

**V Konferencja Naukowa ENZYMOS**  
**Enzymy w nauce i przemyśle**

**Abstrakty**



# **V Konferencja Naukowa ENZYMOS**

## **Enzymy w nauce i przemyśle**

### **Abstrakty**

Redakcja:  
Izabela Mołdoch-Mendoń  
Kamil Maciąg

Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL  
Lublin 2021

**V Konferencja Naukowa ENZYMOS**  
**Enzymy w nauce i przemyśle**

5 lutego 2021 r.

**Abstrakty**

Redakcja:

Izabela Mołdoch-Mendoń

Kamil Maciąg

Skład i łamanie:

Monika Maciąg

Projekt okładki:

Marcin Szklarczyk

© Copyright by Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL

ISBN 978-83-66861-07-7

Wydawca:

Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL

ul. Głowackiego 35/348

20-060 Lublin

[www.fundacja-tygiel.pl](http://www.fundacja-tygiel.pl)

## **Komitet Naukowy:**

- **prof. dr hab. Ryszard Ostaszewski**, Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie
- **dr hab. inż. Janina Kabatc**, Zakład Chemii Organicznej, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy
- **dr Renata Bancercz**, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
- **dr Justyna Karkowska-Kuleta**, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński
- **dr inż. Marta Kuźmińska-Bajor**, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- **dr Jolanta Polak**, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

## **Komitet Organizacyjny:**

- Beata Bujalska
- Ewelina Chodźko
- Alicja Danielewska
- Monika Iwaniuk
- Kinga Kalbarczyk
- Kamil Maciąg
- Monika Maciąg
- Izabela Mołdoch-Mendoń
- Konrad Skrzątek
- Marcin Szklarczyk
- Paulina Szymczyk

## **Organizator:**



Fundacja  
**TYGIEL**

# Spis treści

## Wystąpienia Gości Honorowych

Nowe wyzwania w zastosowaniu enzymów do produkcji związków o wysokiej wartości dodanej (The new challenges in the application of enzymes for the production of compounds with high added value).....11

Wielofunkcyjność białek enzymatycznych (Multifunctionality of enzymatic proteins).....14

## Wystąpienia Uczestników

Badanie mechanizmów reakcji enzymatycznych metodami izotopowymi (Investigation of enzymatic reaction mechanisms using isotope methods) .....19

Biofilm *Salmonella* i rola bakteriofagów w jego eradykacji (*Salmonella* biofilm and role of bacteriophages in its eradication) .....21

Biokonwersja ksylozy i formaldehydu z zastosowaniem enzymatycznego reaktora membranowego (Bioconversion of xylose and formaldehyde with using enzymatic membrane reactor) .....23

Brakujący element – oczyszczanie dehydrogenazy L-fukozowej królika (Missing element – purification of rabbit L-fucose dehydrogenase) .....25

Enantioselektywna oraz stereozbieżna synteza (R)-lizofiliny na drodze rozdzielu kinetycznego katalizowanego lipazami oraz optycznej inwersji (Enantioselective and stereoconvergent syntheses of (r)-lisofylline via lipase-catalyzed kinetic resolution and optical inversion approach).....27

Enzymy celulolityczne jako innowacyjne modyfikatory celulozy (Cellulolytic enzymes as innovative cellulose modifiers) .....29

Ergotioneina – nowy, obiecujący antyoksydant w terapii chorób neurodegeneracyjnych (Ergothioneine – a new, promising antioxidant in the treatment of neurodegenerative diseases).....31

Farmakologia inhibitorów monoaminooksydazy (MAO) i ich zastosowanie w terapii depresji (Pharmacology of the monoamine oxidase inhibitors (MAOI) and their application in the treatment of depressions) .....33

Markery stresu oksydacyjnego (Oxidative stress markers) .....35

Mirozynaza jako problem analityczny w analizie związków lotnych kalarepy (Myrosinase as an analytical problem in the analysis of kohlrabi volatile compounds) .....37

Modelowanie procesów kluczowych dla bioaugmentacji – badanie interakcji fosfolipazy C oraz lipazy z modelowymi błonami komórek bakterii glebowych (Modeling the processes crucial for bioaugmentation – studying the interaction of phospholipase C and lipase with model bacterial membranes).....	39
Ocena efektywności procesu immobilizacji i aktywności katalitycznej lakazy z <i>Trametes versicolor</i> unieruchomionej na mezoporowatym Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Laccase from <i>Trametes versicolor</i> supported onto mesoporous Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : stability tests and evaluations of catalytic activity) .....	41
Oksydoreduktazy jako wszechstronny system enzymatyczny do asymetrycznej syntezy farmaceutycznej (Oxidoreductases as a versatile enzymatic system for pharmaceutical asymmetric synthesis and industry) .....	43
Projektowanie biosensorów warstwowych o możliwościach aplikacyjnych w diagnostyce medycznej (Designing of layered biosensors with application possibilities in medical diagnostics) .....	45
Tajemnicze oblicze BDH2, czyli charakterystyka biochemiczna reduktazy 4-okso-L-prolinowej (EC 1.1.1.104) (Mysterious face of the BDH2, or the biochemical characterization of 4-oxo-L-proline reductase (EC 1.1.1.104)) ...	47
Układ tlenkowy ZrO <sub>2</sub> -Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> jako uniwersalna platforma do immobilizacji enzymów oraz usuwania substancji farmaceutycznie aktywnej (ZrO <sub>2</sub> -Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> oxide system as an universal platform for enzyme immobilization and for removal of pharmaceutically active compounds).....	49
Układy biokatalityczne materiał elektroprzędzony – oksydoreduktaza jako narzędzia do usuwania 17β-estradiolu z roztworów wodnych (Electrospun material – oxidoreductase biocatalytic systems as tools for removing of 17β-estradiol from aqueous solutions) .....	51
Usuwanie 17α-etynyloestradiolu z roztworów wodnych z wykorzystaniem układu CaSiO <sub>3</sub> -lakaza (Removal of 17α-ethinylestradiol from aqueous solutions by CaSiO <sub>3</sub> -laccase system).....	53
Zastosowanie enzymów w dynamicznym rozdziale kinetycznym (Application of enzymes in dynamic kinetic separation).....	55
Zastosowanie preparatu Blossom Protect™ w enzymatycznej modyfikacji związków prochiralnych (Application of antifungal agent Blossom Protect™ in enzymatic transformation of prochiral compounds) .....	57
Indeks autorów.....	60



**Wystąpienia**  
**Gości Honorowych**



## **Nowe wyzwania w zastosowaniu enzymów do produkcji związków o wysokiej wartości dodanej**

*Prof. dr hab. Ryszard Ostaszewski, Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, 01-224 Warszawa, Kasprzaka 4/52*

Współczesne metody otrzymywania związków o wysokiej wartości dodanej takich jak chemikalia, polimery, leki, czy też kosmetyki wykroczyły już znacznie poza obszar tradycyjnie rozumianej chemii organicznej. Metody chemiczne, w których stosowane są klasyczne reagenty i katalizatory chemiczne rozwijane są w kierunku procesów spełniających wymagania zielonej chemii. Znaczący nacisk położony jest także na wykorzystywanie surowców pochodzących ze źródeł odnawialnych i nieobciążających środowiska naturalnego. Procesu, w których nie są wykorzystywane katalizatory chemiczne zastępowane są procesami katalizowanymi przez różnorodne katalizatory, wśród których coraz częściej stosowane są enzymy. Enzymy, jako naturalne katalizatory reakcji chemicznych wydają się być znakomitym kandydatami do miana idealnych katalizatorów. Ponieważ posiadają one strukturę białkową, są biodegradowalne, nie obciążają środowiska naturalnego, znakomicie katalizują chemo-, regio- i stereoselektywne reakcje chemiczne w bardzo łagodnych warunkach. Ponadto ich najwyższa aktywność katalityczna jest obserwowana zwykle w zakresie temperatur 20-80 stopni Celsjusza. Wysoka aktywność katalityczna enzymów i ich selektywność względem poszczególnych związków chemicznych może być dodatkowo łączona z możliwością stosowania ich w kaskadach różnych reakcji chemicznych, w których katalizują jedną lub więcej reakcji chemicznych. Tym samym możliwe jest opracowywanie i praktyczna realizacja nawet złożonych procesów syntezy w formie kaskad reakcji chemoenzymatycznych, w których z prostych substratów można uzyskać złożone produkty. Procesy takie są zdecydowanie bardziej opłacalne w przemyśle o ile są powtarzalne i spełniają wymagania technologiczne.

W ramach wykładu zostaną pokazane i mówione przykłady zastosowania enzymów do syntezy związków o wysokiej wartości dodanej. Poczynając od

procesów, w których enzymy wykorzystywane są prowadzenia jednej reakcji chemicznej, poprzez procesy dwuetapowe do kaskad chemoenzymatycznych reakcji, w których enzymy katalizują jedną bądź więcej reakcji chemicznych.

Badania nad zastosowaniem enzymów, jako biokatalizatorów reakcji chemicznych były finansowane z projektów Narodowego Centrum Nauki: Nr 2016/23/B/ST5/03307 „Chemoenzymatyczne kaskady reakcji multikomponentowych”; Nr 2014/14/M/ST5/00030 „Intensyfikacja reakcji multikomponentowych oraz kaskadowych w liposomach z zastosowaniem procesów katalizowanych enzymatycznie”; Nr 2013/11/B/ST5/02199 „Badania nad mechanizmem i zastosowaniem w syntezie chemoenzymatycznego przegrupowania nienasyconych kwasów karboksylowych”, Nr 2019/33/B/ST4/01118 „Chemoenzymatyczne kaskady nowych reakcji katalizowanych solami Cu i Pd o dużym potencjale aplikacyjnym”.

## **The new challenges in the application of enzymes for the production of compounds with high added value**

The modern methods for the synthesis of compounds with high added value such as chemicals, polymers, drugs or cosmetics, have already gone far beyond the area of traditionally understood organic chemistry. Chemical methods applied classic reagents and catalysts are developed towards processes that meet the requirements of green chemistry. Significant emphasis is also placed on the use of environmentally benign materials derived from renewable sources. Processes in which no chemical catalysts are used are replaced by those catalyzed by various catalysts, among which enzymes are increasingly used. Enzymes, as natural catalysts of chemical reactions, seem to be excellent candidates for the title of ideal catalysts. Because of their protein structure, they are biodegradable and environmentally friendly. They also perfectly catalyze chemo-, regio- and stereoselective chemical reactions under very mild conditions. Moreover, their highest catalytic activity is usually observed in the temperature range of 20-80°C. The high catalytic activity of enzymes and their selectivity

towards individual chemical compounds can be additionally combined with the possibility of using them in cascades of various chemical reactions in which they catalyze one or more chemical transformations. Thus, it is possible to develop and implement even complex synthetic processes in the chemoenzymatic cascade reactions where the complex products can be obtained from simple substrates. Such processes are definitely more profitable in industry as long as they are repeatable and meet the technological requirements.

The research on the application of enzymes as chemical reactions biocatalysts was supported by the National Science Center under research projects: No. 2016/23/B/ST5/03307 "Chemoenzymatic cascades of multi-component reactions"; No. 2014/14/M/ST5/00030 "Intensification of multicomponent and cascade reactions in liposomes using enzymatically catalyzed processes"; No. 2013/11/B/ST5/02199 "The studies on the mechanism and synthetic application of chemoenzymatic rearrangement of unsaturated carboxylic acids", No. 2019/33/B/ST4/01118 "Chemoenzymatic cascades of new reactions catalyzed with Cu and Pd salts with high application potential".

## **Wielofunkcyjność białek enzymatycznych**

*dr Justyna Karkowska-Kuleta, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,  
Uniwersytet Jagielloński*

Jedno z pierwszych doniesień o enzymach zaangażowanych w podstawowe cykle metaboliczne i dodatkowo pełniących także zupełnie odmienne funkcje dotyczyło krystalin – rozpuszczalnych, cytoplazmatycznych białek strukturalnych soczewki oka. W 1987 roku Wistow i Piatigorsky wskazali, że białka reprezentujące wybrane klasy krystalin cechują się znaczącym podobieństwem sekwencji do enzymów cytoplazmatycznych, a niektóre z nich również nadal posiadają aktywność enzymatyczną, tak jak  $\epsilon$ -krystalina, która wykazuje aktywność dehydrogenazy mleczanowej. Od tego czasu klasyczny dogmat jeden gen – jedno białko – jedna funkcja musiał być coraz częściej aktualizowany, ponieważ dla kolejnych enzymów identyfikowano dodatkowe funkcje, często zupełnie niezwiązane z ich pierwotną rolą w metabolizmie komórkowym. W 1999 roku Jeffery zaproponowała termin „moonlighting proteins” w celu sklasyfikowania grupy białek, które bez istotnych zmian strukturalnych pełnią całkowicie odmienne funkcje w zależności od lokalizacji komórkowej, oligomeryzacji, stężenia substratów lub obecności dodatkowych ligandów lub innych białek. Liczne wielofunkcyjne białka enzymatyczne produkowane przez chorobotwórcze bakterie i grzyby mogą być zaangażowane w mechanizmy patogenezы infekcji wywoływanych przez drobnoustroje niezależnie od swojej podstawowej aktywności enzymatycznej. Takie białka mogą być ekspozowane na powierzchni komórek patogenów bądź wydzielane do środowiska zewnętrznego i wchodzić w bezpośrednie oddziaływania z komórkami i białkami zaatakowanego gospodarza, przyczyniając się tym samym do zwiększonej inwazyjności mikroorganizmów.

## **Multifunctionality of enzymatic proteins**

One of the first reports on enzymes involved in basic metabolic cycles and additionally having also completely different functions concerned crystallins – soluble, cytoplasmic structural proteins of the eye lens. In 1987, Wistow and Piatigorsky indicated that proteins representing selected classes of crystallins have significant sequence similarity to cytoplasmic enzymes, and some of them also still demonstrate enzymatic activity, such as  $\epsilon$ -crystallin, which shows lactate dehydrogenase activity. Since then, the classical dogma of one gene – one protein – one function had to be updated frequently, as additional functions of different enzymes were identified, often completely unrelated to their original role in cellular metabolism. In 1999, Jeffery proposed the term "moonlighting proteins" to classify a group of proteins which without significant structural changes perform completely different functions depending on cellular location, oligomerization state, substrate concentration, or the presence of additional ligands or other proteins. The numerous multifunctional enzymatic proteins produced by pathogenic bacteria and fungi may be involved in the pathogenesis of microbial infections independently of their primary enzymatic activity. Such proteins might be exposed on the surface of pathogens or secreted into the external environment and interact directly with the cells and proteins of the affected host, thus contributing to the increased invasiveness of microorganisms.





# **Wystąpienia Uczestników**



## **Badanie mechanizmów reakcji enzymatycznych metodami izotopowymi**

*Małgorzata Pajak, mpajak@chem.uw.edu.pl, Zakład Chemii Fizycznej i Radiochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, www.chem.uw.edu.pl*

Enzymy to cząsteczki białkowe katalizujące niemal wszystkie reakcje chemiczne zachodzące w przyrodzie. Są niezwykle specyficzne, w związku z tym znalazły zastosowanie w wielu gałęziach nauki i przemysłu, w tym medycynie, przemyśle spożywczym, kosmetologii czy gospodarstwie domowym. Coraz częściej odkrywa się nowe zastosowania tych biokatalizatorów, jednak nie jest to możliwe bez poznania dokładnego mechanizmu ich działania. Jedną z metod, która pozwala na śledzenie reakcji enzymatycznych, jest metoda kinetycznych (KIE) i rozpuszczalnikowych (SIE) efektów izotopowych. Pozwala ona na ustalenie mechanizmu działania danego enzymu, wyznaczenie etapu limitującego badaną reakcję oraz określenie wiązań zaangażowanych w tworzenie stanu przejściowego. Metoda ta wymaga użycia związków selektywnie znakowanych izotopami, dlatego też w celu wyznaczenia efektów izotopowych w reakcjach enzymatycznych, niezbędne było opracowanie syntez odpowiednich izotopomerów. Otrzymane związki wykorzystano do przeprowadzenia badań kinetycznych reakcji hydroksylacji L-Tyr do L-DOPY, katalizowanej przez tyrozynazę, konwersji tyraminy do 4'-hydroksyfenyloacetaldehydu, katalizowanej przez oksydazę monoaminową A oraz oksydacyjnej deaminacji L-Tyr do kwasu 4'-hydroksyfenylopirogronowego, katalizowanej przez oksydazę L-aminokwasową. Wartości wyznaczonych efektów izotopowych oraz porównanie parametrów kinetycznych badanych reakcji, pozwoliły na częściowe wyjaśnienie mechanizmu działania tych enzymów.

## **Investigation of enzymatic reaction mechanisms using isotope methods**

Enzymes are proteins which catalyze almost all chemical reactions in nature. They are highly specific, therefore, they are used in many branches of science and industry i.e. medicine, food industry, cosmetology or household. New applications of these biocatalysts are being discovered more and more often, but it is not possible without the knowledge of the exact mechanism of their action. One of the methods that allows to track enzymatic reactions is the method of kinetic (KIE) and solvent (SIE) isotope effects. It allows to determine the mechanism of action of a given enzyme, the rate limiting step of the investigated reaction and bonds involved in the formation of the transition state. This method requires the use of selectively labeled compounds, therefore, in order to determine isotopic effects in enzymatic reactions, it was necessary to develop syntheses of appropriate isotopomers. The obtained compounds were used to carry out kinetic studies of the hydroxylation of L-Tyr to L-DOPA, catalyzed by tyrosinase, conversion of tyramine to 4'-hydroxyphenylacetaldehyde, catalyzed by monoamine oxidase A, and oxidative deamination of L-Tyr to 4'-hydroxyphenylpyruvic acid catalyzed by L-amino acid oxidase. The values of the determined isotope effects and the comparison of the kinetic parameters of the analyzed reactions allowed for a partial explanation of the investigated enzymes mechanisms.

## **Biofilm *Salmonella* i rola bakteriofagów w jego eradykacji**

**Paweł Korzeniowski**, *pawel.korzeniowski1@upwr.edu.pl*, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, *www.binoz.upwr.edu.pl*

Biofilmy to przestrzenne struktury wielokomórkowe drobnoustrojów wykazujące zdolność do przylegania do powierzchni stałych. Ich funkcją, poza adhezją do podłoża, jest ochrona drobnoustrojów przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi. Ta cecha biofilmów skutkuje trudnościami w ich eradykacji, szczególnie potrzebnej w przypadku biofilmu utworzonego przez pałeczki *Salmonella*. Jednym z rozwiązań tego problemu, dzięki specyficzności działania, jest wykorzystanie bakteriofagów. Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie skuteczności preparatu bakteriofagowego zawierającego innowacyjne fagi opatentowane przez Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu w eradykacji 72-godzinnych biofilmów pałeczek *Salmonella* utworzonych na płytkach 96-dołkowych. W celu zmierzenia redukcji biofilmu zastosowano metodę kolorymetryczną tj. pomiar absorbancji po uprzednim barwieniu fioletem krystalicznym wobec próby kontrolnej nietraktowanej preparatem bakteriofagowym. Zaobserwowano znaczną redukcję biofilmu, połowiczną przy niskich mianach preparatu bakteriofagowego oraz niemal całkowitą przy wyższych. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalne zastosowanie ww. preparatów bakteriofagowych w zwalczaniu biofilmów pałeczek *Salmonella* utworzonych na powierzchniach abiotycznych.

## ***Salmonella* biofilm and role of bacteriophages in its eradication**

Biofilms are three-dimensional multicellular structures of microorganisms that perform the ability to adhere to solid surfaces. Their function, apart from adhesion, is to protect microorganisms against unfavorable environmental factors. This feature of biofilms causes difficulties in their eradication, which is especially needed in case of biofilm created by *Salmonella*. The solution to this problem, due to the specificity of action, is the use of bacteriophages. The main goal of the research was to investigate efficacy of bacteriophage preparation containing innovative phages patented by the Wrocław University of Environmental and Life Sciences in the eradication of 72-hour *Salmonella* biofilms in 96-well plates. In order to measure the reduction of biofilm colorimetry method has been used, i.e. absorbance measurement after prior staining with crystal violet against a control sample not treated with a bacteriophage preparation. A significant reduction in biofilm has been observed, halfway with lower bacteriophage levels and almost complete with higher. The obtained results indicate the potential application of the mentioned above bacteriophage preparations in the combating *Salmonella* biofilms on abiotic surfaces.

## **Biokonwersja ksylozy i formaldehydu z zastosowaniem enzymatycznego reaktora membranowego**

**Karolina Bachosz**, *karolinabachosz@gmail.com*, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *fct.put.poznan.pl*

**Jakub Zdarta**, *jakub.zdarta@put.poznan.pl*, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *fct.put.poznan.pl*

**Teofil Jesionowski**, *teofil.jesionowski@put.poznan.pl*, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *fct.put.poznan.pl*

Enzymatyczne reaktory membranowe umożliwiają jednoczesne przeprowadzenie reakcji biokatalitycznej i separacji membranowej, dlatego też bardzo istotne jest umiejętne dobranie techniki separacyjnej i rodzaju membrany, o czym w głównej mierze decyduje wielkość cząsteczek oczekiwanego produktu. Należy jednak zauważyć, że w celu zapewnienia wysokiej stabilności i aktywności katalitycznej zastosowany enzym warto poddać immobilizacji na membranie. Dlatego też w niniejszych badaniach przeprowadzono proces biokonwersji ksylozy do kwasu ksylonowego i przekształcenie formaldehydu do metanolu z wykorzystaniem koimmobilizowanych na membranie nanofiltrycyjnej XN 45 dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy alkoholowej. Tak opracowany układ, składający się z dwóch równoległych reakcji, dodatkowo umożliwił przeprowadzenie jednoczesnej regeneracji zastosowanych kofaktorów enzymatycznych. W trakcie badań określono wpływ stężenia substratów i stosunku kofaktorów NAD<sup>+</sup> i NADH na efektywność prowadzonej biokonwersji. Ponadto dokonano charakterystyki układu enzymatycznego pod względem zastosowania w kolejnych cyklach reakcyjnych, jak również zachowania stabilności w trakcie przechowywania.

Podziękowania: Autor uzyskał środki finansowe w ramach projektu badawczego Politechniki Poznańskiej.

## **Bioconversion of xylose and formaldehyde with using enzymatic membrane reactor**

Enzymatic membrane reactors enable the simultaneous performance of the biocatalytic reaction and membrane separation, therefore it is very important to skillfully select the separation technique and type of membrane, which is mainly determined by the size of the expected product molecules. However, it should be noted that in order to ensure high stability and catalytic activity, the used enzyme should be immobilized on the membrane. Therefore, in the present study, the bioconversion of xylose to xylonic acid and formaldehyde to methanol was carried out using xylose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase co-immobilized on the XN 45 nanofiltration membrane. The system developed in this way, consisting of two parallel reactions, additionally allowed for the simultaneous regeneration of the used enzymatic cofactors. During the research, the influence of the substrate concentration and the ratio of NAD<sup>+</sup> and NADH cofactors on the effectiveness of the bioconversion was determined. In addition, the enzymatic system was characterized in terms of its use in subsequent reaction cycles, as well as its stability during storage.

**Acknowledgement:** The author was supported from funding as part of research project of the Poznan University of Technology.



## **Brakujący element – oczyszczanie dehydrogenazy L-fukozowej królika**

**Apollonia Witecka**, *aa.witecka@student.uw.edu.pl*, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, *biol.uw.edu.pl*

**Sebastian Kwiatkowski**, *s.kwiatkowski@biol.uw.edu.pl*, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, *www.biol.uw.edu.pl*

**Jakub Drożak**, *jdrozak@biol.uw.edu.pl*, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, *www.biol.uw.edu.pl*

L-fukoza (6-deoksy-L-galaktoza) jest monosacharydem, który u kręgowców pełni wiele istotnych funkcji, biorąc udział m.in. w glikozylacji białek i lipidów. W wątrobie i nerkach większości ssaków występuje szlak degradacji L-fukozy. Dehydrogenaza L-fukozowa jest pierwszym enzymem tego szlaku, katalizującym przekształcenia L-fukozy do L-fukonolaktanu. Dotychczas enzym ten nie został zidentyfikowany molekularnie. Celem badań było oczyszczanie dehydrogenazy L-fukozowej królika do etapu umożliwiającego identyfikację molekularną enzymu z użyciem spektrometrii mas. Wykonano frakcjonowanie homogenatu wątroby królika z użyciem glikolu polietylenowego (PEG 4000) oraz oczyszczanie, wykorzystując technikę FPLC i szereg metod chromatograficznych. Uzyskano co najmniej 53-krotne oczyszczenie enzymu z wydajnością około 6%. Aktywność enzymu badano w teście spektrofotometrycznym, śledząc szybkość redukcji NAD<sup>+</sup> do NADH ( $\lambda = 340$  nm). Dodatkowo preparat enzymu otrzymany po ostatnim etapie oczyszczania poddano zymografii, która umożliwiła bezpośrednią identyfikację prążka białka reprezentującego badany enzym w żelu poliakrylamidowym. W dalszych etapach prowadzonych badań planuje się: identyfikację molekularną dehydrogenazy L-fukozowej, wytworzenie oraz oczyszczenie rekombinowanej formy enzymu oraz jego charakterystykę biochemiczną i funkcjonalną. Uzyskane wyniki poszerzą wiedzę na temat szlaku degradacji L-fukozy w organizmach ssaków oraz pozwolą zrozumieć znaczenie fizjologiczne tego procesu.

## **Missing element – purification of rabbit L-fucose dehydrogenase**

L-Fucose (6-deoxy-L-galactose) is a monosaccharide that is commonly present in a variety of glycolipids and glycoproteins produced by vertebrates. Most of mammals have a fucose degradation pathway in a liver and kidneys. L-fucose dehydrogenase is the first enzyme in this pathway that catalyzes the conversion of L-fucose to L-fuconolactone. This enzyme has not been molecularly identified yet. The aim of the study was to purify L-fucose dehydrogenase from rabbit liver to the step at which its molecular identity could be determined with mass spectrometry. Rabbit liver homogenate was fractionated with the use of polyethylene glycol (PEG 4000) and a series of chromatographic methods, resulting in about 53-fold purification of the enzyme, with the yield of 6%. The enzyme activity was followed spectrophotometrically by continuously measuring the rate of NAD<sup>+</sup> conversion into NADH, which is accompanied by an increase in absorbance at  $\lambda=340$  nm. Additionally, a zymography of the most purified enzyme fraction was performed to visualize the protein band corresponding to the enzyme in a polyacrylamide gel. Next planned research steps include: molecular identification of L-fucose dehydrogenase, production and purification of its recombinant form, followed by the biochemical and functional characteristics of the enzyme. The obtained results will broaden the knowledge of the L-fucose degradation pathway in mammals and will allow to understand the physiological importance of this process.

## **Enantioselektywna oraz stereozbieżna synteza (R)-lizofiliny na drodze rozdziału kinetycznego katalizowanego lipazami oraz optycznej inwersji**

**Paweł Borowiecki**, *pawel.borowiecki@pw.edu.pl*, Wydział Chemiczny, Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków, Laboratorium Biokatalizy i Biotransformacji, Politechnika Warszawska *www.pw.edu.pl*

**Beata Zdun**, Wydział Chemiczny, Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków, Laboratorium Biokatalizy i Biotransformacji, Politechnika Warszawska, *www.pw.edu.pl*

**Maciej Dranka**, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Nieorganicznej, Politechnika Warszawska *www.pw.edu.pl*

Opracowano pierwszy wysoce enancjoselektywny enzymatyczny rozdział kinetyczny (EKR) racemicznej lizofiliny. Optymalizacja kluczowych parametrów procesu wykazała, że docelowy system biokatalityczny składa się z immobilizowanej lipazy typu B z *Candida antarctica* (CAL-B) zawieszanej w roztworze octanu winylu oraz octanu etylu. W optymalnych warunkach 1-gramowej reakcji EKR racemicznej lizofiliny katalizowanej przez CAL-B, w przeciągu zaledwie 2 godzin prowadzenia procesu w 60°C otrzymuje się oba produkty rozdziału w postaci homochiralnej (> 99% ee), z konwersją 50%. Ponadto, stereoinwersja (S)-lizofiliny do farmakologicznie aktywnego (R)-enancjomeru została pomyślnie przeprowadzona z zastosowaniem acetolizy odpowiedniego (S)-mesylanu przy użyciu octanu cezu i katalitycznej ilości 18-korony-6 w suchym toluenie, a następnie metanolizy otrzymanego (R)-octanu w obecności K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Opracowana metoda EKR wraz z zaproponowaną strategią inwersji konfiguracji absolutnej odpadowego (S)-enancjomeru lizofiliny wydaje się użyteczną alternatywą dla syntezy tytułowego API. Ponadto, przedstawiono pierwszą udaną analizę rentgenostrukturalną monokryształów obu stereoizomerów lizofiliny. W celu zracjonalizowania obserwowanej stereopreferencji CAL-B wobec enancjomerów lizofiliny przeprowadzono dodatkowe symulacje oddziaływań białko-ligand z zastosowaniem dokowania molekularnego. Teoretyczne prognozy uzyskane w badaniach *in silico* bardzo dobrze korespondowały z wynikami prac eksperymentalnych.

## **Enantioselective and stereoconvergent syntheses of (r)-lisofylline via lipase-catalyzed kinetic resolution and optical inversion approach**

Highly enantioselective enzymatic kinetic resolution (EKR) of racemic lisofylline is presented for the first time. Optimization of the key parameters of this process revealed that optimal biocatalytic system consisted of immobilized lipase type B from *Candida antarctica* (CAL-B) suspended in a solution of vinyl acetate and ethyl acetate. Under optimal reaction conditions, the 1 gram-scale CAL-B-catalyzed EKR of racemic lisofylline carried out for 2 h at 60°C furnished both enantiomeric products in a homochiral form (>99% ee) with the 50% conv. In addition, stereoinversion of the less pharmacologically relevant (S)-lisofylline into its (R)-enantiomer was successfully achieved through acetolysis of the respective optically pure (S)-mesylate by using cesium acetate and catalytic amount of 18-Crown-6 in dry toluene, followed by K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-mediated methanolysis of (R)-acetate. The elaborated EKR methodology together with enantioconvergent strategy provided a useful chemoenzymatic protocol for the synthesis of complementary enantiomers of titled anti-inflammatory API. Moreover, we report on the first single-crystal X-ray diffraction (XRD) analyses performed for both lisofylline enantiomers. Insight into the source of CAL-B stereoselectivity toward racemic lisofylline was gained by molecular docking experiments. *In silico* theoretical predictions matched very well with experimental results.

## Enzymy celulolityczne jako innowacyjne modyfikatory celulozy

**Daria Zielińska**, *daria.d.zielinska@doctorate.put.poznan.pl*, Zakład Polimerów, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *www.fct.put.poznan.pl*

**Sławomir Borysiak**, *slawomir.borysiak@put.poznan.pl*, Zakład Polimerów, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *www.fct.put.poznan.pl*

Naturalnym napełniaczem tworzyw sztucznych, który budzi coraz większe zaciekawienie jest celuloza o rozmiarach nanometrycznych. Otrzymywanie tego materiału jest zadaniem niezwykle trudnym. Istnieje wiele różnych sposobów produkcji nanocelulozy począwszy od energochłonnych i kosztownych metod mechanicznych, po metody chemiczne bazujące na hydrolizie kwasowej oraz wykorzystujące ciecze jonowe. Co więcej, komercyjne nanometryczne celulozy charakteryzują się dużym stopniem polidispersyjności, a także tendencją do tworzenia agregatów, co wpływa na cechy wytrzymałościowe materiałów kompozytowych.

W niniejszej pracy podjęto się próby modyfikacji nanocelulozy z wykorzystaniem enzymów celulolitycznych z grzyba mikroskopowego *Trichoderma reesei* oraz *Aspergillus* sp. Efektywność modyfikacji określono poprzez wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej z detektorem refraktometrycznym (HPLC/RI). W pracy analizowano wpływ modyfikacji na krystaliczność otrzymanego materiału celulozowego z wykorzystaniem szerokokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (XRD) oraz na właściwości dyspersyjne poprzez zastosowanie techniki dyfrakcji laserowej (DLS).

Stwierdzono, że kontrolowana modyfikacja enzymatyczna celulozy z zastosowaniem odpowiednio wyselekcjonowanych enzymów celulolitycznych, odpowiada za zmiany w strukturze nadmolekularnej oraz we właściwościach dyspersyjnych materiałów celulozowych.

Praca została sfinansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

## **Cellulolytic enzymes as innovative cellulose modifiers**

The natural filler of plastics, which arouses more and more interest, is cellulose of nanometric particles. Obtaining this kind of material is an extremely difficult task. There are many different methods of obtaining nanocellulose, ranging from energy-consuming and expensive mechanical methods, to chemical methods based on acid hydrolysis and using ionic liquids. Moreover, commercial celluloses with nanometric particles are characterized by a high degree of polydispersity, as well as a tendency to form aggregates, which affects the strength properties of composite materials.

In this work, attempts were made to modify nanocellulose using cellulolytic enzymes from the microscopic fungus *Trichoderma reesei* and *Aspergillus* sp. The efficiency of enzymatic modification of cellulose was determined by using high-performance liquid chromatography coupled with a refractometric detector (HPLC/RI). The study analyzed the effect of enzymatic modification on the crystallinity of the obtained cellulose material with the use of X-ray diffraction method (XRD) and on the dispersion properties through the use of the laser diffraction technique (DLS).

It was found that the controlled enzymatic modification of cellulose with the use of appropriately selected cellulolytic enzymes is responsible for changes in the supermolecular structure and in the dispersion properties of cellulose materials.

This research was funded by the Polish Ministry of Science and Higher Education.

## **Ergotioneina – nowy, obiecujący antyoksydant w terapii chorób neurodegeneracyjnych**

**Michał Rakowski**, *michal.rakowski@unilodz.eu*, Szkoła Doktorska BioMedChem Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, Uniwersytet Łódzki; Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, *www.uni.lodz.pl*

**Agnieszka Grzelak**, *agnieszka.grzelak@biol.uni.lodz.pl*; Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, *www.uni.lodz.pl*

Ze względu na wydłużenie życia w obecnych czasach choroby neurodegeneracyjne stanowią poważny problem społeczny i gospodarczy. U podłoża chorób neurodegeneracyjnych leży stres oksydacyjny i wywołana nim degeneracja neuronów dopaminergicznych. Wysiłki wielu naukowców i lekarzy koncentrują się na poszukiwaniu remedium, które poprawi rokowania chorych i będzie zapobiegać rozwijaniu się procesów neurodegeneracyjnych. Substancje, które mogą zapobiegać tym procesom często wykazują właściwości antyoksydacyjne. Z uwagi na obecność bariery krew-mózg nie wszystkie antyoksydanty docierają do neuronów w mózgu. Ergotioneina transportowana jest przez transporter OCTN1, który obecny jest we wszystkich tkankach organizmu ludzkiego, dzięki czemu zdolna jest do przenikania bariery krew-mózg i docierania do tkanki mózgowej. Dostępne badania wyraźnie wskazują na dobroczynny wpływ ergotioneiny w terapii oraz prewencji chorób neurodegeneracyjnych. Podczas konferencji przedstawiona zostanie synteza najnowszych doniesień naukowych oraz danych, które umożliwią na postawienie wstępnych wniosków o możliwościach wykorzystania ergotioneiny u pacjentów z chorobami neurodegeneracyjnymi.

## **Ergothioneine – a new, promising antioxidant in the treatment of neurodegenerative diseases**

Due to the extension of life neurodegenerative diseases pose a serious social and economic problem. Oxidative stress and thus the degeneration of dopaminergic neurons are the main causes of neurodegenerative diseases. Efforts of many scientists and physicians are focused on finding a remedy that will improve the prognosis of patients and prevent the development of neurodegenerative processes. Substances that can prevent these processes often exhibit antioxidant properties. Due to the presence of the blood-brain barrier, not all antioxidants reach the neurons in the brain. Ergothioneine is transported by the OCTN1 transporter, which is present in all tissues of the human body, thanks to which it can penetrate the blood-brain barrier and reach the brain tissue. The available studies clearly show the beneficial effect of ergothioneine in the therapy and prevention of neurodegenerative diseases. During the conference, a synthesis of the latest scientific reports and data will be presented, which will allow making preliminary conclusions about the possibilities of using ergothioneine in patients with neurodegenerative diseases.



## **Farmakologia inhibitorów monoaminooksydazy (IMAO) i ich zastosowanie w terapii depresji**

*Łukasz Grabowski, lukaszgrabowski99@o2.pl, Katedra Psychologii Klinicznej i Neuropsychologii, Instytut Psychologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, www.umk.pl*

W niniejszym wystąpieniu przedstawione zostały aktualne wiadomości na temat farmakologicznych aspektów leków z grupy inhibitorów monoaminooksydazy (IMAO) oraz ich zastosowanie w farmakoterapii wybranych zespołów depresyjnych. Leki te hamują metabolizm monoamin (noradrenaliny, 5-hydroksytryptaminy i dopaminy), co przyczynia się do zwiększenia stężenia tych substancji w szczelinie synaptycznej. Efekt terapeutyczny nie pojawia się szybko, z reguły po kilkunastu dniach. Duże znaczenie w badaniach nad IMAO miało wprowadzenie leków niehydrazynowych, które wykazują mniejszą toksyczność w stosunku do wątroby. Pochodne hydrazyny, będące IMAO I generacji to: fenelzyna, iproniazyd, izokarboksazyd i pargilina. Przedstawicielem IMAO niehydrazynowych jest tranylcypromina. Wszystkie te związki są nieselektywne w stosunku do izoenzymów MAO-A i MAO-B oraz blokują je nieodwracalnie. Substancje z generacji II wykazują selektywność, jednak nadal są inhibitorami nieodwracalnymi. Zaliczane są do nich: klogilina (inhibitor MAO-A) i 1-deprenyl (selegilina – inhibitor MAO-B). IMAO generacji III charakteryzują się selektywnością, a także odwracalnością (krótkotrwały efekt): brofaromina, toloksaton i moklobemid – MAO-A; lazabemid – MAO-B.

## **Pharmacology of the monoamine oxidase inhibitors (MAOI) and their application in the treatment of depressions**

In this presentation I will talk about some actual pharmacological aspects of the monoamine oxidase blocking drugs (MAOI) and their importance in the pharmacotherapy of depressions of various etiology. These drugs inhibit the metabolism of monoamines (noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and dopamine), which results in increased concentrations of these substances in the synaptic cleft. The therapeutic effect appears after several days. An important step in the study of IMAOs was the introduction of non-hydrazine drugs. These drugs are less toxic to the liver. Hydrazine derivatives, which are 1<sup>st</sup> generation drugs, are: phenelzine, iproniazid, isocarboxazid and pargilin. A non-hydrazine MAOI is tranylcypromine. All of these compounds are non-selective for MAO-A and MAO-B isoenzymes and block them irreversibly. 2<sup>nd</sup> generation substances show selectivity, but they are still irreversible inhibitors. This group of drugs include: clorgiline (MAO-A inhibitor) and 1-deprenyl (selegiline – MAO-B inhibitor). 3<sup>rd</sup> generation MAOIs are characterized by selectivity as well as reversibility (short-term effect): brofaromine, toloxaton and moclobemide – MAO-A; lazabemide – MAO-B.

## Markery stresu oksydacyjnego

**Arlleta Małecka**, arletam@amu.edu.pl, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, www.amu.edu.pl

**Liliana Ciszewska**, lilcis@am.,edu.pl, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, www.amu.edu.pl

**Aneta Piechalak**, anetap@amu.edu.pl, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, www.amu.edu.pl

W środowisku naturalnym na organizmy oddziałuje wiele czynników o charakterze abiotycznym np.: metale ciężkie oraz biotycznym np. patogeny. Wpływ tych stresorów prowadzi do wzmożonego generowania reaktywnych form tlenu (RFT), które są przyczyną stresu oksydacyjnego. Cząsteczki te są bardzo niebezpieczne, ponieważ ze względu na wysoką swoją reaktywność wchodzą w reakcje z głównymi składnikami komórek np.: białkami, kwasami nukleinowymi czy lipidami. Przed oksydacyjnymi uszkodzeniami w komórce chronią enzymy antyoksydacyjne. Spośród nich najczęściej wymieniane jako markery stresu to: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza askorbinianowa (APOX). Pełnią one kluczową rolę szczególnie w pierwszych godzinach działania stresu, kiedy dochodzi do gwałtownego wzrostu RFT. SOD jest kluczowym enzymem w tolerancji roślin na stres i obronie przed  $O_2^- \bullet$  podczas gdy CAT i APOX mają znaczenie w usuwaniu  $H_2O_2$ . Zwiększona ich aktywność jest skorelowana z tolerancją roślin na stres środowiskowy. Zaobserwowano wzrost aktywności SOD, CAT i APOX w roślinach *Pisum sativum* i *Brassica juncea* eksponowanych na metale ciężkie: Cu, Pb, Zn i Cd pojedynczo oraz w kombinacjach: CuPb, CuCd, CuZn, PbZn, PbCd i ZnCd. Stwierdzono różnice w funkcjonowaniu enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego u roślin różniących się potencjałem fitotoksycznym. Udział enzymów w obronie przed destrukcyjnym działaniem RFT przejawiał się zarówno na poziomie ich aktywności, transkrypcji jak i syntezy.

## Oxidative stress markers

In the natural environment, organisms are affected by many abiotic factors, e.g. heavy metals and biotic, e.g. pathogens. The influence of these stressors leads to the increased generation of reactive oxygen species (ROS), which are the cause of oxidative stress. These molecules are very dangerous because, due to their high reactivity, they react with the main components of cells, e.g. proteins, nucleic acids or lipids. Antioxidant enzymes protect the cell against oxidative damage. Among them, the most frequently mentioned as stress markers are: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APOX). They play a key role, especially in the first hours of stress, when there is a rapid ROS increase. SOD is a key enzyme in plant stress tolerance and  $O_2^{\bullet-}$  defense, while CAT and APOX play a role in  $H_2O_2$  removal. Their increased activities are correlated with plant tolerance to environmental stress. Was observed the increase SOD, CAT and APOX activity in *Pisum sativum* and *Brassica juncea* plants exposed to heavy metals: Cu, Pb, Zn and Cd singly and in combinations: CuPb, CuCd, CuZn, PbZn, PbCd and ZnCd. Differences in the functioning of the enzymatic antioxidant system in plants with different phytotoxic potential were found. The participation of enzymes in the defense against the destructive effects of ROS was manifested at the level of their activities, transcription and synthesis.

## **Mirozynaza jako problem analityczny w analizie związków lotnych kalarepy**

**Monika Marcinkowska**, [monika.marcinkowska@up.poznan.pl](mailto:monika.marcinkowska@up.poznan.pl), Pracownia Badania Związków Lotnych i Aktywnych Sensorycznie, Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, [www.wnoziz.up.poznan.pl](http://www.wnoziz.up.poznan.pl)

**Henryk H. Jeleń**, [henryk.jelen@up.poznan.pl](mailto:henryk.jelen@up.poznan.pl), Pracownia Badania Związków Lotnych i Aktywnych Sensorycznie, Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, [www.wnoziz.up.poznan.pl](http://www.wnoziz.up.poznan.pl)

Niezaprzeczalną zaletą enzymów jest ich szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym oraz udział w kreowaniu aromatu żywności. W warzywach kapustnych, takich jak np. kalarepa – występuje endogenny enzym – mirozynaza, który katalizuje reakcję hydrolizy glukozynolanów do lotnych metabolitów, które w dużym stopniu wpływają na aromat tego warzywa. Pod kątem oznaczania ilościowego – mirozynaza – stanowi problem analityczny, ponieważ aktywny enzym w matrycy warzywa powoduje duże odchylenia pomiędzy poszczególnymi próbami. W celu zablokowania aktywności enzymu wykorzystano wybrane sole metali. Aktywność enzymu badano poprzez pomiar lotnych produktów rozpadu glukozynolanów przy użyciu mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (SPME-GC-MS). Wstępne badania wykazały potencjalnie najlepszą efektywność w blokowaniu mirozynazy przy użyciu  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  oraz bezwodnego  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . W rezultacie nie obserwowano produktów pochodzących z rozpadu glukozynolanów. Rezultaty sprawdzono podczas wykorzystania tkanki kalarepy, do której sztucznie dodano glukozynolany, które w niej naturalnie nie występują: synigrynę i glukotropeolinę. Najwyższą skutecznością blokowania reakcji enzymatycznych w tkance warzywa charakteryzował się  $\text{AgNO}_3$  – brak związków lotnych. Wykorzystanie bezwodnego  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  oraz nasyconego roztworu  $\text{NaCl}$  mają największe uzasadnienie w stosowaniu jako inhibitor mirozynazy w ilościowych badaniach związków lotnych w tkance warzywa.

## **Myrosinase as an analytical problem in the analysis of kohlrabi volatile compounds**

The undeniable advantage of enzymes is their wide use in the food industry and participation in the creation of food aroma. Brassica vegetables, such as kohlrabi, contain an endogenous enzyme namely myrosinase, which catalyzes the hydrolysis of glucosinolates into volatile metabolites that significantly influence the flavor of this vegetable. From the quantification point of view – myrosinase – is an analytical challenge because the active enzyme in the vegetable matrix causes crucial variations between sample replications. Selected metal salts were used to block the enzyme activity. Enzyme activity was studied by measuring volatile glucosinolate breakdown products using solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry (SPME-GC-MS). Preliminary studies have shown that  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , and anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  are most effective at blocking myrosinase. As a result, no products derived from the breakdown of glucosinolates were observed. Previous data were tested by using kohlrabi tissue spiked with sinigrin or glucotropaeolin.  $\text{AgNO}_3$  was a powerful inhibitor in blocking enzymatic reactions in vegetable tissue – no volatile compounds. The use of anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and a saturated solution of  $\text{NaCl}$  are most appropriate in the use as a myrosinase inhibitor in quantitative studies of volatile compounds in vegetable tissue.

## **Modelowanie procesów kluczowych dla bioaugmentacji – badanie interakcji fosfolipazy C oraz lipazy z modelowymi błonami komórek bakterii glebowych**

**Paulina Perczyk**, [paulina.perczyk@doctoral.uj.edu.pl](mailto:paulina.perczyk@doctoral.uj.edu.pl), Zakład Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, [www.uj.edu.pl](http://www.uj.edu.pl)

**Marcin Broniatowski**, [broniato@chemia.uj.edu.pl](mailto:broniato@chemia.uj.edu.pl), Zakład Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, [www.uj.edu.pl](http://www.uj.edu.pl)

Bioaugmentacja jest metodą rekultywacji gleb, które są zanieczyszczone trwałymi zanieczyszczeniami organicznymi (TZO). Niestety, często się zdarza, że mikroorganizmy zaszczeplone w glebie wymierają na skutek działania enzymów, które są wydzielane przez inne mikroorganizmy. Szczególnie groźna jest fosfolipaza C (PLC) oraz lipazy, które są w stanie zniszczyć błonę komórkową mikroorganizmów. Skład błon biologicznych mikroorganizmów jest szeroko zróżnicowany w zależności od gatunku, dlatego niektóre z nich mogą być bardziej odporne na działanie PLC oraz lipazy od innych. Aby dowiedzieć się więcej na ten temat zastosowano monowarstwy Langmuira jako modele błon biologicznych mikroorganizmów glebowych i zbadano ich interakcje z  $\alpha$ -toksyną (model bakteryjnej PLC) oraz lipazą wyizolowaną z grzyba glebowego *Candida rugosa*. Utworzone monowarstwy scharakteryzowano za pomocą techniki Langmuira oraz mikroskopii kąta Brewstera. Wykorzystano również technikę dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego (GIXD) w celu określenia upakowania cząsteczek fosfolipidów. Na podstawie przeprowadzonych badań można powiedzieć, że wszystkie badane klasy fosfolipidów ulegają hydrolizie enzymatycznej PLC, jednak różnią się stopniem hydrolizy. Dla fosfatydyloglicerolu oraz kardiolipiny stopień hydrolizy reakcji był najniższy, dlatego można powiedzieć, że najbardziej odporne na działanie PLC oraz lipazy mogą być bakterie Gram-dodatnie, ponieważ ich błony komórkowe są bogate w te fosfolipidy.

## **Modeling the processes crucial for bioaugmentation – studying the interaction of phospholipase C and lipase with model bacterial membranes**

Bioaugmentation is a method of the remediation of soils polluted by persistent organic pollutants (POP). Unfortunately, it happens frequently that the microorganisms inoculated into the soil die out due to the presence of enzymes secreted by other microorganisms. Especially destructive are phospholipase C (PLC) and lipases which destruct the microorganism's cellular membrane. The composition of bacterial membranes differs between species, so some bacteria are more resistant to PLC and lipases than other. To shed light on these problems we applied phospholipid Langmuir monolayers as model microbial membranes and studied their interactions with  $\alpha$ -toxin (model bacterial PLC) and the lipase isolated from soil fungus *Candida rugosa*. The monolayers were characterized by the Langmuir technique and visualized by Brewster angle microscopy. The grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) was also used to determine the packing mode of the phospholipid molecules. Based on the conducted research, it can be said that all the investigated phospholipids classes can be digested by PLC but differ in the degree of hydrolysis. For phosphatidylglycerol and cardiolipin, the degree of hydrolysis of the reaction was the lowest, therefore it can be said that Gram-positive bacteria may be the most resistant to PLC and lipase because their cell membranes are rich in these phospholipids.



## Ocena efektywności procesu immobilizacji i aktywności katalitycznej lakazy z *Trametes versicolor* unieruchomionej na mezoporowatym Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Agnieszka Kołodziejczak-Radzimska**, [agnieszka.kolodziejczak-radzimska@put.poznan.pl](mailto:agnieszka.kolodziejczak-radzimska@put.poznan.pl),  
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej,  
Politechnika Poznańska, [www.fct.put.poznan.pl](http://www.fct.put.poznan.pl)

**Teofil Jesionowski**, [teofil.jesionowski@put.poznan.pl](mailto:teofil.jesionowski@put.poznan.pl), Instytut Technologii i Inżynierii  
Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska,  
[www.fct.put.poznan.pl](http://www.fct.put.poznan.pl)

Mezoporowaty tlenek glinu z dobrze rozwiniętą powierzchnią właściwą otrzymano zmodyfikowaną metodą miękkiego odwzorowania. Otrzymany materiał zastosowano jako nośnik w procesie immobilizacji lakazy z *Trametes versicolor* (LAC). Proces immobilizacji prowadzono w różnym warunkach pH. Podczas badań określono efektywność immobilizacji oraz aktywność katalityczną otrzymanych układów biokatalitycznych (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>\_LAC). Zsyntezowany Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> charakteryzuje się mezoporowatą strukturą, co czyni go odpowiednim nośnikiem dla enzymów. Podczas badań pośrednio potwierdzono wysoką wydajność procesu immobilizacji lipazy na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> za pomocą różnorodnych charakterystyk fizykochemicznych (m.in. porowatość, stabilność elektrokinetyczna oraz termiczna, a także charakterystyka powierzchniowych grup funkcyjnych). W dalszym etapie badań, określono aktywność katalityczną za pomocą modelowej reakcji utleniania ABTS. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że lakaza została unieruchomiona zarówno wewnątrz porów jak i na powierzchni Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (za pomocą wiązań van der Waalsa, oddziaływań elektrokinetycznych oraz wiązań wodorowych). Na podstawie przykładowej reakcji modelowej stwierdzono, że układ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>\_LAC jest mniej wrażliwy na zmiany pH i temperatury środowiska w porównaniu do wolnego enzymu. Dodatkowo zachowuje ok. 60% swojej początkowej aktywności po 10 cyklach reakcyjnych oraz po 30 dniach przechowywania.

Podziękowania: Badania zostały sfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach subwencji dla Politechniki Poznańskiej.

## **Laccase from *Trametes versicolor* supported onto mesoporous Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: stability tests and evaluations of catalytic activity**

Mesoporous Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> with high surface area and large pore volume was successfully synthesized via a modified soft template method. The prepared sample was used as a support for the immobilization of laccase from *Trametes versicolor*. The immobilization of LAC onto Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> was carried out in different pH conditions. The obtained alumina is characterized by a mesoporous structure, which makes it an adequate support for enzyme binding. Several physicochemical parameters (porosity, electrokinetic and thermal stability, and characteristic functional groups) indirectly confirm that the highest efficiency of immobilization and catalytic activity of the biocatalytic systems were obtained at pH 3-5. Furthermore, ABTS was used as a model substrate to evaluate the catalytic activity, and a catalytic mechanism has been proposed. The results of physicochemical analysis show that immobilization takes place both inside the pores and on the Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> surface (through non-specific forces such as van der Waals, electrostatic interactions and hydrogen bonds). Based on the oxidation of ABTS, laccase immobilized on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> was less sensitive to temperature and pH changes than the free enzyme, and it retained ca. 60% of its initial activity over at least ten oxidation cycles and after 30 days of storage.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education.

## Oksydoreduktazy jako wszechstronny system enzymatyczny do asymetrycznej syntezy farmaceutycznej

**Jan Kutner**, [j.kutner@uw.edu.pl](mailto:j.kutner@uw.edu.pl), Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, Uniwersytet Warszawski, [cnbch.uw.edu.pl](http://cnbch.uw.edu.pl), [cfcb.uw.edu.pl](http://cfcb.uw.edu.pl)

**Paweł Borowiecki**, [pborowiecki@ch.pw.edu.pl](mailto:pborowiecki@ch.pw.edu.pl), Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków, Wydział Chemiczny, [www.ch.pw.edu.pl/ch](http://www.ch.pw.edu.pl/ch)

**Ivan Shabalin**, [ivan\\_s@iwonka.med.virginia.edu](mailto:ivan_s@iwonka.med.virginia.edu), Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia, [minorlab.org](http://minorlab.org)

**Wladek Minor**, [wladek@iwonka.med.virginia.edu](mailto:wladek@iwonka.med.virginia.edu), Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia, [minorlab.org](http://minorlab.org)

**Krzysztof Woźniak**, [kwozniak@chem.uw.edu.pl](mailto:kwozniak@chem.uw.edu.pl), Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, [chem.uw.edu.pl](http://chem.uw.edu.pl), [crystal.chem.uw.edu.pl](http://crystal.chem.uw.edu.pl)

Celem badań jest opracowanie nowych układów enzymatycznych do wytwarzania chiralnych syntonów jako pojedynczych enancjomerów, składowych w syntezie związków biologicznie czynnych, syntetycznych związków pośrednich i reagentów. Wyizolowane rekombinowane enzymy są przedmiotem dużego zainteresowania w chemo-, regio- i enancjoselektywnych biotransformacji cząsteczek prochiralnych. Dlatego jest potrzeba opracowania nowych enzymów o poprawionej wydajności katalitycznej, które mogą pośredniczyć w wysoce wydajnych i stereoselektywnych przemianach chemoenzymatycznych różnorodnych związków organicznych.

Badamy nowe enzymy z najliczniejszej grupy oksydoreduktaz, biorące udział w reakcjach zarówno redukcji jak i utleniania. Oksydoreduktazy stanowią wiodącą klasę enzymów stosowaną w syntezie organicznej czystych optycznie związków chemicznych. Skupiliśmy się nad nowymi dehydrogenazami D-2-hydroksykwasu (2HADHs), które odgrywają w swoim naturalnym środowisku kluczową rolę w metabolizmie komórki. Katalizują w sposób zależny od kofaktora NAD(P)H redukcję prochiralnych kwasów 2-ketokarboksylowych, do pojedynczego enancjomeru, kwasu (R)-2-hydroksykarboksylowego. Poprzez nowe podejście do zmiany właściwości badanych enzymów, w tym ich specyficzności substratowej oraz kinetyki ich

działania, poprzez inżynierie enzymów oraz poprzez rozwiązanie struktury przestrzennej (3D) wybranych oksydoreduktaz powiązanych z ich substratami lub produktami, będziemy mogli z rozdzielczością prawie atomową przyjrzeć się mechanizmowi i dokładnemu działaniu tych enzymów.

## **Oxidoreductases as a versatile enzymatic system for pharmaceutical asymmetric synthesis and industry**

Our research aims to develop new enzyme systems for the production of chiral synthons as single enantiomers. These synthons are components in the synthesis of biologically active compounds, as well as synthetic intermediates and fine chemicals. Isolated recombinant enzymes are of great interest for chemo-, regio- and enantioselective biotransformation of prochiral molecules. Therefore, there is a need to develop new enzymes with significantly improved catalytic efficiency that can mediate highly efficient and stereoselective chemoenzymatic transformations of various organic compounds.

To this aim, new enzymes from the most numerous group of oxidoreductases, involved in both reductions and oxidations reactions, will be tested. Oxidoreductases are the leading class of enzymes used in the organic synthesis of optically pure chemical compounds. We have focused on new D-2-hydroxyacid dehydrogenases (2HADHs), which catalyze the NAD(P)H cofactor-dependent reduction of the prochiral 2-ketocarboxylic acids to a single enantiomer i.e. (R)-2-hydroxycarboxylic acid. We plan to use a new approach to change the properties of the tested enzymes, including their substrate specificity and kinetics, through enzyme engineering and solving the 3-dimensional structures (3D) of selected oxidoreductases, associated with their substrates or products. We will be able to look at the mechanism and of the catalyzed reaction at almost atomic resolution.

## **Projektowanie biosensorów warstwowych o możliwościach aplikacyjnych w diagnostyce medycznej**

**Sylwia Baluta**, *sylwia.baluta@pwr.edu.pl, Katedra Chemii Organicznej i Medycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, wch.pwr.edu.pl*

**Kamila Spsychalska**, *kamila.spsychalska@pwr.edu.pl, Katedra Chemii Organicznej i Medycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, wch.pwr.edu.pl*

**Joanna Cabaj**, *joanna.cabaj@pwr.edu.pl, Katedra Chemii Organicznej i Medycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, wch.pwr.edu.pl*

Choroby neurodegeneracyjne są związane bezpośrednio z nieprawidłowym poziomem neuroprzekaźników w organizmie. Opierając się na raportach Światowej Organizacji Zdrowia, schorzenia te, obecnie dotyczą niemal 90 milionów ludzi na całym świecie, natomiast prognozy wskazują, że do roku 2050 liczba chorych może wzrosnąć do 120 milionów. Biosensory, zapewniające ciągły monitoring oraz szybką detekcję, mogą pozwolić na usprawnienie diagnostyki medycznej związanej z zaburzeniami w organizmie poziomu neuroprzekaźników.

Biosensory należą do grupy sensorów chemicznych, a dzięki obecności w warstwie receptorowej materiału aktywnego biologicznie – charakteryzują się wysoką selektywnością i czułością. Biosensory zbudowane na nano- i mikrostrukturach półprzewodnikowych, są jednymi z najbardziej atrakcyjnych aplikacji nauki w przemyśle w ostatniej dekadzie. Konstruowanie biosensorów zostało w 2012 roku zakwalifikowane przez Ministerstwo Gospodarki Rzeczpospolitej Polskiej jako jedna z technologii priorytetowych, wskazanych w projekcie Foresight technologiczny przemysł – InSight 2030, związanym z rozpoznawaniem strategicznych technologii.

Podczas wykładu Projektowanie biosensorów warstwowych o możliwościach aplikacyjnych w diagnostyce medycznej zaprezentowane zostaną prace dotyczące projektowania nowej generacji miniaturowych urządzeń diagnostycznych – elektrochemicznych i optycznych – pozwalające na oznaczanie oraz monitorowanie neuroprzekaźników.

## **Designing of layered biosensors with application possibilities in medical diagnostics**

Progressive neurological diseases connected with abnormal level of neurotransmitters, such as Parkinson and Alzheimer, according to World Health Organization affect together almost 90 million people around the world. Due to researchers prognosis, this number of patients in 2050 may reach even 120 million. Biosensors, allowing for continuous measurement, represent a strong group of alternative diagnostic methods and can provide fast, sensitive, low-cost and efficient analysis of neurotransmitters in the future.

Biosensors belongs to the group of chemical sensors, however, they are more selective and more sensitive, due to the presence of biological active material (e.g. enzyme, cell, bacteria or antibody) which is an inherent element in the receptor layer. The manipulation of nanostructured materials in conjunction with biological molecules has led to the development of a new class of hybrid modified sensors in which both enhancement of charge transport and biological activity may be preserved. In Poland, the Ministry of Economy has qualified the production of biosensors as one of the priority technologies identified in the industry technological foresight project – InSight 2030, which identifies key technologies

and competitive industrial areas thanks to which Polish industry will be able to compete on the European and international market.

During the lecture Designing of layered biosensors with application possibilities in medical diagnostics will be presented works on the design of a new generation of miniature diagnostic devices – electrochemical and optical biosensors – for the determination and monitoring of neurotransmitters.

## **Tajemnicze oblicze BDH2, czyli charakterystyka biochemiczna reduktazy 4-okso-L-prolinowej (EC 1.1.1.104)**

**Sebastian Kwiatkowski**, [s.kwiatkowski@biol.uw.edu.pl](mailto:s.kwiatkowski@biol.uw.edu.pl), Zakład Regulacji Metabolizmu, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

**Maria Bożko**, Zakład Regulacji Metabolizmu, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

**Michał Zaród**, Zakład Regulacji Metabolizmu, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

**Adam K. Jagielski**, Zakład Regulacji Metabolizmu, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

**Jakub Drożak**, [jdrozak@biol.uw.edu.pl](mailto:jdrozak@biol.uw.edu.pl), Zakład Regulacji Metabolizmu, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Reduktaza 4-okso-L-prolinowa katalizuje reakcję redukcji 4-okso-L-proliny do cis-4-hydroksy-L-proliny z równoczesnym utlenieniem NADH. Istnienie tego enzymu opisano pierwszy raz w zarodkach kur w 1959 roku. W 1962 roku podjęto próbę jego oczyszczenia oraz charakterystyki biochemicznej, jednak dopiero badania prowadzone w naszym laboratorium pozwoliły na identyfikację molekularną reduktazy 4-okso-L-proliny. Enzym oczyszczono z nerek szczurów ok. 280-krotnie. Spośród białek zidentyfikowanych techniką spektrometrii mas (Q-TOF) w najlepiej oczyszczonej frakcji enzymu wytypowano dehydrogenazę 3-hydroksymaślanową typu 2 (BDH2) jako jedyną kandydatkę na poszukiwaną reduktazę. Poprawność identyfikacji zweryfikowano z wykorzystaniem rekombinowanej, oczyszczonej do homogenności BDH2 wyprodukowanej w komórkach *E. coli*. Rekombinowany enzym wykorzystano do przeprowadzenia charakterystyki biochemicznej oraz analizy specyficzności substratowej z wykorzystaniem analogów strukturalnych 4-okso-L-proliny. Wykonano testy *in vivo* z wykorzystaniem ssaczych komórek hodowanych w obecności 4-okso-L-proliny, które pozwoliły zidentyfikować fizjologiczny produkt metabolizmu 4-okso-L-proliny. Podsumowując, BDH2 wykazuje aktywność reduktazy 4-okso-L-prolinowej *in vitro*, a produktem jej aktywności jest cis-4-hydroksy-L-prolina. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem komórek HEK293T oraz COS-7 pozwoliły na identyfikację cis-4-hydroksy-L-proliny jako produktu metabolizmu komórek wyrażających endogennie białko BDH2.

## **Mysterious face of the BDH2, or the biochemical characterization of 4-oxo-L-proline reductase (EC 1.1.1.104)**

4-oxo-L-proline reductase catalyzes the reduction of 4-oxo-L-proline to cis-4-hydroxy-L-proline with concomitant oxidation of NADH. The enzyme has been described for the first time in chicken embryos in 1959. In 1962, the preliminary purification and partial biochemical characterization were done, but only recently the molecular identity of the enzyme has been unfolded in our laboratory. In the present investigation, 4-oxo-L-proline reductase was purified from rat kidneys about 280-fold. Mass spectrometry analysis (Q-TOF) of the purified enzyme preparation resulted in the identification of the BDH2 protein as the only meaningful candidate for the reductase activity. Molecular identification was confirmed with recombinant, purified to homogeneity BDH2 overexpressed in *E. coli*. Biochemical characterization, as well as substrate specificity with various structural analogs of 4-oxo-L-proline, were determined. Finally, the *in vivo* tests with mammalian cell lines cultivated with 4-oxo-L-proline led to molecular identification of the physiological product of 4-oxo-L-proline metabolism. To conclude, BDH2 acts as a 4-oxo-L-proline reductase *in vitro* and cis-4-hydroxy-L-proline is the only product of the activity. Moreover, *in vivo* experiments with HEK293T and COS-7 cell lines allowed the identification of cis-4-hydroxy-L-proline as a product of the natural metabolism of the mammalian cell lines endogenously expressing BDH2.



## **Układ tlenkowy $ZrO_2-Fe_3O_4$ jako uniwersalna platforma do immobilizacji enzymów oraz usuwania substancji farmaceutycznie aktywnej**

**Oliwia Degórska**, *oliwia.degorska@gmail.com*, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *fct.put.poznan.pl*

**Filip Ciesielczyk**, *filip.ciesielczyk@put.poznan.pl*, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *fct.put.poznan.pl*

**Jakub Zdarta**, *jakub.zdarta@put.poznan.pl*, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *fct.put.poznan.pl*

Zważając na stale wzrastające zapotrzebowanie spożycia antybiotyków w weterynarii oraz medycynie, znacząco rośnie ich obecność w ściekach wodnych. W oczyszczalniach ścieków substancje te nie są usuwane i ich śladowe ilości pozostają aktywne, stając się realnym zagrożeniem dla ekosystemu oraz żywych organizmów. Z tego względu od kilku lat poszukuje się coraz to nowszych metod oczyszczania ścieków, kładąc nacisk na metody niezagrażające środowisku, takie jak metody bioremediacji z wykorzystaniem enzymów. W przeprowadzonych badaniach wytworzono układ tlenkowy  $ZrO_2-Fe_3O_4$ , który następnie posłużył jako nośnik w celu unieruchomienia na jego powierzchni enzymu lakaza. Otrzymany biokatalizator wykorzystano w procesie usuwania tetracykliny z roztworów wodnych. W pracy określono wydajność procesu immobilizacji oraz scharakteryzowano otrzymany układ biokatalityczny. Uzyskano wysoką skuteczność usuwania antybiotyku z roztworu wodnego o stężeniu 1 mg/L, na poziomie powyżej 80%, za pomocą wytworzonego układu  $ZrO_2-Fe_3O_4$ -lakaza w szerokim zakresie temperatur 25-45°C oraz pH 4-7. Zbadano również możliwość ponownego wykorzystania biokatalizatora, wykazując zdolność degradacji tetracykliny na poziomie 80% przy 10 cyklu użytkowania.

Podziękowania: Autor uzyskał środki finansowe w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki nr 2019/35/D/ST8/02087.

## **ZrO<sub>2</sub>-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> oxide system as an universal platform for enzyme immobilization and for removal of pharmaceutically active compounds**

Considering the constantly increasing demand for the consumption of antibiotics in veterinary medicine and human medicine, their presence in wastewater is significantly increasing. These substances are not removed in sewage treatment plants and their trace amounts remain active, becoming a real threat to the ecosystem and living organisms. For this reason, for several years, newer and newer methods of wastewater treatment have been sought, with an emphasis on ecofriendly methods, such as enzyme bioremediation methods. In the conducted research, the oxide system ZrO<sub>2</sub>-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> was prepared and used as a carrier to immobilize the laccase enzyme on its surface. The obtained biocatalyst was used in the process of removing tetracycline from aqueous solutions. The work determines the efficiency of the immobilization process and characterizes the obtained biocatalytic system. High efficiency of antibiotic removal from an aqueous solution with a concentration of 1 mg/L at the level of over 80% was obtained with the use of the ZrO<sub>2</sub>-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-laccase system in a wide temperature range of 25-45°C and pH 4-7. The reusability test was also executed, showing the tetracycline degradation at the level of 80% after 10 cycles.

Acknowledgement: The author was supported from funding of the National Science Centre, Poland, under the research Grant number 2019/35/D/ST8/02087.

## **Układy biokatalityczne materiał elektroprzędzony – oksydoreduktaza jako narzędzia do usuwania 17 $\beta$ -estradiolu z roztworów wodnych**

**Jakub Zdarta**, [jakub.zdarta@put.poznan.pl](mailto:jakub.zdarta@put.poznan.pl), Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, [fct.put.poznan.pl](http://fct.put.poznan.pl)

**Karolina Kaźmierczak**, [kazmierczakkarolina56@gmail.com](mailto:kazmierczakkarolina56@gmail.com), Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, [fct.put.poznan.pl](http://fct.put.poznan.pl)

**Teofil Jesionowski**, [teofil.jesionowski@put.poznan.pl](mailto:teofil.jesionowski@put.poznan.pl), Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, [fct.put.poznan.pl](http://fct.put.poznan.pl)

Estrogeny, zwane także hormonami steroidowymi, to grupa naturalnie występujących, jak i syntetycznych związków odpowiedzialnych za regulację gospodarki hormonalnej człowieka. Są to także substancje, które są szeroko stosowane w terapii antykoncepcyjnej, jak i hormonalnej terapii zastępczej. Powszechne spożycie estrogenów oraz fakt, że nie są to substancje w pełni metabolizowane w organizmie człowieka powoduje, że są one wykrywalne w ściekach oraz odpływach z oczyszczalni ścieków. Ponieważ długotrwały kontakt z tymi substancjami może być niebezpieczny dla ludzkiego zdrowia, podjęto badania nad opracowaniem wydajnych metod usuwania estrogenów z wód i ścieków. W zrealizowanych badaniach wykorzystano materiał elektroprzędzony polistyren-chitozan, jako uniwersalną platformę do immobilizacji lakazy oraz peroksydazy chrzanowej, a powstałe w ten sposób układy immobilizowanych enzymów zastosowano w procesach usuwania 17 $\beta$ -estradiolu z roztworów wodnych. Podczas prac zdefiniowano nie tylko efektywność immobilizacji, ale także określono optymalne warunki procesu usuwania estrogeny. Uzyskane dane pozwoliły na wykazanie, że po 24 h prowadzenia procesu w temperaturze 25°C, w pH 5 dla lakazy i w pH 7 dla peroksydazy chrzanowej, z roztworu o stężeniu 0,1 mg/L możliwe były usunięcie ponad 90% estrogeny przez oba badane enzymy.

Podziękowania: Autor uzyskał środki finansowe w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki nr 2019/35/D/ST8/02087.

## **Electrospun material – oxidoreductase biocatalytic systems as tools for removing of 17 $\beta$ -estradiol from aqueous solutions**

Estrogens, also known as steroid hormones, are a group of naturally occurring and synthetic compounds responsible for regulating the human endocrine system. They are also substances that are widely used in contraceptive therapy as well as in hormone replacement therapy. The widespread consumption of estrogens and the fact that these substances are not fully metabolized in the human organism make them detectable in sewage and sewage treatment plant effluents. Since prolonged exposure to these substances can be hazardous to human health, research has been undertaken to develop efficient methods for estrogens removal from water and wastewater. In the conducted research, electrospun polystyrene-chitosan material was used as an universal platform for the immobilization of laccase and horseradish peroxidase, and the resulting systems of immobilized enzymes were used in the processes of 17 $\beta$ -estradiol removal from aqueous solutions. During the work, not only the effectiveness of immobilization was defined, but also the optimal conditions for the estrogen removal process were determined. The obtained data showed that after 24 h of carrying out the process at 25°C, at pH 5 for laccase and at pH 7 for horseradish peroxidase, it was possible to remove more than 90% of estrogen from a solution with a concentration of 0.1 mg/L by both enzymes.

Acknowledgement: The author was supported from funding of the National Science Centre, Poland, under the research Grant number 2019/35/D/ST8/02087.

## Usuwanie $17\alpha$ -etynyloestradiolu z roztworów wodnych z wykorzystaniem układu $\text{CaSiO}_3$ -lakaza

**Katarzyna Jankowska**, *katarzyna.a.antecka@doctorate.put.poznan.pl*, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *fct.put.poznan.pl*

**Filip Ciesielczyk**, *filip.ciesielczyk@put.poznan.pl*, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *fct.put.poznan.pl*

**Jakub Zdarta**, *jakub.zdarta@put.poznan.pl*, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, *fct.put.poznan.pl*

Estrogeny steroidowe, nazywane także steroidowymi hormonami płciowymi, stanowią obszerną grupę związków, które mają kluczowe znaczenie dla biologii i fizjologii człowieka. Niestety, ich obecność w ściekach komunalnych oraz wodach powierzchniowych, nawet w niskich stężeniach, stanowi niebezpieczeństwo dla środowiska oraz zdrowia ludzkiego, wpływając negatywnie na sprawność rozrodczą organizmów żywych. Dlatego tak ważne jest skuteczne usuwanie tych związków z roztworów wodnych. Celem pracy była immobilizacja lakazy na materiale  $\text{CaSiO}_3$ , a następnie wykorzystanie takiego systemu w usuwaniu  $17\alpha$ -etynyloestradiolu z modelowych roztworów wodnych. Wykazano, że proces immobilizacji metodą adsorpcji pozwolił na uzyskanie biokatalizatora, charakteryzującego się wysoką aktywnością. Co więcej, usuwanie estrogenu za pomocą  $\text{CaSiO}_3$ -lakaza wykazało synergiczny mechanizm degradacji tego zanieczyszczenia.  $17\alpha$ -etynyloestradiol został usunięty z modelowego roztworu wodnego ze 100-proc. skutecznością na skutek równoczesnej adsorpcji na  $\text{CaSiO}_3$  oraz biodegradacji enzymatycznej. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, iż uzyskany system  $\text{CaSiO}_3$ -lakaza, dzięki swoim właściwościom, może znaleźć zastosowanie w usuwaniu innych zanieczyszczeń fenolowych z wody na drodze synergicznej degradacji.

Podziękowania: Autor uzyskał środki finansowe w ramach projektu badawczego Politechniki Poznańskiej oraz w ramach finansowania stypendium doktorskiego z Narodowego Centrum Nauki (2020/36/T/ST8/00213).

## **Removal of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol from aqueous solutions by CaSiO<sub>3</sub>-laccase system**

Steroid estrogens, also called sex steroid hormones, are a comprehensive group of compounds, which play critical role for human biology and physiology. Unfortunately, their presence in municipal sewage and surface waters, even in low concentration, is a threat to the environment and human health, negatively affecting the reproductive performance of living organisms. Therefore, effective removal of these compounds from aqueous solutions becomes more and more important. The aim of the study was laccase immobilization onto CaSiO<sub>3</sub> and application of this system for removal of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol from model water solutions. It was shown that the immobilization process by the adsorption method allowed to obtain a biocatalyst with relatively high activity. Moreover, removal of estrogen by CaSiO<sub>3</sub>-laccase showed a synergistic mechanism of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol degradation. This compound was removed from the model water solution with 100% efficiency due to simultaneous adsorption onto CaSiO<sub>3</sub> and enzymatic biodegradation. The obtained results allow to conclude that the obtained CaSiO<sub>3</sub>-laccase system, due to its properties, can be used in the removal of other phenolic compounds from water by synergistic degradation.

Acknowledgement: The author was supported from funding as part of research project of the Poznan University of Technology and from funding of doctoral scholarship by the National Science Centre, Poland, under the research Grant number 2020/36/T/ST8/00213.

## Zastosowanie enzymów w dynamicznym rozdziale kinetycznym

**Monika Heba**, [monika.heba@polsl.pl](mailto:monika.heba@polsl.pl), Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, <https://www.polsl.pl/wydzialy/rch/Strony/Witamy.aspx>

**Dominika Stradomska**, [dominika.stradomska@polsl.pl](mailto:dominika.stradomska@polsl.pl), Katedra Inżynierii Chemicznej i Projektowania Procesowego, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, <https://www.polsl.pl/wydzialy/rch/Strony/Witamy.aspx>

**Nikodem Kuźnik**, [nikodem.kuznik@polsl.pl](mailto:nikodem.kuznik@polsl.pl), Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, <https://www.polsl.pl/wydzialy/rch/Strony/Witamy.aspx>

Z roku na rok rośnie zapotrzebowanie na syntezę związków czystych optycznie. Ma to szczególne znaczenie w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i agrochemicznym. Opracowanie nowych procesów w syntezie organicznej, w celu uzyskiwania związków chemicznych o wysokiej czystości optycznej wciąż stanowi duże wyzwanie. Jednym z takich procesów jest połączenie rozdziału kinetycznego z racemizacją in situ nieprzereagowanego enancjomeru w dynamicznym rozdziale kinetycznym. Ta metoda zyskuje coraz więcej uwagi w ostatnich latach, ponieważ dzięki niej można uzyskać produkty czyste optycznie przy wydajności sięgającej 100%. W procesie dynamicznego rozdziału kinetycznego enzymy odgrywają bardzo istotną rolę, lecz ich połączenie z katalizatorem racemizacji może stanowić duże wyzwanie. Podejmując ten temat dokonano przeglądu literatury na temat wykorzystania enzymów w dynamicznym rozdziale kinetycznym. Przeprowadzono również ten proces na modelowym alkoholu 1-fenylotanolu z użyciem lipazy jako enzymu i katalizatora rutenowego jako katalizatora racemizacji uzyskując bardzo dobre rezultaty.

Praca została sfinansowana ze środków NCN nr UMO-2016/23/B/ST8/00627 w ramach projektu badawczego nr 2016/23/B/ST8/00627

## **Application of enzymes in dynamic kinetic separation**

The demand for the synthesis of optically pure compounds is growing every year. This is of particular importance in the pharmaceutical, food and agrochemical industries. The development of new processes in organic synthesis to obtain high optical purity compound remains a big challenge. One such process is the combination of kinetic resolution with in situ racemization of the unreacted enantiomer in dynamic kinetic resolution. This method has been gaining more and more attention in recent years, because it allows to obtain optically pure products with an yield of up to 100%. Enzymes are important part of dynamic kinetic resolution process, but combining them with the racemization catalyst can be an another challenge. Addressing this issue, the literature on the use of enzymes in dynamic kinetic resolution was reviewed. This process was also carried out on the model alcohol 1 phenylethanol using lipase as the enzyme and ruthenium catalyst as the racemization catalyst with very good results.

The work was financed by the National Science Centre No. UMO-2016/23 / B / ST8 / 00627 within the research project No. 2016/23 / B / ST8 / 00627



## **Zastosowanie preparatu Blossom Protect™ w enzymatycznej modyfikacji związków prochiralnych**

**Renata Kołodziejska**, [renatak@cm.umk.pl](mailto:renatak@cm.umk.pl), Katedra Biologii i Biochemii Medycznej, Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, [www.cm.umk.pl](http://www.cm.umk.pl)

**Hanna Pawluk**, [hannapwaluk1@wp.pl](mailto:hannapwaluk1@wp.pl), Katedra Biologii i Biochemii Medycznej, Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, [www.cm.umk.pl](http://www.cm.umk.pl)

**Dominika Mlicka**, [mikaa0901@gmail.com](mailto:mikaa0901@gmail.com), Katedra Biologii i Biochemii Medycznej, Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, [www.cm.umk.pl](http://www.cm.umk.pl)

**Agnieszka Tafelska-Kaczmarek**, [tafel@umk.pl](mailto:tafel@umk.pl), Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, [www.chem.umk.pl](http://www.chem.umk.pl)

**Renata Studzińska**, [rstud@cm.um.pl](mailto:rstud@cm.um.pl), Katedra Chemii Organicznej, Wydziału Farmaceutyczny, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, [www.cm.umk.pl](http://www.cm.umk.pl)

**Mateusz Pawluk**, [pawluk.mateusz23@gmail.com](mailto:pawluk.mateusz23@gmail.com), Katedra Biologii i Biochemii Medycznej, Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, [www.cm.umk.pl](http://www.cm.umk.pl)

**Magdalena Grześk**, [magdalenagrzesk@gmail.com](mailto:magdalenagrzesk@gmail.com); Katedra Kardiologii i Farmakologii Klinicznej Wydział Nauk o Zdrowiu Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, [www.cm.umk.pl](http://www.cm.umk.pl)

**Alina Woźniak**, [alina-wozniak@wp.pl](mailto:alina-wozniak@wp.pl), Katedra Biologii i Biochemii Medycznej, Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, [www.cm.umk.pl](http://www.cm.umk.pl)

Obecnie coraz większą uwagę zwraca się na ochronę środowiska naturalnego, które zniszczone jest przez wieloletnią działalność człowieka. Przemysł chemiczny i farmaceutyczny generuje zbyt wysoki współczynnik środowiskowy i dlatego poszukuje się nowych, alternatywnych metod ekologicznych, których główną koncepcją jest zmniejszenie ilości toksycznych, niepożądanych odpadów negatywnie wpływających na środowisko. Jednym z rozwiązań może być proces biotransformacji.

W pracy podjęto próbę enancjoselektywnej i wydajnej bioredukcji symetrycznego, prochiralnego związku dikarbonylowego przy udziale mikroorganizmu *Aureobasidium pullulans*, zawartego w preparacie Blossom Protect TM .

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów otrzymano (R)- i (S)-1,2-difenylo-2-hydroksoetanon z wysoką czystością optyczną. Produkt o konfiguracji S z około 90% ee uzyskano w reakcji redukcji diketonu w roztworze buforu fosforanowego o wartości pH 5,5-7,5 po 24h, stosując  $1,0 \times 10^{-5}$  mol substratu oraz w wyniku dwugodzinnej inkubacji  $1,0 \times 10^{-5}$  mol rac-hydroksyketonu w środowisku wodnym o pH 6,5-7,5. Enancjomer o konfiguracji przeciwnej z około 90% ee otrzymano w reakcji bioredukcji po 48h inkubacji w środowisku wodnym o wartości pH 5,0 i 5,5, dla wyższych stężeń substrat ( $7,0-9,5 \times 10^{-5}$  mol) oraz w wyniku 120 godzinnej reakcji przeprowadzonej w roztworze buforu fosforanowego (pH 7,0-7,5) dla  $5,0 \times 10^{-5}$  mol wyjściowego reagenta w obecności substancji dodatkowych.

### **Application of antifungal agent Blossom Protect™ in enzymatic transformation of prochiral compounds**

Currently, more and more attention is paid to the protection of the natural environment, which is devastated by many years of human activity. The chemical and pharmaceutical industries generate a very high environmental factor, the ratio of the amount of waste to the amount of product obtained.

For this reason, new, alternative ecological methods are sought, the main concept of which is to reduce the amount of toxic, undesirable waste negatively affecting the environment. One of the solutions may be the process of biotransformation.

In this study attempts efficient and enantioselective bioreduction symmetrical prochiral diphenylethanedione using the microorganism *Aureobasidium pullulans*, contained in the antifungal agent Blossom Protect TM .

As a result of the experiments (R)- and (S)-1,2-diphenyl-2-hydroxyethanone were obtained with high optical purity. The (S)-product was received with

about 90% ee by reducing the diketone in a phosphate buffer solution (pH 5.5-7.5) for 24h, using  $1.0 \times 10^{-5}$  mol of substrate and as a result of a two-hour incubation of  $1.0 \times 10^{-5}$  mol rac-hydroxy ketone in an aqueous medium (pH 6.5-7.5). The (R)-enantiomer with about 90% ee was obtained in a bioreduction reaction after at least 48 hours of incubation in an aqueous medium with pH 5.0 and 5.5, for higher concentrations of substrate ( $7.0$ - $9.5 \times 10^{-5}$  mol) and after a 120-hour reaction in a phosphate buffer solution (pH 7.0-7.5) for  $5.0 \times 10^{-5}$  mol of the starting reagent in the presence of additives.

## Indeks autorów

Bachosz K. ....	23	Kutner J. ....	43
Baluta S. ....	45	Kuźnik N. ....	55
Borowiecki P. ....	27, 43	Kwiatkowski S. ....	25, 47
Borysiak S. ....	29	Małecka A. ....	35
Bożko M. ....	47	Marcinkowska M. ....	37
Broniatowski M. ....	39	Minor W. ....	43
Cabaj J. ....	45	Mlicka D. ....	57
Ciesielczyk F. ....	53	Ostaszewski R. ....	11
CiesielczykF. ....	49	Pająk M. ....	19
Ciszewska L. ....	35	Pawłuk H. ....	57
Degórska O. ....	49	Pawłuk M. ....	57
Dranka M. ....	27	Perczyk P. ....	39
Drożak J. ....	25, 47	Piechalak A. ....	35
Grabowski Ł. ....	33	Rakowski M. ....	31
Grzelak A. ....	31	Shabalin I. ....	43
Grześk M. ....	57	Spychalska K. ....	45
Heba M. ....	55	Stradomska D. ....	55
Jagielski A.K. ....	47	Studzińska R. ....	57
Jankowska K. ....	53	Tafelska-Kaczmarek A. ....	57
Jeleń H.J. ....	37	Witecka A. ....	25
Jesionowski T. ....	23, 41, 51	Woźniak A. ....	57
Karkowska-Kuleta J. ....	14	Woźniak K. ....	43
Każmierczak K. ....	51	Zaród M. ....	47
Kołodziejczak-Radzimska A. ....	41	Zdarta J. ....	23, 49, 51, 53
Kołodziejska R. ....	57	Zdun B. ....	27
Korzeniowski P. ....	21	Zielińska D. ....	29