do 2019 i 240 pkt do 2021

W wyżej wymienionych pracach eksperymentalnych miałem wiodący udział w opracowywaniu koncepcji i publikacji badań. Charakter prowadzonych przeze mnie badań, w dużej części wysoce aplikacyjny, wymagał współpracy z ekspertami z różnych dyscyplin i jednostek naukowych. W prowadzonych przeze mnie badaniach udział brali specjaliści z różnych obszarów nauk przyrodniczych i inżynieryjnych, mający doświadczenie w dziedzinach związanych biotechnologią, mikrobiologią, inżynierią materiałową i chemiczną.

W dalszej części autoreferatu wprowadzono oznaczenia; **H**, publikacje z cyklu; **P**, publikacje z dorobku dodatkowego; **M**, rozdziały w monografiach; **W**, patenty; **ZP**, zgłoszenia patentowe; odnoszące się do spisu osiągnięć znajdującego się **w załączniku nr 4**.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac oraz osiągniętych wyników, w tym omówienie możliwości ich zastosowania.

4.3.1. Wprowadzenie

W ostatnich latach badania nad rozwojem technologii pozwalających na pozyskiwanie i ukierunkowane modyfikowanie szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie biopolimerów nabrały szczególnego znaczenia, doskonale wpisując się w zasady „zielonej chemii”, a także kładąc nacisk na stosowanie zasad zrównoważonego rozwoju, które mają wyższą akceptację społeczeństwa. Obecnie wiele naturalnych polisacharydów o unikalnych właściwościach materiałowych, wytwarzanych przez mikroorganizmy, rośliny i niektóre bezkręgowce, dostępnych jest w postaci gotowych produktów lub też wykazuje wysoki potencjał komercjalizacyjny. Jednym z tego rodzaju biopolimerów jest celuloza bakteryjna (CB) określana również jako bionanoceluloza (BNC), która od lat jest obiektem zainteresowań wielu ośrodków badawczych. Większość z nich skupiona jest na poszukiwaniu skutecznych metod zwiększających produktywność szczepów bakteryjnych mających zdolność syntezy tego biopolimeru, czy też sposobów na obniżenie kosztów produkcji CB, poprzez np. wykorzystanie substratów odpadowych pochodzących z różnych gałęzi przemysłu rolno-spożywczego. CB jest elementem macierzy biofilmowej wielu Gram-ujemnych bakterii, przy czym największym potencjałem do wytwarzania tego biopolimeru, charakteryzują się bakterie z rodzaju *Komagataeibacter*. CB jest homopolisacharydem, nieróżniącym się chemicznie od celulozy pochodzenia roślinnego, składającym się z podjednostek β -D-glukopiranozy połączonych wiązaniem β -(1,4)-glikozydowym. Jest ona syntetyzowana i dalej wydzielana przez wyspecjalizowany, wielopodjednostkowy kompleks białkowy syntetazy celulozowej, zlokalizowany w przestrzeni periplazmatycznej, ściany komórkowej bakterii.

Ze względu na unikalny sposób syntezy przez komórki bakteryjne, CB cechuje szereg właściwości materiałowych, które są niespotykane w innych biopolimerach. Biopolimer ten charakteryzuje się między innymi wysokim stopniem polimeryzacji oraz wysoką

krystalicznością, wartością modułu Young'a, porowatością i zdolnością do utrzymywania wody. Jest ona przede wszystkim, naturalnym biopolimerem o wysokiej homogenności strukturalnej i czystości chemicznej. W porównaniu do celulozy pochodzenia roślinnego, proces oczyszczania tego biopolimeru jest nieporównywalnie prostszy i tańszy. Właściwości te są ściśle powiązane z jej strukturą molekularną, począwszy od pojedynczych mikrofibrili, kończąc na tworzonej przez nie gęstej sieci, stabilizowanej przez szereg oddziaływań fizykochemicznych, takich jak oddziaływania van der Waalsa czy wiązania wodorowe. Siła i trwałość tych oddziaływań może ulegać zmianie wraz z rozwojem struktury tworzonych membran CB, która może być zależna, jak wspomniano powyżej, zarówno od potencjału szczepu *K. xylinus*, jak i szeroko rozumianych warunków ich hodowli. Właściwości CB, sprawiają również, że ma ona nieograniczony potencjał aplikacyjny w wielu gałęziach przemysłu, w formie niemodyfikowanej lub też jako podstawa różnego rodzaju biokompozytów. CB od wielu lat jest z powodzeniem stosowana w medycynie jako efektywny materiał opatrunkowy zwłaszcza w przypadku leczenia ciężkich oparzeń skóry, regeneracji tkanek lub też w terapii różnego pochodzenia przewlekłych trudno gojących się ran. Ponadto, ze względu na jej wysoką biokompatybilność, opracowywane są metody pozwalające na otrzymywanie m.in. sztucznych naczyń krwionośnych, z wykorzystaniem CB jako rusztowania. Biopolimer ten cieszy się również rosnącym zainteresowaniem we współczesnej kosmetologii, jako idealny materiał na bazie, którego opracowywane są różnego rodzaju kosmetyki i kosmeceutyki dostarczające skórze pożądanych substancji odżywczych i regeneracyjnych [1,2]. Pomimo wielu lat badań i opracowania obiecujących rozwiązań i technologii, efektywna i celowana produkcja CB jest w dalszym ciągu wyzwaniem. Obecnie znanych jest wiele szczepów *Komagataeibacter xylinus* mających zdolność do syntezy CB a zasadnicza różnica pomiędzy nimi to potencjał jakim dysponują one odnośnie wydajności wytwarzania tego biopolimeru. Efektywność produkcji CB przez *K. xylinus* jest ściśle skorelowana ze strukturą genomu tych bakterii, a konkretnie ilością i strukturą operonów kodujących białka szlaku syntezy tego biopolimeru [3,4]. Jednakże pomimo teoretycznych możliwości przewidywania potencjału produktywności poszczególnych szczepów *K. xylinus*, nie istnieją obecnie metody pozwalające na prognozowanie właściwości materiałowych syntetyzowanej CB, czy też przewidywanie optymalnych warunków fermentacyjnych, tylko w oparciu o informacje zgromadzone w genomie *K. xylinus* [5]. Nadzieje budzą prace nad rozwojem metod inżynierii genetycznej umożliwiających modyfikację potencjału genetycznego bakterii w celu uzyskiwania celulozy bakteryjnej o określonych

właściwościach materiałowych. Zwiększa to możliwości projektowania nowych biomateriałów opartych na CB o wysokim potencjale aplikacyjności w wielu dziedzinach biotechnologii [6,7].

Pomimo znaczących postępów w technologiach związanych z produkcją i zastosowaniem celulozy bakteryjnej, pozostaje wiele niewyjaśnionych kwestii, które wymagają głębszego zrozumienia. Opracowanie nowych metod kontrolowania procesu syntezy i nadawania pożądanych właściwości CB oraz pełne zrozumienie ich znaczenia w różnych dziedzinach nauki, przemysłu i biotechnologii może przynieść liczne korzyści. Dlatego dalsze badania nad tym biopolimerem są kluczowe dla rozwoju nowoczesnych technologii, które mogą pomóc w rozwiązaniu różnorodnych wyzwań w dziedzinie przemysłu, medycyny oraz umożliwić innowacyjne zastosowania biopolimerów w dziedzinie biotechnologii.

W swoich badaniach nad procesem syntezy celulozy bakteryjnej, ukierunkowanej modyfikacji i aplikacji postawiłem sobie następujące cele:

- 1. Analiza wpływu specyficzności szczepowej *K. xylinus* oraz okresu hodowli na charakterystykę widm CB otrzymanych z wykorzystaniem spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR) w powiązaniu z wybranymi cechami materiałowymi biopolimeru.**
- 2. Analiza wpływu sposobu ekspozycji hodowli *K. xylinus* na wirujące pole magnetyczne oraz parametrów pola magnetycznego na wydajność procesu syntezy i właściwości CB.**
- 3. Analiza przydatności CB uzyskiwanej z procesów fermentacyjnych stymulowanych wirującym polem magnetycznym jako nośnika dla enzymów.**
- 4. Opracowanie nośników o właściwościach magnetycznych na bazie CB.**

4.3.2. Omówienie celu naukowego oraz osiągniętych wyników, w tym omówienie możliwości ich zastosowania

H1, H2; Celem przeprowadzonych badań było zidentyfikowanie za pomocą techniki spektroskopii ATR-FTIR w połączeniu z dwuwymiarową analizą korelacyjną, wynikających ze specyfiki szczepowej *K. xylinus* oraz okresu hodowlanego markerów zmian strukturalnych w CB, które mogą znaleźć zastosowanie w rutynowej ocenie wybranych właściwości materiałowych jak i kontroli procesu syntezy biopolimeru.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystałem cztery szczepy *K. xylinus*, które jak wykazały wstępne analizy charakteryzowały się różną dynamiką i wydajnością syntezy CB. Sugerowało to zróżnicowanie w strukturze molekularnej wytwarzanego biopolimeru i jego właściwościach materiałowych [8]. Właściwa ocena i zrozumienie istoty tych różnic są kluczowe w identyfikacji najlepszych szczepów *K. xylinus* do produkcji CB do konkretnych zastosowań materiałowych oraz w dalszym doskonaleniu procesu celowanej produkcji tego biopolimeru.

Porównywane szczepy *K. xylinus* w założonym 28 dniowym okresie hodowlanym, wykazały się bardzo zbliżonym i zmiennym w czasie profilem syntezy CB [H2]. Mimo, że różnice między tymi profilami były niewielkie, miały one istotny wpływ na analizowane właściwości molekularne i materiałowe otrzymywanej CB. W hodowlach trzech z analizowanych szczepów, zaobserwowałem najwyższe tempo przyrostu masy uzyskiwanej CB do 10–14 dnia hodowli. Natomiast dla szczepu *K. xylinus* DSM 46602, który charakteryzował się najniższą dynamiką syntezy CB, przyrost masy uzyskiwanego biopolimeru był stosunkowo równomierny w całym okresie hodowli. Jednakże podobnie jak w hodowlach innych szczepów, po 14 dniach również odnotowałem stopniowe zahamowanie tempa syntezy CB. Przyrost masy uzyskiwanej celulozy ściśle korelował ze wzrastającą liczbą komórek bakteryjnych obecnych w nieoczyszczonych membranach CB [H2]. Zmiany makroskopowe w strukturze CB wytwarzanej przez porównywane szczepy *K. xylinus* korelowały również z istotnymi, z punktu widzenia jej dalszej aplikacji, właściwościami materiałowymi jak zdolność do utrzymywania wody (WRV) oraz współczynnik pęcznienia (SRE) [9]. Wraz ze wzrostem masy otrzymywanej celulozy i zwiększaniem się gęstości sieci mikrofibryli, otrzymywana CB charakteryzowała się zwiększoną wartością WRV i jednocześnie obniżonym współczynnikiem pęcznienia SRE. Wartości SRE dla

CB uzyskiwanej z hodowli większości porównywanych szczepów ulegały systematycznemu zmniejszeniu do 10–17 dnia, utrzymując się następnie na tym samym poziomie do końca okresu hodowlanego. Natomiast w przypadku CB wytwarzanej przez szczep *K. xylinus* DSM 5067, wartość tego parametru utrzymywała stały trend spadkowy bez wyraźnego *plateau* [H2]. Ilość wody uwięzionej i stabilność jej wiązania w membranach CB jest zależna od struktury mikrofibrili, a także tworzonej przez nie sieci, której struktura przekłada się na geometrię i powierzchnię mikroporów [9]. Gęstsza sieć wiązań wodorowych w strukturze CB, również wpływa istotnie na stabilność i siłę interakcji mikrofibrili CB z cząsteczkami wody, mających podłoże zarówno chemiczne, jak i fizyczne. Wraz z wydłużaniem czasu hodowli, odnotowałem także zmiany w strukturze CB na poziomie molekularnym przejawiające się między innymi systematycznym spadkiem średniego stopnia polimeryzacji ($_{av}DP$) [H2]. Jest to prawdopodobnie konsekwencją aktywności celulazy, która wydzielana jest przez większość szczepów *K. xylinus* hodowanych w warunkach hodowli statycznej i ma niekiedy kluczowe znaczenie dla inicjacji, tempa syntezy oraz końcowych właściwości CB [10]. Analizę struktury molekularnej CB przeprowadziłem również z wykorzystaniem dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD). Wykazała ona spodziewany wzrost zawartości fazy krystalicznej (χ_{CR}) przy jednoczesnym zmniejszaniu rozmiarów krystalitów mikrofibrili CB wraz z wydłużaniem okresu fermentacyjnego [H1]. Jednakże końcowa wartość tego parametru CB, powiązana była ściśle z potencjałem szczepu *K. xylinus*, gdzie np. dla CB z hodowli szczepu *K. xylinus* DSM 46604 χ_{CR} wynosił on 0,52, podczas gdy dla CB otrzymanej z hodowli *K. xylinus* ATCC 53524, 0,82. Jedną z właściwości wyróżniających CB w porównaniu do celulozy z innych źródeł, jak rośliny czy algi, jest wysoka zawartość formy celulozy I α (trójskośny układ krystalograficzny) w stosunku do I β (jednoskośny układ krystalograficzny). Przeprowadzone analizy wykazały jednak, że wraz z wydłużaniem czasu hodowli, zawartość formy I α celulozy w CB otrzymanej z hodowli większości porównywanych szczepów *K. xylinus*, z wyjątkiem *K. xylinus* DSM 46602, ulegała systematycznemu zmniejszeniu. Właściwość ta ma daleko idące konsekwencje w odniesieniu do dalszej aplikacji otrzymanej CB. Celuloza I α charakteryzuje się zwykle niższym stopniem upakowania, a także udowodnioną wyższą podatnością na różnego rodzaju modyfikacje w porównaniu do formy I β . Stwierdzony przeze mnie spadek zawartości formy I α CB jak i innych parametrów mogły być wynikiem zmiany w tempie biosyntezy tego biopolimeru, będącej konsekwencją stopniowej zmiany kierunku przemian metabolicznych komórek bakteryjnych, dostępności substratów dla produkcji CB, a także parametrów fizykochemicznych medium

hodowlanego [H1, H2]. Otrzymane wyniki wskazywały również, że obserwowane przeze mnie zmiany we właściwościach CB, jak SRE i WRV są także powiązane ze zmianami struktury molekularnej mikrofibryli. Uzyskane dane, sugerowały, że specyfika szczepowa *K. xylinus*, a także okresu hodowlanego procesu syntezy CB, może znaleźć odzwierciedlenie w strukturze widm ATR-FTIR. Widma ATR-FTIR celulozy bakteryjnej składają się z szeregu charakterystycznych pasm w zakresie liczb falowych 3600 cm^{-1} do 400 cm^{-1} , których właściwa interpretacja może dostarczyć wielu informacji nie tylko o obecności określonych grup funkcyjnych, ale również strukturze molekularnej i właściwościach materiałowych CB. Na typowym widmie ATR-FTIR CB, w zakresie liczb falowych od 3600 cm^{-1} do 3000 cm^{-1} , wyróżnić można szereg pasm właściwych dla drgań rozciągających O-H grup hydroksylowych tworzących wewnątrz- i międzycząsteczkowe wiązania wodorowe w strukturze mikrofibryli CB. Następnie przy liczbie falowej 2900 cm^{-1} obecne jest pasmo charakterystyczne dla symetrycznych drgań rozciągających wiązania C-H. W kolejnej części widma obecny jest szereg pasm, właściwych dla symetrycznych drgań zginających grup CH_2 (1427 cm^{-1} , C(6)), drgań zginających C-H (1370 cm^{-1}), drgań w płaszczyźnie grup C-OH (1337 cm^{-1} , C(2) i C(3)), deformacyjnych drgań grup CH_2 (1315 cm^{-1} , C(6)) i deformacyjnych drgań w płaszczyźnie C-OH (1236 cm^{-1} , C(6)). W następnej części widma obecny jest szereg pasm właściwych dla szkieletu β -D-glukopiranozy, w tym asymetryczne drgania rozciągające C-O-C wiązania glikozydowego (1161 cm^{-1}), drgania rozciągające pierścienia piranozowego glukozy (1104 cm^{-1}), drgania wiązań C-O (1030 cm^{-1} , C(6)), drgania rozciągające C-O-C wiązania β -(1-4)-glikozydowego charakterystycznego dla amorficznych regionów mikrofibryli CB (897 cm^{-1}) [11,12]. Do oceny stopnia krystaliczności materiałów celulozowych na podstawie widm ATR-FTIR, wykorzystuje się współczynniki zaproponowane przez Nelson i O'Connor *ang.* Total Crystallinity Index (TCI) i Lateral Order Index (LOI), które oparte są na wartości intensywności pasm przy liczbach falowych 1370 cm^{-1} i 2900 cm^{-1} oraz 1430 cm^{-1} i 897 cm^{-1} [13,14]. Wartości obydwu wskaźników dla otrzymywanej CB, zmieniały się zgodnie z trendem ustalonym na podstawie analizy XRD, wzrastając intensywnie w początkowym okresie hodowli, po czym ulegały ustabilizowaniu. Stwierdziłem również istotne zróżnicowanie w dynamice zmian wartości tych wskaźników, w zależności od szczepu *K. xylinus*, z którego hodowli była uzyskiwana CB.

Ze względu na złożoność uzyskanych widm ATR-FTIR, do ustalenia tzw. *finger-prints*, charakterystycznych dla CB z poszczególnych okresów hodowlanych, jako pierwszy, zastosowałem dwuwymiarową analizę korelacyjną (2DCorr) [H1]. Analiza ta wskazała na istotne znaczenie widma zakresu w przedziale liczb falowych od 1200 cm^{-1} do 950 cm^{-1} . Ten region widma ATR-FTIR w kontekście śledzenia zmian w strukturze CB na poziomie molekularnym jest skąpo opisany w literaturze tematu, a także rzadko brany pod uwagę. Otrzymane na podstawie widm ATR-FTIR z całego okresu hodowlanego (od 3 do 28 dnia), synchroniczne widma korelacyjne 2D, charakteryzowały się obecnością licznych auto pików i pików krzyżowych, w zakresie liczb falowych od $\approx 1100\text{ cm}^{-1}$ do 900 cm^{-1} . Zmiany w intensywności pasm przy liczbach falowych $\approx 1050\text{--}1012\text{ cm}^{-1}$ i $\approx 956\text{ cm}^{-1}$, można powiązać ze zmianami konformacyjnymi alkoholu pierwszorzędowego, obecnego w strukturze cząsteczki β -D-glukopiranozy przy atomie węgla C6 (C6-H₂-O6-H), co jest konsekwencją możliwości swobodnej rotacji na osi wiązania pomiędzy atomami węgla C5-C6 [12]. Przydatność tych pasm, w ocenie właściwości niektórych materiałów celulozowych, została zasugerowana wcześniej przez Liu i wsp., (2012), którzy stwierdzili spadek intensywności pasm $\approx 1043\text{ cm}^{-1}$ i jednoczesny wzrost intensywności pasm $\approx 956\text{ cm}^{-1}$ w widmach ATR-FTIR wraz ze wzrostem krystaliczności włókien celulozowych w kolejnych okresach dojrzewania bawełny [15]. Na podstawie wyników analizy chemometrycznej widm ATR-FTIR CB, jak analiza głównych składowych (*ang. principal component analysis*, PCA), stwierdziłem również ich wyraźną separację ze względu na okres hodowli, z którego pozyskiwano CB. Analiza synchronicznych widm korelacyjnych 2D, uzyskanych po rozdzieleniu prób na podstawie analizy PCA na dwa przedziały czasowe od 3 do 12 i od 14 do 28 dnia hodowli wykazała, że wysoka dynamika zmian krystaliczności CB, zaznaczana przez obecność ujemnych pików krzyżowych $\approx 1043\text{ cm}^{-1}$ vs $\approx 956\text{ cm}^{-1}$, miała miejsce głównie w pierwszym okresie hodowli. Piki te były w szczególności intensywne w synchronicznych widmach korelacyjnych 2D, uzyskanych na podstawie widm ATR-FTIR CB uzyskiwanej z hodowli szczepu *K. xylinus* ATCC 53524. Szczep ten charakteryzował się, jak wykazała analiza XRD, syntezą CB o wysokim stopniu krystaliczności. Natomiast na synchronicznych widmach korelacyjnych 2D, otrzymanych na podstawie widm ATR-FTIR CB uzyskiwanej z hodowli *K. xylinus* DSM 46604, widoczne były głównie dodatnie piki krzyżowe $\approx 1030\text{ cm}^{-1}$ vs 957 cm^{-1} . Wskazywały one na jednoczesny wzrost intensywności tych pasm, będący następstwem zwiększania się gęstości sieci mikrofibryli CB bez dynamicznych zmian w ich krystaliczności, co korelowało z wynikami otrzymywanymi z wykorzystaniem XRD.

Stwierdzone zależności wskazywały także na istotne znaczenie tego regionu widma ATR-FTIR w ocenie zmian zawartości fazy krystalicznej, również dla takiego biopolimeru jak CB. Ponadto, synchroniczne jak i asynchroniczne widma korelacyjne 2D, charakteryzowały się profilami auto pików i pików krzyżowych, które istotnie różniły się między niektórymi z analizowanych szczepów lub też wykazywały znaczące podobieństwo. Wynikało to zapewne ze zróżnicowania analizowanych szczepów *K. xylinus* w potencjale do syntezy CB i powiązanych z tym również właściwości molekularnych tego biopolimeru. Zastosowana przeze mnie rozszerzona analiza widm ATR-FTIR uzyskiwanej CB wykazała, że dwuwymiarowa analiza korelacyjna (2DCorr) jest użytecznym narzędziem analitycznym, rozszerzającym w znacznym stopniu przydatność standardowych metod opartych o spektroskopię w podczerwieni, używanych do kontrolowania procesu syntezy i analizy końcowych cech materiałowych CB. Jako wskaźniki zmian w niektórych właściwościach materiałowych CB, mogą zostać wykorzystane zależności między intensywnością pasm widm ATR-FTIR w zakresie liczb falowych $\approx 1100 \text{ cm}^{-1}$ - 950 cm^{-1} .

Podsumowując:

Dane uzyskane w badaniach wykazały istotny wpływ specyfiki szczepowej *K. xylinus* oraz okresu hodowlanego procesu syntezy celulozy bakteryjnej na charakterystykę widm ATR-FTIR. Ponadto, stwierdzone zależności wskazują również na możliwość oszacowania na podstawie widm ATR-FTIR optymalnego czasu trwania hodowli do otrzymywania CB o określonej wartości parametrów jak np., WRV i SRE. To podejście może być skutecznym narzędziem wstępnej walidacji otrzymywanej celulozy bakteryjnej przed jej zastosowaniem jako np. materiału opatrunkowego o określonej wilgotności lub zdolności do sorpcji wysięku. Dodatkowo, zaobserwowana przeze mnie zmienność w proporcjach zawartości formy I α i I β celulozy, zależna zarówno od specyfiki szczepowej *K. xylinus*, jak i okresu hodowlanego, ma kluczowe znaczenie w doborze wyjściowego materiału pod kątem opracowywania nośników dla enzymów lub innych substancji aktywnych.

H3 i H4; Cel - Analiza wpływu sposobu ekspozycji hodowli *K. xylinus* na wirujące pole magnetyczne (WPM) oraz parametrów pola magnetycznego na wydajność procesu syntezy i właściwości CB.

Celuloza bakteryjna, może być wytwarzana w różnego rodzaju systemach fermentacyjnych pozwalających na intensyfikację procesu produkcji czy też uzyskanie biopolimeru o określonych właściwościach materiałowych [16]. Spośród wielu dostępnych rozwiązań, jednym z budzących szczególne zainteresowanie jest stymulacja procesu produkcji CB z wykorzystaniem różnego rodzaju czynników fizycznych. Jednym z nich jest dynamiczne lub statyczne pole magnetyczne (PM), które może być indukowane przez względnie proste w konstrukcji układy oparte o cewki elektryczne zasilane stałym lub zmiennym prądem elektrycznym. Pole magnetyczne, jako czynnik wpływający na organizmy żywe, może być rozpatrywane jako siła bezpośrednio wpływająca na różne poziomy organizacji struktury komórek lub też jako modyfikator właściwości fizykochemicznych otaczającego je środowiska, jak lepkość, konduktywność, rozpuszczalność gazów i substancji stałych zmieniając ich dostępność dla organizmów **[M1]**. W komórkach eukariontów czy prokariontów, gdzie sprawność szlaków metabolicznych zależy od aktywności białek enzymatycznych, a także integralności membran tworzących poszczególne przedziały komórkowe, ekspozycja na różnego rodzaju PM, może prowadzić do szeregu zmian metabolicznych wynikających z zachwiania delikatnej homeostazy elektrolitowej, czy też zmiany aktywności białek enzymatycznych [17]. Hipoteza ta znalazła potwierdzenie w wynikach **koordynowanych przeze mnie badań [P16, P18]** nad wpływem WPM na aktywność takich enzymów jak lakaza czy peroksydaza chrzanowa. Wykazano, że ekspozycja na ten rodzaj PM, może korzystnie zmieniać ich właściwości katalityczne i operacyjne, **co jest również przedmiotem uzyskanych patentów [W3-W5]**.

Wyniki wcześniejszych prac, w których brałem aktywny udział, dotyczących wpływu WPM na *K. xylinus* wykazały, że czynnik ten może być z powodzeniem wykorzystany do modyfikacji procesu syntezy i końcowych cech materiałowych celulozy bakteryjnej. Przeprowadzone badania, sugerowały również wysokie znaczenie czasu ekspozycji na WPM, zarówno długości jej trwania, jak i okresu aplikacji w odniesieniu do cyklu rozwojowego hodowli *K. xylinus* **[P25, P28-P30]**. W przytoczonych badaniach analizowano głównie wpływ

ciągłej ekspozycji na WPM przy tylko jednej częstotliwości prądu zmiennego i wartość indukcji magnetycznej. W celu dokładnego przeanalizowania tego zagadnienia przeprowadziłem badania nad wpływem interwałowej ekspozycji na WPM przy zmiennych parametrach wirującego pola magnetycznego. W badaniach wykorzystywałem WPM o średniej wartości indukcji magnetycznej $B = 30$ mT, generowanej przez prąd zmienny o częstotliwości 50 Hz. W pierwszym wariantcie (I) hodowle były eksponowane na WPM przez pierwsze 72 godz. z 144 godz. W drugim wariantcie (II) ekspozycja na WPM rozpoczynała się po 72 godz. inkubacji i trwała kolejne 72h. W trzecim wariantcie (III) hodowle były eksponowane na działanie WPM, nieprzerwanie przez cały okres hodowlany trwający 144 godz. W porównaniu do ekspozycji ciągłej (wariant III), rozpoczęcie ekspozycji w początkowym okresie wzrostu hodowli lub też po wstępnym namnożeniu komórek bakteryjnych, wpłynęło istotnie na stopień konwersji substratów i wydajności procesu syntezy CB. Analiza ilości komórek bakteryjnych wskazała na stymulację tempa proliferacji komórek bakteryjnych analizowanego szczepu *K. xylinus*. W hodowlach wariantu I i II, zarówno w medium hodowlanym, jak i otrzymanej CB, stwierdziłem znacząco wyższą ich liczebność w stosunku do hodowli kontrolnych, jak i poddanych ciągłej ekspozycji na WPM. Przekładało się to bezpośrednio na efektywność produkcji CB oraz powstawanie innych metabolitów wtórnych, takich jak kwas glukonowy i octowy. W kontekście produktywności warianty I i II okazały się bardziej korzystne [H3]. Jednakże ekspozycja na WPM, po wstępnym 72 godz. (II) rozwoju hodowli *K. xylinus*, okazała się rozwiązaniem najbardziej efektywnym. Dodatkowo koszty operacyjne, związane z generowaniem WPM, były co najmniej o połowę niższe w stosunku do ekspozycji ciągłej (III), zwiększając tym samym opłacalność procesu syntezy CB.

Uzyskane wyniki zachęciły mnie do kontynuacji prac nad tym zagadnieniem, **ze szczególnym uwzględnieniem specyficzności szczepowej *K. xylinus***. Celem podjętych badań była analiza wpływu kolejnego wariantu stymulacji interwałowej (nieciągłej) WPM na wydajność procesu syntezy CB i jej wybrane parametry materiałowe, dwóch szczepów *K. xylinus* w pożywce z fruktozą jako główne źródło węgla. Zakres badań rozszerzyłem także o analizę wpływu WPM generowanego przy różnych częstotliwościach prądu zmiennego (10 Hz i 50 Hz). W odniesieniu do wpływu ekspozycji WPM na efektywność syntezy CB, korzystny efekt na poziomie $\approx 10\%$ wzrostu wydajności jej produkcji, zaobserwowałem tylko dla hodowli *K. xylinus* ATCC 53524 i WPM generowanym przy 50 Hz. Z kolei, w przypadku hodowli *K. xylinus* ATCC 53582 zastosowanie ekspozycji na WPM nie spowodowało znaczącej zmiany w ilości

uzyskiwanej CB. Odnotowałem natomiast, znacząco wyższy stopień wykorzystania głównego i drugorzędowego źródła węgla, fruktozy i etanolu w porównaniu z kulturami kontrolnymi nie ekspozycjami na WPM. W przypadku obu szczepów nie zaobserwowałem, negatywnego wpływu ekspozycji WPM na komórki bakteryjne w odniesieniu do ich liczby i żywotności. Jednak łącząc te parametry procesu fermentacyjnego, z zużyciem dostępnych w pożywce substratów energetycznych, można stwierdzić, że ekspozycja na WPM, wpłynęła korzystnie na stymulację szczepu *K. xylinus* ATCC 53524, przekładając się na zwiększoną efektywność syntezy CB. Natomiast w przypadku *K. xylinus* ATCC 53582, czynnik ten istotnie zwiększał tylko tempo przemian katabolicznych, o czym świadczyło większe wykorzystanie dostępnych w medium hodowlanym źródeł węgla. Ekspozycja na WPM w przypadku tego szczepu była czynnikiem, zwiększającym zapotrzebowanie komórek bakteryjnych na substraty energetyczne i budulcowe, wynikającym z indukcji wyższego tempa podziałów komórkowych, jak i konieczności dostarczenia zasobów niezbędnych do zaspokojenia ich potrzeb, związanych z wielowymiarowym stresem środowiskowym. Prawdopodobnie obserwowane różnice w odpowiedzi na nieciągłą ekspozycję WPM, były wynikiem zróżnicowania w organizacji kluczowych szlaków metabolicznych porównywanych szczepów *K. xylinus*, który to czynnik w istotnym stopniu determinuje potencjał tych bakterii do syntezy CB. Analiza krystaliczności CB przeprowadzona przeze mnie z wykorzystaniem ATR-FTIR [H4], wykazała różnice w wartościach wskaźników krystaliczności LOI i TCI, które były wyższe dla CB uzyskanej z hodowli szczepu *K. xylinus* ATCC 53582 niż hodowli szczepu *K. xylinus* ATCC 53524.

Ekspozycja na WPM wpłynęła nieznacznie na obniżenie współczynników krystaliczności CB w obu porównywanych hodowlach. Wyjściowa morfologia niesuszonych membran CB, różniła się między porównywanymi szczepami. W porównaniu do *K. xylinus* ATCC 53582, *K. xylinus* ATCC 53524 wytwarzał membrany CB, o wysokiej homogenności strukturalnej. Wpływ WPM na morfologię CB był widoczny zwłaszcza dla celulozy bakteryjnej pozyskiwanej z hodowli szczepu *K. xylinus* ATCC 53582. Membrany CB, w tym przypadku charakteryzowały się wysoką heterogennością, przejawiającą się w ocenie makroskopowej, powierzchnią o nieuporządkowanej makrostrukturze. Analiza powierzchni i przekroju poprzecznego wysuszonej CB z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), nie wykazała jednak istotnego wpływu WPM na układ i morfologię mikrofibryli. Natomiast stopień uwodnienia CB, który zależy od stopnia krystaliczności mikrofibryli, różnił się między szczepami, a także ulegał zmianie w wyniku ekspozycji na WPM. CB otrzymana z hodowli *K. xylinus* ATCC

53582 charakteryzowała się większym stopniem uwodnienia w porównaniu do CB z hodowli *K. xylinus* ATCC 53524. W przypadku CB wytwarzanej przez szczep *K. xylinus* ATCC 53524 zaobserwowano nieznaczny spadek stopnia uwodnienia w wyniku ekspozycji na WPM generowane przy 10 Hz. Natomiast CB otrzymywana z hodowli *K. xylinus* ATCC 53582 eksponowanych na WPM generowane przy 50 Hz była znacząco bardziej uwodniona w porównaniu do hodowli kontrolnych i eksponowanych na WPM generowane przy 10 Hz.

Podsumowując:

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały wysoki potencjał WPM jako czynnika wpływającego na poprawę efektywności produkcji CB oraz kształtowanie niektórych jej właściwości materiałowych. Efekt ten jest silnie związany z potencjałem metabolicznym szczepów *K. xylinus*, a także sposobem ekspozycji na WPM. Wykazałem, że charakterystyka WPM (częstotliwość, wartość indukcji magnetycznej), jest czynnikiem fizycznym, który poprzez kształtowanie wydajności niektórych szlaków metabolicznych komórek *K. xylinus*, może zostać wykorzystany do kierunkowej modyfikacji cech materiałowych CB, mających wpływ na właściwości tego biopolimeru jako potencjalnego nośnika dla enzymów i innych substancji aktywnych.

H5; Cel – Analiza możliwości zastosowania celulozy bakteryjnej uzyskiwanej z hodowli eksponowanych na WPM jako nośnika dla enzymów.

Kolejnym analizowanym przeze mnie zagadnieniem była aplikacyjność celulozy bakteryjnej, otrzymywanej z hodowli *K. xylinus* eksponowanych na WPM, jako nośnika dla enzymów. Materiał ten, jak już opisałem powyżej, w porównaniu do celulozy bakteryjnej uzyskiwanej z hodowli niepoddawanych ekspozycji na WPM, może charakteryzować się wyższym lub niższym uwodnieniem bez istotnego wpływu na strukturę mikrofibryli CB [H3, H4, P25, P30]. Wskazuje to, na możliwe zróżnicowanie we właściwościach materiałowych otrzymywanej CB, a także zdolności do adsorpcji różnego rodzaju biomolekuł, takich jak enzymy oraz możliwe różnice w stabilności takiego układu. W przeprowadzonych badaniach jako modelowy enzym wykorzystałem lakazę (oksydaza *p*-difenolowa, E.C 1.10.3.2), wyizolowaną i oczyszczoną przeze mnie z hodowli wrośniaka różnobarwnego (*Trametes versicolor*). Enzym ten jest jednym z elementów zewnątrzkomórkowego systemu

ligninolitycznego, który w warunkach naturalnych służy grzybom do rozkładania obecnych w tkankach roślin materiałów ligninocelulozowych, w celu pozyskiwania źródeł węgla i energii. Lakazy, ze względu na unikalne właściwości katalityczne, od wielu lat są obiektem intensywnych badań, których wyniki mają przełożenie na ich szerokie wykorzystanie w wielu gałęziach przemysłu, głównie tekstylnego i spożywczego [18]. Proces adsorpcji białek enzymatycznych na CB jest konsekwencją oddziaływań hydrofobowych, elektrostatycznych i wiązań wodorowych, których kierunek i siła może być modulowana przez szereg czynników fizycznych związanych z samą strukturą nośnika jak i unieruchomionego enzymu [19,20]. Optymalizację immobilizacji enzymu, przeprowadziłem zakładając istotny wpływ pH na ten proces. Zarówno dla CB pozyskiwanej z hodowli kontrolnych, jak i eksponowanych na WPM (WPM-CB), najwyższą wydajność unieruchamiania lakazy stwierdziłem przy pH 4,0. W tych warunkach lakaza, jak wykazały wykonane przeze mnie analizy na podstawie 3D struktury krystalicznej enzymu, charakteryzuje się powierzchnią z licznymi obszarami o ładunku dodatnim, co związane jest z wartością jej punktu izoelektrycznego ($pI \approx 3,8$). Powierzchnia niemodyfikowanej celulozy bakteryjnej, charakteryzuje się ujemnym ładunkiem elektrostatycznym jak i ujemną wartością potencjału elektrokinetycznego (potencjał Zeta) przy pH powyżej 3,0, kształtowanych głównie przez obecne na powierzchni mikrofibryli CB grupy hydroksylowe podjednostek β -D-glukopiranozy [21]. Tłumaczyło to obserwowany gwałtowny spadek wydajności immobilizacji enzymu przy pH powyżej 5,0, gdzie zakładając oddziaływania elektrostatyczne jako główny rodzaj sił wpływających na wydajność procesu adsorpcji, można założyć wzrost oddziaływań o charakterze repulsywnym między nośnikiem a biokatalizatorem. Immobilizacja lakazy na WPM-CB wpłynęła na parametry operacyjne enzymu przesuwając jego optimum katalityczne z pH 3,0 na pH 4,0 (kwas 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolino-6-sulfonowy, ABTS, jako substrat). Wskazuje to na wpływ immobilizacji na strukturę samego enzymu, prawdopodobnie indukując zmiany konformacyjne w jego strukturze. Modyfikacje te wpływają na wartość stałych dysocjacji (pK_a) reszt jonizujących regionu katalitycznego, zmieniając w ten sposób optimum pH enzymu. Dodatkowo, przesunięcie optimum pH, sugeruje także możliwy wpływ mikrośrodowiska, które tworzy sieć mikrofibryli CB na lokalny gradient jonów H^+ , OH^- [22]. Dodatkowo stwierdziłem, że immobilizowana lakaza charakteryzowała się znacząco wyższą wartością stałej Michaelis-Menten (K_M), co również mogło wynikać ze zmian konformacyjnych unieruchomionego enzymu. Zmiana powinowactwa unieruchomionego enzymu do substratu, może również być związana z wielowarstwową

i porowatą strukturą membran CB. Wpływa to na rozmieszczenie cząsteczek enzymu, ich orientację, a przede wszystkim zaburza procesy transferu masy, co wymaga wyższego stężenia substratu dla osiągnięcia efektywnego wysycenia centrum aktywnego, jak i utrudnia swobodną dyfuzję produktów [23]. Modyfikacja elastyczności struktury enzymu prawdopodobnie wpłynęła również na stwierdzone przesunięcie optimum temperaturowego enzymu immobilizowanego na WPM-CB, gdzie temperaturowe optimum katalityczne wynosiło 70°C w porównaniu do 60°C dla formy rozpuszczalnej enzymu i unieruchomionej na CB uzyskanej z hodowli kontrolnych [24]. Jednakże pomimo przesunięcia optimum temperaturowego, co mogłoby być korzystne w kontekście dalszego wykorzystania immobilizowanej lakazy, nie stwierdziłem znaczącego zwiększenia stabilności immobilizowanego enzymu w tej temperaturze w stosunku do jego formy rozpuszczalnej. Kluczowym parametrem decydującym o aplikacyjności unieruchomionego enzymu, jest jego stabilność podczas wielokrotnego wykorzystania. W przypadku immobilizacji opartej o oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne, jak adsorpcja, systematyczny spadek aktywności wraz ze wzrastającą liczbą cykli reakcyjnych jest spodziewanym zjawiskiem. Porównując obydwie formy nośnika, stwierdziłem nieznacznie wyższą stabilność operacyjną układu opartego o WPM-CB, czego powodem może być modyfikacja struktury CB, nie na poziomie samych mikrofibryli CB, ale gęstości formowanej przez nie sieci w membranach. Sieć ta charakteryzowała się wyższym stopniem porowatości, na co wskazywała analiza powierzchni, wykonana na podstawie mikrofotografii uzyskanych ze skaningowej mikroskopii elektronowej.

Podsumowując:

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały użyteczność CB, uzyskiwanej z hodowli *K. xylinus* eksponowanych na WPM, jako efektywnego nośnika dla lakazy i prawdopodobnie innych enzymów. Ewentualne zmiany w strukturze molekularnej tego materiału nie wpływały negatywnie na parametry operacyjne enzymu, zmieniając je nieznacznie w stosunku do formy rozpuszczalnej enzymu.

H6; Cel - Opracowanie nośnika o właściwościach magnetycznych do immobilizacji enzymów na bazie celulozy bakteryjnej uzyskiwanej z hodowli wytrząsanych *K. xylinus*.

W zależności od sposobu prowadzenia procesu fermentacyjnego, CB może przybierać różne formy. W hodowlach statycznych wytwarzana jest w postaci błon pokrywających powierzchnie medium hodowlanego. Natomiast CB otrzymywana z hodowli wytrząsanych ma postać nieregularnych sfer, których rozmiary mogą zależeć od wstępnej ilości inokulum i częstotliwości wytrząsania czy obecności innych polimerów. Zasadniczą zaletą tej formy CB jako potencjalnego nośnika, jest wysoce porowata i stosunkowo duża powierzchnia czynna. Ponadto, sferyczny kształt CB faworyzuje homogenny transfer masy. Jednakże podobnie jak WPM-CB, oczyszczona, sferyczna CB, bez dalszej modyfikacji pozwala na immobilizację enzymów jedynie poprzez absorpcję. Metoda ta, pomimo swej prostoty czy niskiej kosztocłonności, nie jest efektywna, gdy podstawowym celem jest otrzymanie stabilnego preparatu, odpornego na zmiany pH, temperatury czy obecności różnego rodzaju soli w środowisku reakcyjnym. Z tego też powodu w dalszych badaniach wykorzystując CB uzyskiwaną z hodowli wytrząsanych *K. xylinus* skoncentrowałem się nad opracowaniem sposobu otrzymywania kompozytu o właściwościach magnetycznych jako nośnika do immobilizacji enzymów. W pierwszym etapie modyfikacji, CB poddawana była procesowi utleniania z wykorzystaniem kwasu jodowego (VII). Reakcja obejmuje głównie drugorzędowe grupy hydroksylowe β -D-glukopiranozy przy C2 i C3. Towarzyszy jej otwarcie pierścienia piranozowego a otrzymanym produktem jest diformylo-CB [25]. Grupy aldehydowe (formylowe) poprzez możliwość tworzenia wiązań z grupami ϵ -NH₂ reszt lizyny, obecnymi na powierzchni białek enzymatycznych, mogłyby służyć jako miejsca wiązania enzymów. Jednakże bliska (mała) odległość cząsteczek enzymu od powierzchni nośnika, znacząco (zwykle negatywnie) wpływa na właściwości katalityczne unieruchomionego biokatalizatora. W dalszym etapie nośnik modyfikowany był przez kationowy polimer, taki jak polietylenoimina (PEI). Wprowadzenie tego polimeru do struktury nośnika miało na celu zwiększanie ilości miejsc wiązania glutaraldehydu (GA), który został wykorzystany jako terminalny łącznik, między nośnikiem a immobilizowanym enzymem. Wprowadzenie dodatkowych grup aminowych poszerzyło również znacząco zakres możliwości dalszych modyfikacji nośnika. Rozwiązanie to pozwala na zastosowanie innego rodzaju tak zwanych „dystanserów” (*ang. spacers arms*),

zwiększając tym samym możliwości manipulacji dystansem (odległością) unieruchomionego enzymu od powierzchni nośnika, a także doboru optymalnego sposobu jego trwałego związania. Jak podkreśliłem już wcześniej, jedną z kluczowych właściwości immobilizowanych enzymów jest możliwość ich kilkukrotnego wykorzystania. W zależności o rodzaju nośnika, tj. jego struktury czy postaci, separacja ze środowiska reakcji może odbywać się poprzez np. filtrację, odwirowanie itp. W opracowanym nośniku, kwestia jego łatwej separacji została przeze mnie rozwiązana, poprzez wprowadzenie cząstek czułych na pole magnetyczne, do struktury sfer CB. W tym celu, po uzyskaniu CB z wysoką ilością grup aldehydowych, wprowadzano do struktury nośnika cząstki magnetyczne Fe_3O_4 , stosując metodę strącenia soli chlorkowych Fe^{2+} i Fe^{3+} w środowisku alkalicznym. Nadanie właściwości magnetycznych nośnikowi na bazie CB, pozwala na jego łatwą separację z wykorzystaniem prostych rozwiązań technicznych, bazujących na łatwo dostępnych magnesach neodymowych. Ponadto, otwiera możliwość zastosowania tego rodzaju nośnika do immobilizacji enzymów, wykorzystywanych w procesach prowadzonych w reaktorach wspieranych przez różnego rodzaju pola magnetyczne, w tym WPM. Opracowany przeze mnie kompozyt był następnie testowany pod względem jego przydatności jako nośnik dla Lecitase® Ultra (LU). Enzym ten jest hybrydą uzyskaną w wyniku połączenia struktury lipazy z *Thermomyces lanuginosus* i fosfolipazy A1 z *Fusarium oxysporum*. LU wykorzystywana jest w wielu procesach przemysłowych, a dzięki możliwości katalizowania reakcji transestryfikacji może być stosowana w procesie syntezy różnego rodzaju estrów jak i surfaktantów. Immobilizacja enzymu na opracowanym przeze mnie nośniku nie wpływała negatywnie na jego parametry operacyjne. Wydajność opracowanego procesu immobilizacji LU pozwalała na uzyskiwanie preparatu o wysokiej aktywności hydrolitycznej testowanej z wykorzystaniem palmitynianu *p*-nitrofenolu jako substratu. Immobilizacja nie wpłynęła istotnie na stałą K_M w stosunku do wolnej formy enzymu wskazując na brak wpływu procesu unieruchamiania na wiązanie substratu. Nie stwierdziłem również zmian w optimum pH, co świadczyło o znikomym wpływie grup funkcyjnych obecnych na powierzchni nośnika na lokalny gradient jonów pH, a także braku istotnych zmian w strukturze unieruchomionego enzymu, mogących zmieniać wartości pK_a reszt aminokwasowych obszaru katalitycznego LU. Jednakże stwierdziłem, zmiany profilu termicznego immobilizowanego enzymu, który charakteryzował się nieznacznie niższą aktywnością w temperaturach poniżej 50°C w porównaniu do formy rozpuszczalnej LU. Częstym efektem unieruchamiania enzymów na powierzchni nośnika jest zwiększanie jego stabilności termicznej, co jest skutkiem usztywnienia

struktury biokatalizatora. Jednakże immobilizowany enzym wykazywał się podobnym stopniem stabilności termicznej zachowując do 80% swojej początkowej aktywności po 1 godz. inkubacji w 50°C. Z punktu widzenia możliwości dalszego wykorzystania przemysłowego opracowanego preparatu, istotnym parametrem jest stabilność operacyjna w odniesieniu do jego możliwości wielokrotnego wykorzystania, która była wysoka, na co wskazywało zachowanie przez LU-MCB, po 10 cyklach reakcyjnych, aktywności na poziomie około 70% aktywności początkowej. LU-MCB cechowała się odpowiednio wysoką odpornością na przechowywanie, zachowując znaczny procent (> 80%) aktywności po 28 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych.

W wyniku nawiązanej przeze mnie współpracy z zespołem dra hab. Witolda Gładkowskiego, prof. Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, opracowany preparat LU-MCB, został przetestowany w kontekście jego przydatności w potencjalnych aplikacjach przemysłowych czego **efektem są publikacje oraz udzielone patenty krajowe [P13, P14, W1, W2].** Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że LU-MCB jest wydajnym biokatalizatorem w procesie enancjoselektywnego, kinetycznego rozdziału serii mieszanin racemicznych, estrów 4-fenylbut-3-en-2-ylu, poprzez ich ukierunkowaną hydrolizę prowadzącą do otrzymania optycznie czynnych alkoholi. W porównaniu do rozpuszczalnej formy enzymu, LU-MCB, wykazywała się wyższą aktywnością hydrolityczną, a także enancjoselektywnością. Polepszone właściwości katalityczne LU-MCB w stosunku do jej rozpuszczalnej formy, pozwoliły na skrócenie blisko trzykrotnie, czasu niezbędnego do efektywnego kinetycznego rozdziału racemicznego octanu (*E*)-4-fenylbut-3-en-2-ylu. Ponadto, znacząco wzrosła enancjoselektywność tej reakcji ($E > 200$), co skutkowało otrzymaniem (*R*)-4-fenylbut-3-en-2-olu oraz nieprzereagowanego octanu (*S*)-4-fenylbut-3-en-2-ylu, z odpowiednio 97% i 98% nadmiarem enancjomerycznym. W przypadku innych testowanych substratów, jak estry kwasu propionowego czy masłowego z (*E*)-4-fenylbut-3-en-2-olem, korzystny efekt dotyczył głównie zwiększonej aktywności immobilizowanej LU, przekładając się na polepszenie wydajności procesu w stosunku do procesu prowadzonego z wykorzystaniem formy rozpuszczalnej enzymu. Tak efektywny rozdział kinetyczny okazał się **niemożliwy do przeprowadzenia z zastosowaniem rozpuszczalnej formy enzymu,** w którym to procesie nadmiary enancjomeryczne **uzyskanych izomerów nie przekraczały 50%.** W przypadku innych testowanych substratów, jak estry kwasu propionowego czy masłowego z (*E*)-4-fenylbut-3-en-2-olem, korzystny efekt dotyczył głównie **zwiększonej aktywności immobilizowanej LU,** przekładając się na wyższą wydajność procesu w stosunku do procesu

prowadzonego z wykorzystaniem formy rozpuszczalnej enzymu, a w przypadku hydrolizy estru kwasu masłowego, także na otrzymanie czystego optycznie nieprzereagowanego *S* enancjomeru. W kolejnych badaniach o **charakterze aplikacyjnym**, wykorzystując zdolność LU do katalizowania reakcji transestryfikacji w mediach reakcyjnych opartych o rozpuszczalniki o niskiej aktywności wody, wykazano przydatność LU-MCB jako wydajnego biokatalizatora w procesie enancjoselektywnego rozdziału racemicznych estrów z układem 4-fenylobut-3-en-2-olu, w tym w modelowym układzie reakcyjnym składającym się z mieszaniny racemicznej (*E*)-4-fenylobut-3-en-2-olu, propionianu winylu jako donora grupy acylowej oraz eteru dipropylowego jako rozpuszczalnika. LU-MCB katalizowała kinetyczny rozdział testowanego substratu z wysokim stopniem konwersji ($E > 200$), a także z preferencją do estryfikacji enancjomeru *R*. Ponadto, stosując preparat LU-MCB, wykazano możliwość uzyskania, wysokiego nadmiaru enancjomerycznego dla nieprzereagowanego (*S*)-4-fenylobut-3-en-2-olu (92%) i produktu propionianu (*R,E*)-4-fenylobut-3-en-2-ylu (98%).

Podsumowując:

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań z wykorzystaniem jako modelowego enzymu Lecitase® Ultra, wskazały na wysoką użyteczność modyfikowanej celulozy bakteryjnej jako podstawy nośników dla enzymów o wysokim znaczeniu aplikacyjnym, w różnego rodzaju gałęziach przemysłu wykorzystujących biokatalizatory. Opracowany preparat może zostać wykorzystany w procesie otrzymywania czystych optycznie alkoholi allilowych, które są ważnymi chiralnymi prekursorami w syntezie biologicznie czynnych związków, takich jak leki, związki zapachowe, a także składniki środków ochrony roślin.

H7; Cel – Opracowanie nośnika o właściwościach magnetycznych i wysokiej zawartości grup karboksylowych na bazie celulozy bakteryjnej.

W kolejnych badaniach nad możliwością modyfikacji celulozy bakteryjnej w kierunku opracowywania skutecznych nośników do immobilizacji enzymów podjąłem prace nad następnym kompozytem o właściwościach magnetycznych na bazie CB. Problem braku znaczącej ilości grup funkcyjnych na powierzchni niemodyfikowanej celulozy bakteryjnej

rozwiązałem poprzez zastosowanie jako czynnika modyfikującego kwasu 2-hydroksy-1,2,3-propanotrikarboksylowego (kwas cytrynowy) w reakcji z wykorzystaniem jako katalizatora podfosforynu sodu. Zastosowanie kwasu cytrynowego jako czynnika modyfikującego ma wiele zalet związanych między innymi z otrzymywaniem go na drodze fermentacji, z wykorzystaniem substratów będących produktami odpadowymi przemysłu rolno-spożywczego, możliwością łatwej biodegradacji i co również istotne, w kontekście syntezy opracowanego nośnika na większą skalę, relatywnie niskimi kosztami jego produkcji.

Jednym z najpowszechniej spotykanych materiałów o właściwościach magnetycznych, stosowanych do opracowywania kompozytów, są nanocząstki Fe_3O_4 , zwykle otrzymywane na drodze reakcji współstrąceniowej różnego rodzaju soli żelaza (II, III) w zasadowym środowisku. Metodę tę wykorzystałem podczas syntezy pierwszego z opracowanych nośników **[H6]**. Jednakże znanych jest wiele innych rodzajów i metod otrzymywania materiałów o właściwościach magnetycznych, w tym ferrytów magnezowych czy niklowych. Materiały te mogą wykazywać odmienne właściwości magnetyczne, które zależą od mikrostruktury sieci krystalicznej, tworzonej przez dodatnio naładowane jony metali i ujemnie naładowane dwuwartościowe jony tlenu, co ma istotne znaczenie w kontekście dalszej aplikacji nośników, opartych o te materiały [26]. Do syntezy wyżej wymienionych ferrytów niklowych i magnezowych, wykorzystałem technikę syntezy w fazie stałej, pozwalającej na istotne ograniczenie ilości odpadów i kosztów procesu [27]. Podczas optymalizacji procesu syntezy nowego kompozytu, testowałem również komercyjnie dostępne cząstki magnetyczne Fe_3O_4 . Ze względu na warunki syntezy kompozytu, wysoką temperaturę i kwasowość, materiał ten wykazywał się niską stabilnością w porównaniu do otrzymanych ferrytów magnezowych czy niklowych (MgFe_2O_4 i NiFe_2O_4), co nie pozwoliło na otrzymywanie kompozytu na bazie tego materiału. Analiza właściwości magnetycznych, wskazała na zbliżone wartości nasycenia magnetycznego (M_s) dla obydwu wariantów nośnika (CB- MgFe_2O_4 7,36 emu/g; CB- NiFe_2O_4 , 5,49 emu/g), a stwierdzone przeze mnie różnice wynikały z charakterystyki magnetycznej zastosowanych cząstek magnetycznych. Analiza powierzchni otrzymanego kompozytu z wykorzystaniem techniki ATR-FTIR, wykazała wysoką wydajność procesu modyfikacji CB kwasem cytrynowym z utworzeniem wiązań estrowych między grupami COOH kwasu, a hydroksylowymi alkoholi obecnych w podjednostkach β -D-glukopiranozowych mikrofibryli celulozy bakteryjnej. Ilość wprowadzonych grup karboksylowych, w optymalnych warunkach, dla obydwu wariantów nośnika wynosiła średnio 3,6 mmol na gram suchej masy kompozytu.

Analizy termiczne z wykorzystaniem technik TGA i DSC, które zostały wykonane w Poznańskim Parku Naukowo-Technologicznym, wykazały destabilizujący wpływ modyfikacji kwasem cytrynowym, na strukturę CB. Jednakże w zakresie temperatur, które ze względu na właściwości molekularne białkowych biokatalizatorów można rozważać za kluczowe, tj. 20°C - 100°C, nie stwierdziłem istotnego wpływu tego czynnika na stabilność obydwu wariantów opracowanego kompozytu magnetycznego. Wprowadzenie grup karboksylowych do struktury podstawy kompozytu jakim była CB miało na celu przede wszystkim zwiększenie możliwości stabilnego wiązania różnego rodzaju enzymów. Wprowadzenie grup karboksylowych pozwala na zastosowanie różnego rodzaju łączników (*ang.* spacer *arms*), między nośnikiem a enzymem. Ze względu na dostępność potencjalnie nieograniczonej liczby tego rodzaju związków, istnieje możliwość zaprojektowania stabilnych układów, uwzględniając właściwości strukturalne enzymów. Użyteczność opracowanych wariantów nośnika, testowałem z wykorzystaniem techniki pozwalającej na bezpośrednie połączenie enzymu do nasyconej grupami karboksylowymi powierzchni nośnika, poprzez jej aktywację 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidem (EDC). Ten sposób immobilizacji pozwala na trwałe wiązanie enzymu z nośnikiem bez konieczności stosowania łącznika z wytworzeniem wiązania amidowego z zaangażowaniem głównie obecnych na powierzchni enzymu grup ϵ -aminowych reszt lizynowych. Jako modelowe enzymy wykorzystałem lipazę B z *Candida antarctica* (CALB) i fosfolipazę A z *Aspergillus niger*, które to enzymy mają szeroko udokumentowane znaczenie jako wydajne biokatalizatory przemysłowe. W optymalnych warunkach do immobilizacji, uzyskany układ charakteryzował się wysoką aktywnością hydrolityczną, którą testowałem z wykorzystaniem maślanu-*p*-nitrofenylu jako substratu. W wyniku immobilizacji, stwierdziłem jednakże zmniejszenie sprawności katalitycznej obydwu enzymów. Przy czym została ona zrekompensowana poprzez ich wysoką stabilność operacyjną, pozwalającą na zachowanie znaczącej aktywności (\approx 50%) po 10 cyklach reakcyjnych. Immobilizacja, analizowanych enzymów nie zmieniła istotnie ich optimum pH i temperatury w porównaniu do formy rozpuszczalnej enzymu. Jednakże proces unieruchomienia dla obydwu enzymów miał pozytywy efekt na zwiększenie stabilności termicznej. Wskazuje to na wspomniane powyżej usztywnianie struktury molekularnej immobilizowanych enzymów w wyniku wielopunktowego wiązania z nośnikiem. Zwiększona odporność w zakresie wyższych temperatur jest kluczowa w kontekście dalszych możliwych aplikacji i pozwala na stosowanie immobilizowanych enzymów

w procesach, w których możliwości dostosowania temperatury procesu do właściwości biokatalizatora są ograniczone, np. ze względu na niską rozpuszczalność substratów.

Podsumowując:

Opracowane przeze mnie nośniki magnetyczne oparte na modyfikowanej kwasem cytrynowym celulozie bakteryjnej, posiadają szerokie spektrum potencjalnych zastosowań jako matryca do unieruchamiania różnego rodzaju enzymów, w tym przede wszystkim biokatalizatorów o znaczeniu przemysłowym.

4.4. Podsumowanie – elementy nowości naukowej.

1. W zakresie obszaru badawczego dotyczącego procesu syntezy CB i możliwości jej monitorowania z wykorzystaniem dostępnych metod spektroskopowych przeprowadzone badania pozwoliły na ustalanie charakterystycznych zależności między profilami widm absorpcyjnych ATR-FTIR a okresami fermentacyjnymi i właściwościami wodnymi CB. Również, co istotne wyniki przeprowadzonych badań jako pierwsze wykazały wpływ specyfiki syntezy CB przez konkretne szczepy bakteryjne na profile pasm w widmach ATR-FTIR, ze szczególnym uwzględnieniem zakresu widma między 1200 cm^{-1} - 950 cm^{-1} . Stwierdzone zależności mogą w dalszej perspektywie zostać wykorzystane do efektywnego kontrolowania procesu produkcji CB, dając możliwość wstępnej selekcji otrzymywanego biopolimeru w celu wykorzystania w konkretnej technologii.
2. Badania nad możliwością wykorzystania wirującego pola magnetycznego, jako czynnika wpływającego na poprawę efektywności produkcji CB oraz kształtowania niektórych jej właściwości materiałowych, wskazały jako kluczowe czynniki: zależność między potencjałem metabolicznym szczepów *K. xylinus* a sposobem ekspozycji na WPM. Wykazano, że charakterystyka procesowa WPM (częstotliwość, wartość indukcji magnetycznej), jest czynnikiem fizycznym, który poprzez modulowanie niektórych szlaków metabolicznych komórek *K. xylinus*, może zostać wykorzystany do kierunkowej modyfikacji niektórych właściwości materiałowych CB. Uzyskiwana w procesach fermentacyjnych stymulowanych przez WPM CB z powadzeniem może być

wykorzystywana jako nośnik dla enzymów oraz niskocząsteczkowych substancji czynnych. Możliwość modyfikacji właściwości CB poprzez ekspozycję na WPM, może być skutecznym sposobem na kształtowanie cech nośnika w zależności od jego dalszego zastosowania.

3. Opracowane sposoby efektywnej modyfikacji otrzymywanej z różnych systemów fermentacyjnych CB, rozszerzają istotnie potencjalny obszar zastosowań CB, jako podstawy różnego rodzaju kompozytów w procesie projektowania uniwersalnych nośników o właściwościach magnetycznych. Opracowane nośniki wykazują się wysokim potencjałem aplikacyjnym zwłaszcza w obszarze unieruchamiania enzymów stosowanych w różnego rodzaju procesach biotechnologicznych o znaczeniu przemysłowym.

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

Już podczas studiów doktoranckich odbyłem trzymiesięczny **(06-09. 2006)** staż naukowy pod opieką profesora Dimitrios Morikisa w Biomolecular Modeling and Designing Lab, Departament of Bioengineering, Uniwersytetu Kalifornijskiego w Riverside, USA, podczas którego zdobyłem umiejętności pozwalające na analizę kluczowych właściwości katalitycznych enzymów z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego.

W **2010 r. (02-05.08)** odbyłem, krótkoterminowy staż naukowo-szkoleniowy **w Pracowni białek wiążących wapń, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie**. Podczas stażu zdobyłem umiejętności pozwalające na samodzielne przeprowadzanie analiz z zakresu techniki dwuwymiarowej elektroforezy żelowej oraz Western-blot. W roku **2013 (03-05)** odbywałem trzy miesięczny staż finansowany w ramach programu „**Czas na Staż**”, w firmie **MEDI-TEST (Szczecin, Polska)**. W czasie stażu oprócz, zapoznania się i pracy z wykorzystywanymi technikami laboratoryjnymi, podjąłem badania mające na celu opracowanie zamiennika komercyjnego złoża o właściwościach magnetycznych do izolacji DNA z wykorzystaniem automatycznego separatora magnetycznego. Podczas kolejnego stażu naukowego **(04-15. 02. 2019)**, odbytego w **Pracowni Syntezy Materiałowych,**

Poznańskiego Parku Naukowo-Technologicznego, zdobyłem umiejętności w zakresie metod analizy właściwości materiałowych, cieczy głęboko eutektycznych w odniesieniu do ich wpływu na aktywność enzymów i **właściwości materiałowe celulozy bakteryjnej**. Doświadczenie zdobyte podczas tego stażu i wykonane w tym czasie wstępne analizy nad właściwościami termicznymi nośników magnetycznych na bazie CB technikami **TGA, DSC**, stanowiły znaczącą część analiz, które zostały wykorzystane podczas badań, których efektem są prace **H7, P6, P16**. Nawiązana współpraca pozwoliła mi również na złożenie wniosku na finasowanie badań w konkursie NCN, OPUS pt., „**Magnetyczne ciecze jonowe oraz ich mieszaniny eutektyczne jako medium reakcji enzymatycznych w modyfikacji naturalnych polimerów**” (sygn. 2019/35/B/ST8/03589), projekt nie uzyskał finansowania. Ponadto, dwukrotnie (**9-13. 10. 2017, 8-12. 10. 2018**) odbyłem krótko terminowe staże naukowo-dydaktyczne w katedrze **Chemii Organicznej i Biochemii w Uniwersytecie im. Mendla w Brnie, Czechy**, gdzie miałem możliwość wygłoszenia referatów oraz zapoznania się z szeregiem technik z zakresu spektrometrii mass i syntezy oligopeptydów o właściwościach antymikrobiologicznych. Nawiązane kontakty zawodowe podczas stażu pozwoliły na wystąpienie przeze mnie z wnioskiem do Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej z wnioskiem na finasowanie wymiany doktorantów i pracowników Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii, ZUT w ramach planowanego projektu pt., „**Opracowanie biosensora do wykrywania zanieczyszczeń żywności na bazie enzymów immobilizowanych na celulozie bakteryjnej**” (sygn. PPN/BCZ/2019/1/00042). Niestety pomimo wysokiej oceny wniosku z powodu ograniczonego budżetu nie uzyskał on finansowania.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych, dydaktycznych i organizacyjnych.

6.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze.

6.1.1. Badania nad wpływem czynników chemicznych i fizycznych na proces syntezy celulozy bakteryjnej, metody modyfikacji i aplikacyjność.

Wpływ czynników chemicznych i fizycznych na wydajność produkcji CB oraz sposoby modyfikacji w celu zwiększenia obszaru jej aplikacyjności były obiektem serii kolejnych inicjowanych przeze mnie badań lub też projektów badawczych związanych z tym zagadaniem,

w których brałem czynny udział jako ekspert w obszarze analizy wybranych właściwości materiałowych CB i enzymologii. Efektem tych działań jest szereg publikacji, patentów i zgłoszeń patentowych. **W badaniach prowadzonych we współpracy z Poznańskim Parkiem Naukowo-Technologicznym (Fundacja Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu)** nad wykorzystaniem innowacyjnych środków powierzchniowo czynnych na bazie silikonów polieterowych (polisiloksanów) testowano je jako nie odżywczy dodatek do pożywek hodowlanych hodowli *K. xylinus*, mogący wpływać na proces produkcji i właściwości materiałowe CB [P7]. Opracowany surfaktant, znacząco obniżał napięcie powierzchniowe standardowego medium hodowlanego, osiągając krytyczne stężenie micelizacji (KSM) przy niskich stężeniach, co było skorelowane ze wzrostem wydajności syntezy CB o 37% w odniesieniu do mokrej masy i $\approx 15\%$ suchej masy. Analiza właściwości molekularnych CB wykazała, że surfaktant nie integruje się ze strukturą CB, a także nie ma istotnego wpływu na jej krystaliczność oraz stabilność termiczną. Ponadto, przy stężeniu surfaktantu w medium hodowlanym, bliskim KSM, otrzymywano membrany CB o ponad 40% zwiększonym stopniu uwodnienia i znacząco wyższej zdolności do utrzymywania wody. CB charakteryzowała się również wysoką biokompatybilnością, analizowaną z wykorzystaniem linii komórkowych fibroblastów L929, potwierdzając tym samym jej przydatność jako podstawy materiału opatrunkowego lub w innych zastosowaniach biomedycznych. Modyfikacja właściwości fizykochemicznych medium hodowlanego za pomocą surfaktantów na bazie polisiloksanów, okazała się tanią i przyjazną dla środowiska metodą zwiększania wydajności produkcji CB, a także sposobem na ukierunkowaną modyfikację jej właściwości *in-situ*. W zakresie zwiększania opłacalności produkcji celulozy bakteryjnej opracowałem koncepcję, bezpośredniego wykorzystania szeregu hydrolaz glikozydowych, mających zdolność do degradacji szeroko dostępnych, bogatych w glukozę i fruktozę, oligo- i polisacharydów wchodzących w skład wielu bioodpadów pochodzących z przemysłu rolno-spożywczego. W wyniku przeprowadzonych badań wykazałem możliwość efektywnej produkcji CB z wykorzystaniem sacharozy, laktozy, skrobi jako podstawowych źródeł węgla w medium hodowlanym uzupełnionym o specyficzne hydrolazy glikozydowe, mające zdolność do ich degradacji do dostępnych dla komórek *K. xylinus* monosacharydów. Nie odnotowałem negatywnego wpływu analizowanych enzymów na właściwości materiałowe CB, co potwierdziło potencjał aplikacyjny przeprowadzonych badań [P5]. CB, pomimo że jest nieocenionym materiałem opatrunkowym, jest biopolimerem „nieaktywnym” w kontekście

ochrony przed rozwojem groźnych zakażeń wywoływanych przez różnego rodzaju bakterie, co niestety jest częstym powikłaniem w procesie gojenia ran. Oczywistym rozwiązaniem tego problemu jest, np. wysycanie membran CB, substancjami o charakterze bakteriobójczym lub bakteriostatycznym. Jednakże w przypadku etiologii niektórych przewlekłych ran, związki te mogą również działać cytotoksycznie w stosunku do komórek gojącej się tkanki. Jednym ze sposobów zwiększenia skuteczności procesu gojenia ran podczas stosowania CB jako materiału opatrunkowego jest immobilizacja enzymów mających zdolność do redukcji ilości macierzy biofilmowej formowanej przez bakterie chorobotwórcze i ułatwiania procesu jej eradykacji, a także zwiększania skuteczności zastosowanej antybiotykoterapii. W pracy **[P15]**, w której **nadzorowałem badania prowadzone przez doktoranta** jako promotor pomocniczy, na podstawie badań przeprowadzonych, **we współpracy z Instytutem Biochemii, Uniwersytetu w Greifswaldzie**, wykazano, że immobilizacja na powierzchni membran CB rekombinowanej hydrolazy glikozydowej PelA_h z *Pseudomonas aeruginosa*, wpływa istotnie na proces formowania i stabilność biofilmu. Enzym ten jest elementem systemu syntezy polimeru Pel, jednego z głównych składników macierzy biofilmowej tego patogennego mikroorganizmu. Jednakże jako osobny element **w postaci rekombinowanego białka**, dzięki swojej aktywności i wysokiej specyficzności względem polimeru Pel, zastosowanie go jako komponentu opatrunku na bazie CB jest rozwiązaniem umożliwiającym zmniejszenie ryzyka rozwoju groźnych zakażeń w przebiegu przewlekłych ran. W kolejnych badaniach z tego zakresu **[P2]**, koordynowałem badania nad możliwością wykorzystania liazы alginianowej pochodzącej z *P. aeruginosa*. Wykazano, że immobilizacja tego enzymu na powierzchni CB jest skutecznym sposobem na destabilizację biofilmu tworzonych przez *P. aeruginosa*. Rozwiązanie to pozwoliło na znaczące zmniejszenie skutecznej dawki antybiotyku gentamycyny, zwiększając jednocześnie bezpieczeństwo leczenia przewlekłych, wrzodziejących ran z wykorzystaniem jako materiału opatrunkowego CB wysycanej tego rodzaju antybiotykami. W kolejnych badaniach z zakresu modyfikacji CB, brałem udział w projekcie dotyczącym stabilizacji struktury membran CB z wykorzystaniem kwasu cytrynowego i różnych soli nieorganicznych jako katalizatorów, jak między innymi fosforan disodowy, wodorowęglan sodu i wodorowęglan amonu **[P11]**. Połączenie fosforanu disodu i wodorowęglanu sodu, jako katalizatorów w procesie sieciowania krzyżowego, pozwalało na uzyskanie CB o ponad 5-krotnie wyższej pojemności wodnej, a także wpływało korzystnie na stopień utrzymania wody, zwiększając go ponad 6-krotnie w porównaniu z niezmodyfikowaną CB. Ponadto, zmodyfikowana CB wykazywała się 1,5-

krotnie większą pojemnością wodną w porównaniu do dostępnych komercyjnie materiałów opatrunkowych stosowanych w leczeniu ran silnie sączących, co istotnie nie wykazując przy tym działania cytotoksycznego wobec linii komórkowej fibroblastów L929. Opracowany materiał na bazie CB, może znaleźć zastosowanie w wysoko chłonnych opatrunkach, przeznaczonych do leczenia przewlekłych ran z dużym wysiękiem. W obszarze wykorzystania CB do zastosowań biomedycznych, uczestniczyłem również w **projekcie badawczo-rozwojowym (BR)** mającym na celu opracowanie wysokowydajnego materiału filtracyjnego. Efektem podjętych prac było opracowanie unikalnego materiału filtracyjnego na bazie CB, modyfikowanej przez niskociśnieniową plazmę argonową. Materiał ten wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwwirusowe, zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*), jak i Gram-ujemnych (*Escherichia coli*) i bakteriofaga $\Phi 6$. Jednocześnie nie stwierdzono jego cytotoksyczności w stosunku do mysich fibroblastów, potwierdzając bezpieczeństwo opracowanego materiału filtracyjnego. Cechy te kwalifikują opracowany biomateriał do wykorzystania go jako środek ochrony indywidualnej układu oddechowego, np. w postaci masek chirurgicznych czy też wkładów do masek oddechowych wielokrotnego użytku. Co więcej zastosowany nisko odpadowy proces produkcyjny CB z wykorzystaniem substratów odpadowych z przetwórstwa rolno-spożywczego, proste oczyszczanie, proces formowania i funkcjonalizacji materiału filtracyjnego sprawia, **że opracowana technologia ma duży potencjał aplikacyjny [P4, ZP1, ZP2]**. W zakresie przydatności CB w procesach biotechnologicznych, brałem udział w badaniach nad jej wykorzystaniem jako nośnika dla komórek mikroorganizmów, takich jak drożdże o wysokim znaczeniu przemysłowym, w tym *Saccharomyces cerevisiae* i *Yarrowia lipolytica* [P20]. W badaniach analizowano wpływ zmiennych parametrów materiałowych CB na skuteczność immobilizacji jak i parametrów operacyjnych otrzymanych układów. Jak wykazałem w pracach **H1 i H2**, czas hodowli ma istotny wpływ m.in. na stopień usieciowania, krystaliczność i inne właściwości materiałowe CB, co może mieć bezpośredni wpływ na stabilność i efektywność procesu unieruchamiania mikroorganizmów. Wydajność immobilizacji analizowanych drożdży, była dodatnio skorelowana m.in. z postępującym w czasie wzrostem całkowitej powierzchni czynnej membran CB, porowatości, średnicy porów, stopnia pęcznienia, zdolności do uwalniania wody i stopnia polimeryzacji. Jednocześnie nie stwierdzono istotnego wpływu efektywności immobilizacji na wodochłonność, a także stopień krystaliczności CB. Unieruchomione komórki drożdży

charakteryzowały się wysoką żywotnością, pozwalającą na dalsze wykorzystanie ich potencjału do produkcji metabolitów wtórnych o wysokim znaczeniu przemysłowym.

Podsumowując:

Omówione wyniki badań w większości o dużym znaczeniu aplikacyjnym wykazały nieograniczony potencjał celulozy bakteryjnej jako biopolimeru znajdującego wiele potencjalnych zastosowań w różnych gałęziach przemysłu. Opracowane metody modyfikacji CB w znaczącym stopniu rozszerzają możliwości stosowania tego biopolimeru.

6.1.2. Badania nad wpływem WPM na parametry procesowe procesów biotechnologicznych.

W obszarze zagadnienia związanego z aplikacyjnością wirującego pola magnetycznego uczestniczyłem w pracach badawczych związanych z opracowywaniem nowych typów reaktorów wspieranych WPM, do prowadzenia różnego rodzaju procesów biotechnologicznych. W wyniku tych prac opracowano wielofazowy reaktor typu AIR-Lift z pętlą zewnętrzną i generatorami WPM umieszczonymi w kolumnie wznoszącej i opadowej [W7, W10, W11]. Rozwiązanie to pozwoliło na znaczącą poprawę parametrów hydrodynamicznych, co przekładało się na skrócenie czasu mieszania w porównaniu do reaktora nie wspomaganego przez WPM. Zastosowanie generatorów WPM, prowadziło do wzrostu prędkości cieczy w kolumnie opadającej i powiązanej z nią średniej prędkości cyrkulacji cieczy. Wykazano również, że średni czas cyrkulacji i czas mieszania w czasie ekspozycji na WPM mają znacznie niższe wartości w porównaniu z konwencjonalnymi reaktorami typu AIR-Lift. **Opracowany reaktor był testowany pod kątem jego przydatności do produkcji hodowli startowych *K. xylinus* [P9]. Zastosowanie zmodyfikowanego reaktora pozwalało na uzyskanie inokulum o blisko 200-krotnie większej gęstości komórkowej w porównaniu do otrzymywanego tradycyjnymi metodami.** Kultury startowe charakteryzowały się wysoką aktywnością metaboliczną i stabilnością, bez obecności komórek bakteryjnych pozbawionych zdolności do syntezy CB. Ponadto, nie odnotowano istotnego wpływu nowego sposobu przygotowania hodowli startowych *K. xylinus* na efektywność syntezy CB, która kształtowała się na poziomie 7,26 g/L. CB otrzymana z inokulum wytworzonego z wykorzystaniem opracowanego reaktora charakteryzowała się również identycznymi

właściami materiałowymi jak CB produkowana z wykorzystaniem tradycyjnego sposobu przygotowywania hodowli startowych. Wpływ WPM na transfer masy analizowano również w reaktorach, w których stosowano tradycyjne rozwiązania konstrukcyjne reaktorów oparte o mieszanie mechaniczne lub pneumatyczne (kolumna barbotażowa) [P19, P23-P30]. Wyniki tych prac, podobnie jak dla opisanego powyżej reaktora AIR-Lift, potwierdziły korzystny wpływ WPM na efektywność procesu mieszania cieczy. Wykazano również istotny związek między czasem mieszania a zmodyfikowaną liczbą Reynoldsa, co można wykorzystać do ukierunkowanego modyfikowania parametrów procesu biotechnologicznego prowadzonego w reaktorach wspieranych WPM. Wykazano, że wartości czasu mieszania dla układu mieszającego wspieranego generatorem WPM, w zakresie najniższych liczb Reynoldsa są znacznie niższe, niż w reaktorach wykorzystujących mechanizm mieszający z turbiną Rushtona. Uzyskane wyniki wykazały również, że WPM pozwala na istotne zwiększenie wartości objętościowego współczynnika wnikania masy k_{La} w cieczach, takich jak woda destylowana, roztwór chlorku sodu i stosowanej **w produkcji celulozy bakteryjnej pożywki mikrobiologicznej** Hestrin-Scharmm (HS). Parametr ten jest kluczowy przy przewidywaniu optymalnych warunków dla procesu mieszania i napowietrzania w procesach prowadzonych z wykorzystaniem różnego rodzaju reaktorów. Wykazano, że wartość parametru k_{La} wzrasta proporcjonalnie do wartości indukcji magnetycznej i prędkości wprowadzania gazu/powietrza do układu. Stwierdzono, również, że jednostkowy wkład mocy wynikający z zastosowania WPM, między 60 a $160 \text{ W}\cdot\text{dm}^{-3}$ przy prędkości napowietrzania od $0,001$ do $0,005 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, pozwalana na podwyższenie wartości współczynnika k_{La} , **6-krotnie w przypadku wody destylowanej i 5-krotnie w przypadku medium HS**. Szybkość transferu składników odżywczych i tlenu, są czynnikami modulującymi tempo wzrostu wielu grup drobnoustrojów, wytwarzających istotne dla przemysłu metabolity wtórne. Wyniki badań jednoznacznie wykazały, że WPM może wpływać na proces wymiany masy w pożywce hodowlanej. Biorąc pod uwagę, że WPM indukuje wyższe rozproszenie fazy gazowej (mniejsze rozmiary bąbelków, wzrost prędkości w układach gaz-ciecz), może z powodzeniem być stosowane w zwiększaniu efektywności różnego rodzaju procesów biotechnologicznych prowadzonych w reaktorach.

Podsumowując:

Możliwość zmiany parametrów WPM pozwala na optymalizację transferu gazu do cieczy w zależności od specyfiki danego procesu biotechnologicznego. Ponadto, ekspozycja na WPM jest doskonałą alternatywą dla mieszania mechanicznego zwłaszcza w procesach biotechnologicznych, gdzie kluczowym jest zapewnienie wysokich wartości współczynników wymiany gaz-ciecz. Co więcej ograniczenie intensywności lub eliminacja mieszania mechanicznego, zmniejsza potencjalnie niekorzystny wpływ sił ścinających w mediach hodowlanych, często charakteryzujących się wysoką gęstością i lepkością, nie zakłócając tym samym wzrostu mikroorganizmów.

6.1.3. Badania nad wpływem WPM na parametry katalityczne i operacyjne enzymów.

WPM można rozpatrywać jako czynnik fizyczny mogący potencjalnie wpływać na aktywność i niektóre parametry operacyjne biokatalizatorów, takich jak enzymy. PM może zmieniać właściwości medium reakcyjnego i wpływać pośrednio na strukturę molekularną enzymu, modyfikując w ten sposób jego właściwości katalityczne i operacyjne. Ekspozycja na PM może również wpływać na energię kinetyczną elektronów, obecnych w niektórych stanach pośrednich aktu katalitycznego, co również może mieć wpływ zarówno na specyficzność i selektywność względem substratów, jak i efektywność katalityczną enzymów, co opisałem w monografii [M1]. W badaniach nad wpływem WPM na aktywność i parametry operacyjne enzymów, w których uczestniczyłem jako promotor pomocniczy, **odpowiadając m.in., za planowanie i nadzorowanie pracy doktoranta w zakresie analizy parametrów operacyjnych enzymów**, badane były dwie oksydoreduktazy o wysokim zaznaczeniu przemysłowym, jak lakaza z *Trametes versicolor* i peroksydaza z *Armoracia rusticana* (HRP) [P16, P18]. Wyniki przeprowadzonych badań wskazały, że WPM może korzystnie wpływać na aktywność lakazy. Stwierdzono istotny wzrost aktywności o 11%, 11% i 9% przy WPM generowanym prądem zmiennym o częstotliwości 10 Hz, 40 Hz i 50 Hz. Ekspozycja lakazy na WPM wpływała również na zwiększoną aktywność enzymu w szerszym zakresie pH oraz nieznaczące przesunięcie optimum pH z 4,0 do 4,5 (WPM, 20 Hz). W wyniku ekspozycji na WPM, stwierdzono również wzrost stabilności enzymu w zakresie niskich wartości pH, **co również było przedmiotem zgłoszeń patentowych zakończonych przyznaniem dwóch patentów**

[W4, W5]. W przypadku analizy wpływu WPM na właściwości katalityczne i operacyjne HRP stwierdzono, że długotrwała ekspozycja na WPM (8 godzin) nie wpływa istotnie na stabilność enzymu. Jednocześnie wykazano, że ekspozycja na WPM wpływała korzystnie na aktywność HRP w szerszym zakresie pH, zwiększając ją o 49% i 68% odpowiednio przy pH 6,5 i pH 7,0. Wpływ WPM na sprawność katalityczną HRP testowano w procesie degradacji antrachinowego barwnika Remazol Brilliant Blue R. Uzyskane wyniki potwierdziły możliwość wykorzystania WPM do zwiększania wydajności rozkładu barwników z wykorzystaniem tego biokatalizatora.

Podsumowując:

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie bioreaktorów wspomaganych przez WPM do kontroli parametrów operacyjnych biokatalizatorów może być skuteczną metodą zwiększania wydajności procesów biotechnologicznych opartych o różnego rodzaju enzymy.

6.1.4. Badania nad zastosowaniem cieczy jonowych i wysoko eutektycznych jako mediów reakcyjnych dla enzymów.

Jednym ze sposobów na kontrolowanie aktywności enzymów w procesach biotechnologicznych jest modyfikowanie warunków środowiskowych mogących zmieniać specyficzność, **selektywność a także stabilność enzymów**. Istotnym jest tu skład medium reakcyjnego, który powinien gwarantować łatwość homogennej dyspersji substratów, a także nie wpływać negatywnie na strukturę enzymów. W większości układów medium reakcyjne oparte jest o wodę, co wynika z samej natury białek enzymatycznych „zaprojektowanych” do tego rodzaju środowiska. Jednakże brak możliwości rozpuszczania niektórych substratów o niskiej polarności, ogranicza możliwości stosowania enzymów. Jednym z możliwych sposobów na rozwiązanie tego problemu jest zastosowanie **cieczy jonowych (CJ) lub cieczy głęboko eutektycznych (DES)**. Podstawową zaletą tego rodzaju rozpuszczalników jest ich organiczny charakter, a substraty do ich syntezy można pozyskać ze źródeł odnawialnych, co również wpływa na łatwość ich biodegradacji. W badaniach nad właściwościami tego rodzaju substancji, w których brałem czynny udział **jako promotor pomocniczy i ekspert w zakresie enzymologii**, analizowano wpływ nowego rodzaju CJ opartych na naturalnych aminokwasach jako anionu i tetraetyloaminy jako kationu. Otrzymane ciecze jonowe w większości

charakteryzowały się wysokim potencjałem do inhibicji aktywności stosowanych w wielu gałęziach przemysłu proteaz, takich jak papaina, bromelanina i subtylizyna. Efekt ten był zależny od rodzaju aminokwasu użytego do syntezy CJ jak i właściwości katalitycznych analizowanych enzymów [P3]. W kolejnych badaniach, wykazano natomiast możliwość wzmacniania aktywności β -galaktozydazy wykorzystując DES jako ko-rozpuszczalniki [P8, P17]. Enzym ten zyskał szczególne znaczenie w przetwórstwie produktów mlecznych o niskiej zawartości laktozy, jak i produkcji galaktooligosacharydów (GOS) o właściwościach prebiotycznych, obecnie istotnego składnika humanizowanego mleka zastępczego dla noworodków i niemowląt. W zależności od rodzaju anionu zastosowanego do syntezy DES, obserwowany ich wpływ na aktywność enzymu był różny, począwszy od silnej inhibicji lub też kilkukrotnego wzrostu aktywności. W przypadku β -galaktozydazy wykazano, że octan choliny jako anion organiczny nie ma istotnego wpływu na aktywność enzymu, natomiast DES na bazie chlorku choliny mogą niemal trzykrotnie zwiększać aktywność enzymu. Oprócz krótko łańcuchowych kwasów karboksylowych, jako potencjalny składnik DES, analizowany był ester kwasu lewulinowego i choliny. W przypadku zastosowania jako ko-rozpuszczalnika DES składające się z lewulinianu choliny: glikolu etylenowego, stwierdzono również ponad trzykrotnie wyższą wydajność hydrolizy laktozy przez β -galaktozydazę. W rozwinięciu badań nad możliwością zastosowania DES w biokatalizie **opracowano szereg mieszanin** o niskiej temperaturze przejścia na bazie czwartorzędowej soli amoniowej mleczanu choliny i testowano je jako media dla reakcji trans-estryfikacji katalizowanej przez lipazę B z *Candida antarctica* (CALB). Najlepsze wyniki uzyskano dla Ch[Lac]:Gly:EthGly, która nie wpływała istotnie na stabilność enzymu, pozwalając na prowadzenie modelowej reakcji transestryfikacji propinonianu propylu i 1-butanolu z 98% wydajnością przy wysokiej czystości otrzymywanych estrów [P6].

Podsumowując:

Wynikiem przeprowadzonych badań było opracowanie szeregu cieczy jonowych i cieczy głęboko eutektycznych o wysokim potencjale aplikacyjnym w procesach biotechnologicznych, jako ko-rozpuszczalniki lub media dające możliwość regulacji efektywności biokatalizatorów.

6.1.5. Badania nad wpływem czynników środowiskowych i żywieniowych na homeostazę redoks organizmów zwierząt wolnożyjących i gospodarskich.

W kolejnym obszarze badawczym będącym obiektem moich zainteresowań, zwłaszcza w początkowym okresie rozwoju kariery naukowej po uzyskaniu stopnia doktora, były zagadnienia związane z wpływem uwarunkowań środowiskowych na sprawność wybranych szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za adaptację zwierząt wolnożyjących i gospodarskich do środowiska bytowania. W moich badaniach dotyczących tego zagadnienia koncentrowałem się na analizie oddziaływania różnego rodzaju czynników biotycznych i abiotycznych na aktywność enzymów wchodzących w skład wewnątrzkomórkowego systemu antyoksydacyjnego, którego komponenty są wiarygodnymi markerem biochemicznymi pozwalającymi na ocenę stanu środowiska i jego wpływu na dobrostan zwierząt, a w dalszej perspektywie także człowieka. W publikacjach [P31, P32] wykazałem, że w zależności od środowiska bytowania ryb z gatunku *Tinca tinca*; *Silurus glanis*; *Acipenser ruthenus* i przede wszystkim stopnia antropopresji oraz związanego z tym obciążenia ekosystemów wodnych różnego rodzaju zanieczyszczeniami, głównie związanymi z wielkoskalową produkcją przemysłową czy wytwarzaniem energii, aktywność enzymów antyoksydacyjnych może odzwierciedlać wpływ tych czynników na ryby wolnożyjące jak i utrzymywane w różnych systemach hodowlanych. Przeprowadzone badania potwierdziły hipotezę zakładającą zróżnicowaną odpowiedź elementów systemu antyoksydacyjnego odpowiedzialnych za utrzymywanie homeostazy redoks w osoczu krwi analizowanych gatunków ryb na identyczne warunki chowu, a także zbliżony skład paszy. **Ponadto, w kontekście aplikacyjności przeprowadzonych badań, wskazano jednoznacznie na konieczność optymalizacji składu paszy wynikającą z różnych wymagań pokarmowych badanych gatunków ryb.**

Wpływ uwarunkowań środowiskowych na status antyoksydacyjny tkanek i narządów zwierząt analizowałem również w przypadku zwierząt dziko żyjących. W badaniach tych koncentrowałem się głównie na tkance wątrobowej dzika (*Sus scrofa*), jelenia europejskiego (*Cervus elaphus*) i zająca szaraka (*Lepus europaeus* L), ze szczególnym uwzględnieniem roli pierwiastka śladowego selenu. W odróżnieniu od zwierząt gospodarskich, które mają zapewnioną zoptymalizowaną paszę, adekwatnie do systemu chowu i dalszego przeznaczenia

pozyskiwanego surowca, zwierzęta wolno żyjące narażone są na niedobory kluczowych dla metabolizmu pierwiastków śladowych **[P34]**. Pierwiastki te są często koenzymami, enzymów będących kluczowymi elementami wielu szlaków metabolicznych, w tym odpowiedzialnych za utrzymywanie równowagi redoks. Zróżnicowanie potencjału siedlisk w kontekście dostępności niektórych pierwiastków śladowych, w tym selenu, została potwierdzona pośrednio w badaniach mających na celu sprawdzenie zawartości Se w tkankach roślin z różnych regionów Polski, Litwy i Ukrainy, a także powiązanego z tym czynnikiem potencjału antyoksydacyjnego **[P44, P45]**. W wątrobach zajęcy w sezonie zimowym stwierdziłem istotnie wyższą zawartość selenu w porównaniu do sezonu wiosennego. Poziomy te były znacząco niższe od wcześniej podawanych i uważanych za świadczące o niedoborze tego pierwiastka śladowego w organizmie zajęcowatych. Nie przełożyło się to jednak istotnie na aktywność seleno-zależnej peroksydazy glutationowej (SeGSHPx). Dodatkowo, nie odnotowałem istotnych różnic w zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych czy też ich frakcji w tkance wątrobowej. Natomiast stwierdziłem istotne różnice w korelacjach między aktywnością analizowanych enzymów antyoksydacyjnych a poszczególnymi kwasami tłuszczowymi i ich frakcjami w zależności od pory roku. Różnice te zapewne miały ścisły związek z wyższym zróżnicowaniem składu diety zwierząt wolno żyjących w okresie wiosennym, która w tym czasie zawiera zwiększoną ilość substancji o charakterze antyoksydacyjnym niż w sezonie zimowym **[P35]**. W przypadku jeleni, pomimo stwierdzenia niskiego stężenia selenu w wątrobie zwłaszcza w okresie letnim, również nie odnotowałem bezpośredniego wpływu tego czynnika na aktywność SeGSHPx **[P39]**. W wątrobach analizowanych dzików niezależnie od pór roku również, jak u poprzednich analizowanych gatunków, był daleki od optymalnego przy czym najwyższą jego akumulację stwierdzono wiosną, a najniższą w okresie zimy **[P36]** [28]. W odróżnieniu od analizowanych wątroób zajęcy i jeleni miało to również odzwierciedlenie w aktywności SeGSHPx, która była najwyższa w sezonie wiosennym a najniższa zimą. W przypadku bydła mlecznego okresowe zróżnicowanie w zapotrzebowaniu na Se związane ze specyfiką metaboliczną cyklu laktacyjnego, ma również odzwierciedlenie w zawartości tego pierwiastka w surowicy krwi zwierząt i aktywności seleno-zależnych enzymów, takich jak SeGSHPx **[P38]**. Wyniki tych badań wskazały na istotne znaczenie odpowiedniej suplementacji Se w zależności od cyklu laktacyjnego u krów mlecznych. Ponadto, w pracy **[P37]** wykazano również istotne znaczenie obecności niektórych ksenobiotyków, jak np. polichlorowane bifenyle (PCB) i ich pochodne, których obecność w środowisku była istotnie skorelowana

z poziomem aktywności transferazy glutationowej (GST). Zmieniające się warunki, takie jak dostępność bogatego w substancje odżywcze pożywienia a przede wszystkim wyższe zapotrzebowanie energetyczne niezbędne do utrzymywania właściwej temperatury ciała, nasila tempo niektórych przemian metabolicznych, a także wzrost stężenia różnego rodzaju substancji wolnorodnikowych, w tym reaktywnych form tlenu. Biorąc pod uwagę, że niskie stężenie Se może wpływać na wydajność systemu obrony antyoksydacyjnej, brak wyraźnych różnic świadczy o wysokiej zdolności adaptacyjnej zwierząt wolno żyjących, bytujących w środowisku o niskiej dostępności istotnych dla metabolizmu pierwiastków śladowych. W obszarze badań nad wpływem dostępności związków odżywczych w pożywieniu, brałem również udział w badaniach nad wpływem składu diety na zawartość Se w tkance mózgowej, osoczu krwi i jądrach szczurów, których dieta oparta była o sacharozę w połączeniu z suplementacją witaminami: B1, B2, B6 i niacyną, w wartościach optymalnych i ponadnormatywnych [P47, P48]. Skład podawanej zwierzętom paszy, miał z założenia symulować model współczesnej diety zachodniej, o ograniczonej zawartości substancji odżywczych, często suplementowanej witaminami i mikroelementami. Przeprowadzone badania wskazały, że ponadnormatywna suplementacja niektórymi witaminami może negatywnie wpływać na stężenie Se w osoczu krwi szczurów jednak nie ma większego znaczenia na jego zawartość w jądrach. W odpowiedzi na zwiększoną podaż analizowanych witamin odnotowano zwiększony poziom enzymów antyoksydacyjnych (SeGSHPx i GST). Wzrost aktywności tych enzymów odnotowano również w tkance mózgowej. Jednakże nie stwierdzono, istotnych zmian statusu antyoksydacyjnego. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że nadmierna suplementacja witaminami z grupy B i niacyny w diecie bogatej w sacharozę, może prowadzić do zwiększenia aktywności komórkowej obrony antyoksydacyjnej mózgu i jądrach zwierząt. Jednakże w szerszym kontekście, również odnoszącym się do aktualnych trendów żywieniowych społeczeństw wysoko rozwiniętych, wyniki te wskazują na wysokie znaczenie właściwej suplementacji witaminami, która w nadmiarze może zaburzać przyswajanie niektórych pierwiastków śladowych, takich jak Se i prowadzić do zaburzenia homeostazy redoks. Zagadnienie dotyczące wpływu czynników zewnętrznych na homeostazę redoks wątroby analizowane było przeze mnie również u przepiórek japońskich (*Coturnix japonica*), gdzie badałem wpływ dodatku do paszy suszu ziołowego tymianku, rozmarynu i szałwii (1% w/w) w połączeniu z siemieniem lnianym (4% w/w) [P40]. Wprowadzenie wymienionych dodatków, miało na celu polepszenie statusu

antyoksydacyjnego paszy i korzystnie wpływać na system antyoksydacyjny w analizowanym narzędziu, końcowo przekładając się na polepszanie dobrostanu zwierząt oraz ich cech użytkowych. W porównaniu do zwierząt skarmianych paszą bez dodatków, stwierdziłem znaczące zwiększanie statusu antyoksydacyjnego, tylko w wątrobach samców skarmianych paszą z dodatkiem samego siemienia lnianego. Ponadto, dodanie suszu tymianku wzmacniało ten efekt, czego nie stwierdziłem w przypadku dodatku rozmarynu i szalwii. W kolejnych badaniach związanych z wpływem żywienia na wartości użytkowe zwierząt hodowlanych, brałem udział w analizie wpływu kombinacji dodatków do pasz, takich jak witamina C, ekstrakt czosnkowy o wysokiej zawartości allicyny (10%) w połączeniu z preparatami pro-biotycznymi na wartości odżywcze wieprzowiny. Dodatki witaminowe i ekstrakty roślinne miały na celu zwiększenie/polepszenie statusu antyoksydacyjnego bazowej paszy. Natomiast dodatek pro-biotycznych hodowli bakterii i drożdży w założeniu powinien korzystnie wpływać na mikroflorę jelitową pozwalając również na ograniczanie konieczności stosowania antybiotyków, a końcowo na profil kwasów tłuszczowych mięsa. W wyniku zastosowania kompleksowej suplementacji, w otrzymywanym mięsie, stwierdzono podwyższoną zawartość kwasu trikozanowego, heptadekanoidowego, eikozanowego i eikozatrienowego. Ponadto, stosunek kwasów C18:2 n-6/C18:3 n-3 był istotnie wyższy. Otrzymany surowiec charakteryzował się zatem lepszymi wartościami odżywczymi, co korzystnie wpływa na zdrowie konsumenta [P41].

Podsumowując:

Wyniki opisanych badań potwierdziły istotny wpływ uwarunkowań środowiskowych na analizowane komponenty układu obrony antyoksydacyjnej tkanek zwierząt. Ponadto, badania te wykazały użyteczność analizy wybranych elementów obrony antyoksydacyjnej jako wiarygodnych markerów biochemicznych pozwalających na ocenę stanu środowiska i jego wpływu na dobrostan zwierząt, a w dalszej perspektywie także człowieka.

6.2.1. Działalność dydaktyczna.

Od początku pracy na stanowisku adiunkta prowadzę zajęcia dydaktyczne jako nauczyciel akademicki na podstawie opracowanych samodzielnie programów kursów z zakresu **chemii, biochemii, enzymologii, jak: Inżynieria enzymowa, Inżynieria białek, Zastosowanie enzymów w przemyśle spożywczym, Enzymologia praktyczna**, a także

innych specjalistycznych przedmiotów powiązanych z enzymami i szeroko pojętą biotechnologią dla studentów kierunków **biotechnologia, biologia, bioinformatyka nanobioinżynieria**. Oprócz wymienionych wyżej kursów, opracowałem również treści programowe i materiały dydaktyczne do prowadzenia kursów w języku angielskim dla studentów w ramach programu **Erasmus+** oraz **POWER** jak; **Industrial enzymology, Molecular modeling of enzymes**.

W ramach współpracy z centrum doskonalenia **zawodowego C&Q Bildungszentrum Haberhauffe GmbH, w Berlinie**, przeprowadziłem warsztaty w języku angielskim z zakresu wybranych metod bioinformatycznych w analizie struktury i funkcji białek, a także przygotowałem dedykowane materiały do szkoleń e-learningowych. Jestem również współautorem skryptu w zakresie współczesnych metod **Inżynierii enzymowej i Nanobioinżynierii [M2]**.

W latach **2011-2015**, pełniłem także funkcje opiekuna roku, kierunku biologia i bioinformatyka. W latach **2017-2019**, brałem udział w pracach Wydziałowej komisji programowej dla kierunku biotechnologia aktywnie uczestnicząc w dostosowaniu programu nauczania.

Do dnia składania wniosku, byłem promotorem **11** prac inżynierskich i **11** magisterskich a także **promotorem pomocniczym** w **5** przewodach doktorskich otwartych na macierzystej Uczelni, a także poza nią na **Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**. Zakres przewodów doktorskich, w których pełniłem funkcje promotora pomocniczego obejmował analizę wpływu wirującego pola magnetycznego na aktywność wybranych oksydoreduktaz w formie rozpuszczalnej i immobilizowanej, modyfikacje celulozy bakteryjnej białkami enzymatycznymi pochodzenia mikrobiologicznego i bakteriofagowego o aktywności antybiofilmowej, analizę wpływu cieczy eutektycznych na aktywność niektórych lipaz i hydrolaz glikozydowych oraz zastosowania aminokwasowych cieczy jonowych jako medium w katalizie enzymatycznej i procesie modyfikacji celulozy bakteryjnej. Jako **promotor pomocniczy** brałem udział w ustalaniu koncepcji i zakresu badań, sprawowałem kontrolę nad poprawnością i zasadnością wykonywanych analiz właściwości badanych enzymów, procesu przygotowywania nośników (modyfikacji celulozy bakteryjnej itp.), poprawną interpretacją otrzymywanych wyników, nadzorowaniem przygotowania publikacji. Wymiernym efektem sprawowanej przeze mnie funkcji promotora pomocniczego są liczne publikacje doktorantów

w czasopismach z indeksowanych w bazie danych JCR, w których w większości jestem autorem **korespondencyjnym [P1, P2, P3, P6, P7, P8, P15, P16, P17, P18, P21, P22]**.

W swojej pracy dydaktycznej **miałem możliwość zaplanowania i nadzorowania** długoterminowego **(01-06. 2011)** stażu naukowo-badawczego doktorantki z **Wydziału Rolniczego Uniwersytetu w Bagdadzie, Irak**, w zakresie optymalizacji procesu produkcji, oczyszczania, a także charakterystyki enzymów pektynolitycznych wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Wyniki uzyskane podczas stażu stanowiły istotną część obronionej przez stażystkę pracy doktorskiej.

Pełniłem również funkcje **opiekuna naukowego (08.2022 – 02.2023) w projekcie stypendialnym „Szkoła Orłów” ZUT** dla wybitnie uzdolnionych studentów, realizowanym w ramach **Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój**, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

Nadzorowałem również długoterminowe staże naukowo-badawcze **8** studentów zagranicznych (Brazylia, Chiny, Indie, Japonia, Portugalia, Serbia) w ramach programu **IAESTE** (The International Association for the Exchange of Students for Technical Experience) a także **2** studentów i doktorantów w ramach programu **Erasmus+** (Turcja, Czechy).

Od początku swojej pracy na stanowisku adiunkta, jestem również **opiekunem założonego z mojej inicjatywy w latach studenckich, utytułowanego Studenckiego Koła Naukowego Enzymologów**, którego członkowie biorąc udział w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych zdobyli wiele nagród głównych i wyróżnień wskazujących na wysoki poziom i nowatorstwo prowadzonych przez nich badań.

6.3. Popularyzowanie nauki.

W ramach upowszechniania nauki wygłosiłem kilka autorskich wykładów popularnonaukowych oraz przeprowadziłem szereg zajęć pokazowych i warsztatów dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych (Licealista w Świecie Nauki), z zakresu biotechnologii, enzymologii stosowanej, inżynierii materiałowej i enzymowej, mające na celu przybliżyć znaczenie enzymów i biopolimerów w procesach biologicznych i dla współczesnego świata (**załącznik 4. 7.3**).

6.4. Działalność organizacyjna.

1. W latach **2010-2015**, pełniłem funkcje pełnomocnika Dziekana Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, ZUT w Szczecinie ds. Funduszy Europejskich.
2. W latach **2015-2017** byłem członkiem Rady Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, ZUT w Szczecinie a także Rady dyscypliny Zootechnika i Rybactwo w latach **2019-2020**.
3. W roku **2023** zostałem wybrany do Rady Dyscypliny Inżynieria Materiałowa, ZUT w Szczecinie.
4. W latach **2017-2022** uczestniczyłem w pracach Wydziałowej komisji ds. oceny nauczycieli akademickich.
5. W roku **2010** byłem **członkiem komitetu organizacyjnego ogólnopolskiej konferencji „Nauki Przyrodnicze we Współczesnym Świecie”**, organizowanej przez Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, gdzie odpowiadałem za organizację i nadzorowanie przebiegu Sesji Młodych Naukowców.
6. W roku **2015** byłem **członkiem komitetu organizacyjnego ogólnopolskiej konferencji „The contribution of the natural sciences to the development of politics of sustainable development of agriculture”** The 60th anniversary of Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry international scientific conference, Szczecin, Polska, gdzie brałem udział w pracach komitetu naukowego konferencji w zakresie oceny merytorycznej nadsyłanych zgłoszeń konferencyjnych.
7. W roku **2017** zostałem również zaproszony do uczestnictwa w **komitecie naukowym międzynarodowej konferencji “The 4th Workshop on Microbiology in Health Care and Environmental Protection MIKROBIOT 2017”** w Łodzi. Jako członek komitetu naukowego brałem udział w pracach komisji konkursowej podczas sesji posterowej.

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

7.1. Współpraca z otoczeniem biznesowym.

Od roku 2014 współpracuję z firmą **BBH Biotech Sp. z o. o**, która zajmuje się opracowywaniem i wdrażaniem rozwiązań biotechnologicznych dla różnego rodzaju gałęzi

przemysłu. W ramach współpracy z BBH Biotech Sp. Z.o.o, zajmowałem się doradztwem, a także uczestniczyłem w projektach, jako ekspert w zakresie analiz i stosowania enzymów w procesach przemysłowych. Podjąłem również współpracę z siecią laboratoriów badawczych **J.S. Hamilton Polska Sp. z o. o**, w zakresie doradztwa, a także wykonywania analiz aktywności różnego rodzaju enzymów o znaczeniu przemysłowym.

7.2. Szkolenia i kursy.

Niezbędne umiejętności do mojej pracy naukowej jak i dydaktycznej poszerzałem aktywnie podczas szkoleń i warsztatów odbywających się zarówno w macierzystej Uczelni, jak i poza nią. Podczas szkoleń zdobyłem umiejętności pozwalające na efektywną pracę systemami FPLC do oczyszczania i analiz białek enzymatycznych, różnego rodzaju systemami do elektroforezy białek enzymatycznych. Uczestniczyłem również w szkoleniach z zakresu technik spektroskopii FTIR (fourierowska w podczerwieni) i Ramana, a także wysokosprawnej chromatografii cieczonej sprzężonej z spektrometrem masowym, czy też cytometrii przepływowej (**załącznik 4, 11.2**).

7.3. Wyróżnienia i nagrody.

W roku **2020** zostałem **laureatem konkursu „Zachodniopomorskich Nobli”**, za prace nad nośnikami **na bazie celulozy bakteryjnej do immobilizacji mikroorganizmów i biokatalizatorów**. Wyróżnienie jest przyznawane przez kapitułę **Zachodniopomorskiego Klub Liderów Nauki** we współpracy z Urzędem Marszałkowskim Województwa Zachodniopomorskiego, Urzędem Miasta Szczecin i Zachodniopomorskim Urzędem Wojewódzkim. Moja aktywność naukowa została również doceniona przez władze Uczelni czego wyrazem było przyznanie nagród za aktywność naukową;

- 1. Nagroda I stopnia J.M Rektora ZUT w Szczecinie, w 2020r.**
- 2. Nagroda II stopnia J.M Rektora ZUT w Szczecinie, w 2021r.**
- 3. Nagroda II stopnia J.M Rektora ZUT w Szczecinie, w 2019r.**
- 4. Nagroda III stopnia J.M Rektora ZUT w Szczecinie, w 2018 r.**

7.4. Dorobek naukowy w liczbach – podsumowanie.

Na dzień składania wniosku mój dorobek naukowy **obejmuje łącznie 56 oryginalnych** prac twórczych opublikowanych w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR), **współautorstwo 2 monografii naukowych** oraz **12** przyznanych patentów krajowych i **2** zgłoszeń patentowych. Od początku swojej kariery naukowej uczestniczyłem w realizacji **6** projektów badawczych i badawczo-wdrożeniowych (**załącznik 4, 9**). W projekcie badawczym **Miniatura II jako kierownik**, realizowałem badania, które dotyczyły wpływu wirującego pola magnetycznego na procesy transportowe białek enzymatycznych w membranach celulozowych pochodzenia bakteryjnego. W kolejnym z projektów w ramach programu **OPUS** (NCN) dotyczącym wpływu cieczy eutektycznych na mikroorganizmy i enzymy **byłem głównym ekspertem** w zakresie analiz enzymatycznych. W kolejnych projektach, m.in: **OPUS** (NCN), **LIDER 5** (NCBiR) dotyczących wpływu pola magnetycznego na procesy fermentacyjne w hodowlach *K. xylinus* a także antybiotykooporność bakterii, **pełniłem rolę wykonawcy**, a także eksperta z zakresu enzymologii i inżynierii materiałowej w zakresie materiałów opartych na celulozie bakteryjnej. Uczestniczyłem też w **2** projektach **badawczo-rozwojowych** w ramach **Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Zachodniopomorskiego**, w których **pełniłem rolę wykonawcy**, a także **eksperta** z zakresu enzymologii i inżynierii materiałowej dotyczącej materiałów opartych na celulozie bakteryjnej. Efektem tych projektów jest opracowanie wysokowydajnych materiałów filtracyjnych na bazie celulozy bakteryjnej. Wyniki prowadzonych przeze mnie badań, a także osiągnięcia zespołów badawczych, z którymi współpracuję, były przedstawione na wielu konferencjach krajowych i międzynarodowych, w formie wystąpień ustnych i plakatów naukowych (**załącznik 4, 7**).

Na dzień 26.09.2023, sumaryczny Impact Factor publikacji naukowych, których jestem współautorem (zgodny z rokiem opublikowania Journal Citation Reports) wynosi 207,63. Łączna suma punktów według listy czasopism MEiN do roku 2019 wynosi 930, po 2019 roku 2210 (sumarycznie 3140). Publikacje naukowe, których jestem współautorem były cytowane 527 razy (bez własnych autocytowań, Web of Science), a mój aktualny indeks Hirsha wynosi 14 (bez własnych autocytowań). W 8 pracach jestem pierwszym autorem, w 20 autorem korespondencyjnym. Zestawienie dorobku naukowego przed zdobyciem stopnia doktora i po przedstawione zostało w tabeli 1.

Tabela 1. Zestawianie dorobku naukowego przed i po uzyskaniu stopnia doktora.

Dorobek naukowy	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z listy JCR	0	56^{abc}
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z poza listy JCR	2	0
Sumaryczny IF zgodnie z rokiem opublikowania	0	207,63
Punkty MEiN	30 (do 01. 2010)	930 (do 07. 2019) 2210 (2022)
Monografie lub rozdziały w monografiach	1	2
Czynne uczestnictwo w konferencjach naukowych		
- krajowych	3	7
- międzynarodowych	1	8
- zagraniczne on-line		2
Komunikaty naukowe prezentowane w formie posterów na konferencjach		
- krajowych	1	30
- międzynarodowych	1	15
Przyznane patenty krajowe	0	12
Zgłoszenia patentowe	0	2
Realizacja projektów badawczych		
- kierowanie projektami badawczymi	0	1
- wykonawstwo w projektach badawczych NCN	0	3
- wykonawstwo w projektach B+R	0	2
Recenzje artykułów naukowych	0	110

a-Ilość prac jako pierwszy autor - 8

b-Ilość prac jako autor do korespondencji - 20

c-Ilość prac jako ostatni autor – 8

8. Piśmiennictwo

1. Bianchet, R.T.; Vieira Cubas, A.L.; Machado, M.M.; Siegel Moecke, E.H. Applicability of bacterial cellulose in cosmetics - bibliometric review. *Biotechnology Reports* **2020**, *27*, e00502, doi:10.1016/j.btre.2020.e00502.
2. Almeida, T.; Silvestre, A.J.D.; Vilela, C.; Freire, C.S.R. Bacterial Nanocellulose toward Green Cosmetics: Recent Progresses and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22062836.
3. Jacek, P.; Dourado, F.; Gama, M.; Bielecki, S. Molecular aspects of bacterial nanocellulose biosynthesis. *Microb. Biotechnol.* **2019**, *12*, 633–649, doi:10.1111/1751-7915.13386.
4. Römling, U.; Galperin, M.Y. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 545–557, doi:10.1016/j.tim.2015.05.005.
5. Ryngajło, M.; Jędrzejczak-Krzepkowska, M.; Kubiak, K.; Ludwicka, K.; Bielecki, S. Towards control of cellulose biosynthesis by *Komagataeibacter* using systems-level and strain engineering strategies: current progress and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 6565–6585, doi:10.1007/s00253-020-10671-3.
6. Florea, M.; Hagemann, H.; Santosa, G.; Abbott, J.; Micklem, C.N.; Spencer-Milnes, X.; Arroyo Garcia, L. de; Paschou, D.; Lazenbatt, C.; Kong, D.; et al. Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose-producing strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E3431-40, doi:10.1073/pnas.1522985113.
7. Jin, K.; Jin, C.; Wu, Y. Synthetic biology-powered microbial co-culture strategy and application of bacterial cellulose-based composite materials. *Carbohydrate Polymers* **2022**, *283*, 119171, doi:10.1016/j.carbpol.2022.119171.
8. Production and applications of cellulose nanomaterials; TAPPI Press: Peachtree Corners, 2013, ISBN 9781595102249.
9. Ul-Islam, M.; Khan, T.; Park, J.K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *88*, 596–603, doi:10.1016/j.carbpol.2012.01.006.
10. Tahara, N.; Yano, H.; Yoshinaga, F. Two types of cellulase activity produced by a cellulose-producing *Acetobacter* strain. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1997**, *83*, 389–392, doi:10.1016/S0922-338X(97)80148-1.
11. Oh, S.Y.; Yoo, D.I.; Shin, Y.; Kim, H.C.; Kim, H.Y.; Chung, Y.S.; Park, W.H.; Youk, J.H. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2376–2391, doi:10.1016/j.carres.2005.08.007.
12. Maréchal, Y.; Chanzy, H. The hydrogen bond network in I β cellulose as observed by infrared spectrometry. *Journal of Molecular Structure* **2000**, *523*, 183–196, doi:10.1016/S0022-2860(99)00389-0.
13. O'Connor, R.T.; DuPré, E.F.; Mitcham, D. Applications of Infrared Absorption Spectroscopy to Investigations of Cotton and Modified Cottons. *Textile Research Journal* **1958**, *28*, 382–392, doi:10.1177/004051755802800503.
14. Nelson, M.L.; O'Connor, R.T. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *J. Appl. Polym. Sci.* **1964**, *8*, 1325–1341, doi:10.1002/app.1964.070080323.

15. Liu, Y.; Thibodeaux, D.; Gamble, G. Characterization of attenuated total reflection infrared spectral intensity variations of immature and mature cotton fibers by two-dimensional correlation analysis. *Appl. Spectrosc.* **2012**, *66*, 198–207, doi:10.1366/11-06440.
16. Fernandes, I.d.A.A.; Pedro, A.C.; Ribeiro, V.R.; Bortolini, D.G.; Ozaki, M.S.C.; Maciel, G.M.; Haminiuk, C.W.I. Bacterial cellulose: From production optimization to new applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 2598–2611, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.255.
17. Mihoub, M.; El May, A.; Aloui, A.; Chatti, A.; Landoulsi, A. Effects of static magnetic fields on growth and membrane lipid composition of *Salmonella typhimurium* wild-type and dam mutant strains. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 259–266, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.017.
18. Brugnari, T.; Braga, D.M.; dos Santos, C.S.A.; Torres, B.H.C.; Modkovski, T.A.; Haminiuk, C.W.I.; Maciel, G.M. Laccases as green and versatile biocatalysts: from lab to enzyme market—an overview. *Bioresour. Bioprocess.* **2021**, *8*, doi:10.1186/s40643-021-00484-1.
19. Watanabe, A.; Morita, S.; Ozaki, Y. Temperature-dependent changes in hydrogen bonds in cellulose I α studied by infrared spectroscopy in combination with perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy: comparison with cellulose I β . *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2969–2975, doi:10.1021/bm700678u.
20. Liu, Y.; Chen, J.Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2016**, *31*, 553–567, doi:10.1177/0883911516637377.
21. Lee, K.-Y.; Quero, F.; Blaker, J.J.; Hill, C.A.S.; Eichhorn, S.J.; Bismarck, A. Surface only modification of bacterial cellulose nanofibres with organic acids. *Cellulose* **2011**, *18*, 595–605, doi:10.1007/s10570-011-9525-z.
22. Secundo, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6250–6261, doi:10.1039/c3cs35495d.
23. Bolivar, J.M.; Woodley, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 6251–6290, doi:10.1039/D2CS00083K.
24. Dinçer, A.; Becerik, S.; Aydemir, T. Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50*, 815–820, doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.11.020.
25. Nypelö, T.; Berke, B.; Spirk, S.; Sirviö, J.A. Review: Periodate oxidation of wood polysaccharides-Modulation of hierarchies. *Carbohydrate Polymers* **2021**, *252*, 117105, doi:10.1016/j.carbpol.2020.117105.
26. Majidi, S.; Sehrig, F.Z.; Farkhani, S.M.; Goloujeh, M.S.; Akbarzadeh, A. Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **2016**, *44*, 722–734, doi:10.3109/21691401.2014.982802.
27. Narang, S.B.; Pubby, K. Nickel Spinel Ferrites: A review. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2021**, *519*, 167163, doi:10.1016/j.jmmm.2020.167163.
28. Nowakowska, E.; Pilarczyk, B.; Pilarczyk, R.; Tomza-Marciniak, A.; Bąkowska, M.; Marciniak, A. Wild boars (*Sus scrofa*) as bioindicators of environmental levels of selenium in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* **2016**, *19*, 793–800, doi:10.1515/pjvs-2016-0100.

.....
(podpis wnioskodawcy)