



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Poznań University of Life Sciences

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Autoreferat

Radosław Dembczyński

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Poznań 2016

1. **Imię i nazwisko:** Radosław Dembczyński
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

Doktor inżynier nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia człowieka, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu; 2003.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Hodowla mikroorganizmów immobilizowanych w kapsułkach hydrożelowych.”

Magister inżynier rolnictwa, specjalność biotechnologia, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Rolniczy, 1996.

Temat pracy magisterskiej: „Mikrofiltracja zawiesin komórek *Carnobacterium divergens* w ceramicznym filtrze rurowym.”

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

1997-2004 Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, asystent.

2004 do chwili obecnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (wcześniej Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu), Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, adiunkt

4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

- a) **tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:**

Wykorzystanie wodnych układów dwufazowych do separacji białka z układów złożonych na przykładzie lizozymu

- b) **(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),**

(wartość podanego wskaźnika impact factor zgodna z rokiem opublikowania)

1. **Dembczyński R.,** Białas W., Jankowski T. (2009) Wykorzystanie dwufazowej ekstrakcji wodnej do separacji lizozymu z białka jaja kurzego [Application of aqueous two-phase extraction to separate lysozyme from hen egg white]. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 16:5-17.

MNiSW₂₀₁₅ = 13 pkt

2. **Dembczyński R.,** Białas W., Jankowski T (2012) Determination of phase diagrams and thermoseparation behaviour of aqueous two-phase systems composed of ethylene oxide-propylene oxide random copolymer and

potassium phosphate. Chemical and Process Engineering - Inżynieria Chemiczna i Procesowa 33:411-429.

IF = 0,394, MNiSW₂₀₁₅ = 15 pkt

3. **Dembczyński R.**, Białas W., Jankowski T. (2013) Partitioning of lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide-propylene oxide copolymer and potassium phosphates. Food and Bioproducts Processing, 91:292-302.

IF = 2,285, MNiSW₂₀₁₅ = 35 pkt

4. **Dembczyński R.**, Białas W., Regulski K., Jankowski T. (2010) Lysozyme extraction from hen egg white in an aqueous two-phase system composed of ethylene oxide-propylene oxide thermoseparating copolymer and potassium phosphate. Process Biochemistry, 45:369-374.

IF = 2,648, MNiSW₂₀₁₅ = 30 pkt

5. **Dembczyński R.**, Białas W., Jankowski T. (2010) Recycling of phase components during lysozyme extraction from hen egg white in the EO50PO50/K2HPO4 aqueous two-phase system. Biochemical Engineering Journal, 51:24-31.

IF = 2,692, MNiSW₂₀₁₅ = 35 pkt

6. **Dembczyński R.**, Białas W. (2013) Pilot-scale separation of lysozyme from hen egg white by integrating aqueous two-phase partitioning and membrane separation processes. Process Biochemistry, 48:1992-1998.

IF = 2,524, MNiSW₂₀₁₅ = 30 pkt

Sumaryczny IF prac wskazanych jako osiągnięcie: **10,543**; suma punktów MNiSW₂₀₁₅: **158**; liczba cytowań (WoS): **52**

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

WSTĘP

Separacja i oczyszczanie bioproduktów są istotnymi etapami procesu biotechnologicznego. Zwykle po etapie biosyntezy przez mikroorganizmy następuje wydzielenie jednego związku z mieszaniny różnych substancji. Najczęściej proces ten przebiega w kilku etapach obejmujących takie procesy jak wirowanie, filtracja, krystalizacja, ekstrakcja czy techniki chromatograficzne. Analogiczne metody wykorzystuje się w trakcie separacji bioproduktów ze źródeł naturalnych, które są mieszaninami wielu różnych związków, w tym także białek np. mleko, jaja ptasie itp. Przykładem takiej substancji jest lizozym (N-acetylo-muramylohydrolaza, EC.3.2.1.17), który na skalę przemysłową jest pozyskiwany z białka jaja kurzego.

Lizozym jest stosowany w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Ze względu na właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne enzym ten znajduje zastosowanie w wielu krajach jako dodatek do żywności służący jej utwaleniu (np. sery dojrzewające, piwo, wino, przetwory rybne i mięsne). Może być także wykorzystany w opakowaniach, które przedłużają trwałość produktów spożywczych bez konieczności stosowania dodatkowych metod utwalających np. obróbki termicznej. Istotną cechą lizozymu stanowi fakt, że jest on naturalną substancją przeciwdrobnoustrojową i należy do grupy dodatków, dla których nie określono limitu dopuszczalnego dziennego spożycia. Lizozym stosuje się także w preparatach wykorzystywanych do leczenia schorzeń jamy ustnej, gardła, oczu czy skóry.

W związku z rosnącym zainteresowaniem przemysłu lizozymem jako naturalną substancją konserwującą, istnieje zapotrzebowanie na tanie i wydajne metody jego separacji z białka jaja kurzego. Preparaty lizozymu można wytwarzać wieloma metodami. Jednak nieliczne z nich zaimplementowano do produkcji na skalę przemysłowej i są to: wielokrotne wytrącanie za pomocą soli i krystalizacja, bezpośrednia ultrafiltracja z białka jaja kurzego oraz chromatografia jonowymienna.

Najczęściej koszty związane z izolacją i oczyszczaniem mogą stanowić nawet 60-80% całkowitych nakładów związanych z wytworzeniem preparatu o odpowiednim stopniu czystości. Dlatego udoskonalanie istniejących metod lub poszukiwanie całkiem nowych i tanich sposobów separacji wydaje się być działaniem jak najbardziej uzasadnionym. W badaniach zaproponowałem zastosowanie ekstrakcji lizozymu w wodnych układach dwufazowych (ang. *aqueous two-phase systems* – ATPSs) [1].

Wodne układy dwufazowe składają się z dwóch bogatych w wodę roztworów (faz), które znajdują się w stanie równowagi. Wytworzenie wodnego układu dwufazowego jest wynikiem wymieszania ze sobą w określonych proporcjach wodnych roztworów dwóch polimerów np. glikolu polietylenowego (PEG) i dekstranu lub też polimeru i soli np. glikolu polietylenowego i siarczanów lub fosforanów. Zawartość wody w wodnych układach dwufazowych zwykle jest większa niż 80%, w związku z tym nie obserwuje się denaturacji białek. Ekstrakcja danego białka zachodzi na skutek większego powinowactwa separowanej cząsteczki do jednej z faz układu dwufazowego. Selektywna separacja do jednej z faz jest zależna od właściwości białka poddanego ekstrakcji, jak i rodzaju zastosowanego wodnego

układu dwufazowego. Metoda ta nie wymaga stosowania kosztownej i złożonej aparatury, proces separacji białek jest mało skomplikowany i wygodny. Istotną zaletą proponowanej metody jest także łatwość powiększania skali. Zasadniczo takie same parametry separacji obserwowane są w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej. Wodne układy dwufazowe nie są jednak szeroko stosowane w przemyśle pomimo tego, że parametry separacji bardzo wielu białek w różnych typach wodnych układów dwufazowych były przedmiotem licznych publikacji naukowych. Podstawowy problem to brak ogólnego modelu pozwalającego przewidzieć zachowanie określonej molekuly w konkretnym wodnym układzie dwufazowym. Dlatego znane są nieliczne, kompleksowe rozwiązania gotowe do wdrożenia do produkcji na dużą skalę. Jednym z nich jest izolacja przeciwciał monoklonalnych z wykorzystaniem wodnych układów dwufazowych opracowana przy udziale firmy Bayer. W metodzie tej tradycyjnie stosowaną, ale kosztowną i mało wydajną chromatografię powinowactwa zastąpiono ekstrakcją w wodnym układzie dwufazowym typu PEG/fosforany.

Innym, często przemilczanym problemem, jest kwestia znalezienia prostej i taniej metody oddzielenia ekstrahowanego białka od składników tworzących fazę, w której to białko znalazło się po procesie ekstrakcji. Zagadnienie to jest często istotnym czynnikiem uniemożliwiającym wykorzystanie wodnych układów dwufazowych w praktyce przemysłowej. W przypadku lizozymu, w najczęściej wykorzystywanych układach typu PEG/fosforany lub PEG/siarczany, enzym ten selektywnie migruje do fazy wzbogaconej w glikol polietylenowy. Zastosowanie technik filtracji membranowej do separacji lizozymu z glikolu polietylenowego nie jest możliwe z uwagi na zbliżone wymiary obu molekuł. W praktyce, jedynym sposobem pozwalającym na skuteczne usunięcie polimeru z preparatu białka pozostaje wykorzystanie technik chromatograficznych. Jest to jednak metoda bardzo kosztowna. Dlatego problem separacji lizozymu z roztworu polimeru można rozwiązać poprzez zastosowanie termoseparujących polimerów jako komponentów wodnych układów dwufazowych. Termoseparujące polimery są najczęściej kopolimerami oksyetylenu (EO) i oksypropylenu (PO). W wodnych roztworach tych polimerów w procesie zwanym termoseparacją następuje wytrącenie polimeru i tworzą się dwie fazy: faza wodna oraz faza zawierająca zagęszczony polimer. Termoseparacja jest indukowana poprzez podgrzanie roztworu polimeru do temperatury wyższej od tzw. temperatury mętnienia (ang. *cloud point* – CP). Białka znajdujące się w roztworach termoseparujących polimerów po procesie

termoseparacji migrują do fazy wodnej. Wśród polimerów typu EOPO można wyróżnić związki o strukturze losowej oraz tzw. polimery blokowe. Przykładem substancji należącej do pierwszej grupy jest EO50PO50. Jest on kopolimerem zawierającym 50% grup oksyetylenowych i 50% grup oksypropylenowych, które w cząsteczce są rozmieszczone całkowicie losowo. Jego średnia masa cząsteczkowa wynosi 3900. Temperatura mętnienia EO50PO50 wynosi 55°C. Przykładem polimeru blokowego jest Pluronic L-64. Zawiera on 40% grup oksyetylenowych i 60% oksypropylenowych, które są zgrupowane w blokach zawierających wyłącznie grupy polioksyetylenowe (PEO) lub polioksypropylenowe (PPO). Jego temperatura mętnienia wynosi 58°C. Pluronic L-64 jest trójblokowym kopolimerem PEO-PPO-PEO. W molekułe o średniej masie cząsteczkowej równej 2900, oba końce łańcucha polimerowego tworzą grupy PEO, natomiast środkową część cząsteczki zajmuje grupa PPO.

CEL PRACY

W pracach wskazanych jako osiągnięcie naukowe, moje zainteresowania skupiały się na opracowaniu nowej metody separacji lizozymu w wodnych układach dwufazowych typu termoseparujący polimer/sól. W tym celu wytypowano komponenty formujące wodny układ oraz określono warunki formowania tego typu układów dwufazowych. W kolejnym etapie zbadano, w jaki sposób modyfikacja składu wodnego układu dwufazowego wpływa na współczynnik podziału oraz wydajność separacji lizozymu oraz wyznaczono optymalny skład układu. Następnie, układ ten wykorzystano do izolacji lizozymu z białka jaja kurzego. Kolejnym zagadnieniem było zbadanie możliwości recyrkulacji składników wodnego układu dwufazowego w trakcie procesu ekstrakcji lizozymu z białka jaja kurzego. W ostatnim etapie zintegrowano ekstrakcję w wodnych układach dwufazowych z filtracją membranową w celu przeprowadzenia izolacji lizozymu z białka jaja kurzego w skali pilotowej.

WYNIKI BADAŃ

Pierwszym zagadnieniem, jakim zajmowałem się podczas swojej pracy było zbadanie warunków tworzenia pierwotnych i wtórnych układów dwufazowych [2]. W początkowej fazie badań oceniono zdolność różnych polimerów (EO50PO50 i Pluronic L-64) do formowania stabilnych pierwotnych układów dwufazowych z

fosforanami lub cytrynianami. Zbadano także wpływ tych substancji oraz procesu termoseparacji (formowanie wtórnego układu dwufazowego) na aktywność lizozymu. Na podstawie tych wstępnych analiz wytypowano EO50PO50 oraz fosforany potasu jako substancje chemiczne tworzące pierwotny wodny układ dwufazowy, który w dalszych etapach badań zastosowano do izolacji lizozymu z białka jaja kurzego. W układzie tym po separacji faz, faza górna była wzbogacona w polimer EO50PO50, natomiast faza dolna składała się głównie z fosforanów potasu. W trakcie przeprowadzonych badań ustalono przedział stężeń obu komponentów, dla których możliwe jest formowanie pierwotnego układu dwufazowego. W tym celu mieszano ze sobą roztwory EO50PO50 i fosforanów potasu o różnych, znanych stężeniach. Separacja faz trwała 20 godzin. Zbadano wpływ na tworzenie się pierwotnych układów dwufazowych takich czynników jak temperatura w trakcie separacji faz (4 i 20°C), pH roztworów fosforanów (6; 7,5 i 9) oraz stężenie chlorku sodu w układzie (0 mol/dm³; 0,085 mol/dm³; 0,475 mol/dm³ oraz 0,85 mol/dm³). Zakres stężeń chlorku sodu ustalono na podstawie aktywności lizozymu w roztworach o podwyższonej sile jonowej. Chlorek sodu w dalszych etapach badań wykorzystano w trakcie ekstrakcji lizozymu z białka jaja kurzego jako substancję modyfikującą siłę oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych pomiędzy białkami i komponentami wodnego układu dwufazowego.

Po wytworzeniu pierwotnego wodnego układu dwufazowego, oddzielano fazę górną (wzbogaconą w polimer EO50PO50) od fazy dolnej (wzbogaconej w fosforany). Następnie przeprowadzano termoseparację fazy polimerowej (65°C, 15 minut) w celu otrzymania wtórnego układu dwufazowego. Separacja faz była wspomagana poprzez wirowanie (21000xg, 15 minut). Po uformowaniu wtórnego układu dwufazowego, fazę zawierającą zagęszczony polimer EO50PO50 (faza dolna) oddzielano od fazy wodnej (faza górna). Stężenia fosforanów i chlorków we wszystkich fazach układów pierwotnych i wtórnych zmierzono za pomocą chromatografii jonowymiennej, natomiast stężenia EO50PO50 oznaczono spektrofotometrycznie po przeprowadzeniu reakcji barwnej z kwasem chromotropowym.

Diagramy fazowe pierwotnych układów EO50PO50/fosforany zostały wyznaczone na podstawie oznaczonych stężeń polimeru i fosforanów w fazach górnych i dolnych zbadanych wodnych układów dwufazowych. W celu wykreślenia przebiegu binod do uzyskanych danych doświadczalnych dopasowano model o

równaniu: $Y = a \exp(-X/b) + c \exp(-X/d)$, gdzie Y oznacza stężenie polimeru EO50PO50 (% w/w), X – stężenie anionu fosforanowego (% w/w), natomiast a, b, c, d – są współczynnikami modelu, które zostały obliczone za pomocą modułu Solver w programie MS Excel. Wyznaczenie przebiegu binod umożliwiło identyfikację zakresów stężeń fosforanów i polimeru, które po wymieszaniu formują pierwotny układ dwufazowy. W wodnym układzie dwufazowym EO50PO50/fosforany w fazie dolnej zanotowano wyższe stężenia polimeru niż w układach typu PEG/sól. Z tej przyczyny zastosowany model charakteryzował się lepszym dopasowaniem do danych doświadczalnych w porównaniu z często stosowanym w układach typu PEG/sól równaniem o postaci $Y = a \exp(bX^{0.5} - cX^3)$. W badanych pierwotnych układach EO50PO50/fosforany wyznaczono też przebieg cięciw równowagi tzw. linii wiążących (ang. tie-line – TL) oraz ich długość zgodnie z równaniem $TLL = [(X_1 - X_2)^2 + (Y_1 - Y_2)^2]^{0.5}$ (TLL – długość linii wiążącej; X_1, X_2 – stężenie anionu fosforanowego odpowiednio w fazie górnej i dolnej; Y_1, Y_2 – stężenie polimeru EO50PO50 odpowiednio w fazie górnej i dolnej). Linie wiążące są wpisane w binodę. Grupują one wszystkie układy o różnej początkowej zawartości EO50PO50 i fosforanów, których fazy po wytworzeniu układu dwufazowego będą miały identyczny skład, ale będą różniły się objętością.

Na podstawie otrzymanych diagramów fazowych pierwotnego układu EO50PO50/fosforany stwierdzono, że na ich przebieg istotnie wpływały pH fosforanów i stężenie chlorku sodu wprowadzonego do układów. Zaobserwowano, że ze wzrostem pH fosforanów (od pH 6 do 9) zmniejszało się stężenie EO50PO50 i fosforanów niezbędne do uformowania pierwotnego układu dwufazowego. Z praktycznego punktu oznacza to, że wodne układy dwufazowe zawierające fosforany o pH 9 można wytworzyć stosując mniejsze ilości obu komponentów. Ponadto, w trakcie ekstrakcji będą one bardziej odporne na rozcieńczenie, które jest wynikiem wprowadzenia do wodnego układu dwufazowego roztworu zawierającego separowane białko. Podobną zależność jak w przypadku pH fosforanów, wywoływał także wzrost stężenia chlorku sodu w pierwotnym układzie dwufazowym. Oprócz tego zaobserwowano, że w fazie dolnej pierwotnych układów dwufazowych zawierających chlorek sodu w stężeniu $0,85 \text{ mol/dm}^3$ znacznie zmniejszyło się stężenie EO50PO50 w porównaniu z układami, do których chlorek sodu wprowadzono w stężeniu mniejszym. Z kolei, temperatura, w której odbywała się separacja faz nie wpływała na kształt i położenie binod na diagramach fazowych. Binody odpowiadające układom dwufazowym formowanym w 4 i 20°C pokrywały się

ze sobą. Jednak stwierdzono, że temperatura wpływała na długość linii wiążących i stężenia substancji w obu fazach. W porównaniu z układami wytwarzanymi w 4°C, układy formowane w 20°C charakteryzowały się liniami wiążącymi o większej długości, wyższymi stężeniami EO50PO50 w fazie górnej oraz niższymi stężeniami fosforanów w fazie dolnej.

We wtórnych układach dwufazowych, powstałych w wyniku termoseparacji fazy polimerowej (górnej) układu pierwotnego, fazę dolną stanowił zagęszczony polimer EO50PO50, natomiast fazą górną był roztwór składający się głównie z wody, w której rozpuszczone były jony fosforanowe, chlorki oraz niewielkie ilości polimeru EO50PO50. Zgodnie z ogólną koncepcją oczyszczania białek w wodnym układzie dwufazowym EO50PO50/fosforany, stężenie polimeru w fazie dolnej po termoseparacji powinno być jak najwyższe. Dzięki temu możliwe będzie ponowne wykorzystanie polimeru w kolejnych ekstrakcjach. W zbadanych wodnych układach dwufazowych maksymalne stężenie EO50PO50 w fazach dolnych układów wtórnych przekraczało 85%. Ponadto, cząsteczka ekstrahowanego białka po termoseparacji powinna znajdować się w fazie górnej (wodnej). Z tej przyczyny stężenie polimeru w tej fazie powinno być jak najniższe. Maksymalne zanotowane stężenie w fazie górnej po termoseparacji wynosiło blisko 12%, natomiast minimalne około 2%. W większości analizowanych układów stężenie polimeru w fazie górnej po termoseparacji zasadniczo zawierało się w zakresie 3-7%.

W pierwotnych i wtórnych układach dwufazowych EO50PO50/fosforany obliczono współczynnik podziału anionu chlorkowego jako iloraz jego stężenia w fazie górnej do stężenia w fazie dolnej. W pierwotnych układach dwufazowych współczynniki podziału anionu chlorkowego były mniejsze niż 1. Oznacza to, że anion chlorkowy preferencyjnie migrował do fazy dolnej (wzbogaconej w fosforany). Zgodnie z danymi literaturowymi, odmienne zachowanie jonów obserwuje się w wodnych układach dwufazowych typu PEG/dekstran, gdzie ich stężenie w obu fazach jest zbliżone (współczynnik podziału jonów w przybliżeniu jest równy 1). Można dlatego spodziewać się, że obecność jonów chlorkowych w wodnym układzie dwufazowym EO50PO50/fosforany będzie także w istotny sposób modyfikować warunki, w których odbywa się ekstrakcja białek. Z kolei, we wtórnych układach dwufazowych współczynniki podziału anionu chlorkowego były większe niż 1 czyli jon w większym stężeniu gromadził się w fazie wodnej (fazie górnej) niż fazy polimerowej (fazie dolnej). Podsumowując, w pierwotnych i wtórnych wodnych

układach dwufazowych EO50PO50/fosforany anion chlorkowy będzie zawsze preferencyjnie migrował do fazy o większej hydrofilowości.

W kolejnym etapie badań zajmowałem się kwestią ustalenia optymalnego składu wodnego układu dwufazowego EO50PO50/fosforany do ekstrakcji lizozymu [3]. Jednym z czynników ograniczających szerokie stosowanie wodnych układów dwufazowych jest brak ogólnych modeli, które pozwalałyby przewidzieć separację konkretnej cząsteczki w danym układzie ekstrakcyjnym. Parametrem, który opisuje zachowanie się cząsteczki jest współczynnik podziału. Wskazuje on, w której z faz oczyszczana cząsteczka będzie się selektywnie rozpuszczać. Wielkość współczynnika podziału zależy od właściwości samej cząsteczki (np. ładunek powierzchniowy, hydrofobowość, wielkość cząsteczki), jak i wielu czynników związanych z układem separacyjnym (np. rodzaj i stężenie substancji tworzących fazy, pH, obecność w układzie dwufazowym dodatkowych substancji). Dodatkowo, często nie jest możliwe oddzielne zbadanie wpływu poszczególnych czynników, ponieważ ich oddziaływanie może być ze sobą skorelowane. Brak odpowiednich modeli matematycznych oraz znaczna liczba czynników, które mogą zmienić kierunek migracji cząsteczek w obrębie wodnego układu dwufazowego, sprawia, że konieczne jest wykonanie wielu eksperymentów w celu ustalenia optymalnych warunków separacji dla konkretnej substancji. Z tej przyczyny w celu redukcji liczby układów doświadczalnych, autorzy zajmujący się izolacją białek w wodnych układach dwufazowych często wykorzystują metody planowania eksperymentu zaliczane do tzw. metod powierzchni odpowiedzi (ang. response surface methodology – RSM). Analogiczną strategię zastosowano w przypadku lizozymu. W celu wyjaśnienia mechanizmów jakie wpływają na proces jego oczyszczania, doświadczenia przeprowadzono zgodnie z planem Box-Behnkena. W planie doświadczenia uwzględniono cztery zmienne niezależne: stężenie polimeru EO50PO50, stężenie fosforanów, pH oraz siłę jonową (wyrażoną jako stężenie chlorku sodu wprowadzonego do pierwotnego układu dwufazowego). Każda z badanych zmiennych przyjmowała wartości liczbowe na trzech poziomach. Stężenia polimeru i fosforanów ustalono na podstawie diagramów fazowych otrzymanych w pierwszym etapie badań. Zmiennymi zależnymi były: współczynnik podziału lizozymu oraz wydajność jego odzysku. Zastosowana metoda umożliwiła wyznaczenie zmienności badanych zmiennych zależnych w postaci wielomianu drugiego stopnia. Współczynniki podziału zbadano w układach pierwotnych EO50PO50/fosforany oraz

w układach wtórnych, które otrzymano w wyniku termoseparacji EO50PO50 z uprzednio oddzielonej fazy górnej układu pierwotnego. Wydajności odzysku lizozymu zbadano w fazach górnych układów pierwotnych i wtórnych. Wydajność odzysku jest parametrem, którego wielkość zależy nie tylko od współczynnika podziału, ale także od ilorazu objętości fazy dolnej do górnej. W trakcie eksperymentów wykorzystano lizozym z handlowego preparatu o aktywności ~70000 U/mg. Aktywność lizozymu oznaczano spektrofotometrycznie poprzez pomiar spadku absorbancji w zawiesinie bakterii *Micrococcus luteus* ATCC 4698.

W badaniach przyjęto założenie, że proces ekstrakcji będzie efektywny, jeśli w pierwotnych układach dwufazowych lizozym będzie preferencyjnie migrował do fazy górnej (wzbogaconej w EO50PO50). Oznacza to, że współczynnik podziału lizozymu powinien być znacznie większy od jedności. W rozpatrywanym zakresie badanych zmiennych niezależnych współczynnik podziału mieścił się w przedziale od 0,03 do ponad 11. Wyznaczone w trakcie analizy regresji równanie modelowe wykazało, że największy wpływ na współczynnik podziału lizozymu w pierwotnym układzie dwufazowym miało stężenie chlorku sodu. Wzrost stężenia tej soli w pierwotnym układzie dwufazowym znacznie zwiększał stężenie lizozymu w fazie górnej, co znacznie zwiększało współczynnik podziału lizozymu. Sugeruje to, że w obecności niskich stężeń chlorku sodu o kierunku migracji lizozymu decydowały oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy obdarzonymi ładunkiem dodatnim cząsteczkami lizozymu (punkt izoelektryczny równy 10,7) a ujemnie naładowaną fazą fosforanową. Z kolei, w obecności wysokich stężeń chlorku sodu, decydującą rolę odgrywały oddziaływania hydrofobowe pomiędzy cząsteczkami polimeru EO50PO50 i lizozymu. Z pozostałych badanych czynników istotny, jednak zdecydowanie mniejszy wpływ niż stężenie chlorku sodu, miało stężenie fosforanów oraz ich pH.

Oprócz współczynnika podziału, nie mniej ważnym wskaźnikiem ekstrakcji jest wydajność odzysku lizozymu w fazie górnej układu pierwotnego. Wykazano, że parametr ten w istotny sposób zależał od stężenia polimeru EO50PO50 oraz chlorku sodu. Pozostałe badane zmienne (pH oraz stężenie roztworu fosforanów) zostały usunięte z równania modelowego, ponieważ nie wykazywały istotnego wpływu na wydajność odzysku lizozymu w fazie górnej układu pierwotnego EO50PO50/fosforany.

Analizie poddano także współczynnik podziału lizozymu we wtórnym układzie dwufazowym. Wtórny wodny układ dwufazowy otrzymano poprzez termoseparację

fazy wzbogaconej w EO50PO50 (faza górna układu pierwotnego) w temperaturze 65°C przez 15 minut. Współczynnik podziału lizozymu we wtórnym układzie dwufazowym był we wszystkich badanych doświadczeniach większy od 1, a jego maksymalna wartość liczbowa wynosiła blisko 50. Oznacza to, że lizozym po termoseparacji został uwolniony do fazy wodnej (górnej), a jego stężenie w fazie dolnej (zagęszczony polimer EO50PO50) było bardzo małe. W przypadku pierwotnego układu dwufazowego, wysokie stężenie chlorku sodu i niska wartość pH sprzyjały migracji lizozymu do fazy górnej (wzbogaconej w EO50PO50). Natomiast we wtórnym układzie dwufazowym zaobserwowano tendencję odwrotną. Współczynnik podziału lizozymu wzrastał ze spadkiem stężenia chlorku sodu i wzrostem pH. Zależność ta została potwierdzona przez równanie modelowe. Model ten także wykazał, że na zmienność współczynnika podziału lizozymu we wtórnym układzie dwufazowym istotnie wpływa interakcja pomiędzy stężeniem polimeru EO50PO50 i stężeniem chlorku sodu. Jedynym czynnikiem, który nie wpływał istotnie na współczynnik podziału lizozymu we wtórnym układzie dwufazowym było stężenie fosforanów.

Analogicznie jak w przypadku układów pierwotnych, również w układach wtórnych wyznaczono wydajność odzysku lizozymu w fazie górnej (faza wodna). Średnia wartość liczbowa z uzyskanych danych doświadczalnych wynosiła ponad 91%. Żadna z badanych zmiennych niezależnych nie wykazała istotnego wpływu na wielkość tego parametru we wtórnych układach dwufazowych.

W kolejnym etapie na podstawie wykonanych obliczeń ustalono, że optymalny badany układ dwufazowy powinien charakteryzować się następującym zestawem zmiennych niezależnych: stężenie EO50PO50 równe 17,40%, stężenie fosforanów potasu wynoszące 22,67%, pH 9 i stężenie chlorku sodu na poziomie 0,85 mol/dm³. W trakcie analizy przyjęto założenie, że w wodnym układzie dwufazowym o optymalnym składzie współczynniki podziału lizozymu w układach pierwotnych i wtórnych oraz wydajność odzysku lizozymu w układzie pierwotnym będą przyjmować wartości maksymalne. Poprawność zdefiniowanego modelu została zweryfikowana poprzez przeprowadzenie ekstrakcji lizozymu z roztworu modelowego oraz białka jaja kurzego w układach dwufazowych o optymalnym składzie. Wykazano, że niezależnie od zastosowanego materiału do separacji (czysty lizozym lub białko jaja kurzego), wydajności odzysku lizozymu w układzie pierwotnym były zbliżone i były bardzo dobrze przewidywane przez równanie modelowe. Model także

prawidłowo przewidywał kierunek migracji lizozymu do fazy górnej układu pierwotnego i wtórnego. Preparat lizozymu uzyskany z białka jaja kurzego posiadał aktywność właściwą ponad 43 000 U/mg białka, natomiast współczynnik oczyszczenia (iloraz aktywności właściwej lizozymu w uzyskanym preparacie do aktywności właściwej lizozymu w białku jaja kurzego) wynosił ponad 13. Analiza elektroforetyczna wykazała, że w preparacie enzymu (faza wodna po termoseparacji) znajdował się tylko prążek lizozymu.

W następnym etapie badań zajmowałem się problemem separacji lizozymu z białka jaja kurzego w wodnym układzie dwufazowym zawierającym wysokie stężenie białek [4]. Należy zaznaczyć, że przed separacją lizozymu w wodnym układzie dwufazowym, białko jaja nie było w żaden sposób przygotowywane np. rozcieńczane czy wstępnie oczyszczane poprzez wytrącanie białek za pomocą siarczanu amonu. Inni autorzy podejmując problem izolacji lizozymu z białka jaja, stosowali często wspomniane operacje np. separacja lizozymu w wodnym układzie dwufazowym PEG/siarczan wiązała się z blisko 8-krotnym rozcieńczeniem białka jaja.

W poprzednim etapie badań [3], podczas weryfikacji poprawności modelu uzyskanego za pomocą metody płaszczyzny odpowiedzi, białko jaja kurzego stanowiło zaledwie 1,25% objętości wodnego układu dwufazowego, natomiast całkowita zawartość białka ogólnego w układzie dwufazowym wynosiła ok. 12 mg. Jednak przyjęto założenie, że ewentualne zastosowanie tej metody oczyszczania lizozymu w praktyce przemysłowej będzie wymagać zwiększenia udziału białka jaja w wodnym układzie dwufazowym. Dlatego w kolejnym etapie badań [4] w celu podwyższenia wydajności procesu, zwiększono zawartość białka jaja w wodnym układzie dwufazowym do ponad 33%. Całkowita zawartość białka ogólnego w wodnym układzie dwufazowym przekroczyła wówczas 700 mg. Drugim działaniem, które podjęto była modyfikacja składu układu dwufazowego w celu zwiększenia wydajności odzysku lizozymu w fazie górnej układu pierwotnego. Wykonane wcześniej badania optymalizacyjne wykazały, że stężenie fosforanów nie ma wpływu na wydajność odzysku lizozymu w pierwotnym układzie dwufazowym. Parametr ten w największym stopniu jest zależny od stężenia chlorku sodu. W pierwotnym układzie dwufazowym przyrost odzysku lizozymu obserwuje się także ze wzrostem stężenia polimeru EO50PO50. Dlatego w kolejnych doświadczeniach, w pierwotnych układach dwufazowych zmniejszono stężenie fosforanów, natomiast zwiększono stężenie polimeru. Starano się tak zmodyfikować skład pierwotnych układów

dwufazowych, aby na diagramie fazowym były one położone w przybliżeniu na jednej cięciwie wiążącej. W badanych pierwotnych wodnych układach dwufazowych na niezmiennym poziomie pozostawały jednak stężenie chlorku sodu ($0,85 \text{ mol/dm}^3$) oraz odczyn roztworu fosforanów ($\text{pH}=9$). Separację faz układów pierwotnych przeprowadzono poprzez sedymentację pod działaniem siły grawitacji w ciągu 18 h w temperaturze 4°C . W układzie skomponowanym z 20% roztworu fosforanów oraz 15% roztworu EO50PO50, iloraz objętości fazy górnej do dolnej wynosił 0,3. Aktywność właściwa lizozymu w fazie górnej była równa blisko 41 000 U/mg białka, natomiast współczynnik podziału lizozymu wynosił 8,3. Wydajność odzysku lizozymu w fazie górnej osiągała wielkość bardzo zbliżoną do wydajności uzyskanej w badaniach optymalizacyjnych [3] i była równa 56%. Z kolei, w pierwotnym układzie dwufazowym wytworzonym z roztworu polimeru o stężeniu 40% oraz 10% roztworu fosforanów objętości obu faz były prawie równe a stosunek objętości fazy górnej do dolnej wynosił 1,3. Aktywność właściwa lizozymu w fazie górnej zmniejszyła się do około 32 000 U/mg białka, natomiast wzrosła wydajność jego odzysku do 86%. W trzecim ze zbadanych pierwotnych układów dwufazowych zaobserwowano kolejny wzrost wydajności odzysku lizozymu w fazie górnej. Wydajność odzysku była równa 96%. Układ ten skomponowano z 60% roztworu EO50PO50 i 5% roztworu fosforanów. Iloraz objętości faz w tym układzie był równy 6, natomiast aktywność właściwa lizozymu w fazie górnej wynosiła blisko 26 000 U/mg białka. Podsumowując, można stwierdzić, że wzrost zawartości EO50PO50 w pierwotnym układzie dwufazowym zwiększał odzysk lizozymu w fazie górnej, ale jednocześnie obniżała się aktywność właściwa enzymu. Dlatego w kolejnym etapie badań termoseparacji poddano fazę górną pierwotnego układu dwufazowego, który skomponowano z równych objętości: białka jaja kurzego, 40% roztworu EO50PO50 i 10% roztworu K_2HPO_4 . Stężenie chlorku sodu w tym układzie wynosiło $0,85 \text{ mol/dm}^3$. Pierwotny układ dwufazowy o powyższym składzie zapewniał rozsądny kompromis pomiędzy wydajnością odzysku enzymu i aktywnością właściwą lizozymu w fazie górnej. Po termoseparacji fazy górnej tego układu otrzymano preparat lizozymu o aktywności właściwej przekraczającej 32 000 U/mg białka. Współczynnik podziału lizozymu w układzie wtórnym osiągnął wartość równą 40. Tak więc lizozym preferencyjnie migrował do fazy wodnej. Jednak niewielkie ilości białek zostały także wykryte w fazie polimerowej układu wtórnego. Spostrzeżenie to jest odmienne w stosunku do rezultatów badań prezentowanych dotychczas w literaturze, zgodnie z

którymi białka z uwagi na termodynamiczną niezgodność nie mogą być obecne w fazie polimerowej po termoseparacji. Hipoteza ta została sformułowana na podstawie danych uzyskanych w wodnych układach dwufazowych, które zawierały tylko jeden rodzaj białka w niskim stężeniu. Natomiast rezultaty badań nad separacją lizozymu [4], które wskazują na możliwą obecność białek w fazie polimerowej po termoseparacji zostały uzyskane, gdy w wodnym układzie dwufazowym białka były obecne w znacznie większym stężeniu. Wydajność odzysku lizozymu w fazie wodnej (górnej) układu wtórnego wynosiła 99%. Współczynnik oczyszczenia uzyskanego preparatu enzymu był równy 16,9. Biorąc więc pod uwagę separację lizozymu w pierwotnym i wtórnym wodnym układzie dwufazowym EO50PO50/fosforany, całkowita wydajność odzysku lizozymu z białka jaja kurzego wyniosła 85%. Przeprowadzone analizy elektroforetyczne i chromatograficzne (chromatografia sitowa) wykazały, że uzyskany preparat zawierał tylko lizozym. Z kolei, lizozym nie był wykrywany w obrazach analiz fazy dolnej układu pierwotnego. Faza ta zawierała pozostałe białka jaja kurzego. Wyniki te potwierdzają wartości współczynnika podziału białka ogólnego w pierwotnych układach dwufazowych, które były znacznie mniejsze od 1 (w zakresie 0,01-0,18).

W kolejnym etapie badań zajmowałem się kwestią wielokrotnego wykorzystania składników wodnego układu dwufazowego EO50PO50/fosforany w trakcie izolacji lizozymu z białka jaja kurzego [5]. W trakcie tej fazy badań zastosowano pierwotny układ dwufazowy składający się z równych objętości białka jaja kurzego, 40% roztworu EO50PO50 oraz 10% roztworu K_2HPO_4 . Stężenie chlorku sodu w tym układzie wynosiło $0,85 \text{ mol/dm}^3$. Celem skrócenia czasu procesu ekstrakcji lizozymu separacja faz w pierwotnym układzie dwufazowym była wspomagana poprzez wirowanie ($1830xg$) w temperaturze 20°C . Po termoseparacji fazy górnej układu pierwotnego oprócz preparatu lizozymu uzyskiwano także zagęszczony roztwór polimeru. Polimer ten wykorzystano do wytworzenia kolejnego pierwotnego układu dwufazowego. Sprawdzone także możliwość wielokrotnego wykorzystania fazy dolnej układu pierwotnego. Zawierała one znaczne ilości soli (fosforany, chlorki) oraz białka ogólnego, które mogłyby stanowić duże obciążenie dla środowiska naturalnego. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że możliwa jest jednoczesna recyrkulacja EO50PO50 oraz substancji, które zawierała faza dolna układu pierwotnego. Wykonano cztery następujące po sobie ekstrakcje lizozymu. Odzyskany z poprzedniego układu wtórnego polimer był mieszany z fazą dolną

uzyskaną w trakcie separacji faz w poprzednim pierwotnym układzie dwufazowym. Przyjęto zasadę, że każdy następny pierwotny układ dwufazowy będzie zawierał takie same stężenie EO50PO50 i soli, jakie ustalono dla pierwszego układu dwufazowego. Stwierdzono, że faza polimerowa po termoseparacji zawierała K_2HPO_4 w stężeniu niższym niż 0,01%, stąd przy komponowaniu kolejnego, pierwotnego układu dwufazowego te niewielkie ilości fosforanów nie były brane pod uwagę. Z kolei, zawartość chlorku sodu w fazie dolnej układów pierwotnych oraz fazie polimerowej po termoseparacji obliczono na podstawie współczynników podziału anionu chlorkowego, które wynosiły około 0,5 w układzie pierwotnym i 10,5 w układzie wtórnym. Do tworzonego na nowo pierwotnego układu dwufazowego, oprócz białka jaja kurzego, wprowadzano także odpowiednie, brakujące ilości polimeru lub soli, mając na uwadze ilości tych substancji w fazach, które były ponownie wykorzystywane. Odnotowano, że iloraz objętości faz we wszystkich pierwotnych układach dwufazowych był zbliżony. Sugeruje to, że wszystkie wytworzone układy dwufazowe zabierały porównywalne ilości soli i polimeru. Stwierdzono, że w pierwotnych układach dwufazowych faza polimerowa charakteryzowała się dużą selektywnością w stosunku do lizozymu, jednak pojemność tej fazy dla białek była stosunkowo mała i nie przekraczała 3-4 mg/cm³. Z drugiej strony, faza fosforanowa układów pierwotnych wykazała się dużą pojemnością dla białek. W trakcie doświadczeń z recyrkulacją składników, ich koncentracja w tej fazie wzrosła ponad dwukrotnie osiągając stężenie ponad 140 mg/cm³. Tak więc nawet duża akumulacja białek w fazie dolnej układu pierwotnego i ponad 30-krotna różnica w stężeniu białek pomiędzy fazami nie zakłóciła procesu izolacji lizozymu. Wskazuje to na dużą przydatność badanego wodnego układu dwufazowego do oczyszczania lizozymu z białka jaja kurzego.

Wykazano także, że oddziaływania elektrostatyczne nie mogą odpowiadać za obserwowany podział białek pomiędzy fazami. W pH równym 9, które zastosowano w pierwotnym układzie dwufazowym lizozym (o punkcie izoelektrycznym wynoszącym 10,7), posiadał powierzchniowy ładunek dodatni. W tych warunkach inne białka jaja kurzego takie jak konalbumina, owotransferyna, owomukoid i owomucyna, których punkt izoelektryczny jest mniejszy niż 6,5, były obdarzone ujemnym ładunkiem elektrycznym. W pierwotnym układzie dwufazowym jony chlorkowe preferencyjnie gromadziły się w fazie fosforanowej (współczynnik podziału Cl^- wynosił 0,54). W wodnym układzie dwufazowym EO50PO50/fosforany występuje więc odmienne

zjawisko niż opisane w literaturze dla wodnych układach dwufazowych typu EO50PO50/polimer, gdzie jony chlorkowe preferencyjnie migrowały do fazy wzbogaconej w EO50PO50 i stwarzały pomiędzy fazami odpowiednią różnicę potencjału elektrycznego. Zatem w układzie EO50PO50/fosforany, który zawiera wysokie stężenie soli zasadniczym czynnikiem kontrolującym podział białek pomiędzy fazami są oddziaływania hydrofobowe. Lizozym zawiera stosunkowo dużo tryptofanu i spośród białek jaja charakteryzuje się największą hydrofobowością. Dlatego też selektywnie gromadzi się w hydrofobowej fazie polimerowej. W tych samych warunkach pozostałe, bardziej hydrofilowe białka jaja preferują fazę fosforanową.

Ostatecznie, po termoseparacji faz górnych układów pierwotnych uzyskano preparaty lizozymu, których aktywność właściwa wynosiła 38 000-43 000 U/mg białka, natomiast współczynnik oczyszczenia zawierał się w zakresie 20-22. Całkowita wydajność odzysku lizozymu z białka jaja kurzego była równa 37-69%. Czystość uzyskanych preparatów lizozymu została potwierdzona za pomocą analiz elektroforetycznych i chromatograficznych. Zmierzono także zawartość EO50PO50 w fazie górnej układu wtórnego po procesie termoseparacji. Stwierdzono, że wszystkie uzyskane preparaty lizozymu zawierały niewielką pozostałość polimeru w stężeniu, które nie przekraczało 0,5%.

W przedstawionej ekstrakcji lizozymu w wodnym układzie dwufazowym EO50PO50/fosforany wykorzystuje się mało kosztowne odczynniki takie jak fosforan dwupotasowy, chlorek sodu i polimer EO50PO50. Dodatkowo, ich recyrkulacja umożliwiła zmniejszenie zapotrzebowania na te substancje. Przykładowo, odzysk polimeru po termoseparacji wynosił około 70%. W ten sposób możliwa jest dalsza redukcja kosztów ekstrakcji lizozymu. Metoda ta co prawda posiada mniejszą rozdzielczość niż techniki chromatograficzne czy wielostopniowa filtracja za pomocą których, zgodnie z danymi literaturowymi, wytwarzano preparaty lizozymu o aktywności rzędu 60 000 -80 000 U/mg białka. Są to jednak metody kosztowne i czasochłonne, a ich wykorzystanie do oczyszczania stosunkowo taniego enzymu jakim jest lizozym może być ekonomicznie nieuzasadnione. Tymczasem, ekstrakcja lizozymu w wodnym układzie dwufazowym EO50PO50/fosforany jest bardzo wydajna, stosunkowo prosta oraz niedroga nie tylko w odniesieniu do wykorzystywanych substancji chemicznych ale także niezbędnej aparatury. Wydaje się także, że ten układ separacyjny mógłby być przydatny do separacji innych

hydrofobowych białek. Dodatkowo, kolejną zaletą separacji w wodnym układzie dwufazowym EO50PO50/fosforany jest duża łatwość powiększania skali procesu.

W ostatnim etapie badań zajmowałem się zagadnieniem ekstrakcji lizozymu z białka jaja kurzego w skali pilotowej [6]. W trakcie doświadczeń połączono separację w wodnym układzie dwufazowym z filtracją membranową w układzie stycznym. Zastosowano między innymi innowacyjną metodę ciągłej termoseparacji polimeru EO50PO50 z wykorzystaniem membrany mikrofiltracyjnej. W skali laboratoryjnej po zwiększeniu temperatury fazy polimerowej powyżej temperatury zmętnienia, separacja faz może odbywać grawitacyjnie lub też może być przyśpieszona poprzez zastosowanie wirowania. W warunkach przemysłowych proces separacji faz można prowadzić w sposób ciągły w wirówkach separacyjnych np. talerzowych. Koszty inwestycyjne zakupu tych urządzeń są jednak wysokie. Dlatego opracowano nową metodę termoseparacji, w której separacja faz była wspomagana przez techniki filtracyjne. Ponadto, w doświadczeniach wykorzystano także ultrafiltrację do usuwania białek z fazy dolnej układu pierwotnego.

Całkowita objętość pierwotnego układu dwufazowego wynosiła 9 litrów. W celu kontroli zużycia substancji tworzących układ ekstrakcyjny oraz powstającego produktu sporządzono bilans masowy procesu, który obejmował ekstrakcję w pierwotnym układzie dwufazowym, termoseparację zintegrowaną z mikrofiltracją oraz regenerację fazy fosforanowej z wykorzystaniem ultrafiltracji.

W pierwszym etapie doświadczeń po to, aby opracować termoseparację z wykorzystaniem filtracji, dokonano doboru membrany filtracyjnej. Fazę górną układu pierwotnego utrzymywano w temperaturze 45^oC w trakcie filtracji na membranach ultrafiltracyjnych i mikrofiltracyjnych w układzie z całkowitą recyrkulacją retentatu i filtratu do zbiornika nadawy. Podwyższenie temperatury spowodowało wytrącenie polimeru z roztworu. Parametrami, na podstawie których dokonano selekcji odpowiedniej membrany filtracyjnej były współczynniki retencji polimeru EO50PO50, lizozymu i białka ogólnego. Współczynnik retencji polimeru powinien przyjmować wartości jak najbardziej zbliżone do 100%. Jednocześnie wymagano, aby membrana filtracyjna umożliwiała swobodne przenikanie lizozymu do strumienia filtratu. Wykazano, że zarówno syntetyczna membrana ultrafiltracyjna o punkcie odcięcia 100 000 Da, jak i ceramiczna membrana mikrofiltracyjna o porowatości 0,45 μm charakteryzowały się zbliżoną wartością współczynnika retencji polimeru, który wynosił około 80%. Jednak membrana ultrafiltracyjna w znacznie większym stopniu

zatrzymywała też lizozym (współczynnik retencji równy 35%), dlatego kolejne doświadczenia wykonano wykorzystując membranę mikrofiltracyjną, której współczynnik retencji lizozymu wynosił niespełna 7%.

W następnych eksperymentach mikrofiltrację prowadzono w trybie okresowym. Strumień filtratu, J , został opisany przez równanie modelowe o postaci $J=(J_0-J_\infty)\exp[-C(VCR-VCR_0)]+J_\infty$, gdzie J_0 i J_∞ oznaczają odpowiednio strumień początkowy i strumień w stanie ustalonym, VCR – współczynnik redukcji objętości, natomiast C – to współczynnik będący miarą szybkości spadku strumienia filtratu w zależności od VCR. Strumień filtratu szybko zmniejszał się ze wzrostem VCR do wartości równej 1,5. Powyżej tej wartości VCR, strumień ustabilizował się na poziomie równym 66% początkowej wartości strumienia filtratu. Przyczyną szybkiego spadku strumienia w początkowym okresie filtracji było odkładanie się polimeru i lizozymu w głębi struktury membrany filtracyjnej. Współczynnik retencji EO50PO50 wynosił około 81% czyli był porównywalny z uprzednio uzyskanym wynikiem w trybie recyrkulacji strumienia filtratu i retentatu. Całkowita wydajność polimeru w retentacie osiągnęła prawie 84% (retentat jest odpowiednikiem fazy polimerowej wtórnego układu dwufazowego). Współczynnik retencji lizozymu był równy 6,1% i był niezależny od współczynnika redukcji objętości. Zatem lizozym przeniknął przez mikrofiltr i był zasadniczo obecny w filtracie, który to jest odpowiednikiem fazy wodnej układu wtórnego. Wydajność odzysku lizozymu we filtracie wynosiła 80,7% i była tylko nieco niższa od zanotowanej w trakcie termoseparacji w skali laboratoryjnej [3-5]. Filtrat (preparat lizozymu) zawierał także niewielką ilość polimeru równą 1,9%, która była tylko nieznacznie większa od pozostałości EO50PO50 zmierzonej w fazie wodnej układu wtórnego po tradycyjnej termoseparacji [5]. Również aktywność właściwa lizozymu wynosząca około 34 000 U/mg białka, która została uzyskana w skali pilotowej była zbliżona do wartości tego parametru w skali laboratoryjnej [3-5]. Biorąc pod uwagę ekstrakcję w układzie pierwotnym i termoseparację wspomaganą przez mikrofiltrację, całkowita wydajność odzysku lizozymu z białka jaja była zbliżona do 50%. Oceny czystości preparatów lizozymu dokonano za pomocą analiz chromatograficznych i elektroforetycznych. Wyniki tych analiz były dodatkowym potwierdzeniem faktu, że izolacja lizozymu z białka jaja kurzego w wodnym układzie dwufazowym EO50PO50/fosforany w skali pilotowej zakończyła się powodzeniem. Niewątpliwą zaletą tej metody jest skuteczne wykorzystanie mikrofiltracji do separacji polimeru od lizozymu w trakcie ciągłej termoseparacji. Dzięki temu można skrócić

czas trwania procesu bez konieczności zakupu bardzo kosztownych wirówek separacyjnych. Instalacje membranowe są znacznie tańsze a zastosowane membrany ceramiczne mogą być użytkowane przez wiele lat. Wykazano także, że integracja termoseparacji z procesami membranowymi umożliwia uzyskiwanie w trakcie procesu preparatu lizozymu o stabilnych parametrach jakościowych. Z kolei, retentat zawierający zagęszczony polimer EO50PO50 może być wykorzystany do wytworzenia kolejnego, pierwotnego wodnego układu dwufazowego. Kolejną zaletą jest zatem możliwość wielokrotnej recyrkulacji komponentów wodnego układu dwufazowego. W tym celu opracowano także metodę usuwania białek gromadzących się w fazie fosforanowej pierwotnego wodnego układu dwufazowego. Wykazano doświadczalnie, że do tego procesu najbardziej odpowiednia będzie membrana ultrafiltracyjną o punkcie odcięcia 30 000 Da. Sporządzono model, który opisywał strumień filtratu w zależności od współczynnika redukcji objętości. Współczynnik odrzucenia białek był równy 99%, a stężenie białka ogólnego we filtracie wynosiło niespełna 0,1%. W ten sposób 83,5% roztworu fosforanów mogło być ewentualnie powtórnie wykorzystane. Wydaje się, że najbardziej ekonomicznym rozwiązaniem będzie przeprowadzenie ultrafiltracji fazy fosforanowej nie częściej niż raz na dwie ekstrakcje, w których zostanie zastosowana procedura wielokrotnego wykorzystania odzyskanych składników wodnego układu dwufazowego. Wówczas będzie można ograniczyć koszty operacyjne związane z myciem membrany ultrafiltracyjnej.

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania dotyczące wykorzystania wodnego układu dwufazowego EO50PO50/fosforany potasu potwierdziły dużą przydatność tej metody do separacji lizozymu z białka jaja kurzego. Izolacja lizozymu w tym procesie przebiega w dwóch etapach. W etapie pierwszym, w pierwotnym układzie dwufazowym lizozym jest ekstrahowany do fazy wzbogaconej w termoseparujący polimer EO50PO50. W etapie drugim, w trakcie termoseparacji fazy polimerowej pierwotnego układu dwufazowego następuje wytworzenie wtórnego układu dwufazowego i oddzielenie polimeru od lizozymu. Formowanie pierwotnych, wodnych układów dwufazowych zależy między innymi od stężenia i pH fosforanów oraz stężenia EO50PO50. Na ten proces wpływa także stężenie chlorku sodu oraz temperatura. Wtórny układ dwufazowy można uzyskać zwiększając temperaturę fazy

polimerowej układu pierwotnego w zakresie 45-65°C. Współczynnik podziału lizozymu jest zależny od składu wodnego układu dwufazowego, głównie zawartości chlorku sodu. Ze wzrostem zawartości polimeru EO50PO50 w układzie dwufazowym wzrasta wydajność odzysku lizozymu, natomiast zmniejsza się współczynnik oczyszczenia enzymu. Wielokrotne wykorzystanie polimeru EO50PO50 odzyskanego w trakcie termoseparacji oraz fazy fosforanowej układu pierwotnego nie wpływa negatywnie na proces ekstrakcji lizozymu z białka jaja kurzego. Termoseparacja polimeru oraz recyrkulacja składników w układzie ekstrakcyjnym mogą być wspomagane przez techniki filtracji membranowej.

Za najważniejsze osiągnięcia uzyskane w prezentowanych pracach uważam:

1. Szczegółowe zbadanie warunków formowania wodnych układów dwufazowych EO50PO50/fosforany potasu, w tym wyznaczenie diagramów fazowych pierwotnych wodnych układów dwufazowych poprzez opisanie przebiegu binod za pomocą równań matematycznych.
2. Opracowanie równań modelowych opisujących wpływ składu wodnego układu dwufazowego EO50PO50/fosforany potasu na takie parametry separacji lizozymu jak współczynnik podziału i wydajność odzysku. Wyznaczenie optymalnego składu pierwotnego układu dwufazowego do ekstrakcji lizozymu
3. Potwierdzenie na przykładzie izolacji lizozymu z naturalnej mieszaniny białek jakim jest białko jaja kurzego, że ekstrakcja w wodnych układach dwufazowych EO50PO50/fosforany potasu jest metodą pozwalającą uzyskać preparaty enzymatyczne o dużej czystości. Wykazanie, że wysokie stężenie białek w wodnym układzie dwufazowym nie utrudnia procesu ekstrakcji lizozymu.
4. Potwierdzenie możliwości wielokrotnego wykorzystania termoseparującego polimeru EO50PO50 oraz soli (głównie fosforanów potasu) w trakcie ekstrakcji lizozymu. Udowodnienie, że termoseparacja EO50PO50 może być skuteczną metodą separacji lizozymu od polimeru.
5. Ocena przydatności wodnego układu dwufazowego EO50PO50/fosforany potasu do separacji białek w dużej skali. Opracowanie innowacyjnej metody termoseparacji z separacją faz wspomaganą przez mikrofiltrację.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moja działalność naukowo-badawcza obejmowała takie główne obszary biotechnologii jak nowoczesne metody hodowli mikroorganizmów ukierunkowane na intensyfikację procesów poprzez zwiększenie stężenia biomasy lub usunięcie produktu w trakcie fermentacji, separacja i oczyszczanie substancji bioaktywnych za pomocą m.in. technik filtracyjnych, ekstrakcji typu ciecz-ciecz i ciecz-ciało stałe, utrwalanie bioproduktów za pomocą suszenia sublimacyjnego i rozpyłowego. Wiele z tych badań było efektem współpracy z pracownikami Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz z innych ośrodków naukowych takich jak Politechnika Poznańska, Politechnika Łódzka, Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, Wielkopolskie Centrum Zaawansowanych Technologii w Poznaniu. W ramach współpracy z University of Luton odbyłem w tym ośrodku trzytygodniowy staż z zakresu konstruowania biosensorów i ich wykorzystania w przemyśle spożywczym i biotechnologii.

Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie studiów brałem udział w badaniach dotyczących produkcji diwercyny, bakteriocyny wytwarzanej przez bakterie *Carnobacterium divergens*. Bakteriocyna ta wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do bakterii patogennych i wywołujących psucie produktów żywnościowych. Jednym z ograniczeń w praktycznym wykorzystaniu bakteriocyn jest mała wydajność ich biosyntezy. W celu zwiększenia tego parametru zamierzano prowadzić ciągłą produkcję bakteriocyn poprzez zastosowanie hodowli z recyrkulacją komórek. Bakterie były zawracane do bioreaktora za pomocą filtra stycznego i możliwe było uzyskanie wysokiego stężenia komórek po to, aby zintensyfikować biosyntezę bakteriocyn. W trakcie badań określono charakterystykę pracy membrany filtracyjnej w zależności od strumienia nadawy, ciśnienia transmembranowego oraz stężenia komórek. Rezultaty tych badań zostały zawarte w mojej pracy magisterskiej oraz zostały zaprezentowane na konferencjach (zał.5, II K 1, III B 1-2). Efektem tych prac była też praca przeglądowa na temat czynników wpływających na wydajność filtracji membranowej (zał. 5, II D 2).

Po zakończeniu studiów podjąłem pracę na stanowisku asystenta w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu). W tym

czasie uczestniczyłem m.in. w badaniach nad opracowaniem optymalnej metody hodowli komórek owadnich w celu zwiększenia wydajności ekspresji nukleoproteiny wirusa grypy w bakulowirusowym systemie ekspresyjnym (zał. 5, III B 8). Brałem też udział w pracach dotyczących zbadania wpływu biopolimerów na przeżywalność komórek mikroorganizmów. Rezultatem tych badań było ustalenie m. in. zależności pomiędzy stężeniem oraz stopniem deacetylacji chitozanu i utratą przeżywalności przez komórki drożdży (zał. 5, II D 1).

Tematyka badawcza, która wzbudziła moje szczególne zainteresowanie, była związana z opracowaniem nowego sposobu otrzymywania zagęszczonych preparatów mikroorganizmów poprzez ich hodowlę w ograniczonej przestrzeni. Tradycyjne nośniki do unieruchamiania (immobilizacji) komórek mają postać pełnożelowych kulek z naturalnych polisacharydów. Zostały one zastąpione przez kapsułki alginianowe z ciekłym rdzeniem skrobiowym. Główną wadą pełnożelowych kulek są duże opory dyfuzyjne w stosunku do metabolitów, prowadzące do intensywnego wzrostu komórek w pobliżu powierzchni matrycy, zniszczenie struktury hydrokoloidu i uwolnienie biomasy do otaczającej pożywki. Uszkodzona struktura żelu nie chroni także całkowicie przed przeniknięciem niepożądanych drobnoustrojów do nośników. Wady te można wyeliminować poprzez zastosowanie kapsułkowania. Kapsułki, w których namnażano mikroorganizmy wytwarzano w wyniku reakcji koacerwacji skrobi kationowej z grupami karboksylowymi alginianu oraz sieciowania alginianu jonami wapnia. Separacja tak otrzymanej biomasy jest bardzo prosta i polega na wydzieleniu nośników z pożywki na sitach bez wykorzystywania kosztownych technik separacji (filtracja, wirowanie), które ponadto zwiększają ryzyko zakażenia. W trakcie badań określono warunki formowania kapsułek oraz ich wytrzymałość mechaniczną. Wykazano, że membrany kapsułek wywoływały tylko nieznaczne opory dyfuzyjne w stosunku do substancji będących składnikami pożywek m. in. współczynnik dyfuzji glukozy był niższy tylko o 5% w stosunku dyfuzji glukozy w wodzie. Zbadano także porowatość membran kapsułek za pomocą odwrotnej chromatografii sitowej podając na kolumnę wypełnioną kapsułkami standardy dekstranów o różnych wymiarach hydrodynamicznych. W następnych etapach badań przeprowadzono testy fermentacyjne w hodowlach okresowych i ciągłych z komórkami *Lactobacillus rhamnosus* unieruchomionymi w kapsułkach. W hodowlach okresowych maksymalna liczebność komórek unieruchomionych wynosiła 5×10^{10} jtk/cm³ objętości rdzenia kapsułek i była osiem razy większa od liczebności

komórek w hodowlach zawieszinowych. Jeszcze lepsze rezultaty uzyskano w hodowlach ciągłych w złożu upakowanych kapsułek, gdzie liczebność komórek wyniosła 10^{11} jtk/cm³ objętości rdzenia kapsułek. Przeprowadzono także studia nad wypełnieniem przestrzeni rdzenia kapsułki przez komórki. Po utrwaleniu biomasy w kapsułkach za pomocą suszenia sublimacyjnego otrzymano stabilną kulturę bakteryjną zawierającą 9×10^{10} jtk/g s.s. Badania nad wykorzystaniem kapsułek hydrożelowych do namnażania mikroorganizmów zostały wykonane w ramach projektu pt. „Wytwarzanie starterowych preparatów bakterii kwasu mlekowego metodą hodowli zakapsułkowanych komórek” (zał. 5, II I 2) i były przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej. Główne rezultaty tych badań zostały opublikowane (zał. 5, II A 1-3 i II D 3). Były one także zaprezentowane na konferencjach w formie wystąpienia ustnego i posterów (zał. 5, II K 2; III B 3-7 i 9-12). Dodatkowo, zdobyte doświadczenie i wiedza na temat kapsułkowania mikroorganizmów zostały upowszechnione w formie publikacji przeglądowej, która ukazała się już po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora (zał. 5, II D 6). Ponadto, także już po uzyskaniu stopnia doktora zostałem zaproszony do wygłoszenia referatu na temat metod unieruchamiania komórek i kapsułkowania mikroorganizmów w hydrożelach na forum Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (zał. 5, II K 3).

Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Wcześniejsze doświadczenia w zakresie metod hodowli mikroorganizmów i metod separacji mogłem wykorzystać w trakcie realizacji projektu, którego celem było opracowanie przemysłowej metody wytwarzania preparatów bakteriocyn dla przemysłu spożywczego oraz probiotyku wykorzystywanego w hodowli ryb (zał. 5, II I 3). Badania te były dalszą kontynuacją prac nad biosyntezą bakteriocyny diwercyny, a ich celem było umożliwienie praktycznego wykorzystania antylisteryjnych właściwości diwercyny. Będąc w składzie zespołu badawczego, zajmowałem się takimi zagadnieniami jak powiększanie skali produkcji diwercyny, opracowaniem metody przedłużenia trwałości preparatów bakteriocyny oraz sposobu produkcji stabilnych kultur starterowych bakterii *Carnobacterium divergens*. W trakcie badań powiększono skalę procesu. Doświadczenia hodowlane prowadzono w bioreaktorach o pojemnościach 5 litrów, 30 litrów i 1500 litrów. Jako kryterium powiększania skali przyjęto stałą moc mieszania przypadającą na jednostkę objętości pożywki. Wyznaczono parametry fermentacji takie jak maksymalna liczebność komórek,

szybkość wzrostu, aktywność diwercyny oraz jej produktywność w zależności od skali hodowli. Wykazano, że czynnikami, które wzmagają uwalnianie bakteriocyn do pożywki były produkty reakcji Maillarda (tworzące się w trakcie sterylizacji termicznej pożywki) oraz wyczerpywanie się składników pokarmowych w medium fermentacyjnym. W badaniach nad hodowlami ciągłymi z recyrkulacją i bez recyrkulacji biomasy określono także zależność pomiędzy liczebnością komórek a produkcją diwercyny. Wykazano, że suszenie sublimacyjne i rozpyłowe nie obniżały aktywności przeciwbakteryjnej diwercyny. Zbadano także przydatność suszenia sublimacyjnego i rozpyłowego do wytwarzania stabilnych preparatów bakterii *Carnobacterium divergens*. Określono wpływ stresów osmotycznych, różnych substancji ochronnych oraz czasu przechowywania na przeżywalność bakterii w uzyskanych suchych preparatach. Rezultaty tych prac zostały opublikowane (zał. 5, II A 5-6; II D 7-8) i były prezentowane na konferencjach naukowych (zał. 5, III B 16-18).

W trakcie badań nad biosyntezą diwercyny podjęto też próbę uzyskania czystego preparatu diwercyny za pomocą chromatografii preparatywnej. Zastanawiałem się także nad możliwością wykorzystania do oczyszczania bakteriocyn ekstrakcji typu ciecz-ciecz w wodnych układach dwufazowych. W rezultacie podjęto także badania nad oczyszczaniem takich białek jak lizozym z białka jaja kurzego, inwertaza z komórek drożdży, laktoperoksydaza z siary oraz mleka. Początkowo stosowano wodne układy dwufazowe typu PEG/inny polimer np. skrobia lub PEG/sól. Przykładowo w ekstrakcji lizozymu z białka jaja w wodnym układzie dwufazowym PEG/fosforany potasu uzyskano preparat o aktywności bliskiej 14 000 U/mg białka i współczynnika oczyszczenia równym 15. Z uwagi na zbliżone wymiary cząsteczek lizozymu i glikolu polietylenowego ich oddzielenie od siebie za pomocą prostej i taniej metody takiej jak filtracja membranowa nie była możliwe. Zastosowanie metod chromatograficznych uznano za zbyt kosztowne. Dlatego w kolejnych etapach doświadczeń postanowiono sprawdzić możliwość wykorzystania termoseparujących polimerów zamiast glikolu polietylenowego w celu rozwiązania problemu separacji białek od polimeru po ekstrakcji w wodnym układzie dwufazowym. Badania były prowadzone między innymi w ramach kierowanego przeze mnie projektu finansowanego przez MNiSW (zał. 5, I 1). Separację białek metodą ekstrakcji typu ciecz-ciecz wykonywano także w układach trójfazowych. Przykładem była izolacja laktoferyny z serwatki w układzie separacyjnym składającym się z wody, siarczanu amonu oraz tert-butanolu.

Najważniejsze rezultaty badań dotyczące oczyszczania lizozymu zostały opublikowane w pracach, które wskazałem jako główne osiągnięcie w postępowaniu habilitacyjnym. Jest to jedno z nielicznych tak kompleksowych, obecnych w literaturze opracowań na temat separacji białka w wodnym układzie dwufazowym. Dodatkowo, ekstrakcja lizozymu w wodnym układzie dwufazowym termoseparujący polimer/siarczan potasu jest przedmiotem zgłoszenia patentowego (zał. 5, II C). Pozostałe wyniki badań dotyczące ekstrakcji typu ciecz-ciecz lizozymu i innych białek zostały opublikowane (zał. 5, II A 10; II D 5), były też prezentowane na konferencjach naukowych w formie referatów i plakatów (zał. 5, II K 4 i 6; III B 19-20). Ponadto, byłem recenzentem publikacji na temat separacji przeciwciał i enzymów w wodnych układach dwufazowych w międzynarodowych czasopismach z listy filadelfijskiej (zał. 5, III P 1-2, 4).

Obecnie uczestniczę w badaniach, których celem jest opracowanie w wodnych układach dwufazowych metody oczyszczania rekombinowanej amylazy z wołka zbożowego, która jest syntetyzowana przez modyfikowane genetycznie drożdże *Yarrowia lipolytica*. W innych pracach sprawdzana jest też przydatność różnych typów wodnych układów dwufazowych do hodowli drożdży *Yarrowia lipolytica* z jednoczesną ekstrakcją powstającego 2-fenyletanolu. W większych stężeniach jest on toksyczny dla komórek, jego usuwanie do fazy polimerowej przedłuża czas trwania hodowli i zwiększa jej produktywność. 2-fenyletanol jest substancją zapachową stosowaną w przemyśle spożywczym i do produkcji kosmetyków. Jego biotechnologiczna synteza umożliwia pozyskanie substancji pochodzenia naturalnego, która dzięki temu wyróżnia się przewagą marketingową nad 2-fenyletanołem otrzymywanym na drodze syntezy chemicznej (zał. 5, III B 25-27). Badania odbywają się we współpracy z Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii w Poznaniu.

Wcześniejsze doświadczenia uzyskane podczas prac nad kapsułkowaniem i hodowlą unieruchomionych mikroorganizmów pozwoliło mi na włączenie się w realizację projektów dotyczących kapsułkowania substancji bioaktywnych oraz wytwarzania stabilnych preparatów bakterii probiotycznych. W ramach grantu finansowanego przez MNiSW opracowano metodę zwiększenia trwałości witamin A i E poprzez ich kapsułkowanie w celu ochrony przed działaniem światła, tlenu i podwyższonej temperatury (zał. 5, II I 5). Jako kapsułki wykorzystano martwe komórki drożdży, które zastosowano jako naturalne pojemniki chroniące substancje

bioaktywne. Ciekłe witaminy po zamknięciu w drożdżach mają postać proszku, dzięki czemu mogą być łatwo wprowadzane do suchych produktów żywnościowych. W trakcie realizacji projektu brałem udział w pracach nad uzyskaniem preparatu o odpowiedniej sypkości. W tym celu wyznaczono warunki jego odwadniania za pomocą suszenia sublimacyjnego po procesie kapsułkowania (zał. 5, II E 1). W innych badaniach kapsułkowanie wykorzystano do produkcji utrwalonych preparatów probiotycznych bakterii *Lactobacillus rhamnosus* GG. Kapsułki otrzymywano poprzez wysuszenie wodnych emulsji dwufazowych za pomocą suszenia sublimacyjnego lub rozpyłowego. Zbadano stabilność wodnych emulsji dwufazowych, przeżywalność komórek po suszeniu oraz stabilność preparatów podczas ich przechowywania. Zmiana liczebności komórek w preparatach w trakcie przechowywania była zależna od składu kapsułek, natomiast nie miała na nią wpływu temperatura przechowywania (zał. 5, II D 11). Uzyskaną wiedzę i umiejętności z zakresu wytwarzania preparatów probiotycznych mogłem wykorzystać w pracach, których celem było sprawdzenie korzystnego działania bakterii na organizmy zwierząt i ludzi (zał. 5, II I 10; III B 30). Obecnie jestem członkiem zespołu, którego celem jest opracowanie i sprawdzenie działania preparatów synbiotycznych, które będą wykorzystywane w żywieniu zwierząt monogastrycznych. Oczekuje się, że zastosowanie tych preparatów będzie zapobiegać chorobom bakteryjnym i zatruciom zwierząt przez toksyny, poprawi wydajność chowu i przyczyni się do wytworzenia produktów mięsnych bezpiecznych dla konsumenta. Badania odbywają się w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju we współpracy m. in. z Politechniką Łódzką oraz partnerem przemysłowym (zał. 5, II I 11; III B 31-32). Doświadczenie z zakresu unieruchamiania komórek mikroorganizmów i wytwarzania preparatów probiotycznych wykorzystałem także w zamawianych ekspertyzach (zał. 5, III M 1-2).

Kolejnym nurtem badań, które pozostaje w sferze moich zainteresowań naukowych i gdzie mogłem wykorzystać swoje wcześniejsze doświadczenia, było wykorzystanie technik filtracyjnych w bioreaktorach membranowych. Wyniki tych badań zostały opublikowane (zał. 5, II A 9; II D 12), były też tematem referatu (zał. 5, II K 7). W ramach projektu dotyczącego biotechnologicznego przetwarzania odpadów przemysłu ziemniaczanego, białka soku ziemniaczanego (produkt odpadowy przemysłu skrobiowego) zostały poddane ciągłej hydrolizie enzymatycznej w bioreaktorze membranowym wyposażonym w moduł ultrafiltracyjny (zał. 5, II I 4).. Zbadano także wpływ wstępnej obróbki soku za pomocą wirowania i mikrofiltracji na

wydajność hydrolizy. Założono, że produkty hydrolizy białek będą mogły być wykorzystane do celów spożywczych. W innych badaniach bioreaktor membranowy został wykorzystany do ciągłej produkcji etanolu z natywnej skrobi w procesie jednoczesnej jej hydrolizy i fermentacji. Instalacja procesowa została wyposażona w ceramiczną membranę mikrofiltracyjną. Zbadano wpływ parametrów filtracji takich jak ciśnienie transmembranowe i prędkość ścinania na strumień filtratu oraz akumulację zanieczyszczeń w przegrodzie filtracyjnej i na jej powierzchni. Wyznaczono także optymalne parametry procesu. Doświadczenia przeprowadzono we współpracy z Politechniką Poznańską.

W kolejnych etapach mojej pracy badawczej zajmowałem się separacją i oczyszczaniem substancji bioaktywnych. W ramach tej tematyki byłem zaangażowany w realizację dwóch projektów badawczych finansowanych przez MNiSW (zał. 5, II I 7 i 9) oraz brałem udział we współpracy z partnerem przemysłowym w programie Konkurencyjność – Unia dla Przedsiębiorczych (zał. 5, III A 3). W badaniach prowadzono ekstrakcję naturalnych antyoksydantów polifenolowych z owoców, warzyw i wyłoków owocowych. Doświadczenia były wykonywane w skali laboratoryjnej i półtechnicznej. Potwierdzono, że niskotemperaturowe metody zagęszczania takie jak kriokoncentracja zapewniają większą stabilność antocyjanów niż metody wymagające podwyższonej temperatury. Opisano kinetykę ekstrakcji związków bioaktywnych za pomocą modeli matematycznych. Oznaczono także potencjał przeciwutleniający uzyskanych ekstraktów. Opracowano także metodę otrzymywania preparatów pojedynczych antocyjanów z ekstraktów za pomocą chromatografii preparatywnej w odwróconym układzie faz. Czystość uzyskanych preparatów było zasadniczo większa niż 90%. W dalszych pracach w modelach komórkowych potwierdzono duży potencjał przeciwnowotworowy uzyskanych ekstraktów i preparatów antocyjanów w aspekcie ich wykorzystania w profilaktyce nowotworów jelita grubego. Wyniki tych badań zostały opublikowane (zał. 5, II A 13-16 i 18-19; II D 9-10 i 13-14), były też prezentowane na konferencjach (zał. 5, III B 21, 23-24). Obecnie jestem członkiem zespołu, który w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki będzie zajmował się wytwarzaniem ekstraktów z owoców jagodowych zawierających związki bioaktywne takie jak antocyjany oraz kwasy fenolowe i badał potencjał biologiczny tych preparatów w kulturach komórkowych w kierunku prewencji otyłości i zaburzeń zespołu metabolicznego (zał. 5, II I 12).

Wiedzę i umiejętności z zakresu utrwalania materiałów biologicznych mogłem wykorzystać także w trakcie współpracy z Instytutem Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Ośrodek ten zajmuje się badaniami nad innowacyjną szczepionką przeciwko wirusowi HBV, który jest odpowiedzialny za wywoływanie wirusowego zapalenia wątroby typu B. Koncepcja szczepionki zakłada doustne podanie materiału roślinnego, w którym wystąpiła ekspresja genów kodującym białka powierzchniowe wirusa. W ramach grantu finansowanego przez MNiSW uczestniczyłem w pracach, których celem było opracowanie optymalnych warunków suszenia sublimacyjnego oraz długookresowego przechowywania materiału roślinnego pod kątem stabilności białek wirusa (zał. 5, II I 6). Wyniki tych badań zostały opublikowane (zał. 5, II A 11 i 17) i zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych (zał. 5, II K 8; III B 22 i 28).

Brałem także udział w pracach zespołu zajmującego się biosyntezą przez mikroorganizmy 1,3-propanodiolu z odpadowego glicerolu. 1,3-propanodiol jest monomerem w procesie wytwarzania syntetycznych polimerów. Celem badań było opracowanie technologii syntezy i oczyszczania 1,3-propanodiolu, która mogłaby zastąpić obecnie stosowane przez przemysł chemiczny rozwiązania oparte o przerób ropy naftowej. Projekt był wykonywany w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka przez konsorcjum naukowe Zielona Chemia, którego uczestnikami oprócz Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu były też inne podmioty, w tym m.in. Politechnika Poznańska czy Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu (zał. 5, II I 8; III E 1). Mój udział w pracach zespołu polegał na uczestnictwie w standaryzacji niektórych metod analitycznych, badaniach nad separacją 1,3-propanodiolu z brzezki pofermentacyjnej oraz przygotowaniu dokumentacji technologicznej procesu. Projekt technologii produkcji 1,3-propanodiolu z odpadowego glicerolu został wykonany m.in. w programie Super Pro Designer (zał. 5, II E 3; II K 5). Program ten służy do modelowania i optymalizacji procesów biotechnologicznych. W trakcie prac nad opracowaniem linii technologicznej mogłem wykorzystać wiedzę i umiejętności nabyte w trakcie szkolenia w Delft University of Technology (zał. 5, III L 4).

W trakcie mojej pracy naukowo-badawczej uczestniczyłem także w pracach zespołu, który zajmował się takimi zagadnieniami biotechnologii środowiskowej jak usuwanie azotanów z wody i ścieków zawierających wysokie stężenia soli oraz biodegradacją herbicydów (zał. 5, II A 4, 7, 8, 12; III B 13-15).

Zestawienie dorobku naukowego

Rodzaj aktywności	Ilość	IF	Punkty MNiSW
Prace oryginalne	34*	46,718	801
Prace przeglądowe	3*	-	26
Rozdziały w monografiach	2	-	8
Zgłoszenia patentowe	1	-	-
Referaty na konferencjach	8	-	-
Komunikaty na konferencjach krajowych i międzynarodowych	32		
Łącznie	80	46,718	835

* Opublikowane publikacje cytowano **173 razy**. Indeks Hirscha **7** (wg Web of Science)

Dembczyński