



UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE
Instytut Nauk Biologicznych

Mateusz Kutyla

**Biokataliza alkoholi terpenowych do nowych związków
aktywnych biologicznie**

***Biocatalysis of terpene alcohols to new biologically active
compounds***

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Mariusz Trytek, prof. UMCS

Lublin, 2022

Spis treści

| | |
|--|----|
| Wykaz skrótów stosowanych w pracy | 6 |
| Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim..... | 10 |
| Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim | 11 |
| 1. Wstęp..... | 12 |
| 1.1. Charakterystyka terpenów..... | 12 |
| 1.1.1. Biosynteza | 13 |
| 1.1.2. Rola biologiczna w naturze | 17 |
| 1.2. Biokataliza..... | 20 |
| 1.2.1. Definicja biokatalizy i rodzaje stosowanych biokatalizatorów | 20 |
| 1.2.2. Biokataliza alkoholi terpenowych | 26 |
| 1.2.2.1. Estryfikacja przy użyciu lipaz..... | 26 |
| 1.2.2.2. Biokataliza w układzie biomimetycznym | 28 |
| 1.3. Aktywność terapeutyczna monoterenów..... | 32 |
| 1.3.1. α -pinen, β -pinen i limonen | 32 |
| 1.3.2. Cytronellol..... | 36 |
| 1.3.3. Geraniol | 38 |
| 1.3.4. Alkohol perylowy..... | 41 |
| 1.3.5. Myrtenol | 43 |
| 2. Cel pracy | 46 |
| 3. Materiały i metody | 47 |
| 3.1. Odczynniki chemiczne | 47 |
| 3.2. Materiał biologiczny | 49 |
| 3.2.1. Selekcja biokatalizatorów grzybowych do estryfikacji alkoholi terpenowych | 49 |
| 3.2.2. Mikroorganizmy użyte do określenia aktywności biologicznej produktów biokatalizy.... | 49 |
| 3.2.3. Linie komórkowe | 50 |
| 3.3. Podłoża i bufony | 51 |
| 3.3.1. Podłoże stałe do wstępnej oceny aktywności lipolitycznej | 51 |
| 3.3.2. Podłoża płynne stosowane do hodowli grzybów | 51 |
| 3.3.3. Bufory i inne roztwory..... | 53 |
| 3.4. Metody badań..... | 54 |
| 3.4.1. Przygotowanie materiału posiewowego..... | 54 |
| 3.4.2. Wstępne określenie aktywności lipolitycznej w teście płytkowym | 54 |
| 3.4.3. Warunki hodowli drobnoustrojów..... | 54 |
| 3.4.4. Optymalizacja stężenia Tween' u 80 | 55 |
| 3.4.5. Zagęszczanie płynu pochodowlanego | 55 |
| 3.4.6. Wytrącanie białek z płynu pochodowlanego za pomocą rozpuszczalników organicznych | 55 |
| 3.4.7. Liofilizacja grzybni i białek wytrąconych z płynu pochodowlanego..... | 56 |
| 3.4.8. Określenie stabilności temperaturowej enzymu o aktywności lipolitycznej..... | 56 |
| 3.4.9. Elektroforeza białek | 56 |
| 3.4.10. Ogólne warunki estryfikacji alkoholi terpenowych..... | 57 |
| 3.4.11. Określenie optymalnych warunków estryfikacji cytronellołu i kwasu octowego | 57 |
| 3.4.12. Określenie wpływu rodzajów reagentów na wydajność reakcji estryfikacji | 58 |
| 3.4.13. Wpływ różnych czynników środowiskowych na aktywność biokatalityczną grzybni | 59 |
| 3.4.13.1. Aktywność biokatalityczna grzybni inkubowanej w różnym pH przed liofilizacją... .. | 59 |
| 3.4.13.2. Wpływ jonów metali na biomasę i aktywność katalityczną grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 | 60 |
| 3.4.13.3. Inkubacja grzybni z alkoholami terpenowymi i kwasami przed liofilizacją | 60 |
| 3.4.13.4. Pojemność wodna grzybni w reakcji estryfikacji | 60 |
| 3.4.13.5. Stabilność operacyjna grzybni | 61 |
| 3.4.13.6. Stabilność grzybni podczas rocznego przechowywania | 61 |
| 3.4.13.7. Bioimprinting grzybni kwasami tłuszczowymi | 61 |
| 3.4.14. Biomimetyczna transformacja alkoholi terpenowych przy użyciu porfiryn | 61 |
| 3.4.15. Określenie optymalnych warunków fotoutleniania myrtenolu przy użyciu tetrafenyloporfiryny..... | 62 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.16. Określenie mechanizmu biomimetycznej oksydacji myrtenolu..... | 62 |
| 3.4.17. Izolacja produktów biokatalizy | 64 |
| 3.4.18. Określenie aktywności biologicznej produktów biotransformacji alkoholi terpenowych .. | 65 |
| 3.4.18.1. Właściwości cytotoksyczne wobec komórek glejaka ludzkiego | 65 |
| 3.4.18.2. Określenie aktywności antymikrobiologicznej | 65 |
| 3.5. Metody analityczne | 68 |
| 3.5.1. Oznaczanie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej metodą miareczkową..... | 68 |
| 3.5.2. Ilościowe oznaczanie białka metodą Bradford | 69 |
| 3.5.3. Analiza jakościowa i ilościowa produktów biokatalizy – chromatografia gazowa (GC-FID) i chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)..... | 69 |
| 3.5.4. Analiza FTIR-ATR..... | 70 |
| 3.5.5. Spektrofotometria UV-VIS – monitorowanie widm absorpcji biokatalizatorów porfiryńowych | 70 |
| 3.5.6. Analiza emisji IR tlenu singletowego (1O_2) | 70 |
| 3.5.7. Mikroanaliza rentgenowska SEM-EDS..... | 71 |
| 3.5.8. Analiza magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)..... | 71 |
| 3.5.9. Analiza statystyczna | 71 |
| 4. Opis wyników badań..... | 72 |
| 4.1. Charakterystyka aktywności lipolitycznej <i>C. pannorum</i> A-1 | 72 |
| 4.1.1. Ocena aktywności lipolitycznej <i>C. pannorum</i> A-1 względem szczepów o potwierdzonej aktywności lipolitycznej..... | 72 |
| 4.1.2. Dobór podłoża do biosyntezy enzymu o aktywności lipolitycznej przez <i>C. pannorum</i> A-1. | 72 |
| 4.1.3. Określenie optymalnej temperatury i pH dla aktywności enzymu o aktywności lipolitycznej | 73 |
| 4.1.4. Określenie stabilności temperaturowej preparatu o aktywności lipolitycznej | 74 |
| 4.1.5. Wpływ węglanu wapnia na aktywność lipolityczną, pH i biomasę <i>C. pannorum</i> A-1 | 74 |
| 4.1.6. Optymalizacja stężenia induktora | 75 |
| 4.1.7. Zagęszczanie i wytrącanie białek z płynu pochodowlanego | 77 |
| 4.1.8. Wybór formy biokatalizatora do estryfikacji alkoholi terpenowych | 78 |
| 4.1.9. Wpływ jonów metali na biomasę i aktywność katalityczną grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 | 79 |
| 4.1.10. Charakterystyka biokatalizatorów grzybowych z użyciem FTIR-ATR | 80 |
| 4.1.11. SEM-EDS biokatalizatorów grzybowych | 83 |
| 4.2. Estryfikacja alkoholi terpenowych przy użyciu grzybni <i>C. pannorum</i> A-1..... | 85 |
| 4.2.1. Optymalizacja warunków estryfikacji cytronellołu i kwasu octowego..... | 85 |
| 4.2.2. Wpływ inkubacji grzybni w różnym pH przed liofilizacją na wydajność estryfikacji | 89 |
| 4.2.3. Wpływ struktury reagentów na wydajność estryfikacji | 91 |
| 4.2.4. Inkubacja grzybni z alkoholami terpenowymi i kwasami karboksylowymi przed liofilizacją..... | 92 |
| 4.2.5. Bioimprinting grzybni kwasami tłuszczowymi | 93 |
| 4.2.6. Pojemność wodna grzybowego biokatalizatora | 96 |
| 4.2.7. Stabilność operacyjna biokatalizatora oraz wpływ temperatury i czasu przechowywania biokatalizatora na aktywność katalityczną..... | 96 |
| 4.3. Kataliza biomimetyczna..... | 97 |
| 4.3.1. Kataliza biomimetyczna cytronellołu, alkoholu perylowego i myrtenolu przy użyciu porfiryń komercyjnych i pochodnych protoporfiryny IX..... | 97 |
| 4.3.2. Dobór porfiryny do katalizy biomimetycznej myrtenolu | 99 |
| 4.3.3. Analiza magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) tlenku myrtenalu – nowego produktu utleniania myrtenolu | 105 |
| 4.3.4. Optymalizacja warunków katalizy biomimetycznej myrtenolu..... | 108 |
| 4.3.5. Mechanizm biomimetycznej katalizy myrtenolu | 110 |
| 4.4. Aktywność biologiczna produktów biokatalizy alkoholi terpenowych | 114 |
| 4.4.1. Aktywność antynowotworowa wobec komórek glejaka ludzkiego | 114 |

| | |
|--|-----|
| 4.4.2. Aktywność antymikrobiologiczna | 116 |
| 5. Dyskusja..... | 121 |
| 6. Wnioski | 141 |
| 7. Część wyników rozprawy doktorskiej jest przedmiotem | 143 |
| 8. Bibliografia | 144 |
| 9. Spis tabel..... | 156 |
| 10. Spis rycin..... | 158 |
| 11. Suplement..... | 161 |
| 12. Aneks – życiorys naukowy | 163 |

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

1-Phe – ang. *1-phenylalanine* – 1-fenylalanina;
2-OG – ang. *2-oxoglutarate* – 2-oksoglutaran;
2-PE – ang. *2-phenylethanol* – 2-fenyletanol;
5FU – ang. *5-fluorouracil* – 5 fluorouracyl;
Ach – ang. *Acetylcholine* – Acetylocholina;
ADP – ang. *Adenosine diphosphate* – Adenozyno-5'-difosforan;
AIDS – ang. *Acquired immunodeficiency syndrome* – Zespół nabytego niedoboru odporności;
ATCC – ang. *American Type Culture Collection* – Amerykańska Kolekcja Kultur;
ATP – ang. *Adenosine triphosphate* – Adenozyno-5'-trifosforan;
APS – ang. *Ammonium persulfate* – Nadsiarazan amonu;
BCL – ang. *Burkholderia cepacia lipase* – lipaza z *Burkholderia cepacia*;
BHI – ang. *Brain hearth infusion* – Wyciąg mózgowo-sercowy;
BHT – ang. *2,6-di-tert-butylphenol* – 2,6-di-tert-butylofenol;
CAT – ang. *Catalase* – Katalaza;
CDK – ang. *Cyclin-dependent kinases* – Kinazy zależne od cyklin;
CDP – ang. *Chrysanthemyl diphosphate* – Difosforan chryzantemyli;
CFU – ang. *Colony-forming unit* – Jednostka tworząca kolonię;
CMK – ang. *Cytidylate kinase* – Kinaza cytydylanowa;
COX – ang. *Cyclooxygenase* – Cyklooksygenaza;
COX-2 ang. *Cyclooxygenase-2* – Cyklooksygenaza-2;
CPL – ang. *Carica papaya lipase* – Lipaza z Melonowca właściwego;
CTP – ang. *Cytidine triphosphate* – Cytydino-5'-trifosforan;
CYP450 – ang. *Cytochrome P450* – Cytochrom P450;
DMAC – ang. *Dimethylacetamide* – Dimetyloacetamid;
DAPI – ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole* – 4',6-diamidyno-2-fenylindol;
DMAPP – ang. *Dimethylallyl diphosphate* – Difosforan dimetyloallilu;
DMEM – ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Zmodyfikowane Podłoże Eagle Dulbecco;
DMF – ang. *Dimethylformamide* – Dimetyloformamid;
DMNT – ang. *4,8-dimethylnona-1,3,7-triene* – 4,8-dimetylonona-1,3,7-trien;
DMSO – ang. *Dimethylsulfoxide* – Dimetylosulfotlenek;
DNA – ang. *Deoxyribonucleic acid* – Kwas deoksyrybonukleinowy;
DTT – ang. *Dithiothreitol* – Ditiotreitol;
DXR – ang. *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductase* - Reduktaza 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforanowa;
DXS – ang. *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase* – Syntaza 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforanowa;
ECACC – ang. *European Collection of Authenticated Cell Cultures* – Europejska Kolekcja Uwierzytelnionych Kultur Komórkowych;
EDS – ang. *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* – Spektroskopia rentgenowska z dyspersją energii;
EFS – ang. *Electrical field-stimulated* – Stymulowane polem elektrycznym;
FDA – ang. *Food and Drug Administration* – Agencja Żywności i Leków;
Fe^{III}(TF₅PP)Cl – ang. *5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin iron (III) chloride* – 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenyl)porfiryne chlorku żelaza (III);
Fe^{III}(TPP)Cl – ang. *Iron (III) chloride 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin* – 5,10,15,20-tetrafenylporfiryne chlorku żelaza (III);
FGP – ang. *Farnesylgeranyl phosphate* – Farnezylogeranylo-fosforan;
FGPPS – ang. *Farnesyl pyrophosphate synthase* – Syntaza pirofosforanu farnezyli;
FPP – ang. *Farnesyl pyrophosphate* – Farnezylo-pirofosforan;
FPPS – ang. *Farnesyl pyrophosphate synthase* – Syntaza farnezylo-pirofosforanowa;
FTIR-ATR – ang. *Fourier Transform Infrared - Attenuated Total Reflectance* – Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera z osłabionym całkowitym odbiciem;
GABA-A – *γ-Aminobutyric acid type A* – Kwas γ -aminomasłowy typu A;
GC-FID – ang. *Gas chromatography - flame ionization detector* – Chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym;
GC-MS – ang. *Gas chromatography - mass spectrometry* – Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas;
GcpE – ang. *4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase gene* – Gen kodujący syntazę Difosforan 4-hydroksy-3-metylobut-2-en-1-yli;
GlcNAc – ang. *N-acetylglucosamic acid* – kwas N-acetyloglukozaminowy;
GGPPS – ang. *Geranylgeranyl synthase* – Syntaza geranylogeranyli;

GP – ang. *Geranyl monophosphate* – Monofosforan geranylu;
 GPP – ang. *Geranyl pyrophosphate* – Geranylo-pirofosforan;
 GPPS – ang. *Geranyl pyrophosphate synthase* – Syntaza geranylo-pirofosforanowa;
 GR – ang. *Glutathione reductase* – Reduktaza glutationowa;
 GSH – ang. *Glutathione* – Glutation;
 GSHPx – ang. *Glutathione peroxidase* – Peroksydaza glutationowa;
 H₂OEP – ang. *2,3,7,8,12,13,17,18-octaethylporphyrin* – 2,3,7,8,12,13,17,18-oktaetyloporfiryna;
 H₂TAlxPP – ang. *5,10,15,20-tetrakis[(4-allyloxy)phenyl] porphyrin* – 5,10,15,20-tetrakis[(4-alliloksy)fenylo]porfiryna;
 H₂TF₃PP – ang. *5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin* – 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenylo)porfiryna;
 H₂TTP – ang. *5,10,15,20-tetraphenylporphyrin* – 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryna;
 H₂TTPOMe – ang. *5,10,15,20-tetrakis(4-methoxyphenyl)porphyrin* – 5,10,15,20-tetrakis(4-metoksyfenylo)porfiryna;
 HDR – ang. *4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase* – Reduktaza difosforanu 4-hydroksy-3-metylobut-2-enylu;
 HDS – ang. *4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase* – Syntaza difosforanu 4-hydroksy-3-metylobut-2-enylu;
 HMG CoA – ang. *β-Hydroxy β-methylglutaryl-CoA* – 3-Hydroksy-3-metyloglutarylokoenzym A;
 HS-CoA, CoA – ang. *Coenzyme A* – Koenzym A;
 HSP90 – ang. *90 kDa Heat shock protein* – Białko szoku cieplnego o masie 90 kDa;
 hTERT – ang. *Catalytic subunit of telomerase* – Katalityczna podjednostka telomerazy;
 IC₅₀ – ang. *Half maximal inhibitory concentration* – Połowa maksymalnego stężenia hamującego;
 IDI – ang. *Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase* – Delta-izomeraza izopentenylo-difosforanowa;
 IgE – ang. *Immunoglobulin E* – Immunoglobulina E;
 IL-1β – ang. *Interleukin 1β* – Interleukina 1β;
 IL-6 – ang. *Interleukin 6* – Interleukina-6;
 iNOS – ang. *Nitric oxide synthase* – Syntaza tlenku azotu;
 IPP – ang. *Isopentenyl diphosphate* – Difosforan izopentenyli;
 IR – ang. *Infrared* – Światło podczerwone;
 IspD – ang. *2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase gene* – Gen kodujący 2-C-metylo-D-erytrytol-4-fosforan cytydylotransferazę;
 IspE – ang. *4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase gene* – Gen kodujący kinazę 4-difosfocytydylo-2-C-metylo-D-erytrytolu;
 IspF – ang. *2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase gene* – Gen kodujący syntazę 2,4-cyklodifosforan 2-C-metylo-D-erytrytolu;
 IspG – ang. *4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase gene* – Gen kodujący syntazę Difosforan 4-hydroksy-3-metylobut-2-en-1-ylu;
 IUPAC – ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry* – Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej;
 JNK – ang. *c-Jun N-terminal kinases* – Kinazy c-Jun N-końcowe;
 LCST – ang. *Lower critical solution temperature* – Niższa temperatura krytyczna roztworu;
 LDL – ang. *Low-density lipoprotein* – Lipoproteina o niskiej gęstości;
 L-NAME – ang. *NG-nitro-L-arginine methyl ester* – Ester metylowy NG-nitro-L-argininy;
 LPS – ang. *Lipopolysaccharide* – Lipopolisacharyd;
 LPP – ang. *Lavandulyl diphosphate* – Difosforan lawandulilu;
 LytB – ang. *4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase gene* – Gen kodujący reduktazę Difosforan 4-hydroksy-3-metylobut-2-enylu;
 LZO – Lotne związki organiczne;
 MAPK – ang. *Mitogen-activated protein kinase* – Kinazy białkowe aktywowane mitogenami;
 MBC – ang. *Minimal bactericidal concentration* – Minimalne stężenie bójcze bakterii;
 MDA – ang. *Malondialdehyde* – Dialdehyd malonowy;
 MEA – ang. *Maltose agar* – Stałe podłoże maltozowe;
 MEP – ang. *2-Methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway* – Szlak 4-fosforan 2-metylo-D-erytrytolu;
 MIC – ang. *Minimal inhibitory concentration* – Minimalne stężenie hamujące;
 MOGCCM – ang. *Human anaplastic astrocytoma cell line MOGCCM* – Linia ludzkich komórek gwiazdki anaplastycznego MOGCCM;
 MPTP – ang. *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine* – 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna;
 mRNA – ang. *Messenger Ribonucleic Acid* – Matrycowy Kwas Rybonukleinowy;

MRSA – ang. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – Metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus*;
 MTBE – ang. *Tert-methyl-butyl ether* – Eter-tert-metylo-butyłowy;
 mTOR – ang. *Mammalian target of rapamycin kinase* – Ssaczy cel rapamycyny;
 MTT – ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* – Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy;
 MVA – ang. *Mevalonate pathway* – Szlak mewalonowy;
 NADP⁺ -ang. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* - Fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego;
 NADPH – ang. *Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* – Zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego;
 Nau5Ac – *N-acetyl-D-neuraminic acid* – Kwas N-acetylo-D-neuraminowy;
 NCBI – ang. *National Center for Biotechnology Information* – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej;
 NF-κB – ang. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* – Czynn timer jądrowy κB;
 NMP – ang. *N-methyl-2-pyrrolidone* – N-metylo-2-pirolidon;
 NMR – ang. *Nuclear magnetic resonance* – Magnetyczny rezonans jądrowy;
 NO – ang. *Nitric oxide* – Tlenek azotu;
 NR – ang. *Neutral Red* – Czerwień obojętna;
 NSCLC – ang. *Non-small cell lung cancer* – Niedrobnokomórkowy rak płuc;
 S6K – ang. *Ribosomal kinase S6* – Rybosomalna kinaza S6;
 SDS – ang. *Sodium lauryl sulfate* – Laurylosiarczan sodu;
 SDS-PAGE – ang. *Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis* – Elektroforeza białek w warunkach denaturujących;
 SEM – ang. *Scanning electron microscope* – Skaningowy mikroskop elektronowy;
 SOD – ang. *SuperOxide Dismutase* – Dysmutaza ponadtlenkowa;
 STZ – ang. *Streptozocin* – Streptozocyna;
 RNA – ang. *Ribonucleic acid* – Kwas rybonukleinowy;
 ROS – ang. *Reactive oxygen species* – Reaktywne formy tlenu;
 PAAS – ang. *The phenylacetaldehyde synthesis pathway* – Szlak syntezy fenyloacetaldehydu;
 PAC – ang. Paclitaxel – Paklitaksel;
 PCMC – ang. *Protein-coated microcrystals* – Mikrokryształy powleczone białkiem;
 PCNA – ang. *Proliferating cell nuclear antygen* – Jądrowy antygen komórek proliferujących;
 PGE2 – ang. *Prostaglandin E2* – Prostaglandyna-E2;
 PI3K – ang. *Phosphoinositide 3-kinase* – Kinaza 3-fosfoinozytydu;
 poliNIPAM – ang. *Poly-N-isopropylacrylamide* – Poli-N-izopropylakrylamid;
 PPL – ang. *Lipase from porcine pancreas* – Lipaza z trzustki świni;
 PPIX(Me)₂ – ang. *Methyl ester derivative of protoporphyrin IX* – Metyloestrowa pochodna protoporfiryny IX;
 PPIX(OH)₂ – ang. Hydroxyl derivative of protoporphyrin IX – Hydroksylowa pochodna protoporfiryny IX;
 PPIX[P(O)(OEt)₂]₂ – ang. Phosphonate derivative of protoporphyrin IX – Fosfonianowa pochodna protoporfiryny IX;
 PPi – ang. *Pyrophosphate* – Pirofosforan;
 PTEN – ang. *Phosphatensin homologue* – Homolog fosfotensyny;
 RPM – ang. *Revolutions per minute* – Obroty na minutę;
 T98G – ang. *Human glioblastoma cell line T98G* – Linia ludzkich komórek glejaka wielopostaciowego T98G;
 TBARS – ang. *Thiobarbituric acid* – Kwas tioarbiturowy;
 TEMED – ang. *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine* – N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina;
 TGF – ang. *Transforming growth factor* – Transformujący czynnik wzrostu;
 THF – ang. *Tetrahydrofuran* – Tetrahydrofuran;
 TLC – ang. *Thin-layer chromatography* – Chromatografia cienkowarstwowa;
 TMTT – ang. *4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene* – 4,8,12-trimetylotrideka-1,3,7,11-tetraen;
 TNF-α – ang. *Tumor necrosis factor α* – Czynn timer martwicy nowotworu-α;
 TPS – ang. *Terpene synthases* – Syntazy terpenowe;
 Tris – ang. *2-amino-2-(hydroxymethyl) propan-1,3-diol* – 2-amino-2-(hydroksymetyl)propan-1,3-diol;
 TSB – ang. *Tryptose-soy bullion* – Bulion tryptozowo-sojowy;
 TTC – ang. *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride* – Chlorek 2,3,5-trifenylotetrazoliowy;
 U – ang. *Unit* – Jednostka aktywności enzymu;
 USD – ang. *United States Dollar* – Dolar amerykański;
 UV-VIS – ang. *UV-Visible* – Światło UV i widzialne;
 WHO – ang. *World Health Organisation* – Światowa Organizacja Zdrowia;

yhbB – ang. *4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase gene* – Gen kodujący kinazę 4-difosfocytydylo-2-C-metylo-D-erytrytolu;
ygbP – ang. *4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol synthetase gene* – Gen kodujący syntetazę 4-difosfocytydylo-2-C-metyloerytrytolu;
ZnTPP – ang. *Zinc (II) tetraphenylporphyrin* – Tetrafenyloporfiryna cynku (II);
ZnTPyP – ang. *5,10,15,20-tetra (4-pyridyl) zinc porphyrin* – 5,10,15,20-tetra(4-pirydylo)porfiryna cynku.

Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim

Terpeny są najliczniejszą klasą naturalnych związków występujących na Ziemi. Od dawna są chętnie wykorzystywane przez ludzi jako związki smakowo-zapachowe i lecznicze. Wśród nich, alkohole terpenowe, wykazują szeroki potencjał terapeutyczny w leczeniu wielu chorób. Modyfikacja struktury alkoholi terpenowych z wykorzystaniem bezpiecznych, selektywnych i zrównoważonych metod biokatalitycznych może prowadzić do otrzymania nowych produktów o potencjalnie zwiększonej aktywności terapeutycznej.

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono estryfikację alkoholi terpenowych z użyciem grzybni o aktywności lipolitycznej, a także transformację fotokatalityczną z wykorzystaniem porfiryn jako biomimetyków enzymów. W badaniach dowiedziono, że liofilizowana grzybnia psychrofilnego grzyba *Chrysosporium pannorum* A-1 jest wydajnym katalizatorem estryfikacji pierwszorzędowych alkoholi terpenowych i kwasów karboksylowych. Zoptymalizowano warunki otrzymywania biokatalizatora w wyniku czego zwiększono znacząco aktywność biokatalityczną grzybni oraz wydajność uzyskiwanej biomasy. Zoptymalizowano również proces estryfikacji, który zachodzi z największą wydajnością w heksanie zawierającym 3% w/v biokatalizatora, z dwukrotnym nadmiarem alkoholu do kwasu w 30-40°C. Dowiedziono, że liofilizowana grzybnia *C. pannorum* A-1 może być wykorzystana w minimum 7 cyklach katalitycznych i zachowuje ponad 80% aktywności po rocznym przechowywaniu w -20°C. Z kolei, spośród badanych alkoholi terpenowych tylko myrtenol ulega biomimetycznej oksydacji przy użyciu porfiryn w układzie fotokatalitycznym. Transformacja myrtenolu do tlenku myrtenalu zachodzi z największą wydajnością w chloroformie przy 0,1 M stężeniu substratu, 0,1-0,2 mM stężeniu tetrafenylporfiryny (H₂TPP) w 25°C. Zaproponowano także, że mechanizm fotoutlenienia myrtenolu, jest ściśle powiązany z tworzeniem się dikationu porfiryny i opiera się na konkurencyjnym udziale reaktywnych form tlenu: tlenu singletowego (¹O₂) oraz rodników tlenowych. Badania aktywności biologicznej produktów biokatalizy alkoholi terpenowych na ludzkich liniach komórek glejaka oraz w testach antymikrobiologicznych wskazują, że niektóre produkty biokatalizy wykazują wyższą aktywność biologiczną niż ich alkoholowe prekursorzy.

Słowa kluczowe: Biokataliza; terpeny; alkohole terpenowe; *Chrysosporium pannorum*; optymalizacja; estryfikacja; porfiryny, 5,10,15,20-tetrafenylporfiryna (H₂TPP); kataliza biomimetyczna; aktywność biologiczna.

Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim

Terpenes are the most numerous class of natural compounds on Earth. They have long been eagerly used by humans as flavour and medicinal compounds. Among them, terpene alcohols show broad therapeutic potential for treating many diseases. Modification of the structure of terpene alcohols using safe, selective and sustainable biocatalytic methods can lead to development of new products with potentially enhanced therapeutic activity.

In the present study, terpene alcohols were esterified using mycelium with lipolytic activity and photocatalytic transformation was carried out using porphyrins as enzyme biomimetics. The study proved that the lyophilized mycelium of the psychrophilic fungus *Chrysosporium pannorum* A-1 is an efficient catalyst for the esterification of primary terpene alcohols and carboxylic acids. The conditions for obtaining the biocatalyst were optimized, which significantly increased the biocatalytic activity of the fungus and the yield of the obtained biomass. The esterification process was also optimized; it exhibited the highest efficiency in hexane containing 3% w/v of the biocatalyst with a twofold excess of alcohol to acid at 30-40°C. It has been proved that freeze-dried mycelium of *C. pannorum* A-1 can be used in a minimum of 7 catalytic cycles and retains more than 80% of activity after one-year storage at -20°C. In contrast, among the terpene alcohols studied, only myrtenol undergoes biomimetic oxidation using porphyrins in a photocatalytic system. Transformation of myrtenol to myrtenal oxide occurs with the highest efficiency in chloroform at the 0.1 M substrate concentration and the 0.1-0.2 mM tetraphenylporphyrin (H₂TPP) concentration at 25°C. It was also proposed that the mechanism of photooxidation of myrtenol is closely related to the formation of porphyrin dication and is based on the competitive participation of the reactive oxygen species: singlet oxygen (¹O₂) and oxygen radicals. Studies of the biological activity of biocatalysis products of terpene alcohols on human glioma cell lines and in antimicrobial assays indicate that some biocatalysis products show higher biological activity than their alcoholic precursors.

Key words: Biocatalysis; terpenes; terpene alcohols; *Chrysosporium pannorum*; optimization; esterification; porphyrins; 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin (H₂TPP); biomimetic catalysis; biological activity.

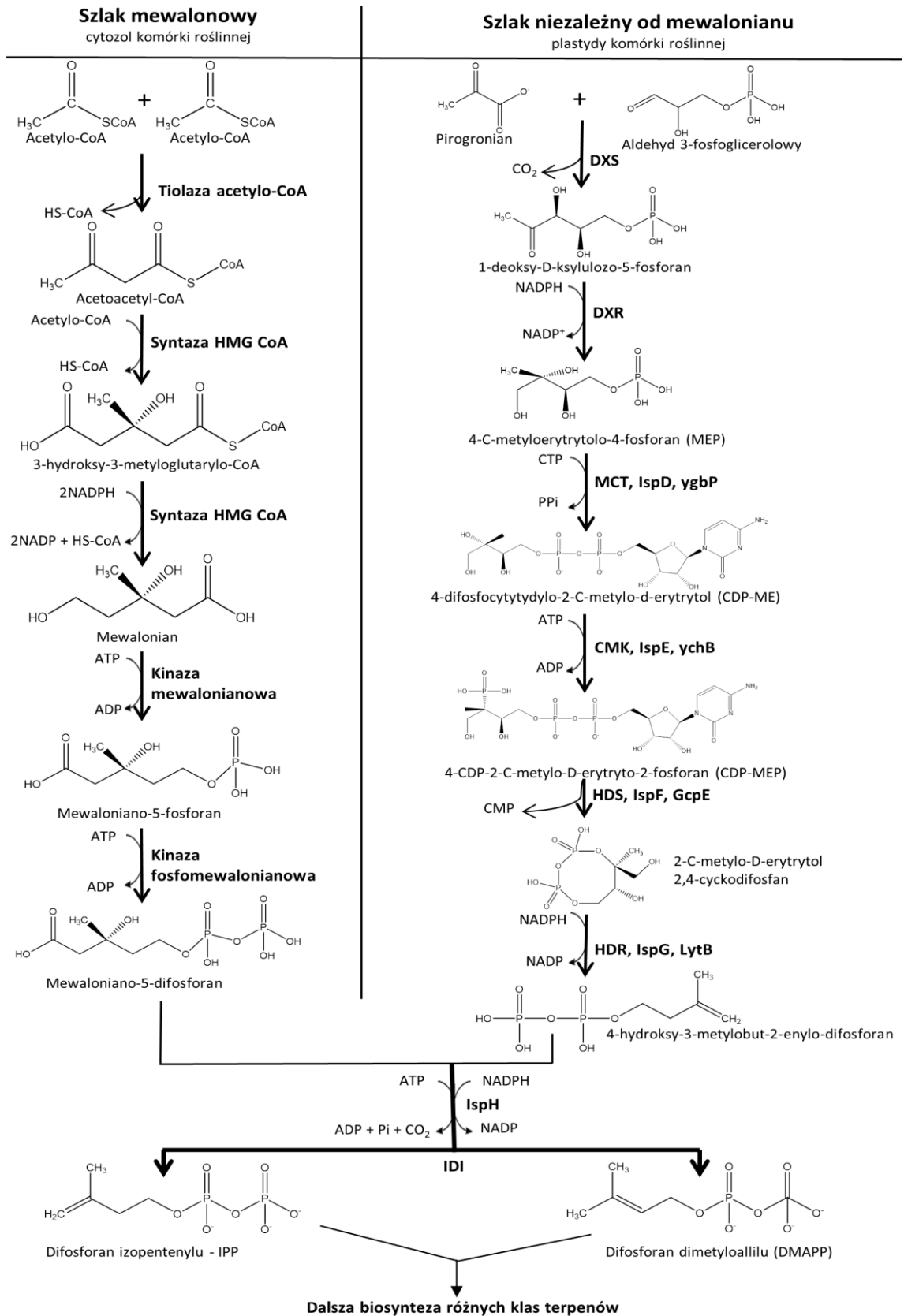
1. Wstęp

1.1. Charakterystyka terpenów

Terpeny stanowią największą klasę związków chemicznych występujących w naturze (Zhou i Pichersky, 2020). Nazwa „terpen” pochodzi od greckiej nazwy drzewa terebintowego „seqébumhoc”, *Pistachia terebinthus*, którego bogata w terpeny żywica stosowana była przez ludzi na Bliskim Wschodzie w leczeniu wielu chorób (Pichersky i Raguso, 2018). Głównie syntetyzowane są przez rośliny, ale w mniejszym stopniu także przez bakterie glebowe, grzyby czy owady (Gershenzon i Dudareva, 2007, Weng i in., 2012). Związki terpenowe są mocno zróżnicowanymi i złożonymi cząsteczkami, z których najczęściej występują monoterpeny (C₁₀), seskwiterpeny (C₁₅) i diterpeny (C₂₀) (Christianson, 2017). Lotne terpeny o masie cząsteczkowej mniejszej niż 300 Da są zaangażowane w interakcje roślina-środowisko oraz, do pewnego stopnia, w reakcję na stres abiotyczny (Boncan, 2020). Monoterpeny odgrywają także istotną rolę w biosyntezie politerpenów, saponin, żywic, plastochinonów, ubichinonów, karotenoidów, steroli, fitoaleksyn, regulatorów i hormonów wzrostu roślin (Pichersky i Raguso, 2018). Terpeny i terpenoidy (utlenione analogi terpenów) wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, m.in.: mają działanie przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne czy przeciwzapalne (Pereira i in., 2019, Raz i in., 2020). Rocznie zużywa się ok. 3 miliony ton terpenów w różnych gałęziach przemysłu, głównie perfumeryjno-kosmetycznym i spożywczym ze względu na unikatowe właściwości smakowo-zapachowe. (Singh i Sharma, 2015). Istotną cechą terpenów jest ich potencjał w zastosowaniu jako biopaliwo ze względu na optymalną lepkość i wysoką gęstość energetyczną (Beller i in., 2015, Mewalal i in., 2017, Peralta-Yahya i in., 2011), oraz jako biomateriały, żywice przemysłowe i powłoki ochronne (Mosquera i in., 2021). Monoterpeny, w szczególności α -, β -pinen i *R*-(+)-limonen, są cennymi prekursorami do syntezy wielu wysokowartościowych związków chemicznych ze względu na podobny szkielet węglowy, szeroką dostępność i niską cenę (Bicas i in., 2009). Pomimo licznych badań nad tą grupą związków nadal pozostaje ograniczona wiedza na temat charakterystyki biochemicznych elementów odpowiedzialnych za produkcję terpenoidów (np. cyklazy terpenowej i cytochromu P450) oraz aktywności biologicznej konkretnych, pojedynczych związków, szczególnie tych występujących w olejkach eterycznych w niskich stężeniach (Bian i in., 2017).

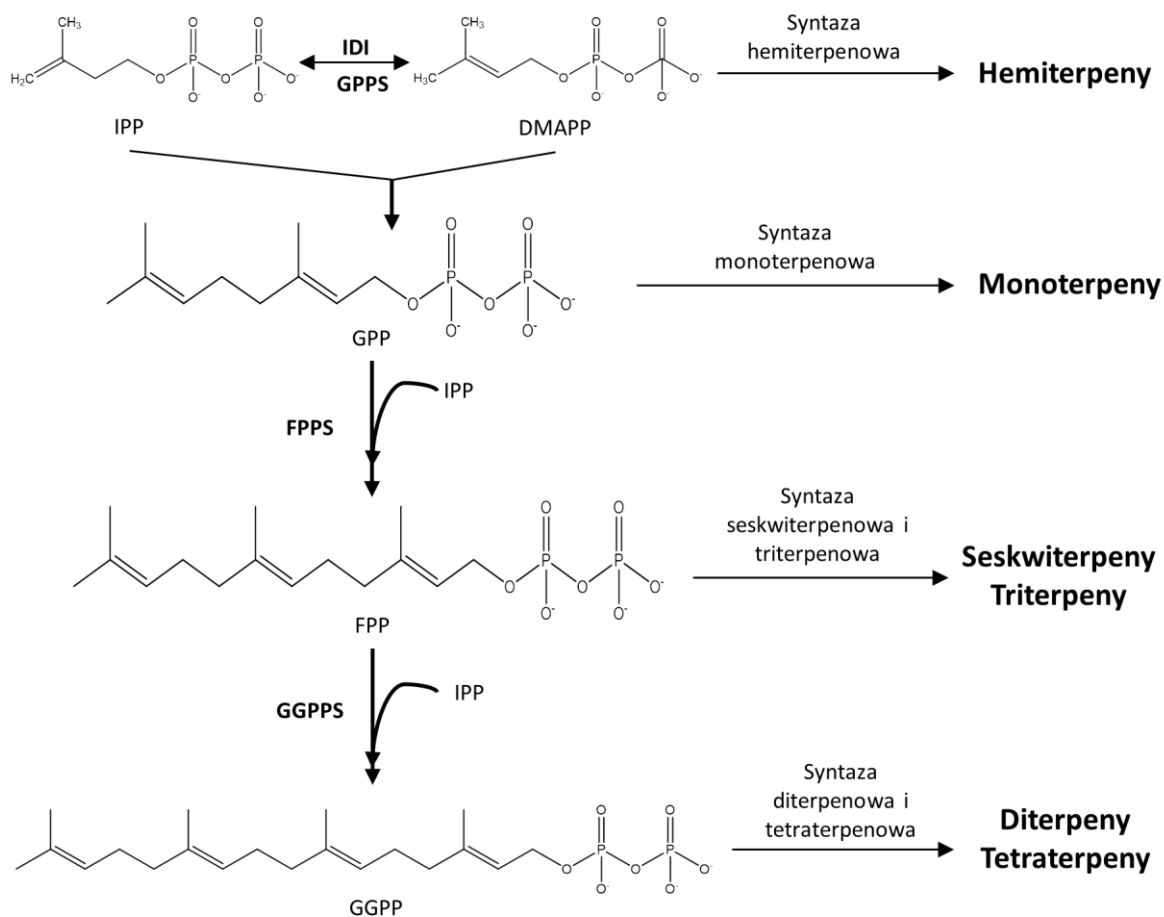
1.1.1. Biosynteza

Wszystkie związki terpenowe są syntetyzowane z dwóch 5-węglowych prekursorów difosforanu izopentenylu (IPP) i jego enzymatycznie przekształconego izomeru difosforanu dimetyloallilu (DMAPP). IPP i DMAPP są produktami dwóch niezależnych szlaków metabolicznych – szlaku mewalonowego (MVA) i 4-fosforan 2-metylo-D-erytrytolu (MEP) (określanego jako szlak Rohmera) (Vranova i in., 2013). Szlak MVA został odkryty w latach 50. XX wieku przez Lynena, Blocha i Cornfortha i występuje w cytozolu roślin, u zwierząt, grzybów, archeonów oraz nielicznych bakterii. Szlak MEP zachodzi w plastydach roślin, zielonych algach i większości bakterii. Odkryty został przez Lichtenthalera, Rohmera, Argoni i Seto na przełomie XX i XXI wieku. Pomimo różnic w cząsteczkach wyjściowych i samego przebiegu szlaków MVA i MEP, produktami są te same cząsteczki IPP i DMAPP (Ryc. 1). W kolejnych etapach syntezy terpenów IPP i DMAPP ulegają przegrupowaniu, kondensacji i reakcjom cyklizacji, dając różne klasy terpenów (Ninkuu i in., 2021, Block i in., 2019, Zhao i in., 2013).



Rycina 1. Biosynteza prekursorów izoprenoidowych (IPP i DMAPP) (Ninkuu i in., 2021, zmodyf.)

Strukturalna różnorodność związków terpenowych wynika z dużej liczby enzymów należących do rodziny syntaz terpenowych (TPS) katalizujących syntezę terpenów. Standardowo, IPP i DMAPP ulegają kondensacji typu „głowa-ogon” przy udziale syntazy geranylo-pirofosforanowej (GPPS) i syntazy farnezylo-pirofosforanowej (FPPS), w wyniku czego powstaje geranylo-pirofosforan (GPP) (prekursor (C10) monoterpenów) i farnezylo-pirofosforan (FPP) (prekursor (C15) seskwiterpenów). Syntaza geranylogeranylu (GGPPS) i syntaza pirofosforanu farnezylu (FGPPS) katalizują reakcję syntezy geranylogeranylo-fosforanu (GGPP) (prekursora (C20) diterpenów) i farnezylogeranylo-fosforanu (FGPP) (prekursora (C25) sesterpenów) (Ryc. 2). Rodzina syntaz terpenowych katalizuje także cyklizację prekursorów GPP, FPP, GGPP i FGPP oraz reakcje przegrupowania karbokationu, czego efektem jest synteza różnych klas terpenoidów (Chang, 2013, Voller, 2019, Wang i in., 2019).



Rycina 2. Biosynteza różnych klas terpenów z IPP i DMAPP (Ninkuu i in., 2021, zmodyf.)

Ze względu na różnice strukturalne i chemiczny mechanizm początkowego tworzenia karbokationu, kanoniczne roślinne syntazy terpenowe podzielono na dwie klasy, TPS typu

I i TPS typu II (Christianson, 2017). Syntazy typu I wytwarzają karbokation allilowy przez uwalnianie difosforanu z odpowiedniego difosforanu izopentenylu. Zawierają one charakterystyczny, bogaty w asparaginian motyw DDxx(D,E) w C-końcowej domenie α , który wiąże poprzez mostki Mg^{2+} część difosforanową substratu, aktywuje wiązanie C–O i promuje powstawanie karbokationu. Syntazy typu II zawierają motyw DxDD w N-końcowej domenie β , który odgrywa kluczową rolę we wnętrzu katalitycznej w protonowaniu trójpodstawionej olefiny w celu wytworzenia karbokationu. Enzymy I typu są głównie odpowiedzialne za biosyntezę stosunkowo mniejszych związków terpenowych złożonych z 5 do 20 atomów węgla, podczas gdy enzymy typu II syntetyzują terpeny składające się z 30 i 40 atomów węgla (Stepanova i in., 2020).

Roślinne TPS składają się z dwóch (α , β) lub trzech domen (α , β i γ), które występują w kolejności γ , β i α od N-końca do C-końca (w niektórych syntazach występuje delecja jednej lub kilku domen). Bakteryjne i grzybowe syntazy terpenowe charakteryzują się z kolei mniejszą wielkością i w większości składają się tylko z domeny α (Jia i in., 2018).

Ponadto w modyfikację i syntezę związków terpenowych są zaangażowane także inne enzymy nienależące do rodziny syntaz terpenowych, np. metylotransferazy, hydrolazy Nudix, oksydoreduktazy cytochromu P450 czy dehydrogenazy zależne od NAD^+ (Rudolf i Chang, 2020, Zhou i Pichersky, 2020, Oldfield i Lin, 2012). W lawendzie (*Lavandula x intermedia*) syntaza difosforanu lawandulilu (LiLPPS) katalizuje kondensację typu „głowa-środek” dwóch jednostek DMAPP do difosforanu lawandulilu (LPP, C10), który jest prekursorem lawandulolu (alkoholu terpenowego) (Demissie i in. 2013). Inna kondensacja dwóch cząsteczek DMAPP, katalizowana przez syntazę difosforanu chryzantemyli (CDS) prowadzi do difosforanu chryzantemyli (CDP), związku pośredniego dalszych etapów syntezy pyretryny, najpowszechniej stosowanego pestycydu pochodzenia roślinnego. CDS pierwotnie wyizolowano i scharakteryzowano z wrotycza (*Tanacetum cinerariaefolium*) i szalwii (*Artemisia tridentate* ssp. *spiciformis*) należących do rodziny astrowatych. Enzym plastydowy CDS należy do rodziny genów *trans*-prenylotransferazy i jest strukturalnie oraz ewolucyjnie spokrewniony z FPPS (Xu i in., 2018, Hemmerlin i in., 2003, Lee i in., 2017). W 2015 roku odkryto nowy niezależny od TPS szlak syntezy monoterpenu u róży (*Rosa x hybrida*). Magnard i in. (2015) wykazali, że różana hydrolaza Nudix RhNudx1 odszczepia grupę fosforanową β cząsteczki GPP, w wyniku czego powstaje monofosforan geranyli (GP), który następnie zostaje przekształcony w geraniol przez drugą, dotychczas nieznaną fosfatazę. Dowodem na udział hydrolazy Nudix w syntezie geraniolu był

eksperyment na transgenicznym liniach róży RNAi-RhNudx1, który wykazał, że obniżona ekspresja hydrolazy skutkuje niższym stężeniem geraniolu.

Oprócz terpenów o regularnej wielkości składających się z wielokrotnej liczby pięciowęglowych jednostek izoprenowych, rośliny syntetyzują również homoterpeny (norterpeny), na drodze degradacji zwykłych terpenów. Przykładem homoterpenów są 4,8-dimetylonona-1,3,7-trien (DMNT, C11) i 4,8,12-trimetylotrideka-1,3,7,11-tetraen (TMTT, C16) emitowane przez wiele roślin w odpowiedzi na atak roślinożerców i patogenów. DMNT i TMTT powstają w wyniku oksydacyjnej degradacji (*E*)-nerolidolu (seskwiterpen) i (*E,E*)-geranylolinalolu (diterpen) katalizowanej przez monooksygenazy cytochromu P450 (Sohrabi i in., 2015).

1.1.2. Rola biologiczna w naturze

Terpenoidy są obecne we wszystkich organizmach żywych, jednak to w roślinach zielonych, a zwłaszcza kwitnących, występuje ich największa liczba. Zdecydowana większość związków terpenowych występuje tylko w konkretnych gatunkach roślin, dlatego nazywane są terpenoidami wyspecjalizowanymi lub wtórnymi. Kilkaset terpenoidów, uniwersalnych dla wszystkich lub zdecydowanej większości roślin, definiowane są jako terpenoidy pierwotne (Pichersky i Raguso, 2018).

Związki terpenowe pierwotne odgrywają rolę hormonów, składników kompleksów przenoszenia elektronów, czynników modyfikujących białka i przeciwutleniaczy oraz determinują płynność błon. Uważa się, że funkcje terpenoidów pierwotnych ewoluowały na początku genezy roślin zielonych (Heiling i in., 2010). Terpeny to związki wysoce hydrofobowe. Stanowią główny składnik błon komórkowych archeonów niesyntetyzujących kwasów tłuszczowych. Płynność błon komórkowych zarówno u zwierząt, jak i roślin powiązana jest ze specyficznym stężeniem steroli triterpenowych (Zhou i in., 2015). Niezwykle istotne znaczenie ma grupa prenylowa, która odpowiada za kotwiczenie białek i innych związków chemicznych do błony komórkowej. Poprzez grupę prenylową zakotwiczone są ubichinon i plastochinon, elementy łańcucha oddechowego. Funkcją terpenów pierwotnych jest także absorpcja promieniowania wysokoenergetycznego i wolnych rodników, która jest możliwa dzięki obecności wiązań podwójnych w cząsteczce terpenu. Taką funkcję ochronną wykazują m.in. karotenoidy ulokowane w aparacie fotosyntetycznym (Velikova i in., 2015). Duży potencjał różnorodnych struktur terpenoidowych spowodował zaangażowanie tych związków do pełnienia roli hormonów rozpoznawanych przez określone receptory. Do terpenowych hormonów roślin należą

gibereliny, cytokininy, auksyny i strigolaktyny. Co istotne, w roślinie istnieje wiele form każdego rodzaju hormonów powstałych w wyniku różnych reakcji modyfikacji, takich jak utlenienie, redukcja, metylacja czy estryfikacja. Powoduje to modulację siły sygnału i precyzyjne dostrojenie odpowiedzi rośliny (Pichersky i Raguso, 2018).

Terpeny specyficzne dla konkretnych gatunków pojawiły się w trakcie ewolucji roślin zielonych. Mają one istotne znaczenie w ekologicznych interakcjach roślin z biotycznymi i abiotycznymi elementami środowiska. Głównie pełnią funkcję obronną przed roślinożercami i patogenami – czy to bezpośrednio jako toksyny lub repelenty, czy też pośrednio poprzez przyciąganie drapieżników lub pasożytów roślinożerców (Kessler i Heil, 2011). Są również związkami sygnałowymi w mikoryzie oraz między rośliną a zapylaczami (Heiling i in., 2010). Jednoznaczne określenie roli, jaką spełnia konkretny związek terpenowy w roślinie, jest niezwykle trudne ze względu na ogromną różnorodność tych związków w roślinie, a nawet w jednym organie. Dlatego większość funkcji ekologicznych terpenów wtórnych nie została jeszcze poznana (Pichersky i Raguso, 2018).

W interakcji między rośliną a roślinożercą pośredniczą lotne związki organiczne (LZO), wśród których znaczna część to terpenoidy. Emitowane LZO mogą wykazywać jednocześnie właściwości toksyczne, odstraszające lub wabiące w zależności od odbiorcy sygnału (Boncan i in., 2020). Olejki eteryczne cynamonu i goździków wykazują działanie toksyczne i odstraszające wobec wołka zbożowego (*Sitophilus granarius*), poważnego szkodnika zbóż. Oprócz tych dwóch olejków eterycznych działanie toksyczne wykazują także eugenol, tlenek kariofilenu, α -pinen, α -humulen i α -felandren (Plata-Rueda i in., 2018). Wykazano, że dorosłe osobniki *Paropsisterna tigrina* powodują mniej uszkodzeń w drzewie herbacianym (*Melaleuca alternifolia*) w obecności wysokiego stężenia terpinolenu (Bustos-Segura i in., 2015). LZO zawierające te same terpenoidy działają przyciągająco lub odpychająco na muszkę ryżową (*Orselia oryzivora*) w zależności od ich stężenia (Ogah i in., 2016). Tabela 1 przedstawia aktywność roślinnych terpenów wobec wybranych owadów.

Tabela 1. Aktywność terpenów wobec wybranych owadów

| Gatunek rośliny | Rodzaj terpenu | Owad | Działanie | Źródło |
|-----------------------------|--|-----------------------|--|--|
| Storczyki tropikalne | 1,8-cineol | Pszczoła storczykowa | Atraktant | Dodson i in., 1969 |
| Kiwi | α -farnezen, germakren D, (E)- β -ocymen, (Z,E)- α -farnezen | Pszczoła miodna | Atraktant | Nieuwenhuizen i in., 2009 |
| Lepnica biała | Lilial | Motyl nocny | Atraktant | Dötterl i in., 2006 |
| Figa | Linalol, limonen i β -pinen | Osa | Sygnal dla zapylaczy do identyfikacji etapu kwitnienia | Chen i Song, 2008 |
| <i>Mimulus lewisii</i> | β -myrcen, D-limonen i (E)- β -ocymen | Trzmiel | Atraktant konkretnych zapylaczy | Byers i in., 2013 |
| Kapustowate | 1,8-cineol | Barylkarz bieliniak | Przyciąga pasożyty składające jaja w gąsienicach określonych roślinożerców | Ahuja i in., 2010 |
| Pomidor i tytoń | β -ocymen | Mszycyca ziemniaczana | Obronne przed mszycami | Cascone i in., 2015 |
| Lawenda | β -trans-ocymen, R-(+)-limonen | Mszyce | Odstraszające szkodniki | Li i in., 2019 |
| Ogórek siewny | Kukurbitacyna | Przędziorek | Działanie antybiotyczne wobec przędziorka; atraktant wobec chrząszczy ogórkowych | Da Costa i in., 1971; Balkema-Boomstra i in., 2003 |
| Wiąz pospolity | (E)-2,6-dimetylo-6,8-nanadien-4-on, (E)-2,6-dimetylo-2,6,8-nonatrien-4-on i (R,E)-2,3-epoksy-2,6-dimetylo-6,8-nonadien | Bleskotki | Atraktant parazytoidów do atakowania jaj chrząszczy | Wegener i in., 2001 |

Oprócz bezpośredniego działania na insekty, terpenoidy wykazują także aktywność stymulującą naturalną odporność roślin, czyli działają jako elicytory. Nadekspresja β -ocymenu w pomidorze powodowała wysokie uwalnianie salicylanu metylu i *cis*-3-heksen-1-olu, które z kolei upośledzały rozwój i reprodukcję mszyc (Cascone i in., 2015).

Terpeny roślinne odgrywają również ważną rolę w odporności na choroby wywoływane przez grzyby i bakterie. Saponiny triterpenoidowe to glikozydy terpenowe o właściwościach detergentów, które są toksyczne dla grzybów ze względu na zdolność do kompleksowania steroli w błonach grzybów, co prowadzi do utraty integralności błony (Morrissey i Osbourn, 1999). Mutanty gatunku owsa (*Avena strigosa*), które nie wytwarzają saponin, mają znacznie obniżoną odporność na patogeny grzybowe w porównaniu do linii typu dzikiego (Papadopoulou i in., 1999).

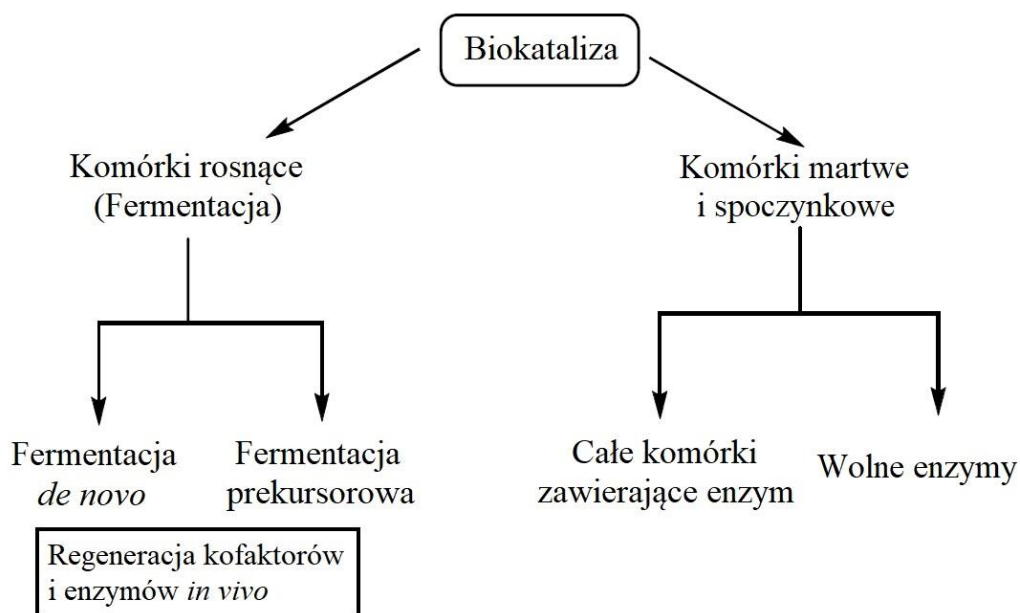
W królestwie zwierząt, zwłaszcza u owadów, związki terpenowe również wykazują funkcje ochronne. Przypisanie takiej roli tym związkom jest znacznie łatwiejsze niż w przypadku roślin ze względu na bezpośrednie rozpylanie związków lotnych na wrogów. Terpenowe wydzieliny ochronne obejmują monoterpény irydoidowe chrząszczy liściastych oraz lepłą mieszaninę złożoną z mono-, seskwi- i diterpenów wydzielaną przez termity (Gershenzon i Dudareva, 2007).

W świecie organizmów morskich, takich jak glony, gąbki, koralowce, mięczaki czy ryby, terpeny także wykazują działanie obronne. Kaulerpenyna, acetylowany seskwiterpenowy składnik alg zielonych, chroni je przed jeżowcem morskim. Związek ten oraz niektóre diterpeny alg morskich są przechowywane w postaci polioctanów i są przekształcane w reaktywne 1,4-dialdehydy przez esterazy w momencie zranienia tkanki (Erickson i in., 2006, Paul i van Alstyne, 1992).

1.2. Biokataliza

1.2.1. Definicja biokatalizy i rodzaje stosowanych biokatalizatorów

Biokataliza odnosi się do wykorzystania całych komórek mikroorganizmów lub izolowanych z nich konkretnych enzymów w reakcjach katalitycznych. Biokatalizę można podzielić na dwa rodzaje (Ryc. 3). Pierwszy obejmuje fermentacje, wśród których można wydzielić dwa podrodzaje – fermentację *de novo* i prekursorową. Synteza *de novo* charakteryzuje się wykorzystywaniem prostych związków organicznych (np. glukozy) przez mikroorganizmy, zarówno do wzrostu komórek, jak i do reakcji biokatalitycznej prowadzącej do otrzymania pożądanego metabolitu. Fermentacja prekursorowa obejmuje otrzymywanie metabolitów na drodze konwersji substratów o podobnym szkielecie węglowym i zwykle w tym kontekście określa się ją terminem biotransformacja. Maszyna metaboliczna komórki wykorzystywana jest do regeneracji wymaganych kofaktorów. Do fermentacji prekursorowych można zaliczyć reakcje utleniania i redukcji, np. hydroksylację steroidów czy redukcję ketonów. Drugi rodzaj biokatalizy obejmuje użycie konkretnych, wyizolowanych i oczyszczonych enzymów lub komórek martwych czy też w fazie spoczynku, które zawierają enzym. W przeciwieństwie do fermentacji, synteza enzymów i konwersja enzymatyczna są niezależne. Dezaktywowane enzymy muszą być zastępowane nowymi, przez co konieczne jest zaprojektowanie systemu regeneracji kofaktorów (Sheldon i Brady, 2018).



Rycina 3. Podział biokatalizy (Sheldon i Brady 2018, zmodyf.)

W ciągu kilku ostatnich lat biokataliza stała się integralną częścią procesów technologicznych w wielu gałęziach przemysłu, szczególnie farmaceutycznym. Pozwala ona na bardziej ekologiczną, zrównoważoną i tańszą produkcję w porównaniu do syntezy chemicznej (Sheldon i Woodley, 2018). Biokatalizatory, w porównaniu z innymi technologiami chemicznymi, takimi jak chemokataliza, mają kilka zalet. Przede wszystkim w naturze dostępna jest szeroka pula różnorodnych biokatalizatorów, przy czym metody inżynierii genetycznej dodatkowo pozwalają na modulację ich aktywności katalitycznej. Ponadto zwiększenie skali produkcji biokatalizatora jest proste i przewidywalne dzięki wykorzystaniu surowców odnawialnych, co pozwala na uniezależnienie procesów od zawirowań geopolitycznych, jak ma to miejsce w procesach wykorzystujących katalizatory z metali szlachetnych. Główną zaletą biokatalizatorów jest ich chemo-, regio-, diastereo- i enancjoselektywność, która często pozwala na skrócenie szlaku syntezy poprzez niestosowanie grup ochronnych, unikanie tworzenia produktów ubocznych i rozdziału mieszanin racemicznych. Jednak z drugiej strony selektywność biokatalizatora bywa ograniczeniem ze względu na niewielki zakres substratów, przez co każdy substrat wymaga biokatalizatora o odpowiednich właściwościach katalitycznych (aczkolwiek znane są enzymy o szerokiej specyficzności substratowej). Ponadto wadą biokatalizatorów jest ich stosunkowo duża wrażliwość na warunki stosowane w procesach przemysłowych, dlatego konieczne jest zwiększenie ich stabilności operacyjnej m.in. poprzez immobilizację, co wiąże się z dodatkowymi nakładami finansowymi (Adams i in., 2019). Istotne jest to, że

zgodnie z FDA (*ang. Food and Drug Administration*, Agencja Żywności i Leków) i legislacją Unii Europejskiej produkty otrzymane metodami biotechnologicznymi można uznać za naturalne i bezpieczne pod warunkiem, że substrat do biokatalizy jest pochodzenia naturalnego. Określenie, że produkt jest „naturalny” ma znaczenie dla ceny końcowej produktu i opłacalności procesu. Na przykład cena 2-fenyletanolu (2-PE) otrzymywanego na drodze syntezy chemicznej z benzenu lub styrenu wynosi około 5 USD/kg, a naturalnego 2-PE już około 1000 USD/kg (Hua i Xu, 2011).

Prowadzenie biokatalizy z wykorzystaniem całych komórek w fazie wzrostu ma wiele zalet. Oprócz szlaków jednoetapowych możliwe jest łatwe wdrażanie kaskad enzymatycznych, które obejmują wiele reakcji, oraz zapewniona jest stała regeneracja kofaktorów *de novo* niezbędnych do przebiegu biotransformacji z wysoką wydajnością. Oprócz tego, obecność błony komórkowej oddziela enzymy od środowiska biokatalizy przez co zwiększa się ich stabilność (Ladkau i in., 2014). Wykorzystywanie biokatalizatorów w postaci całych komórek ma swoje uzasadnienie ekonomiczne ze względu na pominięcie kosztownych etapów pozyskiwania czystego enzymu – wydzielania, zagęszczania i oczyszczania. Dodatkowo, całe komórki mogą być często wykorzystywane wielokrotnie (Lin i in., 2013). W przypadku biokatalizy z użyciem całych komórek bardzo dużą uwagę zwraca się na możliwość wydajnej ekspresji heterologicznej i aktywność specyficznego enzymu w komórkach bakteryjnych i drożdżowych.

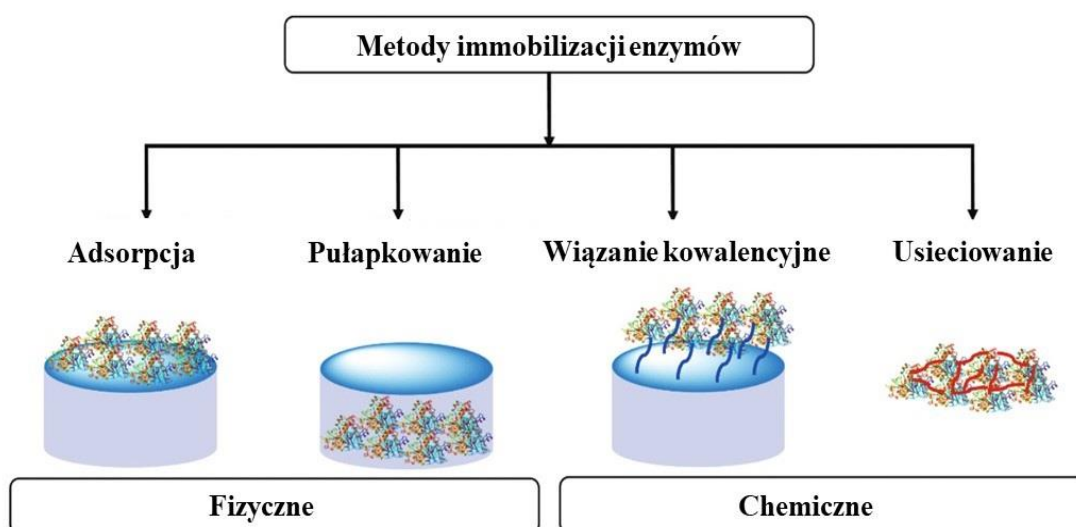
Przykładem jednoetapowej biokatalizy z wykorzystaniem całych komórek jest biotransformacja l-proliny do *trans*-4-hydroksy-l-proliny katalizowana przez proli-no-4-hydroksylazę (oksydazę zależną od 2-oksoglutaranu (2-OG)). Proces opierał się na skonstruowanym mutancie *E. coli* z wyciszonym genem *putA*, który nie może degradować proliny i zawierającym gen proli-no-4-hydroksylazy z *Dactylosporangium* sp. RH1. Kosubstrat 2-OG, produkt pośredni cyklu kwasu cytrynowego, był dostarczany poprzez centralny metabolizm glukozy w komórkach. Końcowe stężenie *trans*-4-hydroksy-l-proliny wynosiło 41 g/l z wydajnością syntezy na poziomie 0,41 g/l/godz. Zastosowanie rekombinowanego szczepu jako biokatalizatora w formie całych komórek umożliwiło zastąpienie kosztownego kosubstratu 2-OG glukożą (Shibasaki i in., 2000).

W przypadku złożonych wieloetapowych biotransformacji całe szlaki metaboliczne mogą zostać przeniesione do gospodarza z innych organizmów. Alkohol aromatyczny 2-fenyletanol (2-PE) jest syntetyzowany z l-fenylalaniny (l-Phe) w trzyetapowym szlaku Ekrlicha w drożdżach i w szlaku syntezy fenylacetaldehydu (PAAS) w roślinach. Rekonstrukcja szlaku Ekrlicha w *E. coli* na drodze rekombinacji enzymów katalizujących

dekarboksylację i redukcję skutkowało 96% konwersją l-fenylalaniny do 2-fenyletanolu (Hwang i in., 2009). W celu biosyntezy 2-PE do *E. coli* wprowadzono również szlak PASS z róży wielokwiatowej, a konkretnie enzym zależny od 5'-fosforanu pirydoksalu (PLP), oraz endogenne dehydrogenazy alkoholowe. Przy użyciu rekombinantów *E. coli* ze szlakiem PAAS wydajność syntezy 2-fenyletanolu wynosi 0,34 g/l (Achmon i in., 2014).

Bardziej skomplikowane jest projektowanie szlaków biosyntetycznych *de novo*, które polega na przeniesieniu genów z różnych niespokrewnionych organizmów w celu skonstruowania sztucznych szlaków metabolicznych w komórce gospodarza. Takie podejście zostało wykorzystane w biosyntezie kwasu N-acetylo-D-neuraminowego (Neu5Ac) z glukozy. W komórkach bakteryjnych szlak metaboliczny z glukozy do Neu5Ac jest siedmioetapowy, a nadekspresja w *E. coli* prowadzi do uzyskania tylko 1,5 g/l Neu5Ac. Zaprojektowano *de novo* dwuetapowy szlak składający się z 2-epimerazy GlcNAc pochodzącej z cyjanobakterii i aldolazy Neu5Ac lub syntazy Neu5Ac bakteryjnej. Ekspresja genów dwuetapowego szlaku w *E. coli* doprowadziła do uzyskania wydajności Neu5Ac na poziomie 53 g/l. Co istotne, zaprojektowany szczep był z powodzeniem wykorzystywany w pięciu cyklach biokatalitycznych (Lin i in., 2013).

Stosowanie w biokatalizie wolnych enzymów bardzo często wymaga wcześniejszej immobilizacji biokatalizatora na nośniku w celu zwiększenia stabilności operacyjnej i możliwości ponownego wykorzystania w nowym cyklu katalitycznym. Immobilizację enzymów można ogólnie podzielić na metody fizyczne i chemiczne (Ryc. 4).



Rycina 4. Metody immobilizacji enzymów (Imam i in., 2021, zmodyf.)

Metody fizyczne opierają się na łagodnych procesach, które polegają na uwięzieniu enzymu w polimerach oraz częściowym oddzieleniu od środowiska reakcji. Biokatalizator może być zaadsorbowany na powierzchni nośnika lub uwięziony w jego wnętrzu (pułapkowanie).

Fizyczne metody immobilizacji oparte na pułapkowaniu enzymów polegają na umieszczeniu biomolekuł w sieci polimerów organicznych (np. poliakrylamidzie) lub w nieorganicznych matrycach polimerowych, takich jak krzemionkowy żół-żel. Immobilizowane enzymy wykorzystuje się w bioreaktorach membranowych, np. *hollow-fiber*. Uwięzienie enzymów jest łagodnym procesem, a usieciowana porowata macierz zapewnia optymalne środowisko katalizy i umożliwia zachowanie natywnej struktury enzymu. Biokatalizator w porowatym nośniku nie jest bezpośrednio narażony na warunki reakcji, jednak pory umożliwiają dyfuzję substratów i produktów. Przy unieruchomieniu enzymu metodą pułapkowania należy pamiętać o doborze nośnika o odpowiedniej wielkości porów. Zbyt duże pory skutkują łatwym wypłukiwaniem się enzymu w trakcie biokatalizy (Romero-Fernandez i Paradisi, 2020).

Z kolei w metodach chemicznych białko jest związane kowalencyjnie z materiałem nośnika lub usieciowane (Imam i in., 2021). Wiązanie białka enzymatycznego z nośnikiem opiera się na oddziaływaniach kowalencyjnych, hydrofobowych, jonowych i van der Waalsa. Oddziaływania niekowalencyjne są zależne od warunków prowadzenia biokatalizy jak pH czy siła jonowa układu. Zmiana warunków reakcji może doprowadzić do wypłukiwania katalizatora z nośnika. Wiązanie kowalencyjne białka z nośnikiem zapobiega wypłukiwaniu enzymu z układu, ale może także spowodować modyfikację strukturalną białka, która często skutkuje zmianą aktywności, specyficzności i wydajności katalitycznej (Sheldon i van Pelt, 2013, Imam i in., 2021).

Sieciowanie agregatów enzymatycznych lub kryształów stosowane jest do otrzymywania makrocząsteczek katalitycznych bez udziału nośnika. Usieciowany enzym powstaje w procesie dwuetapowym. W pierwszym etapie przeprowadza się krystalizację enzymu z buforu wodnego o optymalnym pH przy użyciu organicznych i nieorganicznych środków strącających, po czym dodaje się najczęściej aldehyd glutarowy w celu usieciowania kryształów. W wyniku tego otrzymuje się makrocząsteczkę enzymatyczną o skoncentrowanej aktywności katalitycznej ze względu na brak nośnika (Roy i Abraham, 2004).

Do kowalencyjnej immobilizacji białek enzymatycznych jako nośniki wykorzystuje się syntetyczne polimery organiczne oraz biopolimery, w szczególności rozpuszczalne

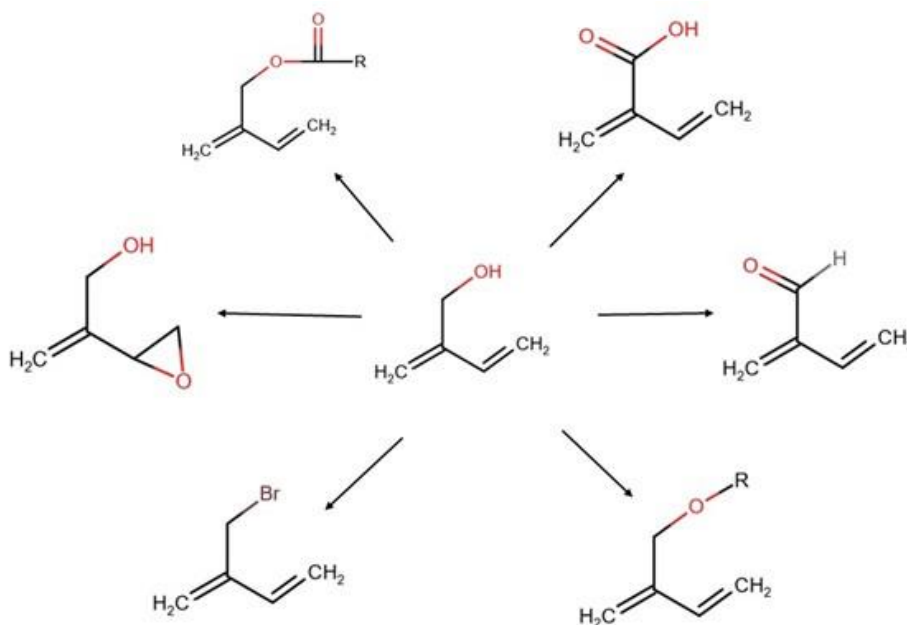
w wodzie polisacharydy, agarozę i chitozan. Z nośników nieorganicznych najczęściej stosuje się krzemionkę, zeolity i mezoporowate krzemionki, np. MCM-41. Bardziej zaawansowane techniki immobilizacji enzymów na nośnikach nieorganicznych opierają się na mikrokryształach powleczonych białkiem (PCMC, ang. *protein-coated microcrystals*), „inteligentnych” polimerach oraz hybrydowych nanocząsteczkach enzymo-magnetycznych. Technika PCMC polega na stabilizacji enzymów w warunkach wodnych węglowodanami lub solami nieorganicznymi i przeniesieniu mieszaniny enzymu i stabilizatora do rozpuszczalnika organicznego mieszającego się z wodą, na skutek czego wytrącają się kryształy soli zawierające na swojej powierzchni enzym. Zaletą tej techniki jest odwodnienie i zachowanie białka enzymatycznego w aktywnej konformacji z minimalną denaturacją oraz możliwość wielokrotnego wykorzystania mikrokryształów (Kreiner i Parker, 2005). Z kolei „inteligentne” polimery, czyli polimery reagujące na bodźce, ulegają istotnym zmianom konformacyjnym na skutek niewielkiej zmiany warunków biokatalizy, np. temperatury, pH czy siły jonowej. Najbardziej znanym przykładem „inteligentnego” polimeru jest termoczuły i biokompatybilny poli-N-izopropylakrylamid (poliNIPAM). Wodne roztwory poliNIPAM wykazują temperaturę krytyczną roztworu (LCST) w okolicach 32°C. Poniżej LCST polimer łatwo rozpuszcza się w wodzie, natomiast powyżej staje się nierozpuszczalny z powodu wydalania cząsteczek wody z sieci polimeru. Dzięki tej właściwości proces biokatalizy można przeprowadzać w warunkach najlepszej rozpuszczalności enzymu z nośnikiem, ograniczając w ten sposób bariery dyfuzyjne i utratę aktywności katalizatora spowodowaną zmianą konformacyjną białka. Podniesienie temperatury układu w końcowym etapie biokatalizy umożliwi wytrącenie polimeru z enzymem i wykorzystanie go w kolejnym cyklu katalitycznym. Dodatkową zaletą „inteligentnych” polimerów jest uniemożliwienie zajścia biokatalizy w niekontrolowanych warunkach temperaturowych, ponieważ gdy temperatura reakcji przekroczy LCST, katalizator wytrąca się i reakcja zostaje zatrzymana (Galaev i Mattiasson, 2004). Z kolei zaletą unieruchomienia enzymów na nanocząstkach magnetycznych jest łatwe odseparowanie ich od mieszaniny poprzez dekantację magnetyczną i ponowne wykorzystanie w procesie katalitycznym (Sheldon i van Pelt, 2013).

Oprócz bezdyskusyjnych zalet immobilizacji warto zwrócić uwagę na wady procesu unieruchamiania biokatalizatorów. Przede wszystkim immobilizacja wymaga dodatkowych nakładów finansowych związanych z kosztem matrycy, utrzymaniem jej stabilności podczas przechowywania i utylizacją po wyczerpaniu aktywności biokatalizatora. Ponadto dyfuzja substratów między środowiskiem reakcji a centrum katalitycznym enzymu może być

zaburzona przez nośnik, co wpływa na obniżenie kinetyki reakcji. Proces immobilizacji może doprowadzić także do częściowej dezaktywacji biokatalizatora (Zajkowska i in., 2013).

1.2.2. Biokataliza alkoholi terpenowych

Biokataliza związków terpenowych najczęściej opiera się na biotransformacji tanich, szeroko dostępnych substratów jak limonen, α - czy β -pinen do utlenionych pochodnych o unikalnych właściwościach smakowo-zapachowych i dużej wartości rynkowej (Vespermann i in., 2017). Alkohole terpenowe najczęściej wykorzystywane są do biokatalitycznego otrzymywania krótkołańcuchowych estrów terpenowych przy udziale lipaz. Oprócz tego mogą one podlegać strukturalnym modyfikacjom w obrębie grupy funkcyjnej oraz w innym rejonie cząsteczki. Modyfikacje strukturalne zachodzą w trakcie reakcji utleniania i redukcji, które mogą być katalizowane przez oksydoreduktazy. Przykłady możliwych modyfikacji strukturalnych alkoholi terpenowych przedstawiono na rycinie 5.



Rycina 5. Możliwe modyfikacje strukturalne alkoholi terpenowych

1.2.2.1. Estryfikacja przy użyciu lipaz

Lipazy (EC 3.1.1.1) są ważną klasą serynowych enzymów hydrolitycznych. Na szeroką skalę są wykorzystywane w przemyśle spożywczym, detergentowym, włókienniczym, farmaceutycznym, skórzanym i kosmetycznym (Matsumoto i in., 2019). Wszystkie organizmy żywe: rośliny, zwierzęta i mikroorganizmy mają zdolność do

syntetyzowania lipaz, jednak to drobnoustroje są głównym źródłem enzymów stosowanych w przemyśle ze względu na łatwość produkcji. Masa cząsteczkowa lipaz grzybowych waha się w przedziale od ok. 17 kDa do 60 kDa, z czego większość z nich to białka jednomerowe. Jednak znane są również lipazy składające się z kilku merów, których masa cząsteczkowa wynosi od 120 do 160 kDa. Wszystkie lipazy posiadają podobną konserwatywną strukturę przestrzenną zwaną fałdem α/β hydrolazy oraz triadę katalityczną złożoną z seryny, histydyny i kwasu asparaginowego lub glutaminowego (Schmid i Verger, 1998, Borelli i Trono, 2015). Ta klasa enzymów hydrolitycznych posiada wiele zalet, m. in. charakteryzują się szeroką specyficnością substratową przy zachowaniu regio-, stereo- i enancjoselektywności, a także niezależnym od kofaktorów mechanizmem reakcji. Zaprojektowanie procesu biokatalizy z wykorzystaniem lipaz jest stosunkowo proste, ponieważ możemy pominąć system regeneracji kofaktorów (Kumar i in., 2016). Lipazy w naturalnym, wodnym środowisku reakcji katalizują hydrolizę wiązań estrowych, a w środowisku rozpuszczalników organicznych i warunkach niedoboru wody katalizują reakcję odwrotną, czyli syntezę wiązania estrowego (Mehta i in., 2017). Ta właściwość znalazła zastosowanie do biokatalitycznej produkcji m. in. estrów terpenowych, glukozowych czy flawonoidowych (Converti i in., 2002, Arcens i in., 2020, Pedersen i in., 2020). Estryfikacja jest reakcją równowagową, której jednym z produktów jest woda. Jej nadmierna ilość może przesunąć równowagę reakcji w kierunku hydrolizy estru. Z tego względu do utrzymania reakcji syntezy estru konieczne jest systematyczne odprowadzanie wody z układu reakcyjnego, np. poprzez jej wiązanie przez sita molekularne (Tamborini i in., 2013).

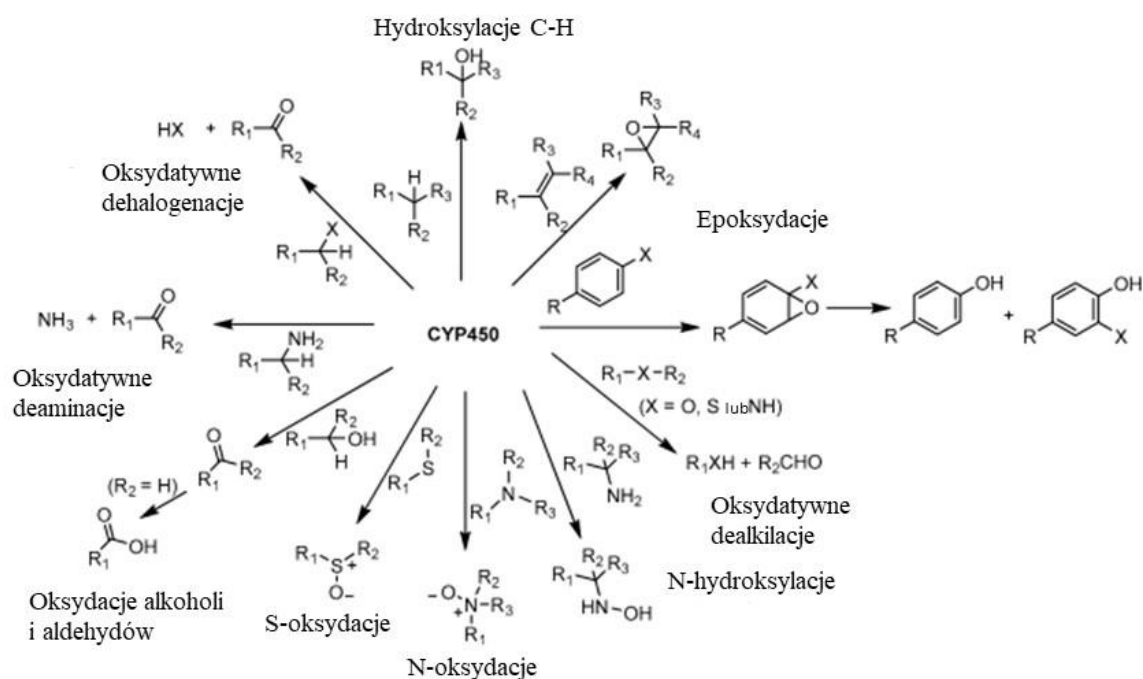
Badania nad biokatalityczną syntezą estrów terpenowych są prowadzone już od ponad 40 lat. W 1980 roku Iwai i in. wykorzystali lipazę z *Aspergillus niger* w celu syntezy estrów octanowych, propionowych, masłowych i walerianowych takich alkoholi terpenowych jak geraniol, cytronellol, mentol, linalol, α -terpineol, farnezol i fitol. Z badań wynika, że lipaza z *A. niger* nie wykazuje żadnej aktywności w syntezie estrów, gdy substratem jest kwas octowy oraz drugo- i trzeciorzędowe alkohole terpenowe (mentol, linalol i α -terpineol). Claon i Akoh (1993, 1994) prowadzili badania nad biosyntezą estrów geraniolu i cytronellolu przy użyciu komercyjnej immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica* (handlowa nazwa preparatu: Novozym435). Novozym435 wydajnie katalizował reakcję estryfikacji w wielu rozpuszczalnikach organicznych. Do uzyskania wysokiej wydajności estryfikacji konieczne było użycie sita molekularnego oraz niskich stężeń kwasu octowego. W 1995 roku ukazała się pierwsza praca włoskiego zespołu badawczego dotycząca syntezy

octanu i maślanu geranylu w heptanie przy użyciu całych liofilizowanych komórek *Rhizopus oryzae* (Molinari i in., 1995). Po 24 godzinach estryfikacji w 55°C uzyskano 31% konwersję substratów do octanu geranylu i 91% konwersję do maślanu geranylu. Istotną zaletą prowadzenia biokatalizy przy użyciu całych liofilizowanych komórek jest wiązanie powstającej wody przez grzybnię, przez co nie jest konieczne stosowanie czynników wiążących wodę. Warto zwrócić uwagę na stosunkowo niewielką ilość biokatalizatora otrzymywaną w jednym cyklu hodowlanym, która wynosiła 2,9 g/l. W kolejnych badaniach wykorzystano inne grzyby nitkowane jak *Rhizopus delemar* (Molinari i in., 1998) i *Aspergillus oryzae* (Molinari i in., 2000) jako biokatalizatory estryfikacji alkoholi terpenowych z kwasem octowym. W przypadku otrzymywania octanu geranylu przy użyciu grzybni *A. oryzae* uzyskano 84% konwersję molową substratów do produktu w 80°C w ciągu 24 godz. biokatalizy. Z kolei zastosowanie liofilizowanych komórek *R. delemar* prowadzi do 55% konwersji substratów do octanu geranylu w 55°C w ciągu 24 godz. reakcji. Wydajność otrzymywania biomasy biokatalizatorów w jednym cyklu hodowlanym mieściła się w granicach 2,3 – 2,4 g/l (Molinari i in., 1998, 2000). Synteza estrów geraniolu i cytronellolu o długości łańcucha od 6 do 12 atomów węgla została przeprowadzona z użyciem komercyjnej lipazy z *Rhizomucor miehei* immobilizowanej na makroporowatej anionowej żywicy. Estryfikację prowadzono w systemie bez rozpuszczalnika organicznego w temperaturze od 55 do 60°C. Po 2 godz. reakcji przy obniżonym ciśnieniu (13,3 hPa) w celu odparowania powstającej wody uzyskano niemal 100% konwersję molową substratów do produktu (Chatterjee i Bhattacharyya, 1998). Do syntezy estrów geraniolu wykorzystana została również lipaza pochodzenia roślinnego – lipaza z Melonowca właściwego (CPL). Określono wpływ długości łańcucha i rodzaju donora alkilowego na reakcję estryfikacji i transestryfikacji katalizowanej przez CPL. Dowiedziono, że lipaza wykazuje najwyższą wydajność syntezy estrów geraniolu w przypadku zastosowania innych estrów jako donorów alkilowych. Zastosowanie kwasu octowego zamiast octanu etylu jako donora skutkuje niemal 5-krotnym spadkiem wydajności reakcji. Świadczy to o negatywnym wpływie kwasu octowego na biokatalizator. Wraz ze wzrostem długości łańcucha donora alkilowego wzrasta wydajność biokatalizacyjnej syntezy estrów geraniolu (You i in., 2011).

1.2.2.2. Biokataliza w układzie biomimetycznym

Kataliza biomimetyczna odnosi się do katalizy chemicznej, która wykorzystuje katalizatory naśladujące kluczowe cechy białek enzymatycznych (Marchetti i Levine, 2011).

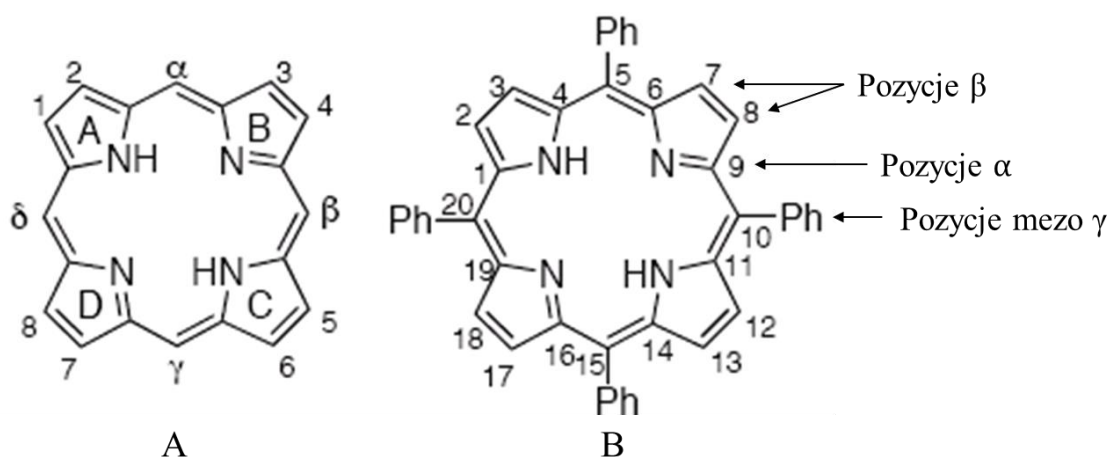
Interesującą klasą biomimetyków są związki naśladujące enzymy cytochromu P450. Cechą wspólną enzymów cytochromu P450 jest kofaktor hemowy w miejscu aktywnym, który bierze udział w złożonym szlaku różnych reakcji utleniania. W większości biomimetyków enzymów P450 atom żelaza zastąpiony jest bardziej stabilnymi jonami metali, takim jak mangan, ruten i rod. W niektórych przypadkach biomimetyki nie zawierają żadnego atomu metalu (Cai i in., 2008, Schenning i in., 1998). Nazwa cytochromu P450 pochodzi od długości fali, przy której białko w kompleksie z tlenkiem węgla wykazuje maksimum absorpcji promieniowania widzialnego (450 nm). Enzymy cytochromu P450 katalizujące różnorodne reakcje utleniania endo- i egzogennych związków (Ryc. 6) są najbardziej rozpowszechnioną rodziną enzymów wśród wszystkich organizmów żywych i biorą udział w około 75% wszystkich procesów metabolicznych w organizmie (Danielson, 2002).



Rycina 6. Główne szlaki utleniania katalizowane przez enzymy cytochromu P450 (Zucca i in., 2016, zmodyf.)

Bardzo duże podobieństwo strukturalne grupy prostetycznej enzymów cytochromu P450 wykazują związki porfirynowe, które z powodzeniem mogą być wykorzystane jako katalizatory biomimetyczne. Porfiryny stanowią klasę naturalnie występujących związków i odpowiadają one za kluczowe zjawiska metaboliczne. Porfiryny żelaza występujące w postaci hemu przenoszą tlen w organizmie, a porfiryny magnezu zawarte w chlorofilu umożliwiają przeprowadzanie fotosyntezy. Nazwa „porfiryne” pochodzi od greckiego słowa „*porphyras*”, co tłumaczy się jako fioletowy. Jest to związane z charakterystyczną barwą tych

związków (Feng i in., 2020). Porfiryny zbudowane są z czterech pierścieni pirolowych połączonych mostkami metionowymi. Obecnie istnieją dwa systemy nazewnictwa atomów w porfirynach: numeracja według założeń Fishera (Fisher i Orth, 1937) i zalecana przez IUPAC (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (Moss, 1987) (Ryc. 7). Ten ostatni system nazewnictwa jest bardziej powszechny w najnowszej literaturze przedmiotu.



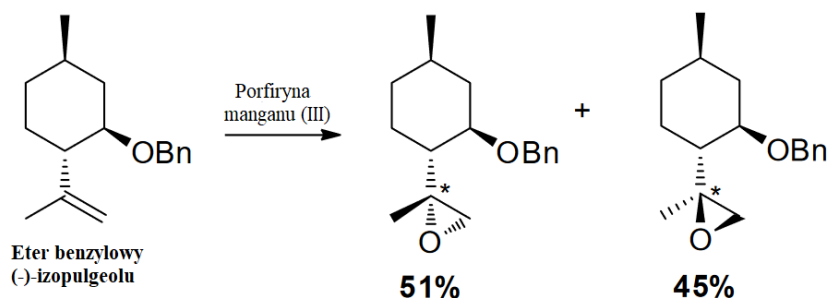
Rycina 7. Nomenklatura porfiryn według: (A) Fishera – A-D – pozycje pierścieni pirolu, 1-8 położenie atomów węgla (pozycje β), α, β, δ, γ – położenie atomów węgla (pozycje mezo); (B) IUPAC – 1-20 położenie atomów węgla (5, 10, 15, 20 – pozycje mezo) (Marques i Brown, 2002, zmodyf.)

Cząsteczka porfiryny ma charakter aromatyczny ze względu na obecność zdelokalizowanych elektronów π . Tworzą one układ dziewięciu sprzężonych wiązań typu π . Występowanie podwójnych sprzężonych wiązań w cząsteczce porfiryny powoduje silne oddziaływanie elektronowe, co warunkuje planarność. Wprowadzenie do cząsteczki porfiryny podstawników powoduje odkształcenia i zaburzenie planarności pierścienia tetrapirolowego, przez co zmieniają się właściwości fizykochemiczne związku. Podstawienie przebiega w pozycjach β lub *meso* (Makarska i Radzki, 2004).

Wśród wielu prac dotyczących katalizy biomimetycznej związków terpenowych stosunkowo rzadko wykorzystywane są alkohole terpenowe w roli substratów. Większość badań dotyczy katalizy limonenu i α -pinenu. Przykładowo, Trytek i in. (2005) prowadząc biotransformację D-limonenu przy użyciu 5,10,15,20-tetrafenyloporfirynę (H_2TPP) w układzie fotokatalitycznym otrzymali karwon, wodoroadtlenki limonenu oraz nieznaną produkt o widmie masowym podobnym do werbenonu. Najwyższą wydajność fotokonwersji limonenu uzyskano przy stosunku molowym H_2TPP do substratu wynoszącym 1:2. Maksymalną wydajność karwonu uzyskano w mieszaninie reakcyjnej złożonej z 90%

limonenu w czasie od 18 do 36 godz. Kolejne badania wskazywały, że fotoutlenianie limonenu nie było istotnie zależne od długości fali światła widzialnego (Trytek i in., 2007). Systemy fotokatalityczne zawierające porfiryny immobilizowane w sproszkowanym żelu krzemionkowym były wykorzystywane w utlenianiu α -pinenu do pinokarweolu, pinokarwonu i myrtenolu. Spośród badanych porfiryn najwyższą wydajnością fotokatalizy w chloroformie charakteryzowała się tetrafenyloporfiryra (Trytek i in., 2009). Znane są także badania nad biomimetycznym utlenianiem α -pinenu wykorzystujące naturalne biokatalizatory w postaci ekstraktu zawierającego chlorofile lub wyizolowane ze szpinaku chlorofile i feofityny. Z badań wynika, że feofityny są stabilnymi i wydajnymi biomimetycznymi katalizatorami oksydacji α -pinenu (Trytek i in., 2011, Lipke i in., 2013).

Do biomimetycznego utlenienia geraniolu i nerolu zastosowano jako katalizator kompleks porfiryny manganu (III). Proces przebiegał w temperaturze pokojowej w acetonitrylu z użyciem octanu amonu jako kokatalizatora i wodnego roztworu H_2O_2 jako utleniacza. Po 2 godz. fotokatalizy uzyskano 100% konwersję substratów do mono- i diepoksydów. W przypadku katalizy biomimetycznej geraniolu jako jeden z produktów uzyskano również epoksyaldehyd geraniolu (Martinas i in., 2001, Martinas i in., 1999). W innym badaniu hybrydowy magnetyczny nanokompozyt porfiryny manganu (III) wykorzystano do epoksydacji pochodnej (-)-izopulegolu w celu uzyskania epoksydu eteru benzylowego (-)-izopulegolu, który wykazuje aktywność przeciwnowotworową (Dias i in., 2019). Kataliza biomimetyczna opierała się na zastosowaniu tlenu cząsteczkowego jako „zielonego” utleniacza i izobutyraldehydu jako koreduktora. Reakcję prowadzono pod ciśnieniem 5 barów w temperaturze pokojowej (25°C) przez 6 godz. Uzyskano 100% konwersję molową substratu do produktów w postaci dwóch stereozomerów epoksydu (Ryc. 8).



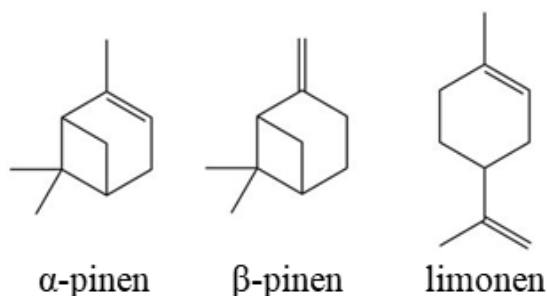
Rycina 8. Biomimetyczna epoksydacja eteru benzylowego (-)-izopulegolu katalizowana przez porfiryne manganu (III) (Dias i in. 2019, zmodyf.)

Procesy biomimetyczne z wykorzystaniem porfiryn umożliwiają utlenianie substratów w sposób ekologiczny i zrównoważony dzięki wykorzystaniu w łagodnych warunkach takich utleniaczy jak O₂ lub H₂O₂, których jedynym produktem ubocznym jest woda (Santos i in., 2018).

1.3. Aktywność terapeutyczna monoterpenu

1.3.1. α -pinen, β -pinen i limonen

Najbardziej znanymi przedstawicielami monoterpenu są α -, β -pinen i limonen. Występują one w ogromnych ilościach w olejkach eterycznych drzew iglastych (pineny) (Bauer i in., 2001) i owoców cytrusowych (limonen) (Anandakumar i in., 2020). α - i β -pinen to dwa izomery bicyklicznego węglowodoru terpenowego z wiązaniem podwójnym. Izomery pinenu i limonen są nietoksyczne i niemutagenne dla ludzi, dlatego są zatwierdzone jako bezpieczne do stosowania w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym (Weston-Green i in., 2021, Singh i Sharma, 2015). Wzory strukturalne pinenu i limonenu przedstawiono na rycinie 9.



Rycina 9. Wzory strukturalne α -, β -pinenu i limonenu

Coraz większym problemem w medycynie XXI wieku jest nabywanie oporności na antybiotyki przez bakterie. Szacuje się, że rocznie w Europie umiera około 25 000 pacjentów z powodu infekcji spowodowanej bakteriami lekoopornymi (Salehi i in., 2019). α -Pinen był stosowany jako modulator oporności na antybiotyki u *Campylobacter jejuni*, bakterii wywołującej nieżyt żołądka i jelit. Badania Kovaca i in. (2015) wykorzystujące testy płytkowe wykazały, że α -pinen w stężeniu 125 mg/L obniżał wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) cyprofloksacyny, erytromycyny i triklosanu wobec *C. jejuni* nawet 512 razy. Aktywność pinenu opierała się na zapobieganiu wypływowi antybiotyków z komórki bakteryjnej.

W 2006 roku van Zyl i in. określili aktywność przeciwdrobnoustrojową α - i β -pinenu wobec szczepów bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* oraz drożdży *Candida albicans* metodą dyfuzyjno-krażkową. Badania wykazały, że (+)- β -pinen charakteryzuje się od 2 do 12 razy wyższą aktywnością wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, a także *C. albicans* w porównaniu do (+)- α -pinenu. W przypadku α - i β -pinenu, ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest silnie zależna od formy enancjomerycznej. Enancjomery (+) α - i β -pinenu wykazują minimalne stężenie hamujące (MIC) wobec *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus oryzae* i *S. aureus* w granicach 0,12 – 6,25 mg/ml. Ujemne enancjomery pinenów nie wykazywały żadnej antymikrobiologicznej aktywności do stężenia 20 mg/ml (da Silva i in., 2012). (+)- α -Pinen wykazuje aktywność antymalaryczną w stężeniu 1,2 μ M i jest ona ponad 250 razy wyższa niż aktywność (+)- β -pinenu (van Zyl i in., 2006).

Wykazano, że α -pinen charakteryzuje się działaniem przeciwnowotworowym wobec linii ludzkich komórek raka jajnika, raka wątrobowokomórkowego i nerwiaka niedojrzałego N2a (Cock, 2013, Elanur i in., 2013). Dodatkowo, α - i β -pinen wzmacniają działanie paklitakselu (PAC), leku stosowanego w terapii niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC). Pineny zwiększały poziom apoptozy oraz indukowały zatrzymanie cyklu komórkowego komórek nowotworowych. Co ważne, stosowanie α - i β -pinenu w połączeniu z paklitakselem wiąże się z obniżeniem niepożądanych skutków ubocznych wywoływanych przez paklitaksel, np. leukopenii, zaburzenia czynności wątroby i nerek, nudności i wymiotów (Zhang i in., 2015). α -Pinen, wyizolowany z dojrzałych owoców pieprzu brazylijskiego *Schinus terebinthifolia* Raddi, stymulował apoptozę komórek linii mysiego czerniaka B16F10-NEX2 oraz wykazywał działanie ochronne przed przerzutami. Molekularna aktywność przeciwczeniakowa α -pinenu opierała się na zaburzeniu funkcji mitochondriów, tworzeniu reaktywnych form tlenu (ROS), indukcji kaspazy-3, agregacji heterochromatyny, rozpadzie DNA i ekspozycji fosfatydyloseryny na powierzchnię komórki (Matsuo i in., 2011). Kusahara i in. (2012) wykazali, że u szczurów umieszczonych w środowisku o wysokiej zawartości α -pinenu następował wolniejszy wzrost czerniaka w porównaniu do szczurów w środowisku bez terpenów.

W badaniach *in vitro* wykazano, że α - i β -pinen chronią przed stresem oksydacyjnym, stanem zapalnym i uszkodzeniem neuronów. W eksperymentach z użyciem mysich makrofagów indukowanych lipopolisacharydem (LPS), α -pinen redukował markery prozapalne takie jak interleukinę-6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α) i tlenek

azotu (NO) na drodze hamowania kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK) i szlaku czynnika jądrowego κ B (NF- κ B). Wskazuje to na zdolność α -pinenu do bezpośredniego hamowania szlaków sygnałowych w komórkach odpornościowych (Kim i in., 2015). α -Pinen wykazuje także właściwości neuroprotektcyjne, co zostało wykazane w badaniach przedklinicznych *in vivo*. Natychmiastowe podanie myszom α -pinenu w dawce 50 i 100 mg/kg po wywołaniu niedokrwienia metodą okluzji tętnicy środkowej mózgu powoduje zmniejszenie rozmiaru zawału i poprawienie behawioralnych wyników neurologicznych, które przypisywano aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej terpenu w hipokampie, korze i prążkowie (Khoshnazar i in., 2019).

Oprócz wyżej wymienionych aktywności terapeutycznych, α - i β -pinen wykazują także aktywność przeciwzakrzepową (Yang i in., 2011), gastroprotektcyjną (Pinheiro i in., 2015), kardioprotektcyjną (Leite i in., 2007), przeciwdrgawkową (Felipe i in., 2019), owadobójczą czy larwobójczą (Govindarajan i in., 2016).

Kolejnym monoterpenem posiadającym liczne udowodnione właściwości terapeutyczne jest limonen. Rocznie produkowane jest ponad 70 tys. ton tego związku, głównie z surowców odpadowych (skórki owoców cytrusowych) (Thomsett i in., 2019).

Murali i in. (2013) zbadali właściwości antyutleniające D-limonenu u samców szczurów Albino Wistar traktowanych streptozocotyną (STZ). Podawanie terpenu w dawce 100 mg/kg masy ciała przez 45 dni istotnie zmniejszyło ilość substancji reagujących z kwasem tioarbiturowym (TBARS), wodoronadtlenków lipidów i sprzężonych dienów w osoczu, wątrobie i nerkach. Zaobserwowano także zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa i transferaza S-glutationowa oraz zwiększenie ilości zredukowanego glutationu i witaminy C w tkankach. Limonen wykazywał również aktywność modulacyjną związków przeciwutleniających w modelu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Doustne podanie D-limonenu (50 mg/kg i 100 mg/kg) szczurom Sprague-Dawley zwiększyło aktywność dysmutazy ponadtlenkowej o 66% i zwiększyło poziom zredukowanego glutationu o 73% przy podaniu maksymalnej dawki leku (Yu i in., 2017).

D-limonen charakteryzuje się także aktywnością przeciwzapalną, którą wykazano w linii mysich makrofagów RAW 264,7 indukowanych lipopolisacharydem. Monoterpen w dawce 0,04% istotnie obniżył poziom azotynów i zmniejszył syntezę prostaglandyny E₂ zaindukowaną przez LPS. Limonen redukował ekspresję markerów prozapalnych TNF- α o 60%, IL-1 β o 40% i IL-6 o 70% (Yoon i in., 2010).

Właściwości przeciwnowotworowe limonenu zostały zbadane na różnych typach komórek nowotworowych, m.in. raka płuc (Yu i in., 2018), piersi (Crowell i in., 1996), żołądka (Lu i in., 2004), prostaty (Rabi i Bishayee, 2009), pęcherza (Ye i in., 2020) czy okrężnicy (Jia i in., 2013).

Ye i in. (2020) zbadali modulację apoptozy i zatrzymanie cyklu komórkowego przez limonen na ludzkiej linii komórek raka pęcherza moczowego T24. Traktowanie komórek limonenem we wszystkich dawkach (0,9, 18 i 36 μM) powodowało zwiększenie liczby komórek apoptotycznych. Stwierdzono, że przy stężeniu 36 μM limonenu odsetek komórek apoptotycznych wynosił 34,7%, który był spowodowany zwiększoną ekspresją białek Bax, kaspazy-3 oraz zmniejszoną ekspresją Bcl-2. Ponadto wyniki cytometrii przepływowej wykazały, że limonen powodował zatrzymanie cyklu komórkowego fazy G2/M w sposób zależny od stężenia. W stężeniu limonenu 36 μM w cyklu komórkowym fazy G2/M było obecnych 75% komórek.

Lu i in. (2004) wykazali potencjał limonenu w zapobieganiu rakowi żołądka w modelowych myszach nagich z zaindukowanymi przerzutami. Monoterpen w dawce 15 ml/kg masy ciała podawano doustnie co drugi dzień przez 7 tygodni. Po 8 tygodniach okazało się, że wskaźnik zahamowania nowotworu był zwiększony o 47,6% u myszy traktowanych limonenem w porównaniu z grupą leczoną 5 fluorouracylem (5 FU) (lek chemioterapeutyczny) oraz grupą leczoną 5 FU i limonenem. Ponadto określono odsetek przerzutów raka żołądka do różnych tkanek. Grupa nieleczona wykazała 100% przerzutów do otrzewnej, 87,5% do wątroby i 33,3% do innych narządów. Grupy leczone limonenem wykazały tylko 20% przerzutów do otrzewnej i 20% do wątroby. Badacze wskazali, że limonen brał głównie udział w indukcji apoptozy i potencjału antyangiogenego.

Oprócz działania proapoptycznego wykazano, że limonen indukuje autofagię w liniach komórkowych raka płuc A549 i H1299 (Yu i in., 2018). Komórki traktowane limonenem wykazały istotny wzrost ekspresji genów pokrewnych autofagii *Ic3b*, *beclin1*, *atg3*, *atg5*, *atg7*, *atg12* i *atg14* ze zwiększoną ekspresją białek związanych z autofagią LC3-II i Atg5.

Bacanli i in. (2017) opisali przeciwcukrzycowe działanie limonenu u szczurów Wistar z cukrzycą indukowaną streptozocyną (STZ). Terpen w dawce 50 mg/kg masy ciała podawany przez 28 dni istotnie ($p < 0,05$) obniżył poziom glukozy we krwi poprzez podwyższenie poziomu insuliny, obniżył poziom dialdehydu malonowego (MDA) oraz poprawił aktywność CAT, SOD, reduktazy glutationowej (GR) i peroksydazy glutationowej (GSHPx). W innym modelu cukrzycy wywołanej STZ u szczurów Wistar limonen

podawano w różnych dawkach (50, 100 i 200 mg/kg) przez 45 dni. W dawce 100 mg/kg monoterpen wykazywał istotne ($p < 0,05$) działanie przeciwcukrzycowe w porównaniu z grupą traktowaną lekiem przeciwcukrzycowym – glibenklamidem (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Podawanie wyższych dawek D-limonenu modulowało zmiany stężenia glukozy w osoczu, stężenia glikozylowanej hemoglobiny oraz aktywność glukozy-6-fosfatazy, fruktozo-1,6-bisfosfatazy i glukokinazy (Murali i Saravanan, 2012).

Oprócz wyżej wymienionych właściwości terapeutycznych limonen wykazuje również aktywność gastroprotekcijną (Arroyo i in., 2013), przeciwwłóknieniową (Ahmad i in., 2018), immunomodulacyjną (Del Torro-Arreola i in., 2005) czy hepatoprotekcijną (Amini i in., 2020).

1.3.2. Cytronellol

Cytronellol jest liniowym alkoholem monoterpenowym występującym powszechnie w olejkach eterycznych wielu roślin, np. melisy, trawy cytrynowej, niektórych gatunków róży, liściach cytryny, bodziszka i pomarańczy. Oprócz unikalnych właściwości zapachowych wykazuje on również udokumentowaną aktywność terapeutyczną. Kotan i in. (2007) zbadali aktywność antybakteryjną β -cytronellolu w stężeniu 30 mg/ml wobec szczepów patogennych, m.in. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* ATCC 176, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* czy *Proteus vulgaris*. Strefa zahamowania wzrostu bakterii na podłożu agarowym wahała się w granicach 7 – 10 mm. Z kolei Echeverrigarav i in. (2008) wykazali aktywność hamującą wzrost bakterii *Proteus mirabilis* w stężeniu 3 mg/ml. Z badań Ngan i in. (2012) wynika, że aktywność bakteriostatyczna cytronellolu jest zależna od jego formy enancjomerycznej. (-)-Cytronellol wykazuje aktywność antybakteryjną w niższych stężeniach niż enancjomer dodatni. Dodatkowo enancjomer ujemny ma szersze spektrum działania.

Cytronellol posiada także aktywność przeciwgrzybiczą. Viollon i Chaumont (1994) wykazali działanie alkoholu terpenowego wobec *Cryptococcus neoformans*, który jest patogenem oportunistycznym u osób z upośledzonym układem immunologicznym. Minimalne stężenie hamujące (MIC) wzrost *C. neoformans* wynosiło 100 $\mu\text{l}/\text{l}$, a minimalne stężenie bójcze (MBC) 150 $\mu\text{l}/\text{l}$. Mahmoud (2004) zbadał aktywność biologiczną cytronellolu wobec *Aspergillus flavus*, który naturalnie występuje w zanieczyszczonej żywności. Stężenie 500 ppm cytronellolu powoduje zahamowanie wzrostu mikroorganizmu, a co istotne stężenie 1000 ppm hamuje syntezę aflatoksyn B1 i B2 przez *A. flavus*. Wykazano również aktywność biologiczną cytronellolu wobec gatunków z rodzaju *Trichophyton*

i *Candida albicans*, które są czynnikami etiologicznymi grzybiczy u ludzi (Shin i Lim, 2004). Badania Pereira i in. (2015) przeprowadzone na szczepie *Trichophyton rubrum* pobranym z paznokci pacjentów z dermatofitozą wskazują, że cytronellol w stężeniu 128 µg/ml zmniejszył wzrost grzybni i liczbę kiełkujących zarodników *T. rubrum* ATCC i LM 422 oraz spowodował redukcję konidiogenezy i nieprawidłowe tworzenie strzępek i konidiów. Zaobserwowano także zwiększone uwalnianie materiału wewnątrzkomórkowego do środowiska zewnętrznego, które było wynikiem hamowania przez cytronellol biosyntezy ergosterolu.

Kobayashi i in. (2016) wykazali, że cytronellol charakteryzuje się działaniem antyalergicznym. W badaniach wykorzystano dwie formy enancjomeryczne (-) i (+) alkoholu w zakresie stężeń 0,5 – 1 mM. Określono poziom degranulacji i wytwarzanie cytokin przez mastocyty indukowane immunoglobuliną E (IgE). W stężeniu 0,5 mM (-)-cytronellol wykazywał wyższą aktywność hamując degranulację mastocytów o 69%, podczas gdy (+)-cytronellol tylko o 21%. Mieszanina enancjomeryczna (±) inhibowała rozpad mastocytów w 55%. Cytronellol istotnie zmniejszał także poziom TNF-α w linii mysich komórek tucznych traktowanych IgE.

Aktywność przeciwzapalna cytronellolu została zbadana przez Su i in. (2010). Alkohol monoterpenowy we wszystkich badanych stężeniach (50 – 750 µM) hamował wytwarzanie tlenku azotu (NO), a w niższych stężeniach (5-250 µM) hamował także wytwarzanie prostaglandyny-E2 (PGE2) w makrofagach mysich traktowanych LPS-em. Cytronellol nie hamował ekspresji syntazy tlenku azotu (iNOS) ani mRNA, ale działał poprzez zmniejszenie aktywności iNOS w etapie konwersji [3H]-argininy do [3H]-cytruliny. Cytronellol hamował również ekspresję cyklooksygenazy-2 (COX-2), obniżał poziom NF-κB oraz zwiększał poziom inhibitora jądrowego czynnika IκBα w cytozolu komórek.

Dwie prace badawcze wskazują, że cytronellol może być wykorzystany jako lek przeciwskurczowy (Sadraei i in., 2013, Vasconceols i in., 2016). Sandraei i in. (2013) opisali przeciwskurczową aktywność cytronellolu w modelu skurczu jelita krętego indukowanego KCl, acetylocholiną (ACh) i polem elektrycznym (EFS). Alkohol skuteczniej wygaszał skurcze wywołane przez KCl ($IC_{50} = 2,9 \mu\text{g/ml}$) niż skurcze wywołane EFS i ACh (odpowiednio, $IC_{50} = 5,4 \mu\text{g/ml}$ i $7,5 \mu\text{g/ml}$). Vasconcelos i in. (2016) wykazali działanie przeciwskurczowe (±)-cytronellolu w modelu skurczu tchawicy szczurów wywołanym przez KCl ($IC_{50} = 120,8 \mu\text{M}$), ACh ($IC_{50} = 210,7 \mu\text{M}$), EFS ($IC_{50} = 240,9 \mu\text{M}$) i ortowanadan sodu ($IC_{50} = 243,0 \mu\text{M}$).

Srinivasan i Murugunathan (2016) ocenili aktywność przeciwcukrzycową cytronellolu (w trzech dawkach: 25, 50 i 100 mg/kg masy ciała) u szczurów traktowanych streptozocyną toksyczną dla komórek β trzustki wytwarzających insulinę. Podawanie cytronellolu w dawce 50 mg/kg skutkowało mniejszym stężeniem glukozy w osoczu szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo wykazano modulację enzymów biorących udział w metabolizmie glukozy, poziomu hemoglobiny, hemoglobiny glikowanej, glikogenu oraz biomarkerów uszkodzenia wątroby i nerek indukowanych przez cukrzycę. Wywołane przez streptozocynę uszkodzenia wątroby i wysepek Langerhansa w trzustce zostały zmniejszone przez leczenie cytronellolem.

Oprócz wyżej wymienionych aktywności terapeutycznych cytronellolu wykazano również jego działanie zmniejszające stężenie cholesterolu o małej gęstości (LDL) we krwi, przeciwbólowe, przeciwłękowe i przeciwdrgawkowe (Santos i in., 2019).

1.3.3. Geraniol

Geraniol jest jednym z najczęściej występujących związków zapachowych w produktach spożywczych i kosmetycznych na rynku europejskim. Charakteryzuje się słodkim, kwiatowym i różanym zapachem. Geraniol jest składnikiem ponad 250 olejków eterycznych, a w największej ilości występuje w olejku z *Monarda fistulosa* (95% olejku stanowi geraniol), *Aeollanthus myrianthus* (66%), różanym (44%) i palczatki imbirowej *Cymbopogon martinii* (53%). Geraniol posiada wiele aktywności terapeutycznych, m.in. wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne, przeciworobacze i odstrasżające owady. Co istotne, geraniol jest substratem w syntezie innych związków o działaniu prozdrowotnym, szczególnie witaminy A i E (Mączka i in., 2020).

Przeciwdrobnoustrojowa aktywność geraniolu może wynikać głównie z jego niepolarnego charakteru, dzięki czemu może zaburzać strukturę lipidową błony komórkowej mikroorganizmu oraz oddziaływać z jego składnikami czyniąc błonę bardziej przepuszczalną również dla innych związków, np. antybiotyków. Dodatkowo, alkohol może wnikać do wnętrza komórki i hamować wzrost mikroorganizmu poprzez oddziaływanie na kluczowe szlaki metaboliczne (Lira i in., 2020).

Bhattamisra i in. (2019) zbadali potencjał ochronny geraniolu na wrzody żołądka u szczurów wywołane kwasem octowym i bakteriami *Helicobacter pylori*. W modelu badawczym wrzody u szczurów wywoływano przez wstrzykiwanie kwasu octowego do warstwy podsłuzówkowej żołądka lub inokulację *H. pylori* w jamie ustnej przez 7 dni. Geraniol podawano w dawce 15 i 30 mg/kg masy ciała oraz w połączeniu z lekami

standardowo stosowanymi w leczeniu infekcji amoksycyliną, klarytromycyną i omeprazolem. Po 2 tygodniach stwierdzono, że w grupie traktowanej geraniem wskaźnik owrzodzenia był istotnie niższy w porównaniu z grupą kontrolną. Dodatkowo, monoterpenoid w dawce 30 mg/kg powodował zmniejszenie kwasowości ogólnej i objętości soku żołądkowego. Zmniejszyła się także aktywność mieloperoksydazy i zwiększył całkowity poziom glutationu w błonie śluzowej żołądka.

Geraniol stosowany w formie aerozolu hamował wzrost groźnych patogenów człowieka, takich jak *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* i *Staphylococcus aureus* oraz lekoopornego *Cryptococcus aureus*, który wywołuje groźne infekcje u osób w ostatnim stadium AIDS. W stężeniu 64 µg/ml geraniol hamował wzrost bakterii *Mycobacterium tuberculosis* będącej czynnikiem etiologicznym gruźlicy (Chen i Viljoen, 2010).

Singh i in. (2016) w swoich badaniach wykazali, że geraniol wykazuje wysoką aktywność wobec szczepów grzybów z gatunku *Candida*. Alkohol monoterpenowy w stężeniu 250 µg/ml hamował tworzenie biofilmu i morfogenezę strzępek badanych szczepów *Candida*. Dodatkowo, geraniol silnie oddziaływał z błoną komórkową poprzez zmniejszenie aktywności ATP-azy zakotwiczonej w błonie oraz powodował zmniejszenie poziomu ergosterolu, co skutkowało wyciekaniem zawartości komórki do środowiska. Geraniol hamował również funkcję mitochondriów i modulował homeostazę żelaza we wnętrzu komórki. Podobną aktywność przeciwgrzybiczą geraniolu wykazano również wobec *T. rubrum* (Silva i in., 2014).

Geraniol charakteryzuje się aktywnością terapeutyczną wobec różnych komórek nowotworowych. Ostatnie badania wykazały, że geraniol istotnie hamuje wzrost komórek w linii komórkowej raka okrężnicy colo-205 z wartością IC₅₀ 20 µM. Barwienie komórek z użyciem DAPI wykazało, że alkohol indukuje apoptozę, a eksperyment Western Blot potwierdził zwiększoną ekspresję białka Bax i inhibicję białka Bcl-2. Dodatkowo monoterpen indukuje uszkodzenie DNA i zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach colo-205 (Qi i in., 2018). Leczenie geraniem w dawce 150 mg/kg masy ciała może hamować raka endometrium poprzez hamowanie onkogenów i aktywację genów supresorowych guza w modelu samicy szczura Wistar. Badania metodą Real-time PCR wskazują na supresję transkrypcji genów białka K-ras, MAPK, PI3K i β-kateniny, a eksperyment Western Blot świadczy o pozytywnej roli geraniolu w ekspresji fosfataz, homologu fosfotensyny (PTEN), receptorów progesteronów i E-kadheryny (Shanmugapriya i in., 2017). Aktywność antyangiogenna została udowodniona na linii komórkowej

śródbłonna eEND2. Geraniol hamuje migrację komórek eEND2 wraz z hamowaniem ekspresji jądrowego antygenu komórek proliferujących (PCNA). Ponadto terpenoid blokuje transdukcję sygnału VEGF/VEGFR-2, który odpowiada za indukcję angiogenezy w komórkach nowotworowych (Witting i in., 2015). Geraniol wykazuje także aktywność biologiczną wobec pierwotnego raka wątroby i trzustki, raka płuc, prostaty, skóry i nowotworów jamy ustnej (Lei i in., 2018).

Wykazano, że geraniol charakteryzuje się działaniem hepatoprotekcyjnym. Monoterpenoid w dawce 200 mg/kg masy ciała szczurów łagodzi niealkoholowe, sftuszczeniowe zapalenie wątroby wywołane dietą z niedoborem metioniny i choliny. W tym modelu geraniol wykazał hamujący wpływ na zwłóknienie i apoptozę komórek wątroby. Na poziomie molekularnym terpen hamuje aktywność aminotransferazy alaninowej i aminotransferazy asparaginianowej w surowicy oraz chroni mitochondria wątroby poprzez supresję mitochondrialnych reaktywnych form tlenu. Dodatkowo, geraniol wpływa na niższe stężenie dialdehydu malonowego i 3-nitrotyrozyny oraz hamuje ekspresję iNOS i cytochromu P450 2E1 w wątrobie. Wykazano także inhibicję stanu zapalnego w wątrobie na drodze hamowania ekspresji TNF- α i IL-6 oraz zmniejszenie aktywności mieloperoksydazy (Chen i in., 2016). Badania wskazują, że geraniol może stymulować regenerację tkanki wątroby po częściowej hepatektomii (70%) i uszkodzeniu oksydacyjnym wywołanym iniekcją H₂O₂ (Canbek i in., 2017, Ozkaya i in., 2017).

W modelu uszkodzenia nerwu wywołanego przez akrylamid u *Drosophila melanogaster* geraniol wykazuje działanie neuroprotekcyjne. Podanie terpeny spowodowało spadek śmiertelności muszek poprzez łagodzenie stresu oksydacyjnego, dysfunkcji mitochondriów i neurotoksyczności akrylamidu. Mechanizm działania geraniolu opierał się na modulacji poziomu GSH i całkowitych tioli ze wzrostem aktywności enzymów detoksykacyjnych. Dodatkowo, jednoczesne podawanie geraniolu z kurkuminą wykazywało negatywny wpływ na funkcję układu cholinergicznego ze spadkiem aktywności acetylocholinesterazy (Prasad i Muralidhara, 2014). Alkohol terpenowy wykazywał również ochronny wpływ na uszkodzenia układu nerwowego w mysim modelu choroby Parkinsona wywołanym przez 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydynę (MPTP). Doustne podawanie geraniolu łagodziło zaburzenia nerwowo-mięśniowe poprzez zwiększenie immunoreaktywnej ekspresji hydroksylazy tyrozynowej i zmniejszenie ekspresji α -synukleiny (Rekha i in., 2013). Rok później, Rekha i Selvakumar (2014) w takim samym modelu choroby Parkinsona wykazali, że geraniol reguluje stosunek Bcl-2/Bax i hamuje

ekspresję proapoptotycznego cytochromu c i kaspazy-9, co skutkuje złagodzeniem neurodegeneracji i poprawę ruchową mysz.

Ponadto wykazano, że geraniol wykazuje szereg innych właściwości terapeutycznych, m.in. przeciwzapalne, antyoksydacyjne, kardioprotekcyjne, przeciwcukrzycowe, antydepresyjne czy antyalergiczne (Lei i in., 2018).

1.3.4. Alkohol perylowy

Alkohol perylowy należy do grupy terpenoidów monocyklicznych występujących w olejkach eterycznych, m.in. cytrusów, mięty pieprzowej, mięty zielonej, wiśni, żurawiny, szałwii, trawy cytrynowej i lawendy. Jest produktem metabolizmu limonenu. Najwięcej uwagi w badaniach naukowych poświęcono właściwościom antynowotworowym alkoholu perylowego wobec glejakom, szczególnie podawanemu donosowo (Chen i in., 2018). Wśród innych udowodnionych aktywności tego monoterpenu można wyróżnić działanie przeciwbakteryjne (Figueiredo i in., 2020), przeciwgrzybicze (Ansari i in., 2016, 2018), przeciwwirusowe (Mello i in., 2020) oraz neuroprotektoryjne (Anis i in., 2018, Zafeer i in., 2018).

W 2006 roku opisano pierwszy przypadek donosowego podania alkoholu perylowego 62-letniej kobiecie ze skąpodrzewiakiem anaplastycznym, u której, pomimo leczenia skojarzonego z chirurgią i radiochemioterapią, wystąpił nawrót nowotworu. Po donosowym podaniu terpenu w stężeniu 0,3% cztery razy dziennie przez kilka miesięcy, rezonans magnetyczny wykazał skurczenie się guza (de Fonseca i in., 2006). W kolejnym badaniu podawano alkohol perylowy 4 razy dziennie w dawce 55 mg 37 pacjentom z nawrotowym glejakiem złośliwym. Okazało się, że leczenie terpenem spowodowało zmniejszenie rozmiarów guza i wydłużenie czasu życia u kilku pacjentów. Co istotne, alkohol perylowy był bardzo dobrze tolerowany przez pacjentów i nie wykazywał efektów ubocznych nawet u osób leczonych przez ponad rok (de Fonseca i in., 2008).

Molekularny mechanizm przeciwnowotworowy alkoholu perylowego jest plejotropowy i wpływa na wiele szlaków komórkowych oraz procesów regulujących wzrost. Traktowanie alkoholem perylowym linii ludzkich komórek gruczolakoraka trzustki i ludzkich komórek raka piersi spowodowało wzrost ekspresji białka p15, p21 i p27, które należą do grupy inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (CDK), służących do zatrzymania progresji cyklu komórkowego. Z drugiej strony terpen obniżał ekspresję kilku białek cyklinowych, które są podjednostkami regulatorowymi CDK i mają zasadnicze znaczenie dla ich funkcji kinazowej. Stwierdzono również obniżenie ekspresji białka p34. W efekcie

nastąpiło silne zatrzymanie cyklu komórkowego, po którym komórki przeszły w fazę apoptozy (Wieseman i in., 2007, Yuri i in., 2004). Alkohol perylowy moduluje również aktywność telomerazy, którą wykazano w badaniach na linii ludzkich komórek prostaty. Terpen skutkowało hamowaniem odwrotnej transkryptazy, katalitycznej podjednostki telomerazy (hTERT), co wiązało się z rozerwaniem kompleksu białkowego składającego się z hTERT, mTOR, Raptor, HSP90 (białko szoku cieplnego o masie 90 kDa) i S6K (rybosomalna kinaza S6). Ponadto alkohol perylowy powodował defosforylację 4E-BP1 (białko wiążące eIF4E) i zakłócał interakcję między eIF4E (eukariotyczny czynnik inicjacji 4E) a eIF4G, które są kluczowymi składnikami translacyjnego kompleksu wiążącego. Świadczy to o działaniu alkoholu w szlakach translacyjnych i post-translacyjnych (Sundin i in., 2013). Alkohol perylowy oddziałuje również na pompę sodowo-potasową, szlak Notch, poziom NF- κ B i TGF. W niektórych typach nowotworów dochodzi do nadekspresji pompy sodowo-potasowej. Badania wskazują, że hamowanie pompy przez terpen może być związane z proapoptyczną funkcją szlaku stresu JNK. Z kolei hamowanie szlaku Notch wpływa na inhibicję migracji i przerzutowania komórek raka wątroby. Alkohol perylowy powoduje także spadek poziomu wapnia, co przekłada się na zahamowanie konstytutywnego zależnego od wapnia szlaku NF- κ B, w konsekwencji doprowadzając do apoptozy komórek nowotworowych. Terpen stymuluje szlak TGF, który koreluje dodatnio z regresją nowotworu *in vivo* (Garcia i in., 2010, Ma i in., 2016, Berchtold i in., 2005).

W 2020 roku opisano przeciwbakteryjną aktywność alkoholu perylowego wobec Gram-ujemnych pasożytów przyzębia *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 i *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii przez alkohol było równe minimalnemu bólcemu i wynosiło 1,6 mM (Figueiredo i in., 2020).

Wykazano również aktywność przeciwgrzybiczną alkoholu perylowego wobec chorobotwórczego *C. albicans* i czterech innych gatunków *Candida*. Z badań wynika, że MIC wobec *C. albicans* wynosi 350 μ g/ml. Traktowanie drożdżaków terpenem skutkowało zahamowaniem ekspresji genu *CNBI* sygnalizacji kalcyneuryny, co zostało potwierdzone w analizie całego transkryptomu. W skutek tego komórki były mniej odporne na niekorzystne warunki środowiska, np. alkaliczne pH czy zasolenie. Alkohol perylowy powoduje uszkodzenie błony i ściany komórkowej, na co wskazuje niższy poziom ergosterolu, zakłócona homeostaza pH i zwiększone tempo sedymentacji komórek. Ponadto monoterpen hamował potencjalne cechy wirulencji, w tym przemiany morfologiczne, tworzenie biofilmu i powodował zmniejszoną zdolność przylegania komórek zarówno do powierzchni

polistyrenowej płytki wielodołkowej, jak i komórek nabłonka policzka. Traktowanie komórek *C. albicans* terpenem w stężeniu 175 µg/ml skutkowało zatrzymaniem cyklu komórkowego i dysfunkcją mitochondriów (Ansari i in., 2016, 2018).

1.3.5. Myrtenol

Myrtenol jest bicyklicznym pierwszorzędowym alkoholem terpenowym występującym w olejkach eterycznych, np. *Agonis fragrans* i *Myrtus communis*, jednak jego stężenie w olejkach rzadko przekracza 10% (Lowe i in., 2007, Mimica-Dukić in., 2010). W ciągu ostatnich kilku lat opublikowano wiele wyników badań świadczących o wysokiej aktywności terapeutycznej myrtenolu, m.in. antybakteryjnej (Cordeiro i in., 2020, Selvaraj i in., 2019, 2020), przeciugrzybiczej (Cavalcanti i in., 2021), przeciwzapalnej (Bejeshk i in., 2018), antynowotworowej (Trytek i in., 2018), gastroprotekcyjnej (Viana i in., 2016), kardioprotekcyjnej (de Brittoa i in., 2018) i antyoksydacyjnej (Rajizadeh i in., 2019).

Aktywność przeciwbakteryjna myrtenolu została wykazana wobec metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA). Wykazano, że minimalne stężenie bójcze wobec komórek jest tożsame z minimalnym stężeniem hamującym wzrost i wynosi 128 µg/ml (Cordeiro i in., 2020). Poza bezpośrednim działaniem bójczym wobec bakterii, myrtenol hamuje wytwarzanie biofilmu i syntezę głównych czynników wirulencji MRSA takich jak lipaza, hemolizyna i stafyloksantyna. Alkohol terpenowy w stężeniu 600 µg/ml powodował rozerwanie w 40% dojrzałego biofilmu (Selvaraj i in., 2019). Selvaraj i in. (2020) badali potencjał alkoholu również wobec biofilmu *Acinetobacter baumannii*, który jest oportunistycznym patogenem w zakażeniach szpitalnych. Terpen w stężeniu 200 µg/ml wykazywał silne działanie antybiofilmowe, nie wywierając jednak żadnego wpływu na wzrost i żywotność metaboliczną szczepów *A. baumannii*. Analizy mikroskopowe potwierdziły zmniejszenie grubości biofilmu, szczególnie biofilmu dojrzałego. Oprócz tego myrtenol hamował związane z biofilmem czynniki wirulencji takie jak synteza egzopolisacharydu, hydrofobową powierzchnię komórki i oporność na utlenianie. Analiza transkryptomiczna ujawniła supresję związanych z biofilmem genów, *bfnR*, *csuA/B*, *bap*, *ompA*, *pgaA*, *pgaC*, *katE*. Myrtenol zwiększał także podatność szczepów *A. baumannii* na konwencjonalne antybiotyki takie jak amikacyna, gentamycyna i trimetoprim.

Przeciugrzybicy potencjał myrtenolu został wykazany wobec drożdżaków *C. albicans* i *C. parapsilosis*. Minimalne stężenie hamujące wzrost komórek wynosiło od 256 do 512 µg/ml. Ponadto, stosowanie (-)-myrtenolu z amfoterycyną B i flukonazolem wykazywało efekt synergistyczny (Cavalcanti i in., 2021).

Rajizadeh i in. (2019) zbadali aktywność antyutleniającą i przeciwzapalną myrtenolu w modelu astmy alergicznej indukowanej u szczurów inhalacją owalbuminy. Myrtenol podawany przez 7 dni w dawce 50 mg/kg masy ciała szczurów istotnie redukował zmiany patologiczne w płucach i śródbrzońku dróg oddechowych w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo, grupa leczona terpenem charakteryzowała się obniżonym poziomem interleukiny-1 β , dialdehydu malonowego i czynnika martwicy nowotworu α . Zwiększeniu uległ natomiast poziom interleukiny-10. Odnotowano także wyższą aktywność peroksydazy glutationowej. Według autorów tych badań, myrtenol wykazuje silny potencjał w leczeniu astmy ze względu na zwiększenie udziału związków antyutleniających do utleniających i zmniejszenie udziału interleukin prozapalnych do przeciwzapalnych w płucach.

W 2018 roku po raz pierwszy wykazano aktywność kardioprotekcyjną myrtenolu w modelu niedokrwienia mięśnia sercowego u szczurów Wistar (de Brittoa i in., 2018). Alkohol podawano szczurom doustnie przez tydzień w dawce 50 mg/kg, po czym indukowano niedokrwienie serca. Myrtenol istotnie zapobiegł upośledzeniu zdolności skurczowej serca, zlikwidował anormalną falę elektrokardiograficzną, a także zmniejszył zagrożające życiu arytmie i wielkość zawału wywołanego niedokrwieniem. Terpen zapobiegł także wzrostowi wytwarzania reaktywnych form tlenu w sercu i przywrócił upośledzoną aktywność endogennych enzymów antyoksydacyjnych, przez co zapobiegł dalszym uszkodzeniom, które wynikały ze stresu oksydacyjnego. Wykazano także modulującą rolę myrtenolu wobec szlaków pro- i antyapoptotycznych (Bax i Bcl-2), objawiającą się zmniejszoną liczbą komórek apoptotycznych.

Viana i in. (2016) zapoczątkowali badania nad gastroprotekcją (przeciwwrzdową) aktywnością myrtenolu. Alkohol w dawkach doustnych 25, 50 i 100 mg/kg masy ciała myszy istotnie zmniejszał nasilenie uszkodzeń żołądka wywołanych etanolem. Wykazano, że myrtenol powoduje spadek aktywności mieloperoksydazy i dialdehydu malonowego oraz wzrost aktywności peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy w komórkach żołądka. Monoterpen utrzymywał prawidłowy stosunek azotanów do azotanów, niebiałkowych tioli i śluzu żołądkowego. Wstępne traktowanie myszy flumazenilem (antagonista receptora GABA-A), idometacyną (inhibitor COX) i L-NAME (inhibitor syntezy NO) wpłynęło negatywnie na potencjał gastroprotekcyny (-)-myrtenolu. Działanie gastroprotekcyjne alkoholu opiera się na bezpośredniej aktywacji receptora GABA-A i aktywności przeciwutleniającej.

Aktywność przeciwnowotworowa myrtenolu została zbadana na linii ludzkich komórek raka okrężnicy (HT29) i linii prawidłowych ludzkich komórek jelita (CCD 841

CoTr) (Trytek i in., 2018). W przypadku linii komórek nowotworowych po 24 godz. inkubacji stężenie (-)-myrtenolu hamujące proliferację komórek w 50% (IC_{50}) wynosiło 8,4 mM w metodzie MTT i 33,5 mM w metodzie NR. Z kolei komórki prawidłowe charakteryzowały się wyższą wrażliwością na traktowanie terpenem ($IC_{50} = 1,7$ mM w teście MTT; $IC_{50} = 0,86$ mM w teście NR). W stężeniu 0,1 mM myrtenol dwukrotnie obniżył stężenie tlenu azotu w porównaniu do próby kontrolnej. Wykazano również wpływ terpeny na aktywność enzymów mitochondrialnych i stabilność błony komórkowej.

2. Cel pracy

Celem nadrzędnym pracy było opracowanie biokatalitycznych metod transformacji alkoholi terpenowych do nowych związków o potencjalnie zwiększonej aktywności biologicznej.

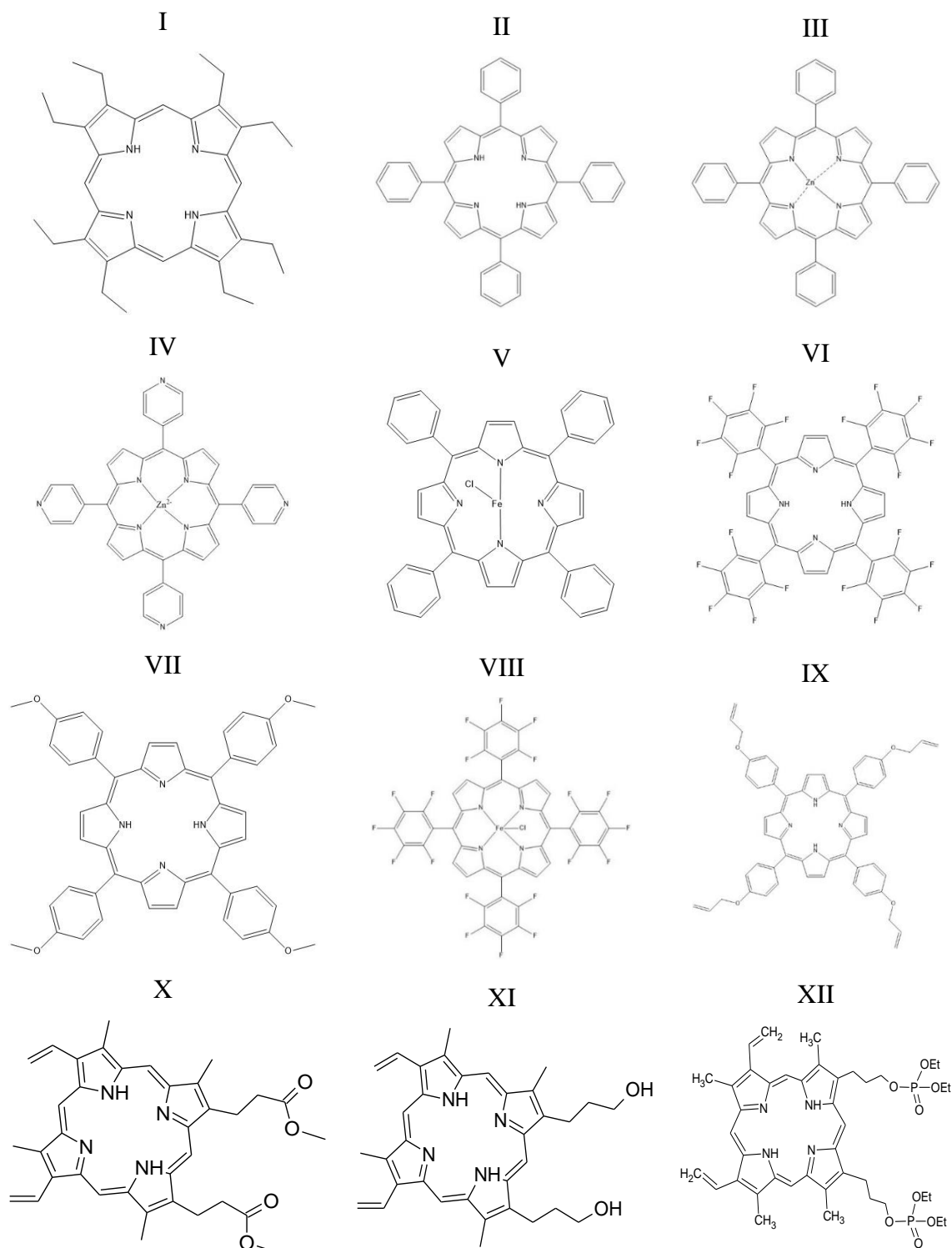
W związku z tym wyszczególniono cele pośrednie pracy:

- selekcja wydajnego biokatalizatora reakcji estryfikacji alkoholi terpenowych,
- optymalizacja warunków estryfikacji alkoholi terpenowych,
- modyfikacja wybranych alkoholi terpenowych w układzie biomimetycznym przy użyciu porfiryn,
- określenie mechanizmu i optymalnych warunków fotoutleniania myrtenolu w układzie biomimetycznym,
- określenie aktywności biologicznej wyizolowanych i oczyszczonych produktów biokatalizy alkoholi terpenowych wobec komórek nowotworowych (glejaka ludzkiego) i mikroorganizmów patogennych.

3. Materiały i metody

3.1. Odczynniki chemiczne

- Składniki podłoży mikrobiologicznych: agar (Oxoid, France), ekstrakt słodowy (Bruntal, Czechy), ekstrakt drożdżowy (Sigma-Aldrich, USA), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NaCl , Tween 80, glukoza, KH_2PO_4 , mocznik, $\text{FeCl}_3 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, D-biotyna, tiamina, CaCO_3 , błękit bromotymolowy, FeCl_2 , MnCl_2 , ZnCl_2 , CaCl_2 , CuCl_2 , MgCl_2 (POCH, Polska), oliwa z oliwek (Luglio, Włochy);
- Alkohole terpenowe: (*S*)-(-)- β -cytronellol ($\geq 98\%$) (Merck, Niemcy), (*IR*)-(-)-myrtenol (95%), (\pm)-linalol (97%), (-)-karweol (97%), geraniol (98%), nerol (97%), farnezoł (95%), (*S*)-(-)-alkohol perylowy (96%), (*IR*)-(-)-nopol (98%), (-)-*trans*-pinokarweol ($\geq 96\%$), (-)-terpinen-4-ol ($\geq 95\%$), (Sigma-Aldrich, USA);
- Kwasy karboksylowe: octowy (C2) ($\geq 99,5\%$), cytrynowy (99%) (POCH, Polska), propionowy (C3) ($\geq 99,5\%$), masłowy (C4) ($\geq 99\%$), walerianowy (C5) ($\geq 99\%$), kaprylowy (C8) ($\geq 99\%$), pelargonowy (C9) ($\geq 99\%$), laurynowy (C12) ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich, USA);
- Rozpuszczalniki organiczne: n-heksan, cykloheksan, heksadekan, acetonitryl, 1,4-dioksan, chloroform, octan etylu, aceton, 1-propanol, 2-propanol, N-metylo-2-pirolidon (NMP), dimetyloacetamid (DMAC), dimetyloformamid (DMF), tetrahydrofuran (THF), etanol, eter-*tert*-metylo-butylowy (MTBE), dimetylosulfotlenek (DMSO) ($\geq 99\%$) (POCH, Polska);
- Porfiryny: 2,3,7,8,12,13,17,18-oktaetyloporfiryne (H₂OEP) (Ryc. 10I), 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryne (H₂TPP) (Ryc. 10II), tetrafenyloporfiryne cynku (II) (ZnTPP) (Ryc. 10III), 5,10,15,20-tetra(4-pirydylo)porfiryne cynku (ZnTPyP) (Ryc. 10IV), 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryne chlorku żelaza (III) (Fe^{III}(TPP)Cl) (Ryc. 10V), 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenylo)porfiryne (H₂TF₅PP) (Ryc. 10VI), 5,10,15,20-tetrakis(4-metoksyfenylo)porfiryne (H₂TPPOMe) (Ryc. 10VII), 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenylo)porfiryne chlorku żelaza (III) (Fe^{III}(TF₅PP)Cl) (Ryc. 10VIII), 5,10,15,20-tetrakis[(4-alliloksy)fenylo]porfiryne (H₂TAlxPP) (Ryc. 10IX) (97%) (Sigma-Aldrich, USA), metyloestrowa pochodna protoporfiryne IX (PPIX(Me)₂) (Ryc. 10X), hydroksylowa pochodna protoporfiryne IX (PPIX(OH)₂) (Ryc. 10XI), fosfonianowa pochodna protoporfiryne IX (PPIX[P(O)(OEt)₂]₂) (Ryc. 10XII) (zsyntetyzowane w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie).



Rycina 10. Struktury chemiczne porfiryn wykorzystanych w biomimetycznej katalizie alkoholi terpenowych

- Inne odczynniki: Hoechst 33342, jodek propidyny, oranż akrydyny ($\geq 94\%$), CDCl_3 , 2,6-di-*tert*-butylofenol (BHT), α -tokoferol (Sigma-Aldrich, USA), Na_2HPO_4 , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH, fenoloftaleina, TTC (chlorek 2,3,5-trifenylotetrazoliowy), resazuryna (POCH, Polska), podłoże do hodowli komórkowych DMEM, wyciąg mózgowo-

sercowy (BHI) (Biomaxima, Polska) mieszanina składników odżywczych Ham's F-12 (ThermoFisher Scientific, USA), Coomassie Brilliant Blue R-250/G-250 (Bio-Rad, USA).

3.2. Materiał biologiczny

3.2.1. Selekcja biokatalizatorów grzybowych do estryfikacji alkoholi terpenowych

W badaniach nad doбором biokatalizatora do estryfikacji alkoholi terpenowych użyto szczep psychrotroficznego grzyba nitkowatego *Chrysosporium pannorum* A-1, szczepy o udokumentowanej aktywności lipolitycznej: mezofilne *Penicillium roqueforti* (Eitenmiller i in., 1970) i *Rhizomucor miehei* (Rodrigues i Fernandez-Lafuente, 2010) oraz psychrotroficzny *Penicillium chrysogenum* 9' (Bancerz i in., 2005). Mikroorganizmy pozyskano z kolekcji Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej. Szczepy psychrotroficzne pierwotnie wyizolowano z gleby zachodniego wybrzeża Spitzbergenu w archipelagu Svalbard, północna część Bellsundu (Norwegia) (77°33'N, 14°31'E) (Kurek i in., 2007; Bancerz i in., 2005). W tabeli 2 przedstawiono systematykę badanych szczepów na podstawie danych z MycoBank (www.mycobank.org; dostęp z dnia 22.08.2022 r.).

Tabela 2. Systematyka szczepów wykorzystanych w badaniach nad selekcją biokatalizatora do estryfikacji alkoholi terpenowych

| Królestwo | Gromada | Klasa | Rząd | Rodzina | Gatunek |
|-----------|---------------------|----------------------|-------------------|------------------------|--------------------------------|
| Fungi | Ascomycota | Eurotiomycetes | <i>Onygenales</i> | <i>Onygenaceae</i> | <i>Chrysosporium pannorum</i> |
| | | | <i>Eurotiales</i> | <i>Aspergillaceae</i> | <i>Penicillium chrysogenum</i> |
| | <i>Mucoromycota</i> | <i>Mucoromycetes</i> | <i>Mucorales</i> | <i>Lichtheimiaceae</i> | <i>Rhizomucor miehei</i> |

3.2.2. Mikroorganizmy użyte do określenia aktywności biologicznej produktów biokatalizy

W badaniach nad aktywnością biologiczną produktów biokatalizy wykorzystano następujące gatunki grzybów: *Candida albicans* ZMP1, *Penicillium chrysogenum* 46, *Aspergillus niger* AM-11 oraz bakterie *Staphylococcus aureus* ATTC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 15442. W tabeli 3 przedstawiono taksonomię poszczególnych gatunków na podstawie danych z MycoBank i National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov i www.mycobank.org; dostęp z dnia 22.08.2022 r.).

Tabela 3. Systematyka gatunków wykorzystanych w badaniach nad aktywnością biologiczną produktów biokatalizy

| Królestwo | Gromada | Klasa | Rząd | Rodzina | Gatunek |
|-----------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| Fungi | Ascomycota | <i>Saccharomycetes</i> | <i>Saccharomycetales</i> | <i>Incertae sedis</i> | <i>Candida albicans</i> |
| | | <i>Eurotiomycetes</i> | <i>Eurotiales</i> | <i>Aspergillaceae</i> | <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus niger</i> |
| Bacteria | <i>Proteobacteria</i> | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Pseudomonadales</i> | <i>Pseudomonadaceae</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | <i>Firmicutes</i> | <i>Bacilli</i> | <i>Bacillales</i> | <i>Staphylococcaceae</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |

Szczepy grzybowe przechowywano na płytkach ze stałym podłożem maltozowym (MEA) (Kutyła i in., 2020), natomiast szczepy bakteryjne na stałym bulionie tryptozowo-sojowym (TSB, *ang. tryptic soy broth*) (Brożyna i in., 2020). Dla dalszego przygotowania inokulum, hodowlę bakterii i drożdżaków *C. albicans* prowadzono na podłożu stałym od 2 do 4 dni w 37°C, grzybów psychrotroficznych przez 14 dni w 20°C, zaś grzybów mezofilnych odpowiednio przez 7 dni w 30°C. Przerośnięte biomasa płytki przechowywano w lodówce (4°C). Skład podłoży stosowanych do przechowywania mikroorganizmów zamieszczono w tabeli 4.

Tabela 4. Skład podłoży stałych stosowanych do przechowywania mikroorganizmów

| Nazwa podłoża | Makroelementy | Stężenie (g/l) |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Maltozowe (MEA) | Ekstrakt słodowy | 70 |
| | Agar | 20 |
| Bulion tryptozowo-sojowy (TSB) | Trypton | 17 |
| | Ekstrakt sojowy | 3 |
| | NaCl | 5 |
| | K ₂ HPO ₄ | 2,5 |
| | Glukoza | 2,5 |
| | Agar | 20 |

Przed użyciem, podłoża zostały wyjałowione w autoklawie przez 20 minut w temp. 121°C, przy naciśnięciu 0,075 MPa.

3.2.3. Linie komórkowe

W badaniach nad aktywnością przeciwnowotworową produktów biokatalizy wykorzystano linie ludzkich komórek glejaka wielopostaciowego T98G (IV^o złośliwości nowotworu wg WHO) oraz ludzkich komórek gwiazdki anaplastycznej MOGCCM

(III° złośliwości nowotworu wg WHO). Obie linie pochodziły z Europejskiej Kolekcji Linii Komórkowych (ECACC, *ang. European Collection of Cell Cultures*).

Hodowle komórkowe prowadzono w podłożu płynnym, złożonym z 3 części podłoża DMEM (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium*) oraz 1 części mieszaniny składników odżywczych F-12, uzupełnionym 10% płodową surowicą bydlęcą, penicyliną (100 U/ml) i streptomycyną (100 µg/ml). Wzrost komórek prowadzono w 37°C w wilgotnej atmosferze 95% powietrza i 5% CO₂.

3.3. Podłoża i bufony

3.3.1. Podłoże stałe do wstępnej oceny aktywności lipolitycznej

Wstępną ocenę aktywności lipolitycznej grzybów przeprowadzono na podłożu stałym o składzie przedstawionym w tabeli 5.

Tabela 5. Skład podłoża stałego stosowanego do wstępnej oceny aktywności lipolitycznej grzybów

| Nazwa podłoża | Makroelementy | Stężenie (g/l) |
|---|---|----------------|
| Podłoże do wstępnej oceny aktywności lipolitycznej (P1) | K ₂ HPO ₄ | 1 |
| | MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,3 |
| | CaCl ₂ × 6 H ₂ O | 0,1 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2 |
| | NaCl | 0,1 |
| | Agar | 20 |
| | Masło | 5 |

Przygotowane podłoże rozlano do probówek w objętości po 20 ml, które jałowiono w autoklawie przez 20 minut w temp. 121°C przy nadciśnieniu 0,075 MPa. Po wyjałowieniu probówki z podłożem ostudzono do około 60°C i dodano 150 µl alkoholowego roztworu błękitu bromotymolowego (0,04%) w celu uzyskania zielonego zabarwienia podłoża. Zawartość probówek wylano na płytki Petriego.

3.3.2. Podłoża płynne stosowane do hodowli grzybów

W badaniach wykorzystano trzy bazowe rodzaje podłoży płynnych stosowanych do hodowli grzybów. Ich skład przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Skład płynnego podłoża glukozowo-maltozowego (M), podłoża (A) (Bancerz i in., 2005) i podłoża podstawowego (BM) (Molinari i in., 2000) stosowanych do hodowli grzybów

| Nazwa podłoża | Makroelementy | Stężenie (g/l) |
|--|---|-----------------------|
| Podłoże glukozowo-maltozowe (M) | Glukoza | 10 |
| | Ekstrakt słodowy | 10 |
| | Ekstrakt drożdżowy | 5 |
| | Bacto-pepton | 5 |
| Podłoże (A) | Makroelementy | Stężenie (g/l) |
| | Glukoza | 10 |
| | KH ₂ PO ₄ | 6 |
| | MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 1 |
| | Mocznik | 4 |
| | Oliwa z oliwek | 10 |
| | Mikroelementy | Stężenie (g/l) |
| | FeCl ₃ × 6 H ₂ O | 0,01 |
| | D-biotyna | 0,000008 |
| | Tiamina | 0,0002 |
| Podłoże podstawowe (BM) | Makroelementy | Stężenie (g/l) |
| | Tween 80 | 5 |
| | Ekstrakt drożdżowy | 1 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5 |
| | K ₂ HPO ₄ | 1 |
| | MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,2 |

Końcową wartość pH każdego podłoża ustalano na 6,0 poprzez dodanie odpowiedniej objętości roztworu 1 M NaOH lub 1 M HCl. W celu otrzymania różnych wariantów podłoża do indukcji aktywności lipolitycznej, podłoże BM modyfikowano poprzez dodatek glukozy, oliwy z oliwek i CaCO₃. Rodzaj modyfikowanych wersji podłoża BM przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Rodzaje zmodyfikowanego podłoża BM i ich akronimy

| Akronim modyfikowanego podłoża | Rodzaj modyfikacji |
|--------------------------------|---|
| BM1 | Podłoże BM + 1% oliwa z oliwek |
| BM2 | Podłoże BM + 1% oliwa z oliwek + 1% glukoza |
| BMC | Podłoże BM + 1% CaCO ₃ |
| BMC1 | Podłoże BM + 1% oliwa z oliwek + 1% CaCO ₃ |
| BMC2 | Podłoże BM + 1% oliwa z oliwek + 1% glukoza + 1% CaCO ₃ |

3.3.3. Bufory i inne roztwory

W doświadczeniach wykorzystano następujące rodzaje buforów i roztworów:

- a) Płyn fizjologiczny – sporządzony poprzez rozpuszczenie 0,9% NaCl w wodzie destylowanej;
- b) Bufor fosforanowy 50 mM, pH 7 – sporządzony poprzez zmieszanie w odpowiednich proporcjach 50 mM roztworu diwodorofosforanu (V) sodu (NaH₂PO₄) z 50 mM roztworem wodorofosforanu (V) sodu (Na₂HPO₄);
- c) Bufory cytrynianowo-fosforanowe o wartościach pH: 2,2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 – sporządzone poprzez zmieszanie w odpowiednich proporcjach 0,1 M roztworu kwasu cytrynowego z 0,2 M roztworem wodorofosforanu (V) sodu (Na₂HPO₄);
- d) Bufory węglanowe 0,2 M o wartościach pH: 9,2; 10; 10,7 – sporządzone poprzez zmieszanie w odpowiednich proporcjach 0,2 M roztworu węglanu sodu (Na₂CO₃) z 0,2 M roztworem wodorowęglanu sodu (NaHCO₃);
- e) Roztwór titranta, 0,05 M KOH – sporządzony poprzez rozpuszczenie 5,61 g wodorotlenku potasu w 1000 ml wody destylowanej;
- f) Roztwory i bufory stosowane przy elektroforezie:
 - a. Akrylamid roztwór wyjściowy 30% (akrylamid : NN'-metylenobisakrylamid 29:1);
 - b. Bufor elektrodowy – sporządzony poprzez zmieszanie 25 mM 2-amino-2-(hydroksymetyl)propan-1,3-diolu (Tris), 192 mM glicyny i 0,1% w/v laurylosiarczanu sodu (SDS);
 - c. Bufor próbkowy redukujący – sporządzony poprzez zmieszanie 60 mM Tris-u, 2% w/v SDS-u, 10% v/v glicerolu, 0,025% błękitu bromofenolowego i 2% w/v ditiotreitolu (DTT).

3.4. Metody badań

3.4.1. Przygotowanie materiału posiewowego

Inokulum grzybów do zaszczepiania podłoży płynnych stanowiła zawiesina konidiów w wodzie jałowej z dodatkiem 0,01% Tween'u 80. Konidia z przerośniętych grzybnią płytek z podłożem MAE zalewano 10 ml wody jałowej z dodatkiem 0,01% Tweenu'u 80, po czym zdrapywano przy użyciu ezy i następnie uzupełniano wodą jałową do uzyskania gęstości w zakresie od 8×10^6 do 11×10^6 konidiów/ml. Gęstość materiału posiewowego mierzono przy pomocy komory Thoma pod mikroskopem świetlnym Olympus BX61

3.4.2. Wstępne określenie aktywności lipolitycznej w teście płytkowym

Do wstępnego określenia aktywności lipolitycznej zastosowano metodę radialną. Krążki o średnicy 6 mm wycinano sterylnym korkoborem z podłoża MEA przerośniętego grzybnią, po czym jałowo przenoszono je punktowo na podłoże P1 (p. 3.3.1). Płytki Petriego z krążkami grzybni na podłożu P1 inkubowano 24 godz. w temp. 20°C w przypadku *C. pannorum* A-1 i *P. chrysogenum* 9' oraz w temp. 30°C w przypadku *R. miehei* i *P. roqueforti*. Po czasie inkubacji, dla każdego szczepu zmierzono średnicę strefy przebarwienia podłoża, którą wyrażono w mm. Wydzielony do podłoża enzym o aktywności lipolitycznej katalizował hydrolizę zawartych w maśle tłuszczów, co w następstwie obniżenia pH podłoża przez uwolnione kwasy tłuszczowe skutkowało zmianą barwy indykatora z zielonej na żółtą.

3.4.3. Warunki hodowli drobnoustrojów

Hodowle grzybów w podłożu płynnym przeprowadzono w szklanych kolbach Erlenmeyera z szeroką szyjką o pojemności 300 ml. Kolby z zawartością 50 ml badanego podłoża, jałowiono w autoklawie w temperaturze 117°C, przy nadciśnieniu 0,075 MPa przez 20 minut. W przypadku stosowania podłoży modyfikowanych, węglan wapnia i oliwę z oliwek sterylizowano oddzielnie, po czym suplementowano do podłoża BM bezpośrednio przed inokulacją. Po ostudzeniu kolb podłoże zaszczepiano w warunkach jałowych 2 ml zawiesiny konidiów (wg. p. 3.4.1) i hodowano w 20°C (temp. właściwej dla psychrotrofów) w wytrząsarce orbitalnej (150 RPM). Czas trwania hodowli był uzależniony od doświadczenia i wynosił od 1 do 7 dni. Po zakończeniu hodowli w określonym czasie, oznaczono zewnątrz- i wewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną (wg p. 3.5.1), pH

i stężenie białka (wg p. 3.5.2) w płynie pohodowlanym oraz ilość uzyskanej biomasy grzybni.

3.4.4. Optymalizacja stężenia Tween'u 80

W celu określenia optymalnego stężenia Tween'u 80 jako indukora aktywności lipolitycznej przeprowadzono hodowlę *C. pannorum* A-1 na podłożu BMC zawierającym w swoim składzie od 0 do 1% w/v Tween'u 80. Hodowlę prowadzono od 3 do 5 dni w warunkach opisanych w punkcie 3.4.3.

3.4.5. Zagęszczanie płynu pohodowlanego

Zagęszczanie płynu pohodowlanego przeprowadzono metodą ultrafiltracji i metodą zatężania na wyparce laboratoryjnej (Rotavapor R-200/205; Buchi). W procesie ultrafiltracji płyn pohodowlany przepuszczono przez membranę o wielkości porów 11 kDa. Ultrafiltrację i proces odparowywania prowadzono do 5-krotnego zatężenia płynu. Następnie w odcieku, ultrafiltracie i zatężonym płynie oznaczono stężenie białka wg. p. 3.5.2, oraz aktywność lipolityczną wg. p. 3.5.1.

3.4.6. Wytrącanie białek z płynu pohodowlanego za pomocą rozpuszczalników organicznych

Płyny pohodowlane przefiltrowano na lejku Büchnera przy użyciu pompy wodnej, po czym białka zawarte w filtratach wytrącano zmrożonymi do -20°C rozpuszczalnikami organicznymi: acetonem, metanolem, etanolem, 1-propanolem oraz 2-propanolem. Rozpuszczalniki w odpowiedniej objętości dodawano do 10 ml płynów pohodowlanych do uzyskania stosunków objętościowych (płyn : rozpuszczalnik): 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6. Roztwory mieszano na mieszadle magnetycznym przez 10 minut po czym inkubowano w 4°C przez 1 godz. w stożkowo-dennych probówkach wirówkowych. Precypitat oddzielano poprzez wirowanie (wirówka MPW-352R; Polska) przy 9600 RPM w czasie 30 min. w 4°C . Otrzymany osad suszono w temperaturze pokojowej przez 1 godz. w celu usunięcia pozostałości rozpuszczalników, po czym zawieszano w 10 ml 50 mM buforu fosforanowego pH 7. Następnie w roztworach oznaczono stężenie białka wg p. 3.5.2 i aktywność lipolityczną wg p. 3.5.1.

3.4.7. Liofilizacja grzybni i białek wytrąconych z płynu pohodowlanego

Wytrącone z płynu pohodowlanego białka i zawieszzone w 50 mM buforu fosforanowego pH 7, zamrożono na ściankach kolby przy użyciu ciekłego azotu i umieszczono w -20°C na 12 godz. Odsączoną i przepłukaną grzybnię zamrożono przez noc w -20°C. Następnie zamrożone preparaty poddano suszeniu sublimacyjnemu przy użyciu liofilizatora (Labconco Freezone 6; USA) przez 24 godz. Po wysuszeniu uzyskane preparaty utarto do postaci jednorodnego proszku i przechowywano w -20°C do czasu kolejnych doświadczeń lub analiz.

3.4.8. Określenie stabilności temperaturowej enzymu o aktywności lipolitycznej

W celu określenia stabilności temperaturowej enzymu o aktywności lipolitycznej, rozpuszczono 20 mg liofilizatu w 10 ml schłodzonego do 5°C buforu fosforanowego o pH 7. Sporządzono 10 roztworów preparatu enzymatycznego, które inkubowano w 5°C, 20°C, 30°C, 40°C i 50°C przez 24 godz. Po inkubacji określono aktywność lipolityczną wg p. 3.5.1.

3.4.9. Elektroforeza białek

W celu rozdziału ilościowego, określenia składu preparatu białkowego i wielkości mas cząsteczkowych białek wydzielonych z grzybni poprzez inkubację w buforze węglanowym o pH 9,2 wg p. 3.4.13.1, przeprowadzono elektroforezę w warunkach denaturujących przy gęstości żelu 12% (SDS-PAGE). W doświadczeniach wykorzystano metodę opisaną w pracy Sambrook i in. (1989), odpowiednio ją modyfikując. Elektroforezę przeprowadzono przy użyciu aparatu Bio-Rad Mini Protean 3 (Niemcy). W tabeli 8 przedstawiono skład żelu zagęszczającego i separującego użytych w rozdziale elektroforetycznym.

Tabela 8. Skład żelu zagęszczającego i separującego wykorzystanych w elektroforezie PAGE

| Rodzaj żelu | Składnik | Objętość (ml) |
|----------------|---|---------------|
| Zagęszczający | H ₂ O | 5,2 |
| | 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 | 2,5 |
| | Akrylamid | 2 |
| | 10% SDS | 0,1 |
| | 10% nadsiarczan amonu (APS) | 0,1 |
| | N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED) | 0,01 |
| Separujący 12% | H ₂ O | 3,1 |
| | 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 | 2,5 |
| | Akrylamid | 4,2 |
| | 10% SDS | 0,1 |
| | 10% APS | 0,1 |
| | TEMED | 0,0075 |

Końcowa objętość żelu wynosiła 10 ml.

Próbki preparatu zawieszono w denaturującym buforze próbkowym (20 µg białka w próbce), po czym inkubowano w 100°C przez 10 minut. Rozdział elektroforetyczny białek 1D wykonywano w warunkach denaturujących w buforze elektrodowym, przy napięciu 60 V, po czym zwiększono napięcie do 80 V, od momentu pojawienia się próbki w żelu separującym. Zastosowano markery masy cząsteczkowej w zakresie od 10 kDa do 250 kDa. Białka barwiono przy użyciu barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad).

3.4.10. Ogólne warunki estryfikacji alkoholi terpenowych

Reakcję estryfikacji prowadzono w heksanie w obecności 2% (w/v) biokatalizatora, przy równomolowym, 50 mM stężeniu alkoholu terpenowego i kwasu karboksylowego, w 40°C przez 8 lub 24 godz., na wytrząsarce (170 RPM) w szczelnie zamkniętych kolbach Erlenmeyera o pojemności 25 ml. Po zakończeniu reakcji mieszaninę osuszano bezwodnym siarczanem magnezu i poddawano analizie jakościowej i ilościowej techniką GC-MS wg p. 3.5.3.

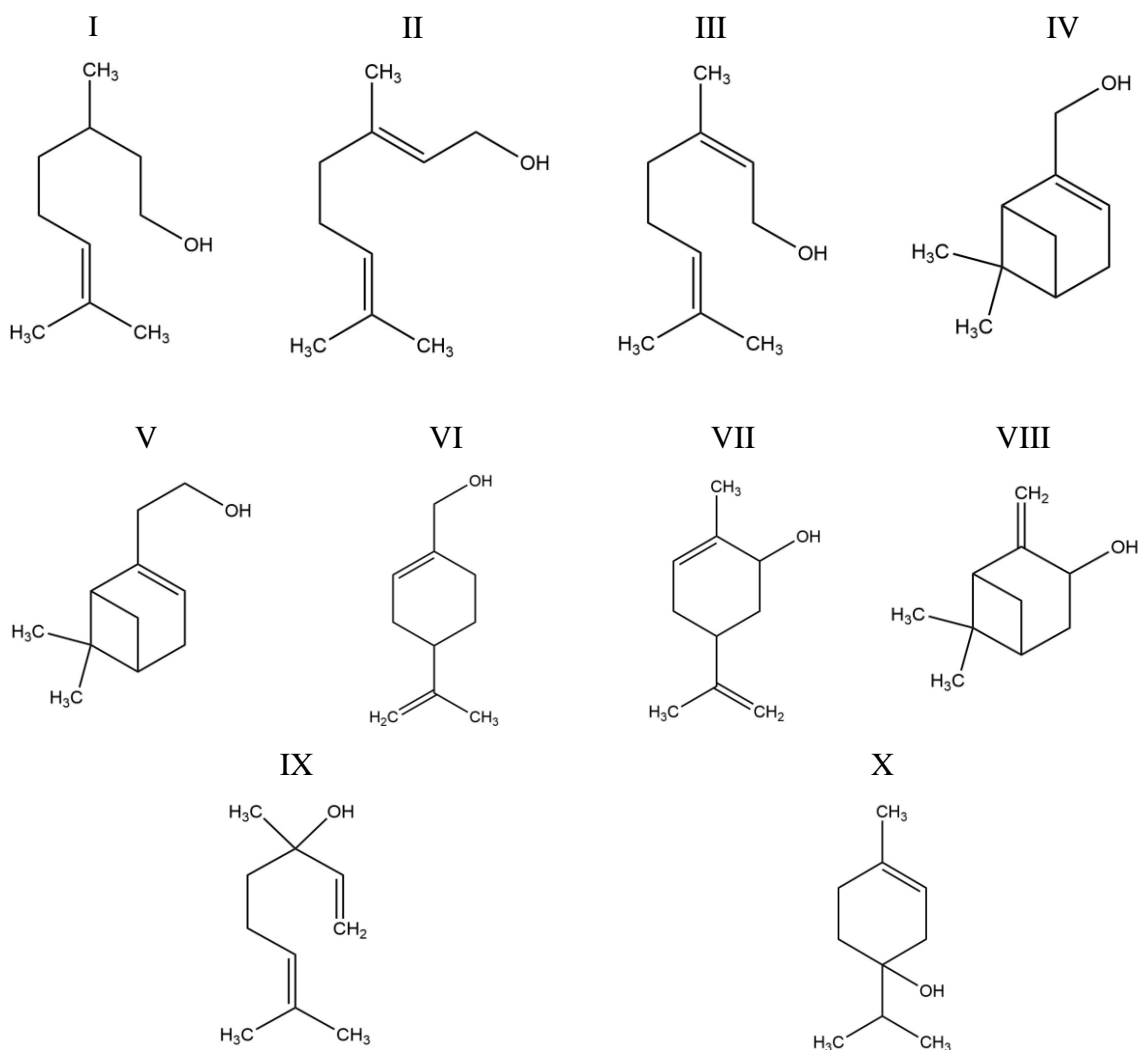
3.4.11. Określenie optymalnych warunków estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego

Określenie optymalnych warunków estryfikacji β-cytronellolu i kwasu octowego z wykorzystaniem biokatalizatora w formie zliofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 przeprowadzono według punktu 3.4.10 z tą różnicą, że modyfikowano badane parametry reakcji. Zbadano wpływ temperatury (20 – 70°C), ilości biokatalizatora (1 – 3,5% w/v),

równomolowych stężeń substratów (10 – 200 mM), stosunku molowego alkoholu do kwasu (1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 2:1; 3:1; 4:1; 5:1), szybkości mieszania (0 – 300 RPM) oraz rodzaju rozpuszczalnika organicznego (heksan, cykloheksan, heksadekan, acetonitryl, 1,4-dioksan, chloroform i octan etylu). Reakcję estryfikacji prowadzono przez 24 godz. (do wyznaczenia początkowej szybkości reakcji próbki pobierano po 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8 i 12 godz.), po czym wykonywano analizę ilościową produktów metodą GC-FID wg p. 3.5.3.

3.4.12. Określenie wpływu rodzajów reagentów na wydajność reakcji estryfikacji

Wpływ rodzajów reagentów na wydajność estryfikacji badano w optymalnych warunkach określonych dla reakcji cytronellolu z kwasem octowym. Zbadano I-rzędowe alkohole terpenowe [liniowe: cytronellol (Ryc. 11I), geraniol (Ryc. 11II), nerol (Ryc. 11III), bicykliczne: myrtenol (Ryc. 11IV), nopol (Ryc. 11V) i monocykliczny alkohol peryłowy (Ryc. 11VI)], II-rzędowe [karweol (Ryc. 11VII) i *trans*-pinokarweol (Ryc. 11VIII)] i III-rzędowe alkohole [linalol (Ryc. 11IX) i terpinen-4-ol (Ryc. 11X)] oraz kwasy karboksylowe: octowy (C2), propionowy (C3), masłowy (C4), walerianowy (C5), kapryłowy (C8), pelargonowy (C9) i laurynowy (C12). Reakcja estryfikacja trwała 20 godz. w 30°C, po czym produkty estryfikacji poddano ilościowej i jakościowej analizie GC-MS wg p. 3.5.3.



Rycina 11. Struktury alkośli terpenowych użytych w estryfikacji z kwasami karboksylowymi z zastosowaniem liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 jako biokatalizatora

3.4.13. Wpływ różnych czynników środowiskowych na aktywność biokatalityczną grzybni

3.4.13.1. Aktywność biokatalityczna grzybni inkubowanej w różnym pH przed liofilizacją

Wilgotną grzybnię *C. pannorum* A-1 (3 g), wyhodowaną uprzednio na podłożu BMC1, przepłukano 300 ml płynu fizjologicznego i zawieszono w 50 ml buforu o ustalonym pH. Grzybnię inkubowano w 0,2 M buforze cytrynianowo-fosforanowym (w zakresie pH 2,2 – 8) i 0,2 M buforze węglanowym (w zakresie pH 9,2 – 10,7) przez 3 godz., w 20°C. Następnie grzybnię przefiltrowano, przepłukano 100 ml płynu fizjologicznego, zamrożono i poddano liofilizacji zgodnie z procedurą opisaną w p. 3.4.7. Aktywność biokatalityczną liofilizowanej grzybni określano w reakcji estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego w optymalnych warunkach w ciągu 8 godzin względem grzybni kontrolnej przeprowadzając

analizę GC-FID wg p. 3.5.3. Grzybnię kontrolną stanowił biokatalizator bezpośrednio po hodowli.

3.4.13.2. *Wpływ jonów metali na biomasę i aktywność katalityczną grzybni C. pannorum A-1*

W tym celu przeprowadzono 4-dniową hodowlę *C. pannorum* A-1 na podłożu: BMC1 z dodatkiem 1 mM soli chlorkowej badanego jonu metalu (Fe, Mn, Zn, Ca, Cu i Mg) (wg p. 3.4.3). Po zakończeniu hodowli grzybnię zliofilizowano i wykorzystano w reakcji cytronellolu z kwasem octowym w optymalnych warunkach przez 9 godz. Po zakończeniu estryfikacji, mieszaniny preakcyjne poddano analizie GC-FID wg p. 3.5.3.

3.4.13.3. *Inkubacja grzybni z alkoholami terpenowymi i kwasami przed liofilizacją*

Celem było zbadanie wpływu reagentów na aktywność biokatalizatora. Wilgotną grzybnię *C. pannorum* A-1 (3 g), wyhodowaną uprzednio na podłożu BMC1, przepłukano 300 ml płynu fizjologicznego i zawieszono w 50 ml mieszaniny złożonej z 50 mM buforu fosforanowego pH 7 i 10% heksanu jako kosolwenta. Do zawiesiny dodawano 50 mM badanego alkoholu terpenowego lub kwasu karboksylowego (linalol, cytronellol, *trans*-pinokarweol, karweol, nopol, kwas octowy, kwas pelargonowy i kwas walerianowy). Grzybnię inkubowano przez 1 godz. w 20°C, po czym przefiltrowano, przepłukano 100 ml płynu fizjologicznego i 25 ml heksanu, zamrożono i poddano liofilizacji zgodnie z procedurą opisaną w p. 3.4.7. Aktywność liofilizowanej grzybni określono w estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego w optymalnych warunkach w ciągu 24 godzin przy użyciu analizy GC-FID wg p. 3.5.3.

3.4.13.4. *Pojemność wodna grzybni w reakcji estryfikacji*

Pojemność wodną grzybni *C. pannorum* A-1 określono na podstawie różnicy aktywności biokatalitycznej grzybni w reakcji estryfikacji prowadzonej w obecności różnych objętości wody. Pojemność wodną badano w optymalnych warunkach estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego w zakresie 0,25% - 500% v/w wody w stosunku biokatalizatora. Reakcja estryfikacja trwała 24 godz., po czym produkty estryfikacji poddano analizie GC-FID wg p. 3.5.3.

3.4.13.5. *Stabilność operacyjna grzybni*

Stabilność operacyjną biokatalizatora w formie grzybni *C. pannorum* A-1 określono w optymalnych warunkach estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego. Po każdym 24-godz. cyklu w 30°C, mieszaninę reakcyjną poddawano ilościowej analizie GC-FID, zaś grzybnię trzykrotnie przemywano 25 ml heksanu. Następnie grzybnię, po wysuszeniu w eksykatorze, użyto w kolejnym cyklu katalitycznego z nowymi porcjami substratów w tych samych warunkach reakcji.

3.4.13.6. *Stabilność grzybni podczas rocznego przechowywania*

W celu zbadania wpływu temperatury na stabilność biokatalizatora, grzybnię przechowywano w -20°C, 4°C i 20°C. Po półrocznym i rocznym przechowywaniu sprawdzono jej aktywność w estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego w zoptymalizowanych warunkach. Po 24 godz. reakcji estryfikacji mieszaninę produktów poddano analizie GC-FID wg p. 3.5.3.

3.4.13.7. *Bioimprinting grzybni kwasami tłuszczowymi*

Bioimprinting kwasami tłuszczowymi przeprowadzono z użyciem liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1. W pierwszym wariantcie eksperymentu przygotowano mieszaninę składającą się z 9,33 ml rozpuszczalnika organicznego (izopropanolu i izopropanolu z heksanem w proporcji 1:1) i czynnika imprintującego w ilości 0,67 ml (kwasu kaprylowego i oleionowego) lub 0,67 g (kwasu laurynowego). Do mieszaniny przeniesiono 0,7 g liofilizowanej grzybni, po czym próbki wytrząsano (200 RPM) w 30°C przez 60 min. Po inkubacji grzybnię przefiltrowano i przemyto dwukrotnie 20 ml heksanu. Grzybnię wysuszono pod próżnią w eksykatorze, po czym wykorzystywano w reakcji estryfikacji. W drugim wariantcie bioimprintingu wykorzystano mieszaniny imprintujące składające się z 9,33 ml rozpuszczalników organicznych (izopropanol, heksan, 1,4-dioksan i metanol) zmieszanych ze sobą w różnych proporcjach i 0,67 g kwasu laurynowego. Pozostałe etapy były analogiczne jak w pierwszym wariantcie doświadczenia. Próbę kontrolną stanowiła grzybnia bezpośrednio po liofilizacji, którą nie poddawano żadnej inkubacji.

3.4.14. *Biomimetyczna transformacja alkoholi terpenowych przy użyciu porfiryn*

Biotransformację alkoholi terpenowych w układach biomimetycznych prowadzono z zastosowaniem porfiryn hydrofobowych (9 porfiryn komercyjnych i 3 pochodne

protoporfiryny IX). Reakcję prowadzono w układzie homogenicznym w szklanych fiolkach szczelnie zamkniętych korkiem, do których odważano jedną z porfiryn i rozpuszczono w 4 ml odpowiedniego rozpuszczalnika uzyskując roztwór o stężeniu $4,5 \times 10^{-4}$ M. Do otrzymanej mieszaniny dodawano 200 μ mol substratu (cytronellol, alkohol perylowy lub myrtenol). Katalizę biomimetyczną prowadzono na mieszadle magnetycznym (200 RPM) przez 4 lub 24 godz., w temp. 20°C w warunkach sztucznego oświetlenia przy użyciu sześciu świetlówek imitujących światło dzienne (Osram Lumilux Cool White, o łącznej mocy 90W). Intensywność naświetlenia (gęstość strumienia fotonów) określano przy użyciu fitofotometru (Optel FR20, Opole, Poland). Natężenie napromienienia (irradiancja) przy określonej długości fali (mierzone miernikiem mocy Coherent LaserCheck, USA) wynosiło odpowiednio: 6 mW/cm² (421 nm), 2,36 mW/cm² (467 nm), 2,20 mW/cm² (518 nm) i 1.68 mW/cm² (566 nm). Po zakończeniu reakcji do 0,5 ml mieszaniny dodawano wzorec wewnętrzny (n-dekan w chloroformie w stężeniu 1 g/l), po czym produkty biotransformacji analizowano techniką GC-MS wg p. 3.5.3.

3.4.15. Określenie optymalnych warunków fotoutleniania myrtenolu przy użyciu tetrafenyloporfiryny

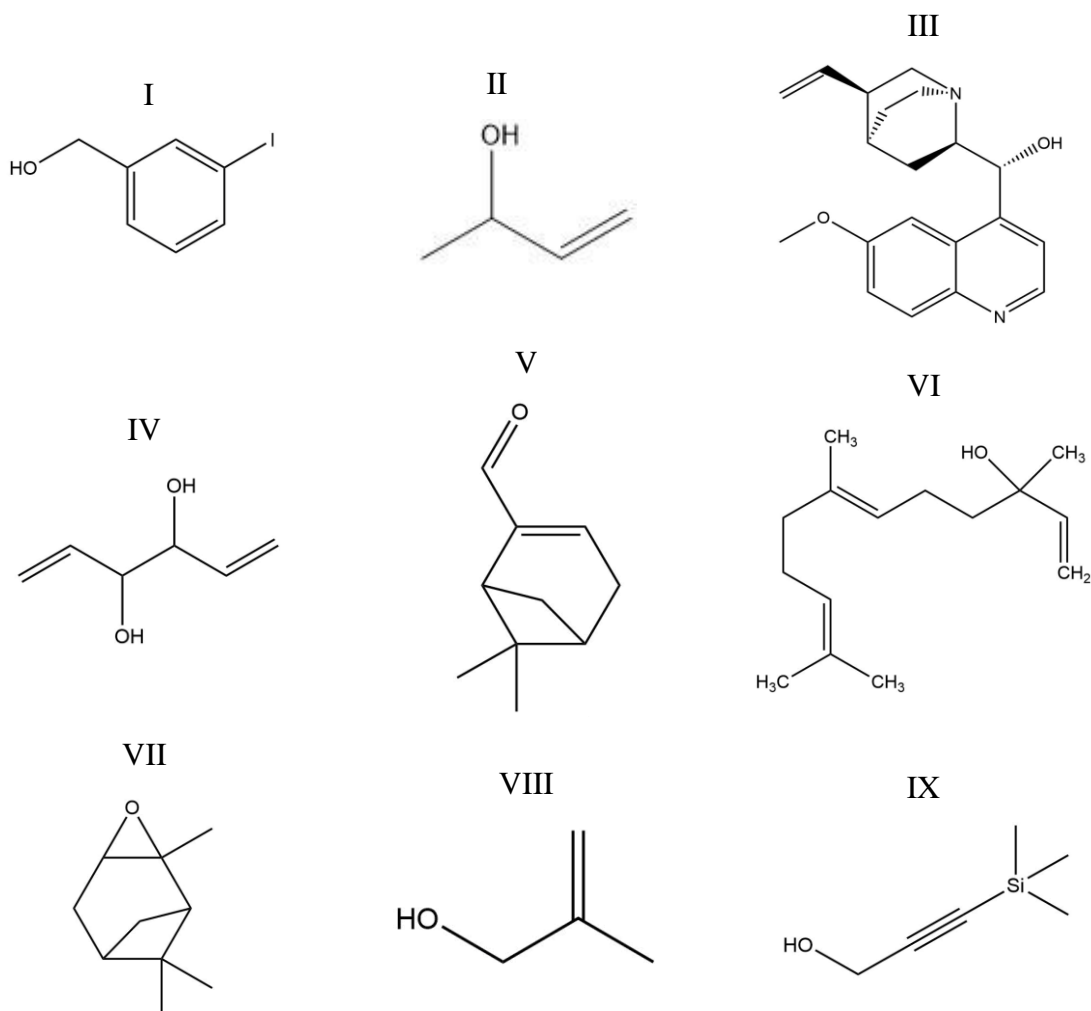
Określenie optymalnych parametrów katalizy biomimetycznej myrtenolu przy użyciu wyselekcjonowanej porfiryny (tetrafenyloporfiryny, H₂TPP) przeprowadzono według p. 3.4.16, z tą różnicą, że reakcję oksydacyjnej transformacji prowadzono przy zmiennych parametrach reakcji. Badano wpływ stężenia myrtenolu w zakresie od 5×10^{-4} do 6 M, stężenia porfiryny w zakresie od 4×10^{-5} do 5×10^{-2} M, temperatury w zakresie od 10 do 40°C i rodzaju rozpuszczalnika. Reakcję prowadzono przez 12 godz. przy intensywności światła widzialnego na poziomie $135 \frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2 \times \text{s}}$. Po zakończeniu biotransformacji, mieszaninę poddawano analizie GC-FID (p. 3.5.3).

3.4.16. Określenie mechanizmu biomimetycznej oksydacji myrtenolu

W celu zbadania mechanizmu fotoutleniania myrtenolu z użyciem H₂TPP przeprowadzono 3 eksperymenty:

1. Wykorzystano w roli substratów inne, podobne strukturalnie do myrtenolu związki, które rozpuszczano w tym celu w 4 ml chloroformu do uzyskania stężenia 1×10^{-1} M. Przebadano następujące związki: alkohol 3-jodobenzylowy (Ryc. 12I), but-3-en-2-ol (Ryc. 12II), chininę (Ryc. 12III), heksa-1,5-dien-3,4-diol (Ryc. 12IV), myrtenal (Ryc.

12V), nerolidol (Ryc. 12VI), tlenek α -pinenu (Ryc. 12VII), 2-metyloprop-2-en-1-ol (Ryc. 12VIII) i 3-(trimetylosililo)-2-propyn-1-ol (Ryc. 12IX). Reakcję prowadzono w obecności porfiryny w stężeniu 2×10^{-4} M, w 25°C przez 12 godz. Po tym czasie mieszaninę poreakcyjną analizowano za pomocą GC-MS wg p. 3.5.3.



Rycina 12. Struktury związków wykorzystanych w badaniach nad mechanizmem fotoutleniania myrtenolu

- Określono parametry fotowzbudzenia porfiryny w reakcji biotransformacji myrtenolu. W tym eksperymencie zbadano wpływ długości fali światła widzialnego na wydajność oksydatywnej transformacji myrtenolu przy użyciu tetrafenyloporfiryny. Zastosowano optyczne filtry interferencyjne Caflex C przepuszczające światło o długości fali 425, 525, 550, 600, 650 i 700 nm. Stała intensywność naświetlenia ($40 \frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2 \times \text{s}}$) została dostosowana dla każdego filtra za pomocą neutralnych filtrów szarych. Reakcję prowadzono przez 12 godz. w 25°C w kwarcowych kuwetach spektrofluorymetrycznych zawierających 2 ml

chloroformu, tetrafenylporfiryne w stężeniu 2×10^{-4} M i myrtenol w stężeniu 1×10^{-1} M. Po tym czasie mieszaninę poreakcyjną analizowano za pomocą GC-MS wg p. 3.5.3.

3. Określono udziału tlenu singletowego i wolnych rodników w reakcji biotransformacji. Reakcję prowadzono w szklanych fiolkach zawierających 4 ml chloroformu, tetrafenylporfiryne w stężeniu 2×10^{-4} M i myrtenol w stężeniu 1×10^{-1} M przez 12 godz. w 25°C w obecności BHT lub Troloxu, jako czynników antyoksydacyjnych, w ilości 3 równoważników molowych w stosunku do substratu. Po zakończeniu reakcji mieszaniny analizowano za pomocą GC-MS (p. 3.5.3) i badano pod kątem intensywności emisji IR tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$) wg p. 3.5.6.

3.4.17. Izolacja produktów biokatalizy

Uzyskane mieszaniny poreakcyjne frakcjonowano za pomocą preparatywnej cieczowej chromatografii kolumnowej. Dobór eluentów do rozdziału określono za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). W przypadku oczyszczania produktów estryfikacji, mieszaninę poreakcyjną zateżano pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce próżniowej (350 mbar, 40°C), po czym rozdzielano na kolumnie (400 mm długości \times 20 mm średnicy wewnętrznej) zawierającej napęczniały w eluencie (heksan:octan etylu 10:1) żel krzemionkowy (średnica porów 0,02 – 0,045 mm, Roth). Eluowane frakcje zbierano do kolejnych probówek, po czym oceniano jakość rozdziału za pomocą TLC. Frakcje zawierające produkt estryfikacji zateżano na wyparce próżniowej (350 mbar, 40°C) i określono czystość uzyskanego produktu za pomocą GC-FID.

Oczyszczenie produktu biomimetycznej oksydacji myrtenolu rozpoczęto od odparowania rozpuszczalnika z mieszaniny poreakcyjnej na wyparce próżniowej (350 mbar, 40°C), po czym przeprowadzono destylację próżniową w celu oddzielenia produktów terpenoidowych od porfiryn. Mieszaninę terpenoidów rozdzielano na kolumnie (400 mm długości \times 20 mm średnicy wewnętrznej) zawierającej żel krzemionkowy (średnica porów 0,02 – 0,045 mm, Roth) napęczniały w eluencie (heksan : MTBE 30 : 1). Pozostałe kroki były identyczne jak w przypadku rozdziału produktów estryfikacji. Czystość uzyskanych produktów biokatalizy wynosiła $>94\%$.

3.4.18. *Określenie aktywności biologicznej produktów biotransformacji alkoholi terpenowych*

3.4.18.1. *Właściwości cytotoksyczne wobec komórek glejaka ludzkiego*

W badaniach nad cytotoksycznością produktów biokatalizy wobec komórek glejaka ludzkiego wykorzystano linie komórkowe opisane w p. 3.2.3. Alkohole terpenowe, ich estry oraz tlenek myrtenalu dodano do podłoża do uzyskania końcowego stężenia 25 μM . Komórki nowotworowe inkubowano ze związkami przez 24 godz. Próbę kontrolną stanowiły linie inkubowane bez dodatku związku. Apoptozę i nekrozę identyfikowano za pomocą barwienia fluorescencyjnego, odpowiednio związkiem Hoechst 33342 (H-33342) (roztwór wyjściowy 0,4 mg/ml) i jodkiem propidyny (roztwór wyjściowy 0,5 mg/ml). Po dodaniu 2,5 μl roztworu barwnika do 1 ml pożywki, komórki inkubowano przez 15 min. w 37°C. W przypadku określenia autofagii do pożywki dodano 5% oranżu akrydyny, po czym inkubowano w ciemni przez 15 min. Komórki obserwowano, zliczano i analizowano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon E-900). Komórki z jądrami emitującymi światło niebieskie po wybarwieniu H-33342 interpretowano jako apoptotyczne. Komórki z różowym, fluorescencyjnym jądrem po barwieniu jodkiem propidyny określano jako nekrotyczne. Typowe komórki autofagalne rozróżniano na podstawie obecności świecących na czerwono ciałek autofagalnych w obrębie cytoplazmy. Zliczano co najmniej 1000 komórek w 3 losowo wybranych polach widzenia. Poziom indukcji śmierci komórkowej wyrażono jako % komórek wykazujących odpowiednią fluorescencję w stosunku do wszystkich komórek w polu widzenia (Sumorek-Wiadro i wsp., 2020).

3.4.18.2. *Określenie aktywności antymikrobiologicznej*

Właściwości antymikrobiologiczne produktów biokatalizy przeprowadzono trzema metodami:

1. Oceniono potencjał przeciwgrzybiczy produktów biokatalizy w hodowli planktonicznej wobec *P. chrysogenum* i *A. niger* na płytkach 96-dołkowych poprzez wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC) i minimalnego stężenia biobójczego (MBC) szczepów. W celu uzyskania w dołkach odpowiedniego stężenia badanego związku, do dołków od 2-go do 10-ego dodano 10 μl DMSO zaś do dołka nr 1 20 μl roztworu terpenu w DMSO o stężeniu 40,96 mg/ml. Następnie z dołka nr 1 pobierano 10 μl roztworu terpenu i przenoszono do dołka nr 2 uzyskując dwukrotne rozcieńczenie. Analogicznie postępowano aż do dołka nr 10 przy czym z ostatniego dołka odrzucono

10 µl roztworu. Następnie do każdego dołka dodano 180 µl podłoża M (p. 3.3.2), po czym uzyskane roztwory zaszczerpiono 10 µl inokulum przygotowanym wg p. 3.4.1. (do gęstości $2,5 \times 10^5$ CFU/ml w dołku). Jednocześnie wykonano kontrolę sterylności (podłoże M + DMSO bez zaszczerpionia), kontrolę negatywną (podłoże M + DMSO z zaszczerpioniem) oraz kontrolę pozytywną zawierającą antybiotyki. Wszystkie operacje wykonywano w warunkach sterylnych przy użyciu komory laminarnej. W celu określenia MBC, po 24 godz. inkubacji pobierano 10 µl próby z każdego dołka i nakrapiano na płytkę ze stałym podłożem maltozowym. Końcowe stężenia terpenów i amfoterycyny B w poszczególnych dołkach przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Końcowe stężenia terpenów i amfoterycyny B uzyskanych w poszczególnych dołkach płytki 96-dołkowej

| Nr dołka | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------------------------|------|------|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| Stężenie terpenu (µg/ml) | 2048 | 1024 | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 |
| Stężenie amfoterycyny (µg/ml) | 12,5 | 6,25 | 3,125 | 1,56 | 0,78 | 0,39 | 0,19 | 0,098 | 0,049 | 0,024 |

Mianem MIC określano najniższe stężenie badanego związku, przy którym obserwowano zahamowanie wzrostu grzybów w podłożu. Mianem MBC określano najniższe bójcze stężenie związku.

2. Aktywność antybiofilmową związków lotnych określono przy użyciu metody AntiBioVol (Brożyna i in., 2020). W eksperymencie wykorzystano trzy szczepy referencyjne: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 i *Candida albicans* ATCC 10231. W pierwszym etapie mikroorganizmy hodowano na podłożu TSB w 37°C przez 24 godz., po czym przygotowywano zawiesiny o gęstości 10^8 CFU/ml i rozcieńczano w TSB – 1000× w przypadku bakterii i 14× w przypadku drożdży. Studzienki 48-dołkowej płytki „A” wypełniono podłożem z wyciągiem mózgowo-sercowym (20 g/L) (Biomaxima) i 2% agaru. Po zastygnięciu podłoża, z dołków wycięto krążki o średnicy 6 mm, które dzielono na pół. Jedną część każdego krążka umieszczano z powrotem w dołku płytki „A”, płytkę zaklejano parafilmem i przechowywano w temperaturze 8°C. Drugą część krążka umieszczano w studzience nowej 48-dołkowej płytki „B”, po czym do każdej studzienki dodawano 1 ml zawiesiny mikroorganizmów. Płytkę „B” inkubowano przez 24 godz. w 37°C

w celu wytworzenia biofilmu. Następnie krążki z biofilmem przepłukano 2 ml 0,9% NaCl i przeniesiono na płytkę „A”. Na dno nowej płytki „C” dodawano 320 µl 0,82% roztworu terpenu w DMSO. W kolejnym etapie płytkę „A” zawierającą krążki z biofilmem umieszczono do góry nogami na płytce terpenowej „C”. Złączone płytki zaklejano parafilmem i inkubowano przez 24 godz. w 37°C. Jako kontrolę stanowiły próby z 0,9% NaCl (kontrola wzrostu), 85% DMSO i 96% etanolem zamiast terpenów. Po inkubacji, krążki z biofilmem przenoszono do dołków nowych płytek w celu pomiaru żywotności bakterii i grzybów *Candida*. Żywotność bakterii oznaczono przy użyciu TTC, a grzybów przy użyciu resazuryny. Metabolicznie aktywne komórki bakterii przekształcają TTC w czerwony formazan, a komórki drożdży niebieską resazurynę w różową rezorufinę. Przygotowano 0,1% roztwór TTC i 0,001% roztwór resazuryny w podłożu TSB. Do studzienek z krążkami z biofilmem dodawano 1 ml roztworu wskaźnika i inkubowano w 37°C przez 2 godz. dla TTC lub 4 godz. dla resazuryny. W przypadku bakterii, po inkubacji, usunięto roztwór TTC, dodano 1 ml roztworu metanolu i kwasu octowego (w stosunku 9:1), po czym płytki wytrząsano przy 300 RPM przez 30 min. w celu uwolnienia formazanu. Ilość uwolnionego formazanu w 200 µl roztworu określano spektrofotometrycznie przy długości fali 490 nm. W przypadku drożdży, po inkubacji z resazuryną, pobierano 200 µl roztworu i oznaczano absorbancję przy 570 nm (dla rezorufiny) i 600 nm (dla resazuryny). Do oznaczenia żywotności *Candida*, absorbancja przy 570 nm była odejmowana od absorbancji resazuryny przy 600 nm. Procent redukcji komórek w biofilmie po ekspozycji na terpen obliczano według wzoru:

$$100\% - \left(\left(\frac{A}{AK} \right) \times 100\% \right)$$

A – absorbancja krążków traktowanych terpenem

AK – absorbancja krążków nietraktowanych żadnymi związkami

- Ocenę aktywności antymikrobiologicznej metodą dyfuzyjno-krążkową (DK) przeprowadzono wobec referencyjnych szczepów *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Candida albicans* ATCC 10231. W tym celu na płytkę agarową z podłożem TSB naniesiono 50 µl rozcieńczonej zawiesiny bakterii i drożdży przygotowanej według p. 3.4.18.2.2, po czym rozprowadzono ją za pomocą głaszczki. Na zaszczepioną płytkę nałożono jałowy krążek bibułowy o średnicy 1 cm i naniesiono na niego 20 µl 0,8% roztworu badanego terpenu. Płytki inkubowano

w 37°C przez 24 godz., po czym mierzono strefę zahamowania wzrostu wyrażoną w mm.

3.5. Metody analityczne

3.5.1. Oznaczanie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej metodą miareczkową

Po zakończeniu hodowli grzybnię oddzielono od płynu pohodowlanego przez wirowanie przy 10000 RPM przez 15 min. w temp. 4°C. Supernatant wykorzystano jako źródło zewnątrzkomórkowego enzymu o aktywności lipolitycznej. Część grzybni z każdej hodowli (0,2 – 0,3 g wilgotnej masy) zamrażano w celu dalszego wykorzystania jako źródło wewnątrzkomórkowego enzymu o aktywności lipolitycznej. Pozostałą część biomasy suszono w temp. 105°C przez 3 godz. w celu określenia suchej masy grzybi wyrażonej w g/l.

Oznaczenie aktywności hydrolazy zewnątrzkomórkowej przeprowadzono na podstawie hydrolizy tributyriny według następującej metody: 0,5 ml supernatantu mieszano z 1 ml 50 mM buforu fosforanowego pH 7 i 1,5 ml tributyriny w kolbie Erlenmeyera o pojemności 25 ml. Kolby wytrząsano (200 RPM) przez 1 godz. w temp. 20°C, po czym dodano 1 ml 96% etanolu w celu zwiększenia rozpuszczalności wolnych kwasów tłuszczowych. Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych uwolnionych podczas hydrolizy tributyriny oznaczono przez miareczkowanie 0,05 M KOH. Równolegle wykonano analizę prób kontrolnych z inaktywowanym enzymem zgodnie z powyższym opisem z tą różnicą, że supernatant uprzednio gotowano przez 15 min. Oznaczanie aktywności lipolitycznej wykonywano w trzech powtórzeniach. Aktywność enzymu obliczano na podstawie średniej objętości zużytego titranta pomniejszonej o objętość zużytą na odmiareczkowanie próby kontrolnej. Jednostkę aktywności enzymu (U) definiowano jako ilość enzymu uwalniająca 1 μ mol wolnych kwasów tłuszczowych w ciągu 1 min. Aktywność enzymu zewnątrzkomórkowego wyrażono jako U/ml płynu pohodowlanego.

W celu określenia aktywności hydrolazy wewnątrzkomórkowej, zamrożoną grzybnię (od 0,2 do 0,3 g) zdeintegrowano przy pomocy dezintegratora (Universal laboratory aid type MFW 309; Mechanika Precyzyjna; Polska). Proces prowadzono w łaźni lodowej przez 3 min z dodatkiem 0,5 ml 50 mM buforu fosforanowego pH 7, po czym mieszaninę uzupełniano buforem fosforanowym do końcowej objętości 5 ml i odwirowywano przy 7000 RPM, przez 10 min. w temp. 4°C. Supernatant wykorzystano do oznaczenia aktywności wewnątrzkomórkowego enzymu o aktywności lipolitycznej, stosując tę samą procedurę, co

w przypadku enzymu zewnątrzkomórkowego. Aktywność hydrolazy wewnątrzkomórkowej wyrażono jako U/mg suchej masy grzybni.

W celu określenia optymalnej temperatury i pH dla zewnątrzkomórkowego enzymu o aktywności lipolitycznej, przeprowadzono hydrolizę tributyriny w zakresie temperatur od 15 do 50°C oraz w pH od 2,2 do 10,7. Do określenia wpływu pH użyto 0,2 M bufor cytrynianowo-fosforanowy (zakres pH 2,2 – 8) i 0,2 M bufor węglanowy (zakres pH 9,2 – 10,7).

3.5.2. Ilościowe oznaczanie białka metodą Bradford

Ilościowe oznaczenie białka metodą Bradford polegało na przygotowaniu 0,8 ml odpowiednio rozcieńczonych prób badanych, dodaniu 0,2 ml odczynnika Bradford i wymieszaniu na wytrząsarce typu vortex. Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, dokonywano pomiaru absorbancji z użyciem spektrofotometru CECIL CE 2021 (Wielka Brytania), przy długości fali 595 nm wobec próby odczynnikowej składającej się z 0,8 ml wody dejonizowanej i 0,2 ml odczynnika Bradford. Stężenie białka obliczano ze wzoru wyznaczonego dla sporządzonej krzywej kalibracyjnej:

$$C = \frac{A_{595} \times b}{k \times 1000}$$

gdzie:

C – stężenie białka (mg/ml),

A₅₉₅ – absorbancja światła przy długości fali 595 nm,

b – rozcieńczenie próby,

k – współczynnik kalibracji (0,04214), wynikający z krzywej kalibracyjnej,

1000 – przelicznik µg na mg.

3.5.3. Analiza jakościowa i ilościowa produktów biokatalizy – chromatografia gazowa (GC-FID) i chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)

Po upływie określonego czasu biokatalizy pobrano 50 µl mieszaniny reakcyjnej, odwodniono bezwodnym siarczanem sodu i rozcieńczono 10-krotnie w n-heksanie. Próbkę poddawano analizie GC-FID (Varian CP-3380; USA) i GC-MS (GC-17A sprzężony z MS-QP500, Shimadzu; USA). Analizy chromatograficzne produktów biokatalizy przeprowadzono przy użyciu kolumny kapilarnej DB-5 (30 m × 0,25 mm średnicy wewnętrznej). Gazem nośnym był hel przy stałym przepływie 1 ml/min. Do analizy lotnych związków terpenoidowych stosowano następujący program temperaturowy: dozownik 270°C, kolumna: 100°C przez 1 min., następnie wzrost w tempie 10°C/min. do temperatury 160°C (1 min.), po czym dalszy wzrost temperatury do 270°C (1 min.) w tempie 20°C/min.

Temperatura detektora: 300°C. Wydajność biokatalizy wyrażono w % konwersji molowej substratu do specyficznego produktu oraz jako początkową szybkość tworzenia się produktu w przypadku reakcji estryfikacji ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). W przypadku produktów biomimetycznej katalizy z użyciem porfiryn, wydajność reakcji wyrażano jako stopień konwersji molowej (%) substratu do produktu oraz jako stężenie produktu w g/l na podstawie pola powierzchni wzorca wewnętrznego (n-dekan w chloroformie w stężeniu 1 g/l).

3.5.4. Analiza FTIR-ATR

Liofilizowaną grzybnię z wybranych rodzajów podłoży analizowano techniką spektroskopii podczerwieni z osłabionym całkowitym odbiciem promieniowania IR (FTIR-ATR) w celu zbadania różnic pomiędzy widmami badanych biokatalizatorów. Widma rejestrowano przy użyciu spektrometru TENSOR 27 Bruker (Bruker GmbH, Niemcy) wyposażonego w diament, na który nanoszono badaną grzybnię lub płyn pochodowlany. Widma rejestrowano w zakresie liczby falowej $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ z 60 skanami na widmo z rozdzielczością 1 cm^{-1} .

3.5.5. Spektrofotometria UV-VIS – monitorowanie widm absorpcji biokatalizatorów porfiryńowych

Pomiary widm absorpcji biokatalizatorów porfiryńowych przeprowadzono przy użyciu spektrometru UV-VIS V-660 firmy JASCO w zakresie długości fali 200-850 nm przy szybkości skanowania 400 nm/min. W przypadku każdej serii pomiarowej rejestrowano widmo próbki kontrolnej (bez porfiryny). Elementami wchodzącymi w skład układu pomiarowego było źródło promieniowania, monochromator, komora pomiarowa, detektor oraz komputer z oprogramowaniem Spectra Manager służący do archiwizacji i wizualizacji wyników.

3.5.6. Analiza emisji IR tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$)

Widmo luminescencji tlenu singletowego rejestrowano za pomocą spektrofluorymetru Photon Technology International Inc. wyposażonego w moduł podczerwieni (moduł NIR PMT z materiałem fotokatodowym InP/InGaAs, Hamamatsu Photonics KK) pracujący w zakresie odpowiedzi spektralnej 950 – 1700 nm.

3.5.7. Mikroanaliza rentgenowska SEM-EDS

W celu określenia składu pierwiastkowego biomasy grzybni wyhodowanej na podłożach BM, BM1, BM2, BMC, BMC1 i BMC2 z optymalnym stężeniem induktora, przeprowadzono analizę za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) z systemem EDS (ang. *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) (Quanta 3D FEG, FEI). Zliofilizowaną i dodatkowo suszoną grzybnię mocowano do cylindrycznego nośnika o średnicy 10 μm za pomocą dwustronnej węglowej taśmy. Mikroskop pracował z napięciem przyspieszającym 20 kV i w trybie wysokiej próżni ($<6 \times 10^{-4}$ Pa). Detekcję pierwiastków w systemie EDS przeprowadzono dla każdej grzybni w sześciu polach widzenia.

3.5.8. Analiza magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Widma NMR (1D i 2D) otrzymano za pomocą spektrometru Avance 600 (Bruker, Billerica, USA) pracującym przy 600,2 MHz (^1H) i 150 MHz (^{13}C) w 21°C. Przesunięcia chemiczne przedstawiono w stosunku do resztkowych sygnałów CHCl_3 (δH 7,26 ppm) i CDCl_3 (δC 77,1 ppm) jako wewnętrzne odniesienia odpowiednio dla ^1H i ^{13}C NMR. Stałe sprzężenia podano w Hz. Pomiar przeprowadzono przy 4000 skanów, z czasem kontaktu 2 ms, czasem powtórzenia 25 s, przy użyciu sond Bruker 4 i 7 mm.

3.5.9. Analiza statystyczna

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w minimum trzech powtórzeniach. Wyniki poddano analizie wariancji (ANOVA), a następnie testowi *post-hoc* Tukeya dla porównań wielokrotnych. Korelację między pH a aktywnością zewnątrz- i wewnątrzkomórkową analizowano na podstawie współczynnika korelacji r Pearsona. W przypadku oceny aktywności biologicznej produktów biokatalizy zastosowano test Dunnetta. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica dla Windows w wersji 13.1 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA). Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnią \pm błąd standardowy średniej. Różnice przy poziomie ufności $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie (w przypadku oceny aktywności biologicznej związków wyszczególniono kilka poziomów istotności statystycznej).

4. Opis wyników badań

4.1. Charakterystyka aktywności lipolitycznej *C. pannorum* A-1

4.1.1. Ocena aktywności lipolitycznej *C. pannorum* A-1 względem szczepów o potwierdzonej aktywności lipolitycznej

Aktywność lipolityczną *C. pannorum* A-1 określono wstępnie w teście radialnym na płytkach agarowych. Porównanie stref przebarwień ze strefami tworzonymi przez szczepy o potwierdzonej aktywności lipolitycznej wskazują na względnie wysoką aktywność psychrofilnego grzyba *C. pannorum* A-1 po 24 godz. inkubacji (20 ± 1 mm). W przypadku szczepów *P. chrysogenum* 9' i *R. miehei* średnica stref wynosiła odpowiednio 17 ± 2 mm i 14 ± 2 mm. Mezofilny *P. roqueforti* nie wykazywał aktywności po 24-godz. inkubacji (Tab. 10). W dalszych badaniach wykorzystywano szczep *C. pannorum* A-1.

Tabela 10. Aktywność lipolityczna wybranych gatunków grzybów nitkowatych po 24-godzinnej inkubacji na stałym podłożu P1

| Gatunek grzyba nitkowatego | Średnica stref przebarwień po 24 godz. inkubacji (mm) |
|----------------------------|---|
| <i>C. pannorum</i> A-1 | 20 ± 1 |
| <i>P. chrysogenum</i> 9' | 17 ± 2 |
| <i>R. miehei</i> | 14 ± 2 |
| <i>P. roqueforti</i> | 0 |

4.1.2. Dobór podłoża do biosyntezy enzymu o aktywności lipolitycznej przez *C. pannorum* A-1

W celu doboru odpowiedniego medium do wydajnej syntezy enzymu o aktywności lipolitycznej przez *C. pannorum* A-1 wykorzystano podłoża A, BM, BM1 i BM2. Najwyższą aktywność hydrolazy zewnątrzkomórkowej uzyskano na podłożu BM w 5 dniu hodowli ($1,65 \pm 0,03$ U/ml) oraz podłożu BM1 w 3 dniu hodowli ($1,43 \pm 0,11$ U/ml). W przypadku enzymu wewnątrzkomórkowego najwyższą wydajność odnotowano na podłożu BM w 3 i 5 dniu hodowli (odpowiednio $0,38 \pm 0,14$ i $0,30 \pm 0,08$ U/mg) oraz w 3 dniu hodowli na podłożu BM1 ($0,19 \pm 0,02$ U/mg) (Tab. 11). Największe stężenie białka zawierał płyn pohodowlany z podłoża BM2, jednak nie jest to skorelowane z wysoką aktywnością hydrolityczną. Odnotowano wysoką dodatnią korelację pomiędzy pH a aktywnością zewnątrz- i wewnątrzkomórkową ($r = 0,73$). Wraz ze spadkiem pH płynu pohodowlanego spadała aktywność hydrolityczna enzymu. Największy przyrost biomasy obserwowano na podłożach BM1 z dodatkiem 1% oliwy z oliwek i 1% glukozy. W przypadku hodowli *C. pannorum* A-1 na bogatym podłożu A (zawierającym 1% glukozy i 1% oliwy z oliwek)

w ciągu 7 dni nie odnotowano zarówno zewnętrz- jak i wewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej.

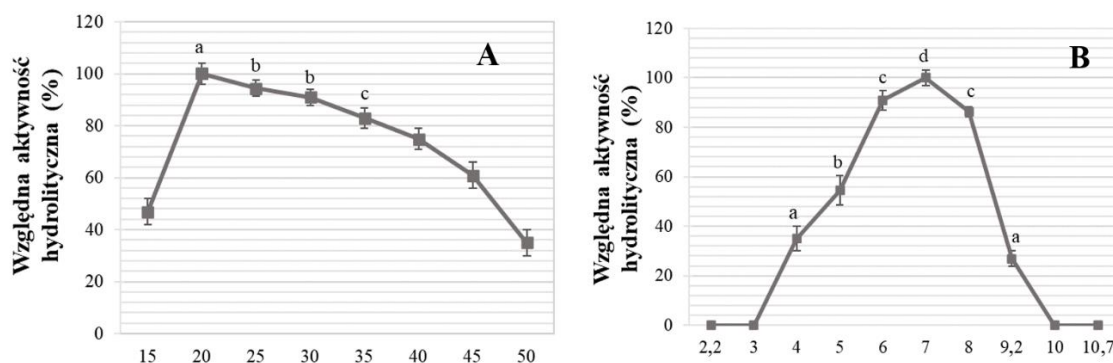
Tabela 11. Wpływ składu podłoża i czasu hodowli na aktywność hydrolazy, suchą masę *C. pannorum* A-1 oraz pH płynu pohodowlanego

| | Dzień hodowli | Rodzaj podłoża | | |
|---|---------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | BM | BM1 | BM2 |
| Zewnątrzkomórkowa aktywność hydrolityczna (U/ml) | 3 | 1,01 ± 0,19 ^{ab} | 1,43 ± 0,11 ^{ac} | 0 ^d |
| | 5 | 1,65 ± 0,03 ^c | 0 ^d | 0 ^d |
| | 7 | 0,96 ± 0,07 ^b | 0,13 ± 0,02 ^d | 0 ^d |
| Białko zewnątrzkomórkowe (mg/ml) | 3 | 0,026 ± 0,03 | 0,019 ± 0,01 | 0,466 ± 0,044 |
| | 5 | 0,029 ± 0,05 | 0,018 ± 0,04 | 0,196 ± 0,023 |
| | 7 | 0,033 ± 0,02 | 0,018 ± 0,09 | 0,161 ± 0,018 |
| Wewnątrzkomórkowa aktywność hydrolityczna (U/mg) | 3 | 0,38 ± 0,14 ^a | 0,19 ± 0,02 ^{ab} | 0,03 ± 0,01 ^b |
| | 5 | 0,30 ± 0,08 ^{ab} | 0,08 ± 0,01 ^b | 0,03 ± 0,01 ^b |
| | 7 | 0,22 ± 0,04 ^{ab} | 0,09 ± 0,03 ^b | 0,05 ± 0,01 ^b |
| Białko wewnątrzkomórkowe (mg/g suchej masy) | 3 | 14,90 ± 0,09 | 9,92 ± 0,41 | 1,86 ± 0,11 |
| | 5 | 13,10 ± 0,30 | 5,68 ± 0,37 | 3,94 ± 0,20 |
| | 7 | 15,10 ± 0,28 | 2,99 ± 0,24 | 2,17 ± 0,44 |
| pH płynu pohodowlanego | 3 | 5,81 ± 0,13 | 3,74 ± 0,20 | 2,32 ± 0,05 |
| | 5 | 6,35 ± 0,04 | 2,59 ± 0,07 | 2,22 ± 0,03 |
| | 7 | 6,72 ± 0,03 | 2,55 ± 0,07 | 2,41 ± 0,12 |
| Sucha masa grzybni (g/l) | 3 | 1,34 ± 0,05 | 1,65 ± 0,18 | 5,15 ± 0,20 |
| | 5 | 1,09 ± 0,11 | 5,17 ± 0,02 | 6,30 ± 0,75 |
| | 7 | 1,05 ± 0,20 | 6,71 ± 1,15 | 9,08 ± 1,06 |

Wartości średnie dla zewnętrz- i wewnątrzkomórkowej aktywności hydrolitycznej z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

4.1.3. Określenie optymalnej temperatury i pH dla aktywności enzymu o aktywności lipolitycznej

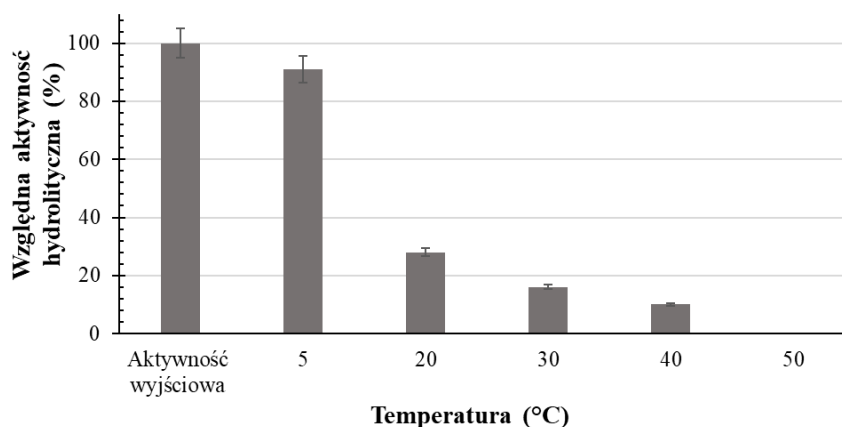
Optymalną temperaturę i pH dla aktywności lipolitycznej określono dla enzymu zewnątrzkomórkowego z podłoża BM. Najwyższą aktywność hydrolazy uzyskano w temp. 20°C, z kolei wydajność hydrolizy tributyriny w temp. 15°C spadała o około 50%. W 25°C i 45°C enzym zachował odpowiednio 94% i 61% swojej wyjściowej aktywności (Ryc. 13A). Zewnątrzkomórkowy enzym o aktywności lipolitycznej wykazywał aktywność w zakresie pH od 4,0 do 9,2, przy optymalnej wartości pH 7,0 (Ryc. 13B).



Rycina 13. Wpływ temperatury (A) i pH (B) na zewnątrzkomórkową aktywność hydrolityczną enzymu z *C. pannorum* A-1. Średnie dla wyznaczonych wartości z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

4.1.4. Określenie stabilności temperaturowej preparatu o aktywności lipolitycznej

Preparat zewnątrzkomórkowej hydrolazy zachowuje 91% swojej wyjściowej aktywności po 24-godzinnej inkubacji w 5°C. Inkubacja enzymu w temp. 20°C powoduje spadek aktywności hydrolitycznej o 72%, w 40°C o 90%, natomiast po inkubacji w 50°C białko całkowicie traci swoją aktywność (Ryc. 14).



Rycina 14. Aktywność preparatu lipolitycznego po 24-godz. inkubacji w poszczególnych temperaturach

4.1.5. Wpływ węgla wapnia na aktywność lipolityczną, pH i biomasę *C. pannorum* A-1

Suplementacja podłoża węglanem skutkowałą stabilizacją pH, które w płynach pochodowlanych utrzymywało się w granicach między 6 a 7 (Tab. 12). W wyniku tego odnotowano aktywność hydrolityczną (z 0 do 0,42 U/ml) w płynie pochodowlanym z podłoża BMC2 i ponad trzykrotnie wyższą suchą masę grzybni (21,3 g/l) w porównaniu z podłożem bez węgla wapnia (6,3 g/l) (Tab. 11). Znacząco wzrosła także wewnątrzkomórkowa aktywność enzymu na podłożu BMC1 (z 0,19 na 0,37 U/mg) i BMC2 (z 0,03 na 0,25 U/mg).

Najwyższą zewnątrz- i wewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną oraz najwyższą biomasę uzyskano w 4 dniu hodowli na podłożu BMC i BMC1 (Tab. 12).

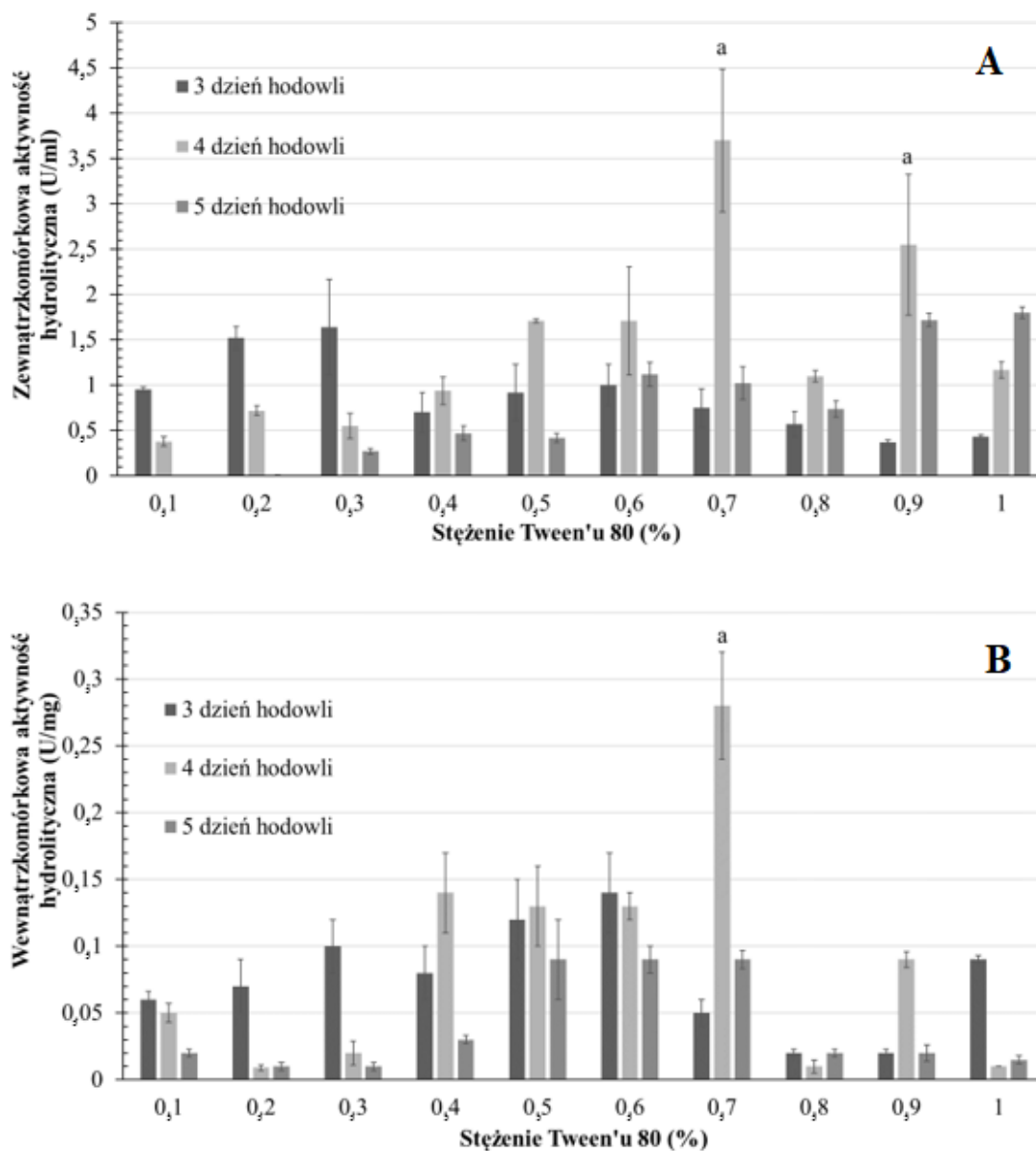
Tabela 12. Wpływ suplementacji podłoża 1% CaCO₃ na aktywność hydrolityczną enzymu i suchą masę grzybni *C. pannorum* A-1 oraz pH płynu pohodowlanego

| | Dzień hodowli | Podłoże | | |
|---|---------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | | BMC | BMC1 | BMC2 |
| Zewnątrzkomórkowa aktywność hydrolityczna (U/ml) | 2 | 0,32 ± 0,01 | 0,32 ± 0,04 | 0,39 ± 0,01 |
| | 3 | 1,19 ± 0,13 ^{ab} | 0,53 ± 0,08 | 0,42 ± 0,10 |
| | 4 | 1,40 ± 0,07 ^b | 0,97 ± 0,08 ^a | 0,27 ± 0,01 |
| | 5 | 0,25 ± 0,05 | 0,33 ± 0,05 | 0,25 ± 0,05 |
| Wewnątrzkomórkowa aktywność hydrolityczna (U/mg) | 2 | 0,05 ± 0,01 ^a | 0,07 ± 0,01 ^{ac} | 0,19 ± 0,01 ^{abcd} |
| | 3 | 0,10 ± 0,01 ^{abc} | 0,14 ± 0,01 ^{abc} | 0,25 ± 0,05 ^{bde} |
| | 4 | 0,24 ± 0,01 ^{bde} | 0,37 ± 0,02 ^e | 0,23 ± 0,03 ^{bcde} |
| | 5 | 0,17 ± 0,07 ^{abc} | 0,34 ± 0,04 ^{de} | 0,16 ± 0,03 ^{abc} |
| pH płynu pohodowlanego | 2 | 7,26 ± 0,02 | 7,22 ± 0,07 | 5,96 ± 0,03 |
| | 3 | 6,92 ± 0,04 | 6,46 ± 0,13 | 5,86 ± 0,01 |
| | 4 | 7,06 ± 0,04 | 5,90 ± 0,04 | 5,92 ± 0,01 |
| | 5 | 7,25 ± 0,01 | 5,90 ± 0,06 | 6,07 ± 0,02 |
| Sucha masa grzybni (g/l) | 2 | 3,44 ± 0,11 | 6,20 ± 0,35 | 16,60 ± 0,23 |
| | 3 | 7,53 ± 0,46 | 8,75 ± 0,89 | 21,90 ± 0,11 |
| | 4 | 7,28 ± 0,16 | 15,17 ± 0,32 | 21,80 ± 0,11 |
| | 5 | 5,38 ± 0,72 | 13,75 ± 0,09 | 21,30 ± 0,09 |

Wartości średnie dla zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej aktywności hydrolitycznej z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

4.1.6. Optymalizacja stężenia induktora

Wpływ stężenia Tweenu 80 na aktywność hydrolityczną enzymu zbadano w zakresie 0 – 1% (w/v) na podłożu BMC. Najwyższą aktywność odnotowano w 4 dobie hodowli przy stężeniu induktora w zakresie od 0,4 do 0,9%. Przy 0,7% Tweenu uzyskano odpowiednio $3,70 \pm 0,79$ U/ml i $0,28 \pm 0,04$ U/mg zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej hydrolitycznej aktywności enzymu. Niskie stężenia induktora (0,1 – 0,3%) skutkowały uzyskaniem wysokiej zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej w krótszym czasie już w 3 dniu hodowli (Ryc. 15).



Rycina 15. Wpływ stężenia Tweenu 80 i czasu hodowli na zewnątrz- (A) i wewnątrzkomórkową aktywność hydrolityczną enzymu z *C. pannorum* A-1. Wartości średnie oznaczone literą a różnią się istotnie od pozostałych średnich przy $p < 0,05$

Wartość pH płynu pohodowlanego utrzymywała się w okolicach 7,0 w trakcie trwania hodowli. Zaobserwowano także istotny spadek biomasy grzybni w hodowlach trwających 5 dni w porównaniu z hodowlą 4-dniową (Tab. 13).

Tabela 13. Wpływ stężenia Tweenu 80 na pH płynu pohodowlanego oraz suchą masę grzybni *C. pannorum* A-1

| Stężenie Tween'u (%) | pH płynu pohodowlanego | | | Sucha masa grzybni (g/l) | | |
|----------------------------|------------------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------|-------------|
| | Dzień hodowli | | | Dzień hodowli | | |
| | 3 | 4 | 5 | 3 | 4 | 5 |
| 0 | 7,52 ± 0,02 | 7,67 ± 0,04 | 7,88 ± 0,02 | 4,22 ± 0,11 | 4,81 ± 0,04 | 2,26 ± 0,08 |
| 0,1 | 7,52 ± 0,01 | 7,58 ± 0,01 | 7,65 ± 0,03 | 3,71 ± 0,16 | 3,51 ± 0,07 | 2,14 ± 0,13 |
| 0,2 | 7,30 ± 0,01 | 7,43 ± 0,03 | 7,44 ± 0,02 | 4,72 ± 0,39 | 3,36 ± 0,98 | 1,08 ± 0,08 |
| 0,3 | 7,12 ± 0,01 | 7,29 ± 0,03 | 7,33 ± 0,03 | 5,99 ± 0,27 | 3,75 ± 0,55 | 2,06 ± 0,18 |
| 0,4 | 6,97 ± 0,02 | 7,12 ± 0,02 | 7,25 ± 0,03 | 6,74 ± 0,12 | 5,78 ± 0,13 | 3,40 ± 0,15 |
| 0,5 | 6,84 ± 0,01 | 7,03 ± 0,01 | 7,19 ± 0,04 | 6,98 ± 0,16 | 4,85 ± 0,55 | 4,18 ± 0,86 |
| 0,6 | 6,79 ± 0,03 | 6,96 ± 0,04 | 7,10 ± 0,02 | 6,61 ± 0,36 | 6,55 ± 0,16 | 4,83 ± 0,20 |
| 0,7 | 6,73 ± 0,02 | 6,87 ± 0,02 | 7,07 ± 0,02 | 7,20 ± 0,26 | 5,02 ± 0,66 | 2,92 ± 0,10 |
| 0,8 | 6,66 ± 0,02 | 6,74 ± 0,02 | 6,93 ± 0,03 | 6,43 ± 0,41 | 4,95 ± 0,13 | 4,96 ± 0,12 |
| 0,9 | 6,66 ± 0,02 | 6,66 ± 0,01 | 6,91 ± 0,01 | 7,12 ± 0,20 | 5,09 ± 0,17 | 6,33 ± 0,23 |
| 1 | 6,55 ± 0,01 | 6,64 ± 0,02 | 6,80 ± 0,01 | 6,02 ± 0,17 | 6,95 ± 0,07 | 5,50 ± 0,12 |

W celu doboru biokatalizatora do biokatalitycznej estryfikacji alkoholi terpenowych, szczep *C. pannorum* A-1 hodowano na podłożu OM (podłoże z optymalnym stężeniem 0,7% Tween'u) w różnych wariantach przez 4 dni, wcześniej dobierając odpowiednią metodę do zagęszczenia i separacji białek z płynu pohodowlanego.

4.1.7. Zagęszczanie i wytrącanie białek z płynu pohodowlanego

Zagęszczenie płynu pohodowlanego przed liofilizacją przeprowadzono za pomocą ultrafiltracji i wyparki próżniowej. Ultrafiltrat płynu pohodowlanego charakteryzował się 5-krotnie niższą aktywnością lipolityczną w porównaniu do wyjściowego płynu pohodowlanego (spadek aktywności z 1,5 do 0,3 U/ml) oraz ponad 3-krotnie niższym stężeniem białka (spadek z 0,06 do 0,017 mg/ml). W odcieku nie odnotowano aktywności lipolitycznej. Z kolei zatężanie płynu pohodowlanego na wyparce próżniowej skutkowało 20-krotnym spadkiem hydrolitycznej aktywności enzymu. Ze względu na duże straty aktywności enzymu w trakcie zatężania przeprowadzono wytrącanie białek z płynu pohodowlanego za pomocą rozpuszczalników organicznych. Zaobserwowano, że optymalnym wariantem wytrącania w przypadku wszystkich użytych rozpuszczalników organicznych, z wyjątkiem metanolu (1:4), okazał się stosunek objętościowy płynu pohodowlanego do rozpuszczalnika 1:3. Preparaty uzyskane tym sposobem wykazywały najwyższą aktywność specyficzną. Z kolei najniższą aktywnością lipolityczną charakteryzowały się preparaty uzyskane po wytrącaniu w stosunku 1:1. Najwyższe aktywności specyficzne uzyskano w preparatach otrzymanych w wyniku wytrącania acetonem w wariantach 1:3 (53,5 U/mg) oraz 1:4 (48,4 U/mg) (Tab. 14).

Tabela 14. Aktywność lipolityczna (U/ml), specyficzna (U/mg) i stężenie białka wytrąconego rozpuszczalnikami organicznymi z płynu pochodowlanego pochodzącego z 4-dniowej hodowli *C. pannorum* A-1 na podłożu BMC1

| Rozpuszczalnik | Wariant wytrącania* | Aktywność lipolityczna (U/ml) | Stężenie białka (mg/ml) | Aktywność specyficzna enzymu (U/mg)** |
|--------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| | Płyn wyjściowy | 1,37 | 0,06 | 22,83 |
| n-propanol | 1:1 | 0,06 | 0,07 | 0,83 |
| | 1:3 | 0,64 | 0,02 | 40,00 |
| | 1:4 | 1,08 | 0,03 | 39,20 |
| | 1:5 | 0,54 | 0,02 | 28,40 |
| Metanol | 1:1 | 0,22 | 0,04 | 5,20 |
| | 1:3 | 0,68 | 0,03 | 26,00 |
| | 1:4 | 1,30 | 0,04 | 34,70 |
| | 1:5 | 0,73 | 0,03 | 28,00 |
| Etanol | 1:1 | 0,39 | 0,05 | 7,45 |
| | 1:3 | 0,68 | 0,03 | 20,60 |
| | 1:4 | 0,98 | 0,06 | 17,00 |
| | 1:5 | 0,56 | 0,02 | 25,50 |
| Izopropanol | 1:1 | 0 | 0,01 | 0 |
| | 1:3 | 0,72 | 0,02 | 36,00 |
| | 1:4 | 0,82 | 0,02 | 39,00 |
| | 1:5 | 0,73 | 0,02 | 36,50 |
| | 1:6 | 0,63 | 0,02 | 35,25 |
| Aceton | 1:1 | 0,27 | 0,02 | 14,20 |
| | 1:3 | 1,07 | 0,02 | 53,50 |
| | 1:4 | 0,92 | 0,02 | 48,40 |
| | 1:5 | 0,75 | 0,02 | 39,50 |

*Wytrącanie przeprowadzono w różnych stosunkach objętościowych (v/v) płyn pochodowlany : rozpuszczalnik

**Wartości aktywności specyficznej określono wobec zawartości białka w próbkach

4.1.8. Wybór formy biokatalizatora do estryfikacji alkoholi terpenowych

Najwyższą aktywność estryfikacyjną wykazał biokatalizator w formie liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 uzyskany w trakcie hodowli na podłożu OM z dodatkiem 1% oliwy z oliwek i 1% węglanu wapnia. Po 8 godz. reakcji w heksanie w 40°C uzyskano konwersję molową cytronellolu do octanu cytronellolu z wydajnością 75% (Tab. 15). W przypadku zastosowania preparatu w formie wytrąconych i liofilizowanych białek z płynu pochodowlanego wydajność estryfikacji alkoholu do estru wynosiła około 1%. Hodowla *C. pannorum* A-1 z węglanem wapnia na podłożu z oliwą z oliwek i na podłożu z oliwą i glukozą skutkuje odpowiednio 6- i 3,5-krotnym zwiększeniem ilości otrzymywanej biomasy w porównaniu do podłoża bez węglanu oraz zwiększeniem jej aktywności biokatalitycznej; 2,4-krotnie na podłożu OM z oliwą i 7-krotnie na podłożu OM z oliwą i glukozą (Tab. 15).

Tabela 15. Wpływ składu podłoża hodowlanego na aktywność estryfikacyjną biokatalizatora w formie grzybni *C. pannorum* A-1. Hodowlę prowadzono w 20°C przez 4 dni. Reakcję estryfikacji prowadzono w heksanie z 2% w/v biokatalizatora i równomolowym (50 mM) stężeniem cytronellołu i kwasu octowego w temp. 40°C przez 8 godzin

| Podłoże | Szybkość początkowa reakcji ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | Konwersja molowa (%) | Sucha masa grzybni (g/l) |
|---|--|-------------------------|-----------------------------|
| OM | 0,65 ± 0,01 ^a | 64 | 1,56 ± 0,21 |
| OM + 1% oliwa z oliwek | 0,32 ± 0,01 ^b | 31 | 2,43 ± 0,06 |
| OM + 1% oliwa z oliwek + 1% glukoza | 0,11 ± 0,01 ^c | 10 | 6,30 ± 0,09 |
| OM + 1% CaCO ₃ | 0,62 ± 0,01 ^a | 60 | 6,82 ± 0,11 |
| OM + 1% oliwa z oliwek + 1% CaCO ₃ | 0,77 ± 0,01 ^d | 75 | 14,82 ± 0,43 |
| OM + 1% oliwa z oliwek + 1% CaCO ₃ + 1% glukoza | 0,72 ± 0,01 ^e | 71 | 22,40 ± 0,33 |

Wartości średnie dla początkowej szybkości reakcji z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

OM – podłoże BM z optymalnym stężeniem 0,7% Tweenu.

4.1.9. Wpływ jonów metali na biomasę i aktywność katalityczną grzybni *C. pannorum* A-1

Każdy z badanych jonów metali dodawany do hodowli wykazywał wpływ na aktywność katalityczną wyhodowanej grzybni *C. pannorum* A-1. Mangan i cynk spowodował 2-krotne zwiększenie aktywności estryfikacyjnej biokatalizatora. Grzybnia uzyskana na podłożach zawierających wapń i magnez charakteryzowała się 1,4-krotnie wyższą aktywnością w porównaniu do grzybni kontrolnej. Z kolei Fe²⁺ i Cu²⁺ znacząco obniżyły aktywność biokatalityczną grzybni. W przypadku jonów żelaza i wapnia można zaobserwować 18% spadek masy biokatalizatora otrzymywanej w jednym cyklu hodowlanym (Tab. 16).

Tabela 16. Wpływ jonów metali na biomasę i aktywność katalityczną grzybni *C. pannorum* A-1

| Badany jon | Sucha masa (g/l) | Wydajność estryfikacji (%) |
|------------------|------------------|----------------------------|
| Kontrola | 19,7 ± 1,2 | 24,8 ± 1,5 ^a |
| Fe ²⁺ | 16,3 ± 0,6 | 8,6 ± 0,2 ^b |
| Mn ²⁺ | 19,6 ± 0,9 | 48,3 ± 2,4 ^c |
| Zn ²⁺ | 19,0 ± 1,1 | 48,9 ± 1,3 ^c |
| Ca ²⁺ | 16,5 ± 0,4 | 35,6 ± 0,1 ^d |
| Cu ²⁺ | 18,6 ± 0,3 | 12,3 ± 0,2 ^b |
| Mg ²⁺ | 19,8 ± 0,5 | 34,7 ± 0,1 ^d |

Wartości średnie wydajności estryfikacji z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

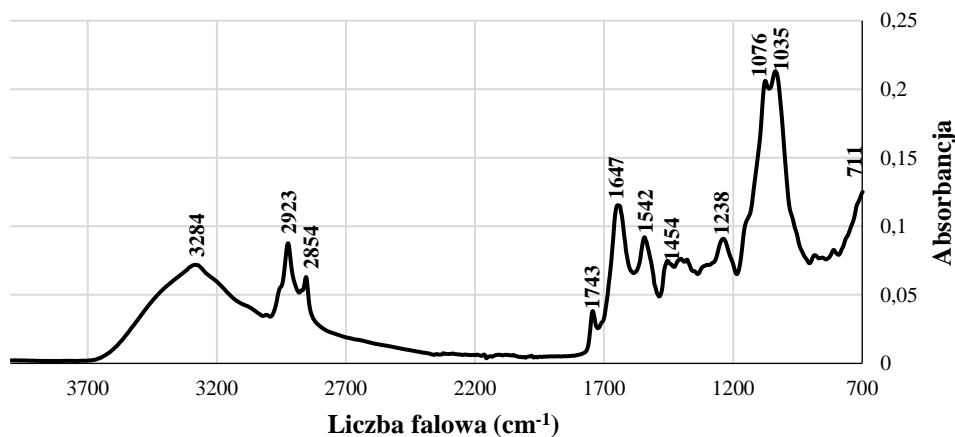
4.1.10. Charakterystyka biokatalizatorów grzybowych z użyciem FTIR-ATR

Biokatalizatory grzybowe różniące się między sobą aktywnością biokatalityczną poddano analizie spektrofotometrycznej w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Celem eksperymentu było jakościowe oznaczenie grup funkcyjnych występujących w formie zliofilizowanej i sproszkowanej grzybni oraz próba powiązania aktywności biokatalitycznej z obecnością konkretnych grup funkcyjnych w strukturze biokatalizatora. Na podstawie porównania pików na widmie FTIR-ATR do tabel korelacyjnych w spektroskopii oscylacyjnej przypisywano do konkretnej liczby falowej poszczególne grupy wiązań (Tab. 17).

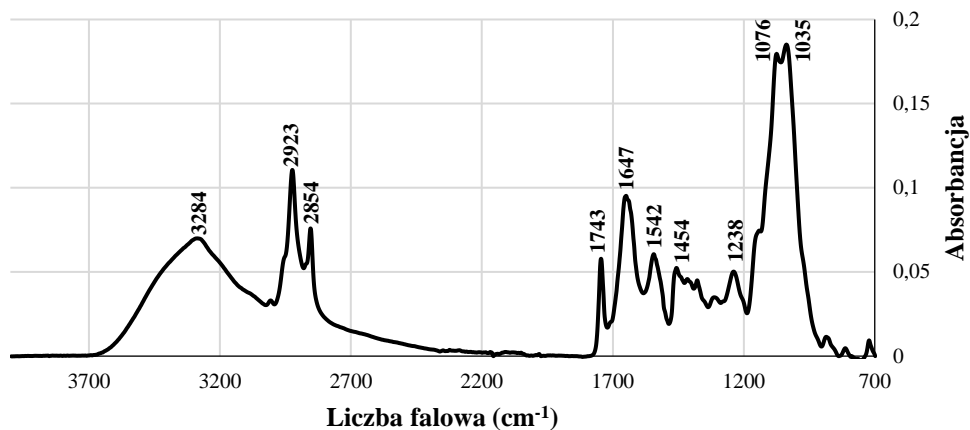
Tabela 17. Rozkład pasm w widmach FTIR-ATR grzybni uzyskanej na różnych podłożach

| Liczba falowa (cm ⁻¹) | Grupa funkcyjna |
|-----------------------------------|--|
| 3284 | -OH, drgania rozciągające zasocjowanej grupy OH lub grupy -NH lub -NH ₂ |
| 2923-2854 | C-H, drgania rozciągające aromatycznych i alifatycznych grup C-H |
| 1743 | C=O, drgania rozciągające |
| 1647 | C=C, drgania rozciągające węgli z pierścienia aromatycznego |
| 1573-1542 | C-N, drgania deformacyjne |
| 1454 | C-H, drgania deformacyjne |
| 1409 | CO ₃ , drgania asymetryczne rozciągające |
| 1238 | C-O, drgania rozciągające |
| 1153 | C-N, drgania rozciągające |
| 1076-1035 | -C-O- i -C-C-, drgania rozciągające i deformacyjne |
| 871 | CO ₃ , asymetryczne drgania rozciągające |
| 711 | CO ₃ , symetryczne drgania rozciągające lub grupy -NH |

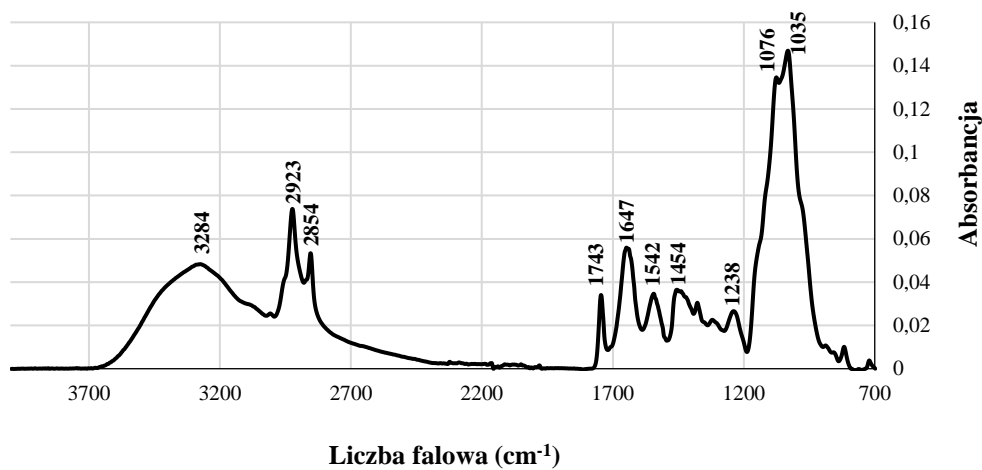
Analiza spektrometryczna FTIR-ATR wykazała wiele podobieństw w widmach grzybni uzyskanych na różnych wariantach podłoży hodowlanych. Widma przedstawiono na ryc. 16 – 21.



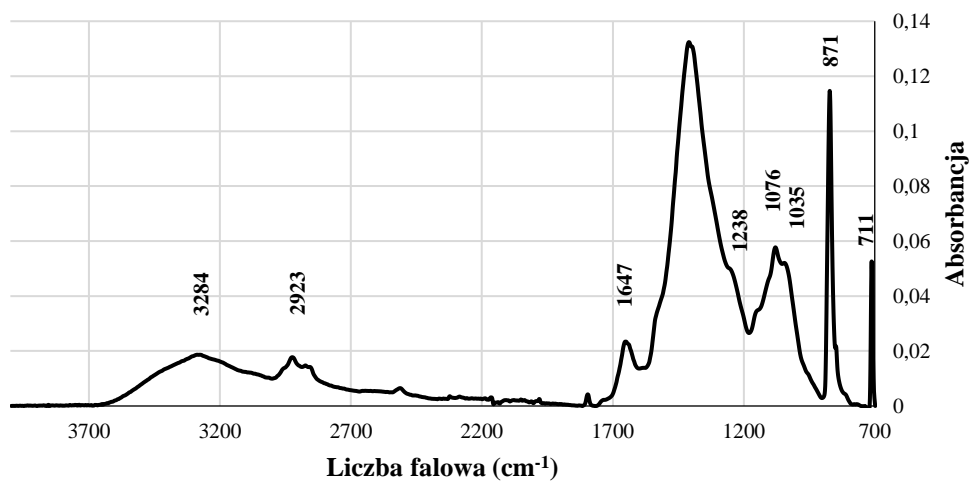
Rycina 16. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM



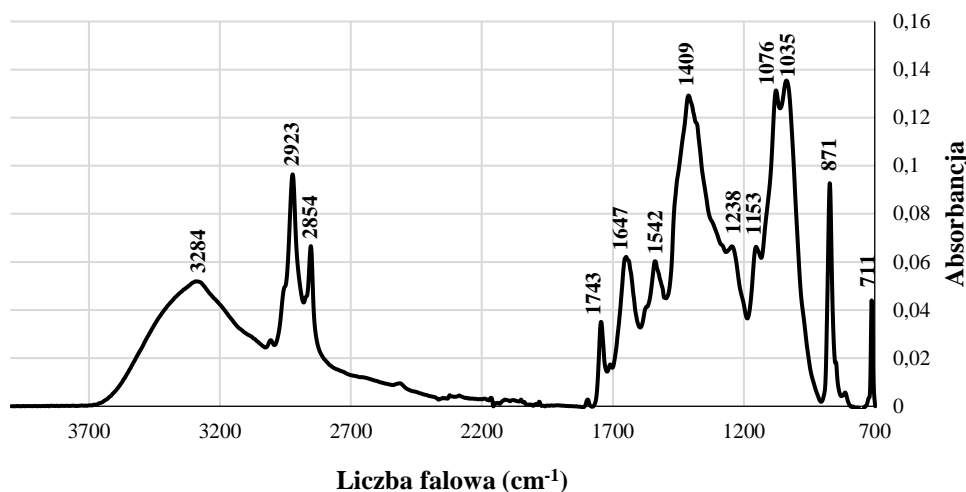
Rycina 17. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM + 1% oliwa



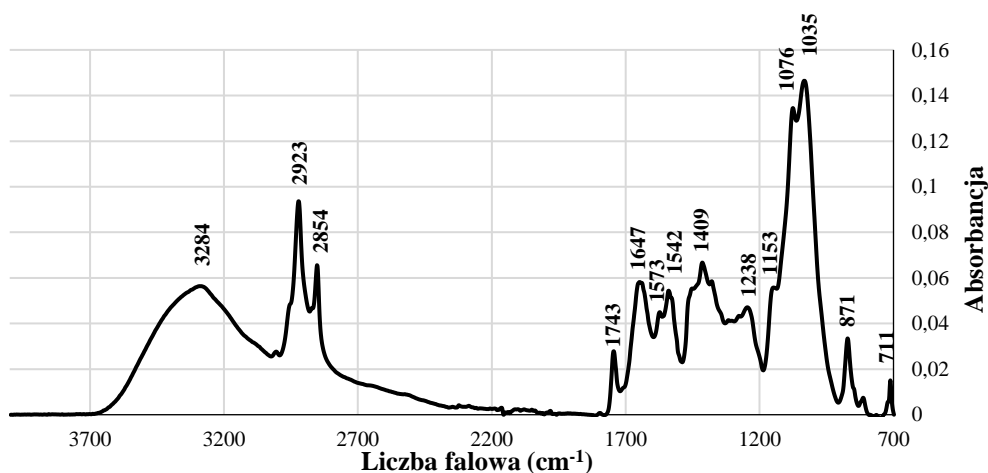
Rycina 18. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM + 1% oliwa + 1% glukoza



Rycina 19. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM + 1% CaCO₃



Rycina 20. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM + 1% oliwa + 1% CaCO₃



Rycina 21. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM + 1% oliwa + 1% glukoza + 1% CaCO₃

Na wszystkich analizowanych widmach występuje szeroki pik przy liczbie falowej 3284 cm⁻¹, który odpowiada zasocjowanej grupie OH, NH lub NH₂. Wyraźnego pasma 2923-2845 cm⁻¹, które pochodzi od drgań rozciągających aromatycznych i alifatycznych grup C-H oraz pasma 1743 cm⁻¹ wskazującego na obecność grup C=O, nie odnotowano jedynie na widmie biokatalizatora uzyskanego z podłoża OM + CaCO₃. Kolejną cechą wspólną dla wszystkich grzybni była obecność pasma 1647 cm⁻¹ charakterystycznego dla drgań rozciągających węgli C=C z pierścienia aromatycznego. Pasma 1573-1542 cm⁻¹, odpowiadające drganiom deformacyjnym C-N, obecne było we wszystkich widmach z wyjątkiem widma grzybni z podłoża OM + CaCO₃. Pasma 1454 cm⁻¹ odnotowano na widmach grzybni uzyskanych na podłożach bez węglanu wapnia. Pasma 1409, 871 i 711

cm^{-1} , odpowiadające za drgania grupy CO_3 , były obecne na widmach biokatalizatorów uzyskanych z podłoży suplementowanych węglanem wapnia. Intensywność pasm określających grupę CO_3 zmniejsza się przy suplementacji podłoża oliwą z oliwek i glukozą. We wszystkich widmach odnotowano pasmo 1238 cm^{-1} , które jest charakterystyczne dla drgań rozciągających grupy C-O . Pasma 711 cm^{-1} odpowiadające za drgania grupy CO_3 lub $-\text{NH}$ widoczne było na widmach biokatalizatorów uzyskanych z podłoży z węglanem ale też z podłoża OM. Pasma 1153 cm^{-1} , świadczące o drganiach rozciągających grupy C-N , zaobserwowano jedynie na widmach biokatalizatorów uzyskanych z podłoża OM + 1% oliwa z oliwek + 1% CaCO_3 i OM + 1% oliwa z oliwek + 1% glukoza + 1% CaCO_3 . Warto zwrócić uwagę na fakt, że biokatalizatory te charakteryzowały się najwyższą aktywnością estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego. Na widmach wszystkich badanych grzybni zaobserwowano pasmo $1076\text{-}1035 \text{ cm}^{-1}$, charakterystyczne dla drgań rozciągających i deformacyjnych grup $-\text{C-O-}$ i $-\text{C-C-}$.

4.1.11. SEM-EDS biokatalizatorów grzybowych

Analiza SEM-EDS wykazała, że w biokatalizatorach grzybowych występuje 11 pierwiastków chemicznych – węgiel, azot, tlen, sód, magnez, krzem, fosfor, siarka, chlor, potas i wapń. Grzybnie uzyskane na różnych rodzajach podłoży różnią się procentową zawartością poszczególnych pierwiastków. Węgiel i tlen stanowiły od 84,1% do 92,5% wszystkich pierwiastków w biomase. Największą zawartością węgla 63,4% charakteryzowała się grzybnia uzyskana na podłożu OM + 1% oliwa. Najmniej węgla (37,1%) spośród badanych biokatalizatorów zawierała grzybnia z podłoża OM + 1% CaCO_3 . Nie ma istotnych różnic w udziale węgla dla biokatalizatorów z podłoża OM, OM + 1% oliwa + 1% glukoza i OM + 1% oliwa + 1% glukoza + 1% CaCO_3 . Zawartość tlenu w grzybniach wahała się w granicach od 29,1% do 47,0%. Najwyższą zawartość tlenu 47% odnotowano w przypadku grzybni z podłoża OM + 1% CaCO_3 . Udział azotu w składzie pierwiastkowym grzybni wahał się od 6,5% do 8,5%, przy czym największa ilość występowała w grzybniach z podłoża OM, OM + 1% CaCO_3 i OM + 1% oliwa + 1% glukoza + 1% CaCO_3 . Zawartość magnezu istotnie różniła się jedynie w biokatalizatorze z podłoża OM (0,12%) w stosunku do pozostałych grzybni (0,04-0,05%). Najwyższą zawartość fosforu 0,6% i 0,4% odnotowano dla biokatalizatorów odpowiednio z podłoża OM i OM + 1% oliwa + 1% CaCO_3 . Zawartość siarki wahała się od 0,05% do 0,4% z największym udziałem w biokatalizatorze z podłoża OM. Nie odnotowano obecności chloru w grzybniach hodowanych na podłożach z dodatkiem 1% glukozy. Bardzo duże

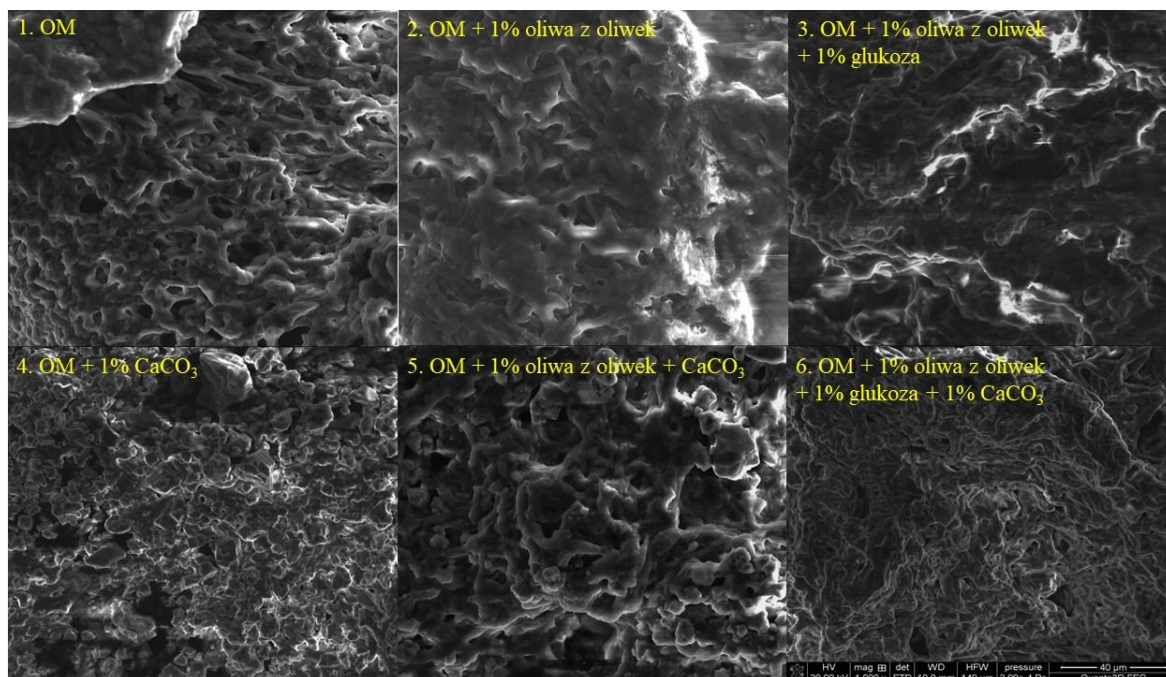
różnice odnotowano w przypadku zawartości wapnia. Biokatalizatory z podłoża OM + 1% CaCO₃ i OM + 1% oliwa + 1% CaCO₃ zawierały odpowiednio z 7,9% i 6,1% wapnia, zaś pozostałe biokatalizatory od 0,03% do 0,7% tego pierwiastka (Tab. 18).

Tabela 18. Zawartość pierwiastków w grzybniach uzyskanych z podłoży hodowlanych

| Zawartość pierwiastków w grzybniach uzyskanych z podłoży hodowlanych (%) | | | | | | |
|--|--------------------------|------------------------------|--------------------------|--|----------------------------------|--|
| Podłoże hodowlane | | | | | | |
| Pierwiastek | OM | OM + 1% CaCO ₃ | OM + 1% oliwa | OM + 1% oliwa + 1% CaCO ₃ | OM + 1% oliwa + 1% glukoza | OM + 1% oliwa + 1% glukoza + 1% CaCO ₃ |
| Węgiel | 55,7 ± 1,2 ^a | 37,1 ± 1,2 ^b | 63,4 ± 3,0 ^c | 49,6 ± 1,5 ^d | 57,3 ± 2,1 ^a | 53,8 ± 2,1 ^a |
| Azot | 8,5 ± 0,6 ^a | 7,6 ± 0,7 ^{ab} | 6,5 ± 0,8 ^b | 6,8 ± 0,3 ^b | 7,0 ± 0,9 ^b | 8,1 ± 0,7 ^{ab} |
| Tlen | 33,6 ± 1,7 ^a | 47,0 ± 2,9 ^b | 29,1 ± 2,4 ^c | 36,3 ± 1,2 ^{ad} | 35,1 ± 2,0 ^{ad} | 37,1 ± 2,5 ^{ad} |
| Sód | 0,02 ± 0,01 ^a | 0 | 0 | 0 | 0,02 ± 0,01 ^a | 0 |
| Magnez | 0,12 ± 0,07 ^a | 0,05 ± 0,01 ^b | 0,05 ± 0,01 ^b | 0,05 ± 0,01 ^b | 0,04 ± 0,01 ^b | 0,05 ± 0,01 ^b |
| Krzem | 0,02 ± 0,01 ^a | 0,02 ± 0,01 ^a | 0,01 ± 0,01 ^a | 0,02 ± 0,01 ^a | 0,02 ± 0,01 ^a | 0,02 ± 0,01 ^a |
| Fosfor | 0,6 ± 0,3 ^a | 0,2 ± 0,07 ^b | 0,3 ± 0,06 ^b | 0,4 ± 0,1 ^a | 0,2 ± 0,03 ^b | 0,2 ± 0,03 ^b |
| Siarka | 0,4 ± 0,1 ^a | 0,05 ± 0,02 ^b | 0,2 ± 0,04 ^a | 0,2 ± 0,05 ^a | 0,2 ± 0,05 ^a | 0,05 ± 0,02 ^b |
| Chlor | 0,05 ± 0,05 ^a | 0,07 ± 0,04 ^a | 0,03 ± 0,01 ^a | 0,05 ± 0,05 ^a | 0 | 0 |
| Potas | 0,7 ± 0,4 ^a | 0,1 ± 0,04 ^b | 0,2 ± 0,08 ^b | 0,3 ± 0,3 ^b | 0,1 ± 0,04 ^b | 0,1 ± 0,03 ^b |
| Wapń | 0,3 ± 0,2 ^{ac} | 7,9 ± 3,3 ^b | 0,2 ± 0,1 ^{cd} | 6,1 ± 0,3 ^b | 0,03 ± 0,1 ^{ad} | 0,7 ± 0,3 ^{ad} |

Wartości średnie z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie dla każdego pierwiastka przy p<0,05

Na obrazach biokatalizatorów ze skaningowego mikroskopu elektronowego można zaobserwować strzępki charakterystyczne dla grzybów nitkowatych. Największe usieciwienie strzępek występuje u biokatalizatorów z podłoża OM, OM + 1% oliwa + 1% CaCO₃ i OM + 1% oliwa + 1% glukoza + 1% CaCO₃ charakteryzujących się najwyższą aktywnością katalityczną. Dodatek oliwy do podłoża przy braku suplementacji węglanem wapnia skutkuje uzyskaniem grzybni (Ryc.12-2 i 12-3) najmniej usieciwionej.

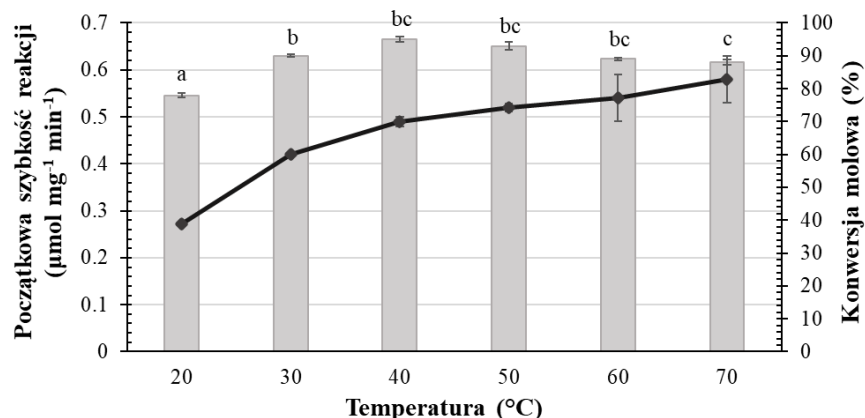


Rycina 22. Obrazy SEM powierzchni biokatalizatorów uzyskanych z różnych podłoży hodowlanych

4.2. Estryfikacja alkoholi terpenowych przy użyciu grzybni *C. pannorum* A-1

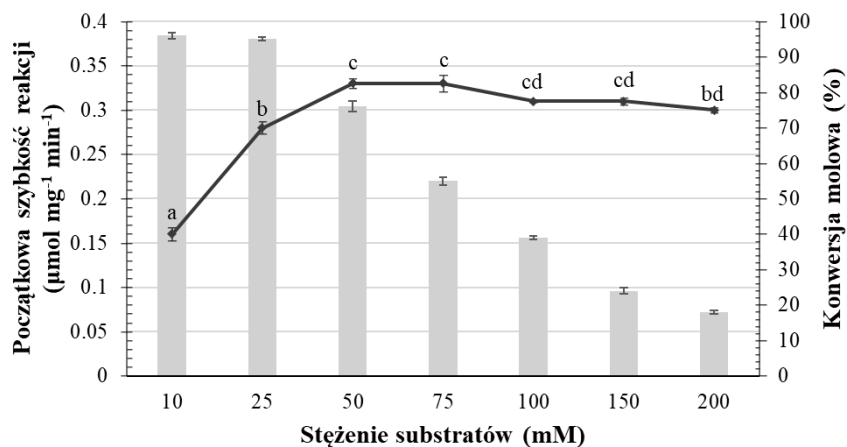
4.2.1. Optymalizacja warunków estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego

W kolejnym etapie badań przeprowadzono optymalizację reakcji estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego z użyciem biokatalizatora uzyskanego z podłoża OM + 1% oliwa + 1% CaCO_3 ze względu na najwyższą konwersję molową i szybkość początkową reakcji. Najwyższą konwersję molową alkoholu do estru (95%) przy użyciu liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 uzyskano w 40°C po 24 godz. reakcji, w wyższych temperaturach zaobserwowano jej nieznaczny spadek. Wraz ze wzrostem temperatury biokatalizy wzrastała szybkość początkowa reakcji (Ryc. 23). W temp. 20°C, biokatalityczna estryfikacja cytronellolu i kwasu octowego zachodziła z 78% wydajnością.



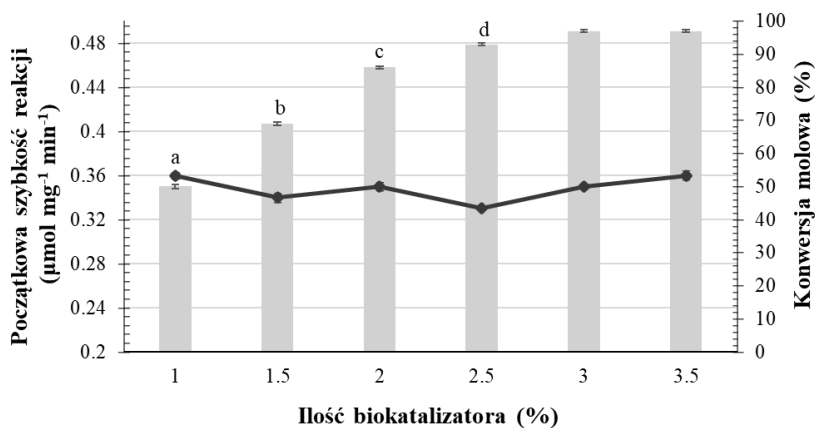
Rycina 23. Wpływ temperatury na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię *C. pannorum* A-1. Reakcję prowadzono w n-heksanie z 2% w/v biokatalizatora i 50 mM równomolowym stężeniem substratów przez 24 godz. Słupki reprezentują konwersję molową, linia wskazuje początkową szybkość reakcji. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

Zastosowanie niskich równomolowych stężeń substratów w zakresie od 10 do 25 mM prowadziło do konwersji molowej na poziomie ponad 95% przy niższej szybkości początkowej reakcji w porównaniu do wyższych stężeń substratów. Wzrostowi stężenia substratów z 50 do 200 mM towarzyszył liniowy spadek wydajności z zachowaniem szybkości początkowej reakcji na poziomie powyżej $0,3 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (Ryc. 24).



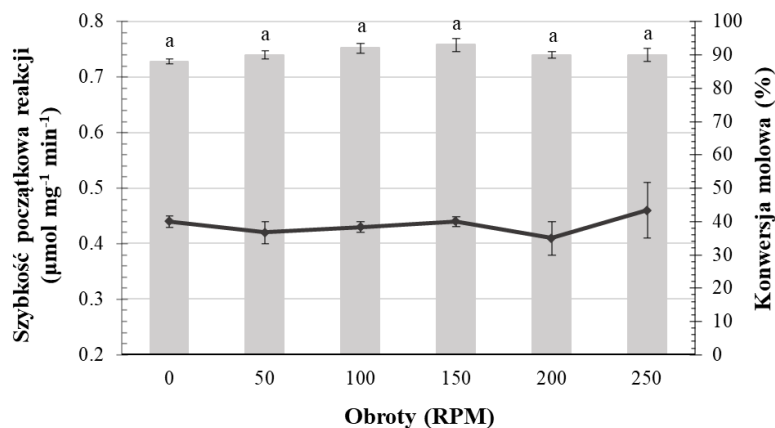
Rycina 24. Wpływ stężenia substratów na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię *C. pannorum* A-1. Reakcję prowadzono przy równomolowych stężeniach substratów w n-heksanie z 2% w/v biokatalizatora przez 24 godz. w 30°C. Słupki reprezentują konwersję molową, linia wskazuje początkową szybkość reakcji. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

Maksymalną wydajność reakcji (98%) uzyskano przy zastosowaniu 3% w/v biokatalizatora w formie sproszkowanej grzybni *C. pannorum* A-1. Zwiększenie ilości grzybni w reakcji nie przekładało się na zwiększenie początkowej szybkości reakcji (Ryc. 25).



Rycina 25. Wpływ ilości biokatalizatora na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię *C. pannorum* A-1. Reakcję prowadzono w n-heksanie z 50 mM równomolowym stężeniem substratów przez 24 godz. w 30°C. Słupki reprezentują konwersję molową, linia wskazuje początkową szybkość reakcji. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

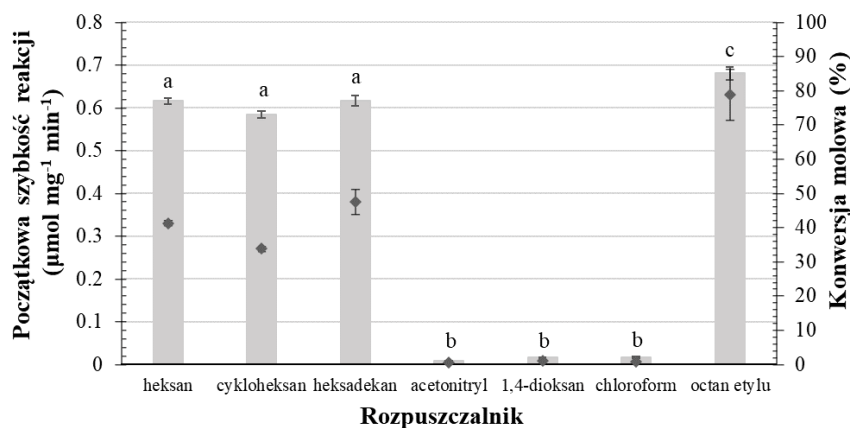
Nie odnotowano istotnego wpływu szybkości mieszania układu na wydajność estryfikacji (Ryc. 26).



Rycina 26. Wpływ szybkości mieszania na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię *C. pannorum* A-1. Reakcję prowadzono w n-heksanie z 50 mM równomolowym stężeniem substratów, 3% w/v biokatalizatora przez 24 godz. w 30°C. Słupki reprezentują konwersję molową, linia wskazuje początkową szybkość reakcji. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

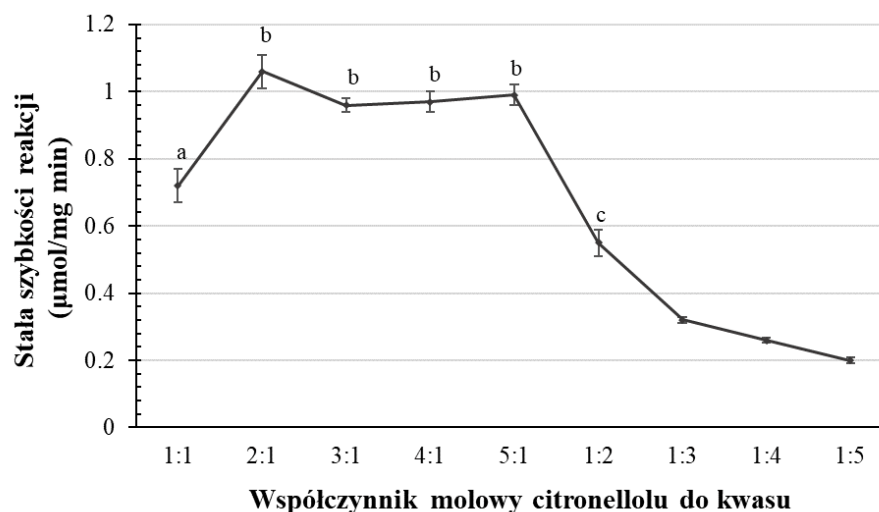
Spośród badanych rozpuszczalników organicznych najwyższą początkową szybkość reakcji i konwersję molową uzyskano stosując octan etylu ($0,63 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$; 83%),

heksan ($0,33 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$; 77%), cykloheksan ($0,27 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$; 73%) i heksadekan ($0,38 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$; 77%) (Ryc. 27). Śladową aktywność katalityczną grzybni uzyskano w środowisku acetonitrylu, 1,4-dioksanu i chloroformu. Biokatalizator nie wykazywał aktywności estryfikacyjnej w 1-butanolu, DMAC, DMF, NMP, etanolu, tetrahydrofuranie i 1-propanolu.



Rycina 27. Wpływ rozpuszczalnika organicznego na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnę *C. pannorum* A-1. Reakcję prowadzono z 50 mM równomolowym stężeniem substratów, 3% w/v biokatalizatora przez 24 godz. w 30°C. Słupki reprezentują konwersję molową, punkty wskazują początkową szybkość reakcji. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

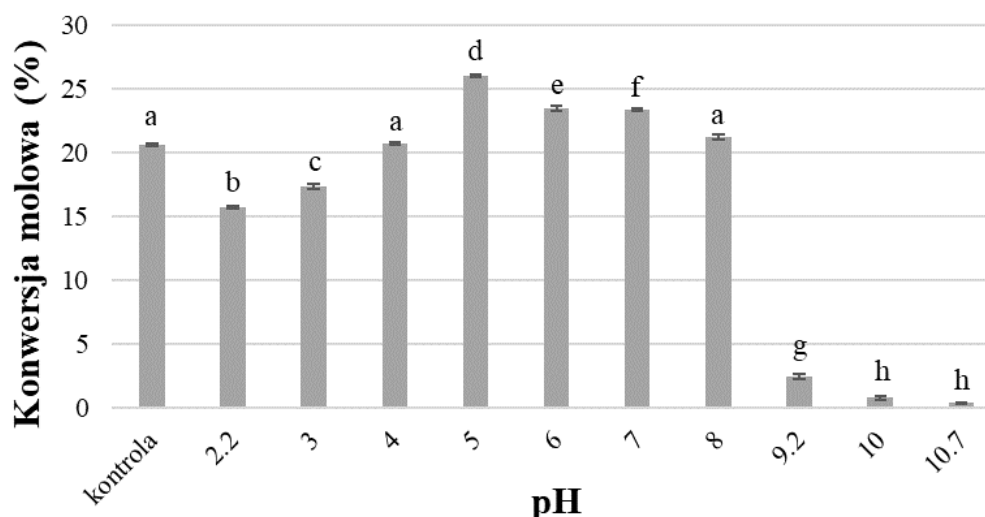
W końcowym etapie optymalizacji estryfikacji β -cytronellolu z kwasem octowym z użyciem grzybni *C. pannorum* A-1 określono wpływ stosunku molowego substratów na początkową szybkość reakcji. Nadmiar cytronellolu w zakresie 2:1 – 5:1 w stosunku do kwasu octowego prowadził do zwiększenia początkowej szybkości estryfikacji o minimum 34% w porównaniu do stężenia równomolowego (50 mM). Nadmiar kwasu powodował drastyczny spadek początkowej szybkości biokatalizy. Estryfikacja z dwukrotnym i 5-krotnym nadmiarem kwasu octowego skutkowałą spadkiem początkowej szybkości reakcji odpowiednio o 33% i 72% (Ryc. 28).



Rycina 28. Wpływ stosunku molowego cytronellolu do kwasu na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię *C. pannorum* A-1. Reakcję prowadzono z 3% w/v biokatalizatora przez 24 godz. w 30°C. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

4.2.2. Wpływ inkubacji grzybni w różnym pH przed liofilizacją na wydajność estryfikacji

Inkubacja grzybni w buforach o różnym pH przed liofilizacją miała istotny wpływ na aktywność biokatalizatora w reakcji estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego. Istotny wzrost aktywności biokatalitycznej o 26% w stosunku do grzybni bezpośrednio po hodowli uzyskano w przypadku biokatalizatora inkubowanego w buforze o pH 5,0. Wyższą aktywność obserwowano także po inkubacji w buforach o pH 6,0 i 7,0 odpowiednio o 13,5% i 13% w porównaniu do kontroli. W trakcie inkubacji w kwaśnym pH 2,2 i 3,0 utracono odpowiednio 24% i 16% wyjściowej aktywności biokatalizatora. Zastosowanie w inkubacji zasadowych buforów wiązało się ze spadkiem konwersji molowej substratów w estryfikacji o minimum 85%. Inkubacja biokatalizatora w pH 4,0 i 8,0 nie miała istotnego wpływu na aktywność katalityczną grzybni (Ryc. 29).



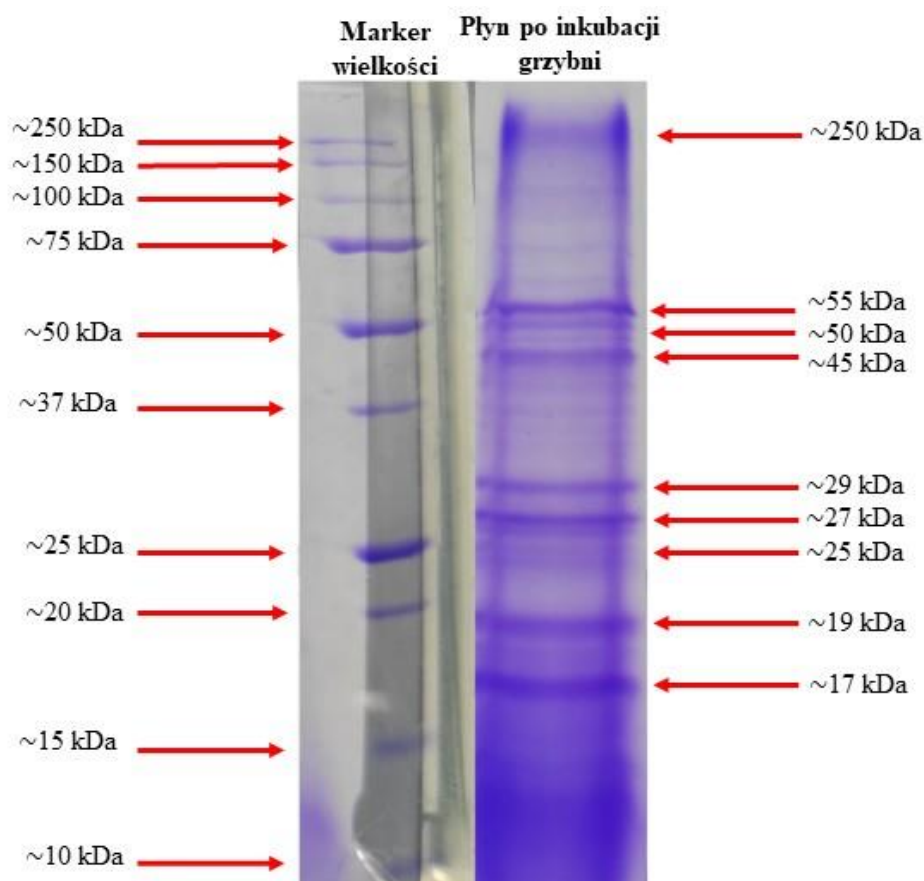
Rycina 29. Wpływ 3-godz. inkubacji grzybni *C. pannorum* A-1 przed liofilizacją w buforach o różnym pH na konwersję molową β -cytronellolu i kwasu octowego. Reakcję prowadzono z 50 mM równomolowym stężeniem substratów, 3% w/v biokatalizatora przez 6 godz. w 30°C. Kontrola – grzybnia nie poddawana inkubacji. Wartości średnie wydajności reakcji z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

W celu zbadania przyczyny spadku aktywności biokatalitycznej, ze względu na możliwą elucję białka z grzybni w trakcie 3-godz. inkubacji, określono jego stężenie w buforach o pH 2,2, 5 i 9,2 po inkubacji. W buforze o pH 2,2 i 5 odnotowano niższe stężenie białka (odpowiednio 0,03 i 0,075 mg/ml) w porównaniu do buforu o pH 9,2 (0,25 mg/ml) (Tab. 19).

Tabela 19. Porównanie stężenia białka w buforach o pH 2,2, 5 i 9,2 po zakończeniu inkubacji z aktywnością biokatalityczną grzybni otrzymanej po inkubacji w tych roztworach

| Bufor | Stężenie białka (mg/ml) w buforze po inkubacji | Konwersja molowa (%) substratów przy użyciu grzybni po inkubacji |
|--------|--|--|
| pH 2,2 | 0,03 | 15,8 |
| pH 5 | 0,075 | 26,1 |
| pH 9,2 | 0,25 | 2,5 |

W celu określenia profilu białek wydzielonych w buforze o pH 9,2 przeprowadzono elektroforezę SDS-PAGE. W badanym płynie odnotowano dziewięć wyraźnych prążków białkowych o przybliżonych masach 250 kDa, 55 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 29, kDa, 27 kDa, 25 kDa, 19 kDa i 17 kDa. Oprócz tego widoczne są prążki białkowe o mniejszej intensywności w całym zakresie wielkości (Ryc. 30).



Rycina 30. Profil białkowy uzyskany po elektroforezie SDS-PAGE płynu po inkubacji grzybni *C. pannorum* A-1 w buforze o pH 9,2

4.2.3. Wpływ struktury reagentów na wydajność estryfikacji

Spośród badanych pierwszorzędowych alkoholi terpenowych najwyższą konwersję molową, przekraczającą 91% dla wszystkich reagentów kwasowych, uzyskano dla monocyklicznego alkoholu perylowego (po 20 godz. w 30°C). Odnotowano różną aktywność biokatalizatora wobec liniowych alkoholi terpenowych (cytronellolu, geraniolu, nerolu i farnesolu). Konwersja cytronellolu wynosiła >78% dla wszystkich reagentów kwasowych, a nerolu >34%. Najniższą aktywność biokatalizatora uzyskano dla alkoholi bicyklicznych: >12% dla myrtenolu i >11% dla nopolu. Wraz ze wzrostem długości łańcucha kwasu karboksylowego w estryfikacji wzrastała wydajność reakcji (Tab. 20).

Tabela 20. Wydajność estryfikacji z użyciem biokatalizatora w formie grzybni *C. pannorum* A-1 w zależności od struktury pierwszorzędowych alkoholi terpenowych i długości łańcuchów węglowych w kwasach karboksylowych

| | Konwersja molowa (%) | | | | | |
|-------------------------|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Rodzaj kwasu | | | | | |
| | C2 | C3 | C4 | C5 | C8 | C9 |
| Cytronellol | 78 ± 1,1 | 86 ± 0,9 | 95 ± 0,8 | 96 ± 0,5 | 97 ± 0,6 | 97 ± 0,4 |
| Geraniol | 51 ± 0,8 | 71 ± 1,2 | 88 ± 1,8 | 96 ± 0,6 | 96 ± 1,7 | 95 ± 0,4 |
| Nerol | 34 ± 1,2 | 39 ± 2,1 | 60 ± 0,8 | 87 ± 1,1 | 70 ± 0,8 | 69 ± 0,5 |
| Farnezol | 51 ± 0,9 | 56 ± 0,7 | 77 ± 1,2 | 89 ± 0,9 | 87 ± 1,1 | 86 ± 0,7 |
| Alkohol perylowy | 91 ± 0,4 | 92 ± 0,8 | 94 ± 0,5 | 94 ± 0,5 | 95 ± 1,1 | 96 ± 0,9 |
| Myrtenol | 12 ± 0,9 | 35 ± 1,2 | 58 ± 0,7 | 67 ± 0,3 | 74 ± 1,3 | 75 ± 0,5 |
| Nopol | 11 ± 0,4 | 23 ± 0,9 | 44 ± 0,9 | 52 ± 1,1 | 49 ± 2,1 | 58 ± 0,3 |

W przypadku wykorzystania w estryfikacji terpenowych alkoholi drugorzędowych – karweolu i *trans*-pinokarweolu z kwasem octowym wydajność wynosiła odpowiednio 1,4% i 0,41% po 20 godz. reakcji. Grzybnia *C. pannorum* A-1 nie wykazywała żadnej aktywności wobec alkoholi trzeciorzędowych – linalolu i terpinen-4-olu.

4.2.4. Inkubacja grzybni z alkoholami terpenowymi i kwasami karboksylowymi przed liofilizacją

Ze względu na niską aktywność biokatalizatora wobec drugo- i trzeciorzędowych alkoholi terpenowych i niższą konwersję molową substratów w estryfikacji z kwasem octowym w porównaniu z kwasami C3-C9 postanowiono określić potencjalny wpływ tych reagentów na aktywność biokatalizatora. W tym celu grzybnie poddano godzinnej inkubacji w 20°C z alkoholami o różnej rzędowości i trzema kwasami karboksylowymi (C2, C5 i C9) w środowisku wodnym z 10% heksanu jako kosolwenta. Następnie przeprowadzono estryfikację cytronellolu i kwasu octowego przy użyciu preinkubowanej grzybni. Wszystkie badane alkohole nie wykazywały negatywnego wpływu na aktywność biokatalityczną grzybni *C. pannorum* A-1. Około 15% spadek aktywności grzybni odnotowano jedynie w przypadku inkubacji biokatalizatora z kwasem octowym (Tab. 21).

Tabela 21. Wpływ inkubacji grzybni *C. pannorum* A-1 z kwasami karboksylowymi i alkoholami terpenowymi przed liofilizacją na wydajność estryfikacji cytronellolu z kwasem octowym

| Rodzaj grzybni | Konwersja molowa (%) |
|--|----------------------|
| Kontrolna | 93 |
| Inkubowana z kwasem octowym | 79 |
| Inkubowana z kwasem pelargonowym | 94 |
| Inkubowana z kwasem walerianowym | 94 |
| Inkubowana z linalolem | 92 |
| Inkubowana z cytronellolem | 92 |
| Inkubowana z <i>trans</i> -pinokarweolem | 94 |
| Inkubowana z karweolem | 90 |
| Inkubowana z nopolem | 92 |

Grzybnię inkubowano przez 1 godz. z 50 mM stężeniem kwasu lub alkoholu terpenowego. Kontrolę stanowiła grzybnia inkubowana bez dodatku kwasu lub alkoholu terpenowego.

4.2.5. Bioimprinting grzybni kwasami tłuszczowymi

Bioimprinting biokatalizatora w formie liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 przeprowadzono w celu indukcji aktywności biokatalitycznej wobec drugo- i trzeciorzędowych alkoholi terpenowych. Kontrolę stanowił biokatalizator bezpośrednio po hodowli. Grzybnia inkubowana w rozpuszczalniku organicznym bez czynnika imprintującego nie wykazywała różnic w aktywności w porównaniu do próby kontrolnej (dane nie prezentowane). Biokatalizator kontrolny wykazywał wysoką aktywność wobec pierwszorzędowego alkoholu terpenowego – cytronellolu oraz nieterpenowego alkoholu drugorzędowego – cykloheksanolu i całkowity brak aktywności wobec III-rz. linalolu. Bioimprinting kwasem kaprylowym, oleinowym i laurynowym nie powodował indukcji aktywności biokatalizatora wobec drugo- i trzeciorzędowych alkoholi terpenowych. Odnotowano za to pozytywny wpływ inkubacji biokatalizatora z kwasami na konwersję molową pierwszorzędowego cytronellolu. Najwyższy wzrost aktywności (o 33%) estryfikacji cytronellolu i kwasu laurynowego odnotowano w przypadku bioimprintingu kwasem laurynowym w mieszaninie heksanu i izopropanolu. Zastosowanie kwasu laurynowego w samym izopropanolu powodował spadek aktywności biokatalizatora o 46% (Tab. 22).

Tabela 22. Bioimprinting biokatalizatora w formie grzybni *C. pannorum* A-1 kwasem kaprylowym, oleinowym i laurynowym (6,7%) w izopropanolu i mieszaninie izopropanolu z heksanem w proporcji 50:50

| Środowisko bioimprintingu | Czynnik bioimprintujący | Wariant estryfikacji | Konwersja molowa (%) po 24 godz. reakcji |
|--|-------------------------|-----------------------------|--|
| Grzybnia kontrolna nie traktowana rozpuszczalnikami | | Cytronellol + kaprylowy | 63,6 ± |
| | | Cytronellol + walerianowy | 81,6 |
| | | Cytronellol + laurynowy | 31,4 |
| | | Cykloheksanol + kaprylowy | 62,9 |
| | | Cykloheksanol + walerianowy | 59,1 |
| | | Cykloheksanol + laurynowy | 46,2 |
| | | Karweol + kaprylowy | 2,7 |
| | | Karweol + walerianowy | 2,7 |
| | | Karweol + laurynowy | 1,2 |
| Izopropanol | Kwas kaprylowy | Cytronellol + kaprylowy | 68,1 |
| | | Cykloheksanol + kaprylowy | 46,2 |
| | | Karweol + kaprylowy | 2,8 |
| | Kwas oleinowy | Cytronellol + walerianowy | 67 |
| | | Cykloheksanol + walerianowy | 46,1 |
| | | Karweol + walerianowy | 1,4 |
| | Kwas laurynowy | Cytronellol + laurynowy | 17,2 |
| | | Cykloheksanol + laurynowy | 26,8 |
| | | Karweol + laurynowy | 0,9 |
| Izopropanol: heksan (1:1) | Kwas kaprylowy | Cytronellol + kaprylowy | 78,0 |
| | | Cykloheksanol + kaprylowy | 53,2 |
| | | Karweol + kaprylowy | 2,5 |
| | Kwas oleinowy | Cytronellol + walerianowy | 80,8 |
| | | Cykloheksanol + walerianowy | 49,0 |
| | | Karweol + walerianowy | 1,9 |
| | Kwas laurynowy | Cytronellol + laurynowy | 41,7 |
| | | Cykloheksanol + laurynowy | 30,7 |
| | | Karweol + laurynowy | 0,7 |

W następnym eksperymencie, ze względu na istotny wpływ środowiska imprintingu na aktywność katalityczną grzybni, zastosowano cztery rozpuszczalniki organiczne różniące się polarnością – heksan, izopropanol, metanol i 1,4-dioksan oraz ich mieszaniny. Jako czynnik imprintujący wykorzystano kwas laurynowy.

Biokatalizator kontrolny charakteryzował się wyższą aktywnością estryfikacji drugorzędowego alkoholu nieterpenowego – cykloheksanolu (45,5%) niż pierwszorzędowego alkoholu terpenowego – cytronellolu (35,1%) z kwasem laurynowym. Po bioimprintingu w mieszaninie 1,4-dioksan : heksan i mieszaninach heksan : izopropanol grzybnia wykazywała wyższą aktywność w estryfikacji cytronellolu niż cykloheksanolu. Największy wpływ na aktywność grzybni *C. pannorum* A-1 w estryfikacji cytronellolu wykazała indukcja kwasem laurynowym w mieszaninie 1,4-dioksanu z heksanem

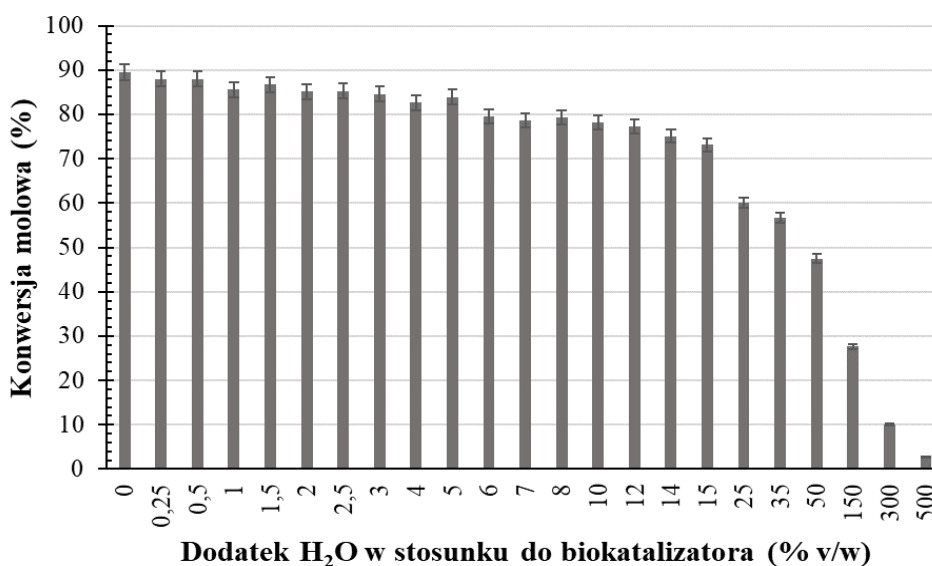
w proporcji 1:1. Biokatalizator wykazywał niemal 2-krotnie wyższą aktywność estryfikacji w porównaniu do kontroli. Zwiększenie aktywności biokatalizatora uzyskano także po bioimprintingu w mieszaninach heksanu z izopropanolem. Aktywność grzybni uzależniona była od proporcji rozpuszczalników w mieszaninie indukującej. Inkubacja w heksanie i izopropanolu w proporcji 1:1, 1:3 i 3:1 skutkowała zwiększoną aktywnością grzybni w estryfikacji cytronellolu z kwasem laurynowym odpowiednio o 28%, 55% i 70%, oraz w przypadku drugiego układu (1:3) osiągnięto największą zmianę specyficzności biokatalizatora w kierunku estryfikacji cytronellolu względem estryfikacji cykloheksanolu. Użycie metanolu jako środowiska indukcji prowadziło do inhibicji ogólnej aktywności katalitycznej. Żaden wariant molekularnego imprintingu nie wpływał na zwiększenie specyficzności biokatalizatora wobec drugorzędowego alkoholu terpenowego – karweolu (Tab. 23).

Tabela 23. Bioimprinting biokatalizatora w formie grzybni *C. pannorum* A-1 kwasem laurynowym w mieszaninach rozpuszczalników organicznych

| Środowisko bioimprintingu | Wariant estryfikacji | Konwersja molowa (%) po 24 godz. reakcji |
|-----------------------------------|---------------------------|--|
| Biokatalizator kontrolny | Cytronellol + laurynowy | 35,1 |
| | Cykloheksanol + laurynowy | 45,5 |
| | Karweol + laurynowy | 1,3 |
| Heksan:izopropanol 1:1 | Cytronellol + laurynowy | 44,9 |
| | Cykloheksanol + laurynowy | 30,2 |
| | Karweol + laurynowy | 0,9 |
| Heksan:izopropanol 1:3 | Cytronellol + laurynowy | 54,5 |
| | Cykloheksanol + laurynowy | 32,7 |
| | Karweol + laurynowy | 1,1 |
| Heksan:izopropanol 3:1 | Cytronellol + laurynowy | 59,6 |
| | Cykloheksanol + laurynowy | 39,2 |
| | Karweol + laurynowy | 1,0 |
| Metanol:heksan 1:1 | Cytronellol + laurynowy | 3,9 |
| | Cykloheksanol + laurynowy | 1,8 |
| | Karweol + laurynowy | 0 |
| Metanol:heksan 1:3 | Cytronellol + laurynowy | 7,5 |
| | Cykloheksanol + laurynowy | 3,2 |
| | Karweol + laurynowy | 0 |
| Metanol:heksan 3:1 | Cytronellol + laurynowy | 2,5 |
| | Cykloheksanol + laurynowy | 0,9 |
| | Karweol + laurynowy | 0 |
| 1,4-dioksan:heksan 1:1 | Cytronellol + laurynowy | 66,7 |
| | Cykloheksanol + laurynowy | 45,1 |
| | Karweol + laurynowy | 1,1 |

4.2.6. Pojemność wodna grzybowego biokatalizatora

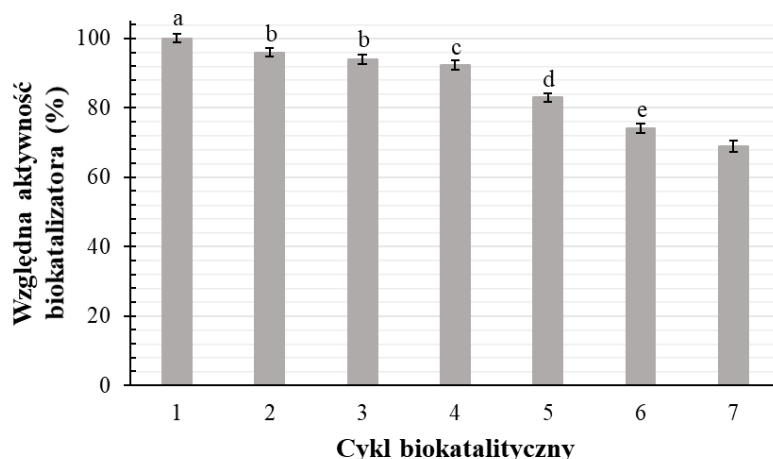
Estryfikacja jest reakcją równowagową w trakcie której, oprócz estru, powstaje woda. Zmienia ona równowagę reakcji w kierunku hydrolizy estru. Dlatego w kolejnym eksperymencie postanowiono określić pojemność wodną grzybowego katalizatora. Dodanie do układu wody w ilości do 5% v/w w stosunku do biokatalizatora skutkuje spadkiem wydajności konwersji cytronellołu do estru o niecałe 5% względem kontroli bezwodnej. Dalsze zwiększenie udziału wody w układzie do 15% v/w ilości grzybni powodowało spadek wydajności estryfikacji o około 16%. Dodatek 150%, 300% i 500% wody w stosunku do biokatalizatora powodował spadek konwersji substratów odpowiednio o 69%, 89% i 97% (Ryc. 31).



Rycina 31. Wpływ dodatku wody do reakcji estryfikacji na aktywność biokatalityczną grzybni *C. pannorum* A-1

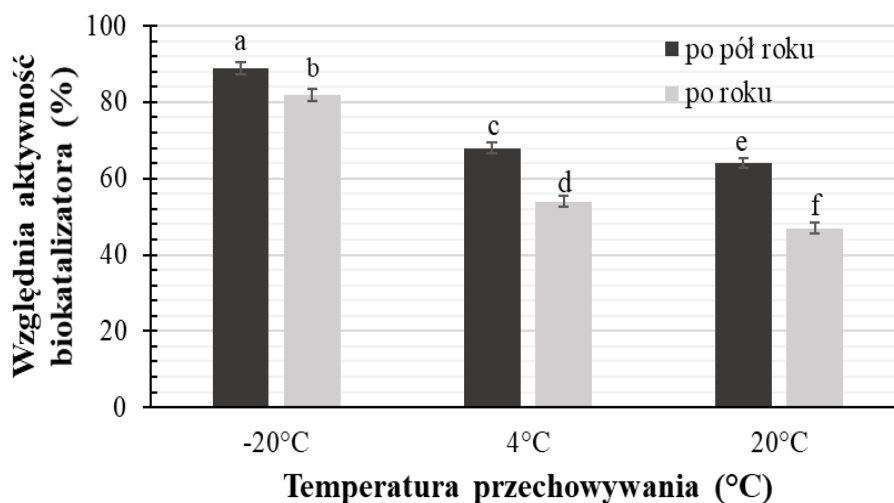
4.2.7. Stabilność operacyjna biokatalizatora oraz wpływ temperatury i czasu przechowywania biokatalizatora na aktywność katalityczną

Liofilizowana grzybnia *C. pannorum* A-1 zachowuje do 70% swojej wyjściowej aktywności po siedmiu 24-godz. cyklach biokatalitycznych. Największy spadek aktywności biokatalizatora (w stosunku do cyklu poprzedniego) odnotowano po czwartym i piątym cyklu katalitycznym (o 11%) (Ryc. 32).



Rycina 32. Stabilność operacyjna grzybni *C. pannorum* A-1 w kolejnych 24-godzinnych cyklach biokatalitycznych. Estryfikację prowadzono w optymalnych warunkach w 30°C. Wartości średnie z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

Po rocznym okresie przechowywania w -20°C grzybnia *C. pannorum* A-1 utraciła 18% swojej początkowej aktywności estryfikacyjnej. Istotny spadek aktywności biokatalitycznej był zauważalny w temp. 4°C i 20°C po 6 miesiącach (odpowiednio o 32% i 36%) oraz po 12 miesiącach przechowywania (odpowiednio o 46% i 54%) (Ryc. 33).



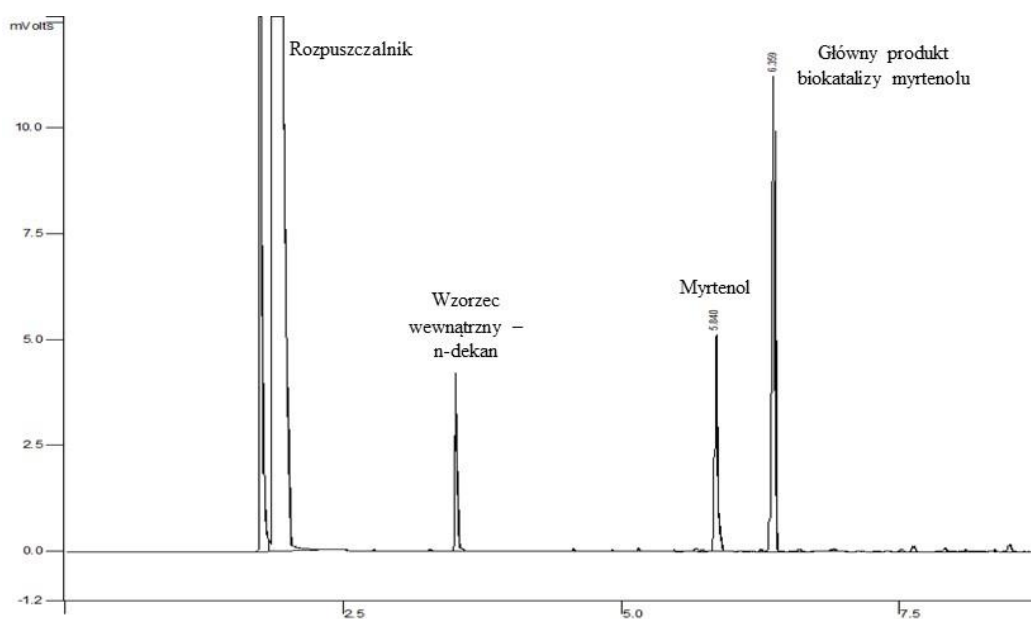
Rycina 33. Wpływ temperatury przechowywania na aktywność grzybni *C. pannorum* A-1 w reakcji estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego. Wartości średnie z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

4.3. Kataliza biomimetyczna

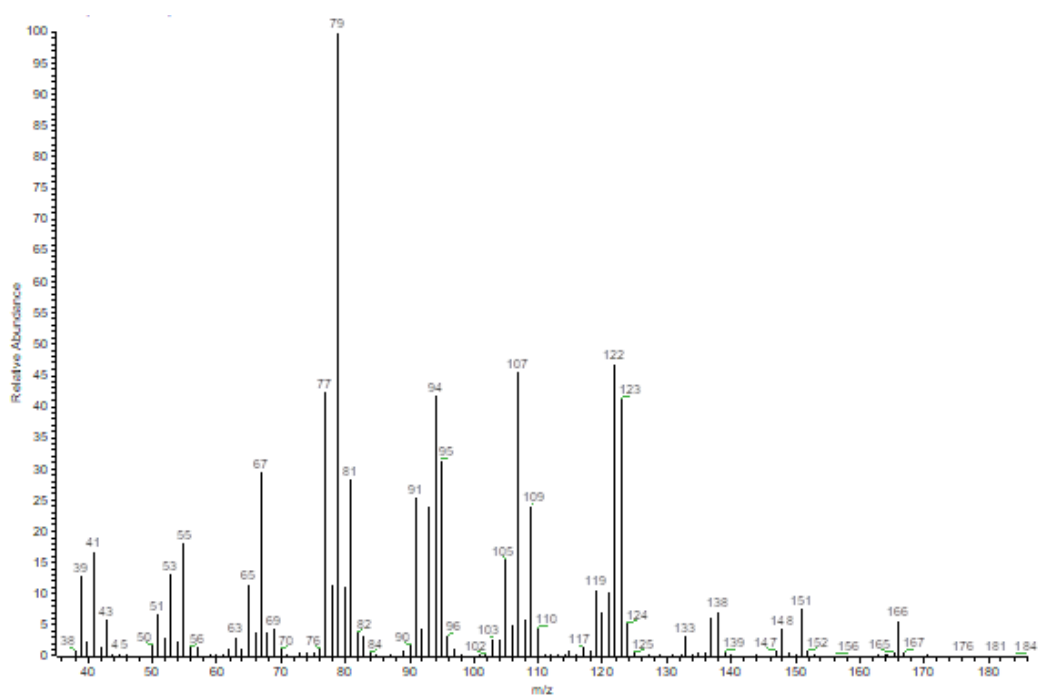
4.3.1. Kataliza biomimetyczna cytronellolu, alkoholu perylowego i myrtenolu przy użyciu porfiryń komercyjnych i pochodnych protoporfiryny IX

W biokatalizie związków terpenowych, oprócz białek enzymatycznych, można wykorzystać także porfiryń jako biomimetyki enzymów o aktywności oksygenazowej. W tej części badań przeprowadzono katalizę biomimetyczną pierwszorzędowych alkoholi

terpenowych – cytronellolu, alkoholu perylowego i myrtenolu z wykorzystaniem 9 porfiryn komercyjnych i 3 pochodnych protoporfiryny IX. Biotransformacja w układzie biomimetycznym zachodziła jedynie wówczas, gdy substratem dla porfiryn był bicykliczny myrtenol. We wszystkich układach porfiryńowych powstawał ten sam, niezidentyfikowany jak dotąd, główny produkt o czasie retencji (RT) = 6,4 min (Ryc. 34) i o jonie masowym 166 (MS), który wskazuje na włączenie atomu tlenu do struktury myrtenolu (Ryc. 35).



Rycina 34. Przykładowy chromatogram uzyskany po biomimetycznej katalizie myrtenolu



Rycina 35. Widmo masowe głównego produktu utleniania myrtenolu o czasie retencji RT = 6,4 min.

Najwyższą konwersję molową myrtenolu do nowego produktu po 4 godz. (13,2%) uzyskano z wykorzystaniem komercyjnej tetrafenyloporfiryny (H₂TPP). Wysoką aktywność katalityczną względem myrtenolu wykazywały także H₂TPPOMe (11,9%), PPIX[P(O)(OEt)₂]₂ (9,8%), H₂TAlxPP (9,4%) i H₂OEP (9,1%). Porfiryny posiadające w swojej cząsteczce atom metalu charakteryzowały się niską aktywnością biokatalizy myrtenolu (ZnTPyP – 3,1%) lub jej w ogóle nie wykazywały (ZnTPP, Fe^{III}(TPP)Cl, Fe^{III}(TF₅PP)Cl) (Tab. 24). W kolejnym etapie badań przeprowadzono fotokatalityczne utlenienie myrtenolu do nowego produktu w ciągu 24 godzin z wykorzystaniem porfiryn wykazujących aktywność wobec bicyklicznego alkoholu terpenowego.

Tabela 24. Konwersja molowa alkoholi terpenowych (%) w układzie biomimetycznym z wykorzystaniem porfiryn komercyjnych i pochodnych protoporfiryny IX

| Konwersja molowa substratu (%) po 4 godz. | | | |
|--|--------------------------|------------------|-------------|
| Porfiryra | Myrtenol | Alkohol perylowy | Cytronellol |
| H ₂ OEP | 9,1 ± 0,20 ^a | 0 | 0 |
| H ₂ TPP | 13,2 ± 0,40 ^b | 0 | 0 |
| ZnTPP | 0 | 0 | 0 |
| ZnTPyP | 3,1 ± 0,30 ^c | 0 | 0 |
| Fe ^{III} (TPP)Cl | 0 | 0 | 0 |
| H ₂ TF ₅ PP | 7,6 ± 0,30 ^d | 0 | 0 |
| H ₂ TPPOMe | 11,9 ± 0,32 ^e | 0 | 0 |
| Fe ^{III} (TF ₅ PP)Cl | 0 | 0 | 0 |
| H ₂ TAlxPP | 9,4 ± 0,40 ^a | 0 | 0 |
| PPIX(Me) ₂ | 0,9 ± 0,38 | 0 | 0 |
| PPIX(OH) ₂ | 6,6 ± 0,80 ^d | 0 | 0 |
| PPIX[P(O)(OEt) ₂] ₂ | 9,8 ± 0,40 ^a | 0 | 0 |

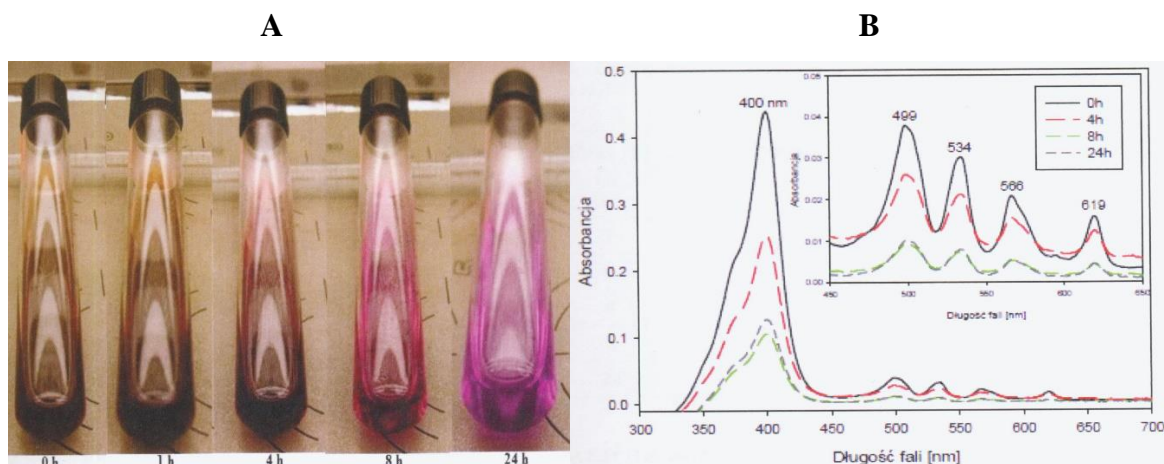
Wartości średnie dla konwersji molowej myrtenolu z różnymi literami w indeksie górnym oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

4.3.2. Dobór porfiryny do katalizy biomimetycznej myrtenolu

W trakcie badań nad selekcją katalizatora porfirynewego określono stopień konwersji molowej myrtenolu po 4, 8, 12 i 24 godz. oraz określono stabilność porfiryn w trakcie reakcji poprzez pomiar widma absorpcji UV-Vis. Monitorowano także zmianę barwy mieszaniny w trakcie i po zakończeniu reakcji, która może wskazywać na zmianę formy katalizatora.

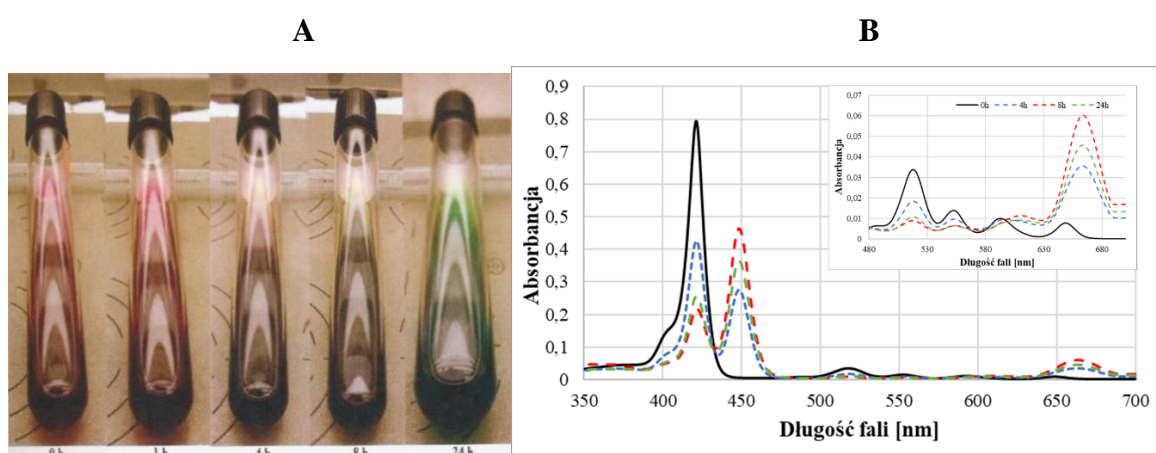
Biokataliza myrtenolu do głównego produktu o czasie retencji RT = 6,4 min. z wykorzystaniem H₂OEP zachodzi z wydajnością 9,5%, 20,2%, 37,4% i 48,9% odpowiednio po 4, 8, 12 i 24 godz. trwania reakcji. Po 24 godz. naświetlania powstaje także drugi niezidentyfikowany produkt o czasie retencji RT = 7,5 min. (Tab. 26) z wydajnością 6,6%. W trakcie naświetlania nastąpiła zmiana barwy mieszaniny z ciemnobrunatnej na

jasnofioletową (Ryc. 36A). Po 24 godz. naświetlania, poza niższą intensywnością pasm absorpcji, nie odnotowano zauważalnej zmiany widma H₂OEP (Ryc. 36B).



Rycina 36. Zmiana barwy H₂OEP po 1, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)

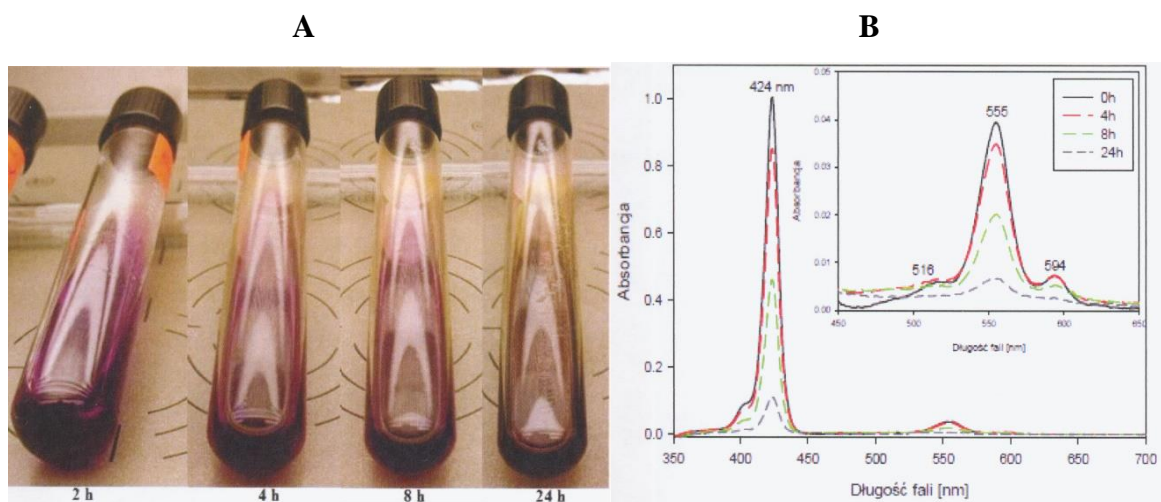
Naświetlanie tetrafenyloporfiryny (H₂TPP) w obecności myrtenolu skutkowało systematycznym zwiększaniem konwersji substratu do produktu o RT = 6,4 min. Po 4 godz. katalizy uzyskano 12,5% konwersję, po 8 godz. – 18,8%, po 12 godz. – 27,1%, a po 24 godz. – 66,2%. Podobnie jak w przypadku porfiryny H₂OEP, po dobie naświetlania powstaje także produkt o RT = 7,5 min., jednak ze śladową wydajnością (0,01%). Tetrafenyloporfiryne zmienia swoją barwę w trakcie naświetlania z myrtenolem z ciemnofioletowej na zieloną (Ryc. 37A). Widoczna jest zmiana widma absorpcji w trakcie reakcji – szczególnie przesunięcie pasma Soreta w stronę fal dłuższych oraz zmiany w zakresie pasma Q (Ryc. 37B).



Rycina 37. Zmiana barwy H₂TPP po 1, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)

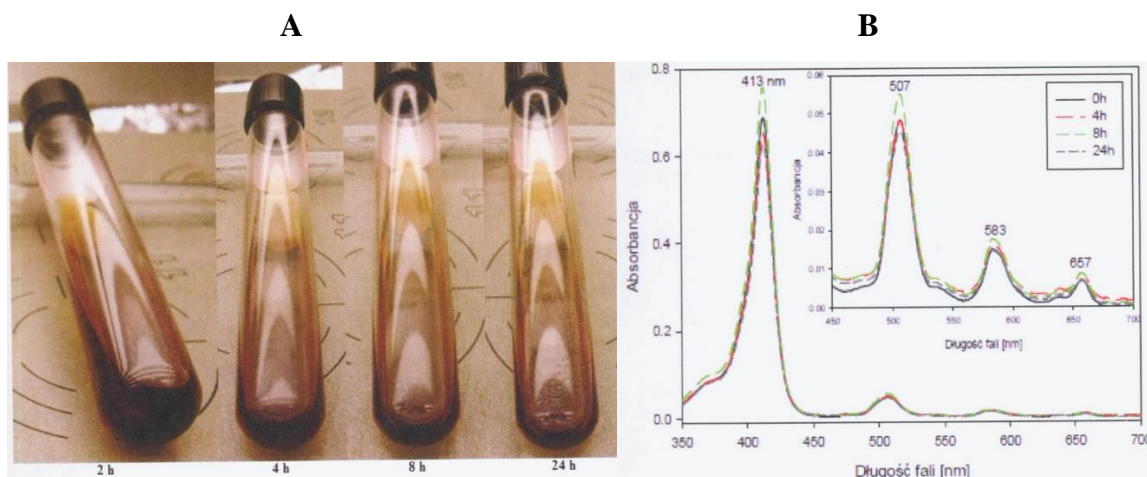
Tetrafenyloporfiryne cynku (ZnTPyP) charakteryzuje się stosunkowo niską aktywnością fotokatalityczną wobec myrtenolu. Po 4 godz. reakcji uzyskano 2,8% konwersji

substratu do produktu o RT = 6,4 min. Wydłużenie czasu katalizy biomimetycznej do 24 godz. prowadzi do uzyskania wydajności na poziomie 23%. W trakcie trwania reakcji nie odnotowano powstawania produktu o czasie retencji 7,5 min. Mieszanka reakcyjna z ZnTPyP nie zmieniała swojej barwy w trakcie fotokatalizy (Ryc. 38A), jednak intensywności pasm na widmie absorpcji po zakończeniu reakcji wskazują na fotodegradację biokatalizatora (Ryc. 38B).



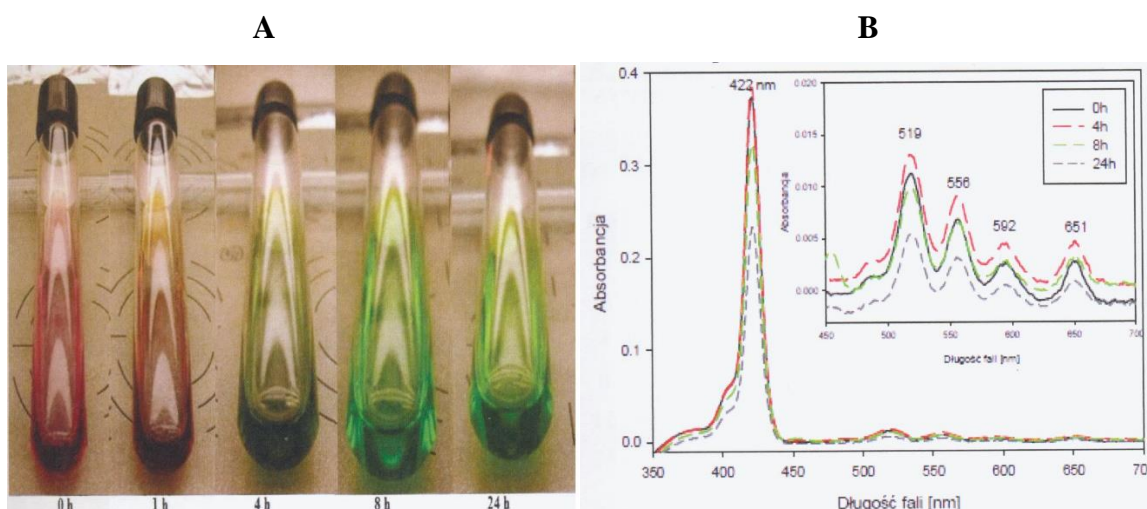
Rycina 38. Zmiana barwy ZnTPyP po 2, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)

Wysoką aktywność fotokonwersji myrtenolu wykazuje pentafluorofenylporfiryra (H_2TF_5PP). Biokataliza substratu do głównego produktu o RT = 6,4 min. zachodzi z wydajnością 8,1%, 18,6%, 27,9% i 51,7% odpowiednio po 4, 8, 12 i 24 godz. reakcji. Odnotowano powstawanie drugiego produktu o RT = 7,5 min. po 12 i 24 godz. naświetlania ze śladową wydajnością odpowiednio 0,003% i 0,02%. H_2TF_5PP charakteryzuje się wysoką stabilnością w trakcie naświetlania. Świadczy o tym brak zmiany zabarwienia mieszaniny (Ryc. 39A) i brak istotnych zmian w widmie absorpcji porfiryry po 24-godz. reakcji (Ryc. 39B).



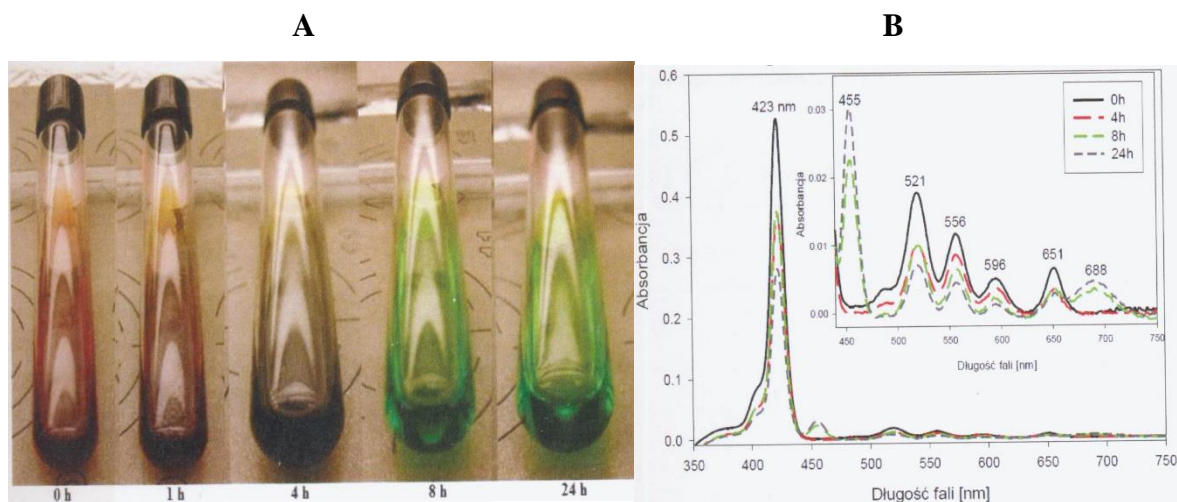
Rycina 39. Barwy H_2TF_5PP po 2, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)

Metoksyfenyloporfiryra ($H_2TPPOMe$) wykazuje jedną z najwyższych aktywności w fotokatalizie trwającej do 12 godz. Wydłużenie katalizy biomimetycznej z 12 do 24 godz. skutkuje zwiększeniem konwersji myrtenolu do głównego produktu o $RT = 6,4$ min. tylko o 3,8% (z 28,9% do 32,7%). Metoksyfenyloporfiryra wykazuje najwyższą konwersję myrtenolu do drugiego produktu o $RT = 7,5$ min. po 24 godz. naświetlania (12,9%) (Tab. 26). Zmiana barwy katalizatora z ciemnoczerwonej na ciemnopomarańczową następuje już po 1 godz. reakcji (Ryc. 40A). Po dobie naświetlania roztwór z porfiryną przybiera barwę jasnozieloną. Na widmach porfiryny po 8 i 24 godz. katalizy pojawia się nowe pasmo przy 453 nm, poza tym obserwuje się zmniejszenie intensywności pasma Soreta i pasm Q (Ryc. 40B).



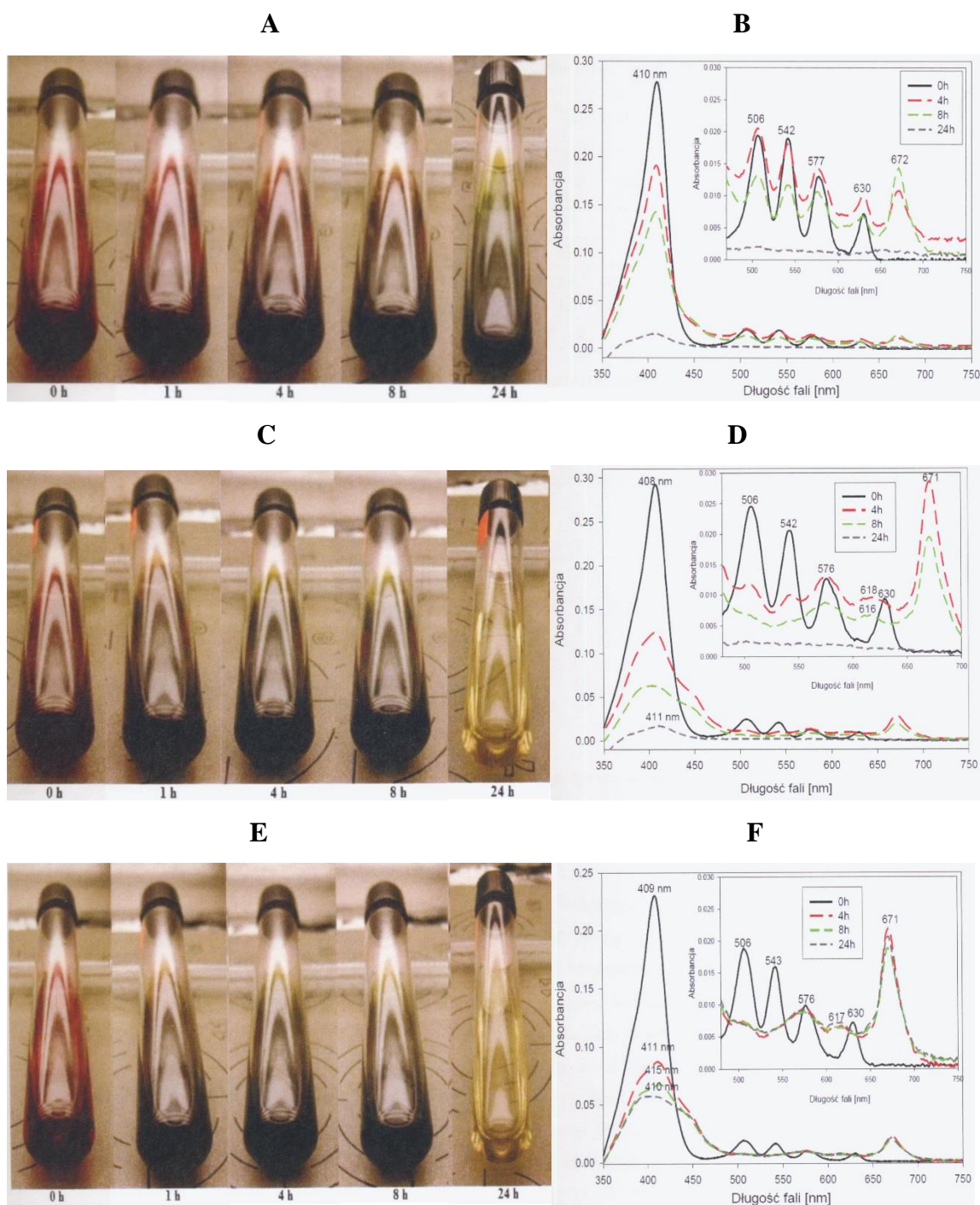
Rycina 40. Zmiana barwy $H_2TPPOMe$ po 1, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)

Ostatnia z porfiryn komercyjnych – H₂TAlxPP katalizuje konwersję myrtenolu do produktu o RT = 6,4 min. z wydajnością 9,8%, 19,3%, 27,3% i 35,7% odpowiednio po 4, 8, 12 i 24 godz. naświetlania. Po dobie katalizy biomimetycznej powstaje drugi produkt o RT = 7,5 min. w ilości 8,5%. Podobnie jak w przypadku metoksyfenyloporfiryryny, H₂TAlxPP zmienia swoją barwę na jasnozieloną po 24-godz. naświetlaniu (Ryc. 41A). Analiza widma absorpcji UV-Vis wskazuje na pojawienie się dwóch nowych pasm przy 455 i 688 nm po 8 godz. naświetlania (Ryc. 41B).



Rycina 41. Zmiana barwy H₂TAlxPP po 1, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)

Wśród pochodnych protoporfiryryny IX najwyższą aktywnością w fotokatalizie myrtenolu do produktu o RT = 6,4 min. charakteryzowała się fosfonianowa pochodna protoporfiryryny IX (PPIX[P(O)(OEt)₂]₂). Otrzymano produkt z wydajnością 44,7% po 24 godz. katalizy. Hydroksylowa pochodna PPIX charakteryzowała się 37,9% konwersją myrtenolu, a metylowa 17,5% do produktu o RT = 6,4 min. po 24-godz. czasie naświetlania. Wszystkie badane pochodne protoporfiryryny IX wykazują niską stabilność chemiczną w czasie 24 godz. reakcji, o czym świadczą zasadnicze zmiany w widmach absorpcji UV-Vis (Ryc. 42B, 42D, 42F). Najwyższą stabilnością pomiędzy 4 a 24 godz. reakcji charakteryzowała się PPIX[P(O)(OEt)₂]₂.



Rycina 42. Zmiana barwy PPIX(Me)₂ (A), PPIX(OH)₂ (C) i PPIX[P(O)(OEt)₂]₂ (E) po 1, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji PPIX(Me)₂ (B), PPIX(OH)₂ (D) i PPIX[P(O)(OEt)₂]₂ (F) po 4, 8 i 24 godz. reakcji

Podsumowując, najwyższą konwersję molową myrtenolu do nowego produktu o czasie retencji = 6,4 min. po 24 godz. biokatalizy otrzymano przy użyciu tetrafenyloporfiryny (66,2%). Konwersją substratu na poziomie około 50% po dobie reakcji charakteryzują się H₂TF₅PP (51,7%), H₂OEP (48,9%) i PPIX[P(O)(OEt)₂]₂ (44,7%).

Pozostałe porfiryny katalizują fotoutlenienie myrtenolu z wydajnością poniżej 40% (Tab. 25).

Tabela 25. Konwersja molowa myrtenolu (%) w układzie biomimetycznym do głównego produktu o czasie retencji RT = 6,4 min

| Porfiryra | Konwersja molowa myrtenolu (%) do produktu o RT = 6,4 min | | | |
|--|---|------------|------------|--------------------------|
| | 4 godz. | 8 godz. | 12 godz. | 24 godz. |
| H ₂ OEP | 9,5 ± 1,2 | 20,2 ± 0,9 | 37,4 ± 0,5 | 48,9 ± 0,4 ^a |
| H ₂ TPP | 12,5 ± 0,2 | 18,8 ± 0,5 | 27,1 ± 0,8 | 66,2 ± 1,7 ^b |
| ZnTPyP | 2,8 ± 0,2 | 5,8 ± 0,6 | 11,3 ± 0,2 | 23,0 ± 0,3 ^c |
| H ₂ TF ₅ PP | 8,1 ± 0,2 | 18,6 ± 0,1 | 27,9 ± 0,4 | 51,7 ± 1,9 ^a |
| H ₂ TPPOMe | 10,9 ± 0,3 | 25,7 ± 1,5 | 28,9 ± 0,1 | 32,7 ± 0,9 ^d |
| H ₂ TAlxPP | 9,8 ± 0,3 | 19,3 ± 0,4 | 27,3 ± 0,3 | 35,7 ± 1,2 ^{de} |
| PPIX(Me) ₂ | 0,7 ± 0,3 | 2,1 ± 0,3 | 4,5 ± 0,4 | 17,5 ± 0,9 ^f |
| PPIX(OH) ₂ | 5,9 ± 0,6 | 12,7 ± 0,4 | 19,9 ± 0,4 | 37,9 ± 2,1 ^e |
| PPIX[P(O)(OEt) ₂] ₂ | 9,9 ± 0,4 | 17,9 ± 0,7 | 26,4 ± 1,1 | 44,7 ± 1,6 ^g |

Wartości średnie dla konwersji molowej myrtenolu po 24 godz. z różnymi literami w indeksie górnym oznaczają różnice istotne statystycznie przy p < 0,05.

W tabeli 26 przedstawiono wydajność fotokonwersji myrtenolu do produktu o czasie retencji 7,5 min po 24 godz. naświetlania.

Tabela 26. Konwersja molowa myrtenolu (%) w układzie biomimetycznym do produktu o czasie retencji RT = 7,5 min

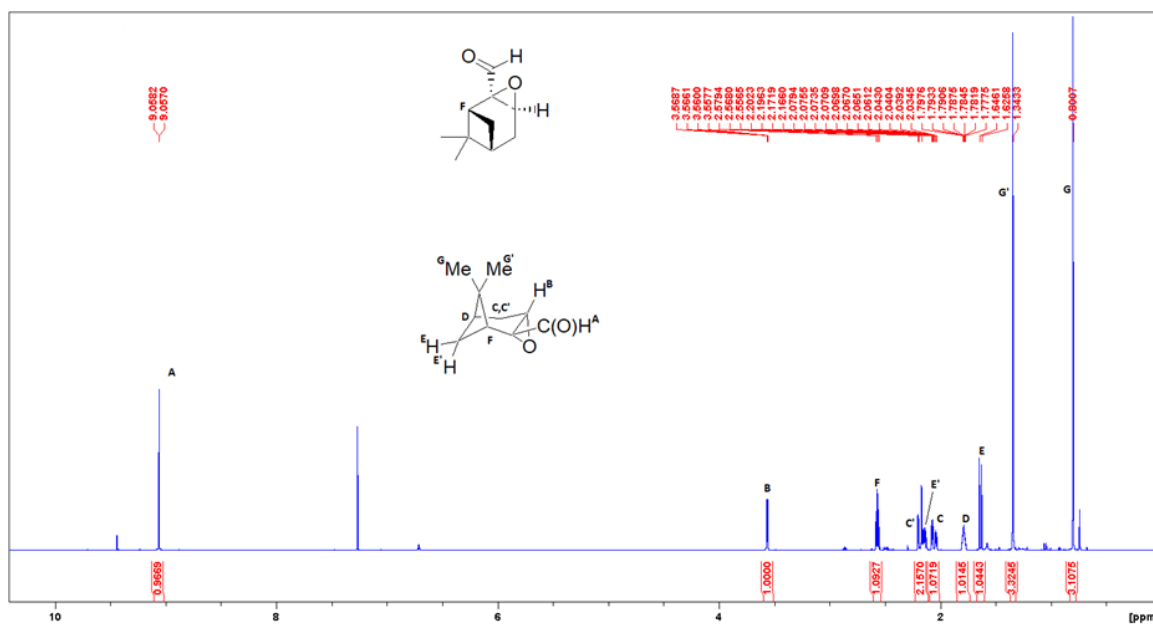
| Porfiryra | Konwersja molowa myrtenolu (%) do produktu o RT = 7,5 min |
|--|---|
| | po 24 godz. naświetlania |
| H ₂ OEP | 6,60 ± 0,21 ^c |
| H ₂ TPP | 0,01 ± 0,005 ^d |
| ZnTPyP | 0 |
| H ₂ TF ₅ PP | 0,02 ± 0,01 ^d |
| H ₂ TPPOMe | 12,9 ± 1,20 ^a |
| H ₂ TAlxPP | 8,5 ± 0,98 ^b |
| PPIX(Me) ₂ | 0 |
| PPIX(OH) ₂ | 0 |
| PPIX[P(O)(OEt) ₂] ₂ | 0 |

Wartości średnie dla konwersji molowej myrtenolu z różnymi literami w indeksie górnym oznaczają różnice istotne statystycznie przy p < 0,05.

4.3.3. Analiza magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) tlenku myrtenalu – nowego produktu utleniania myrtenolu

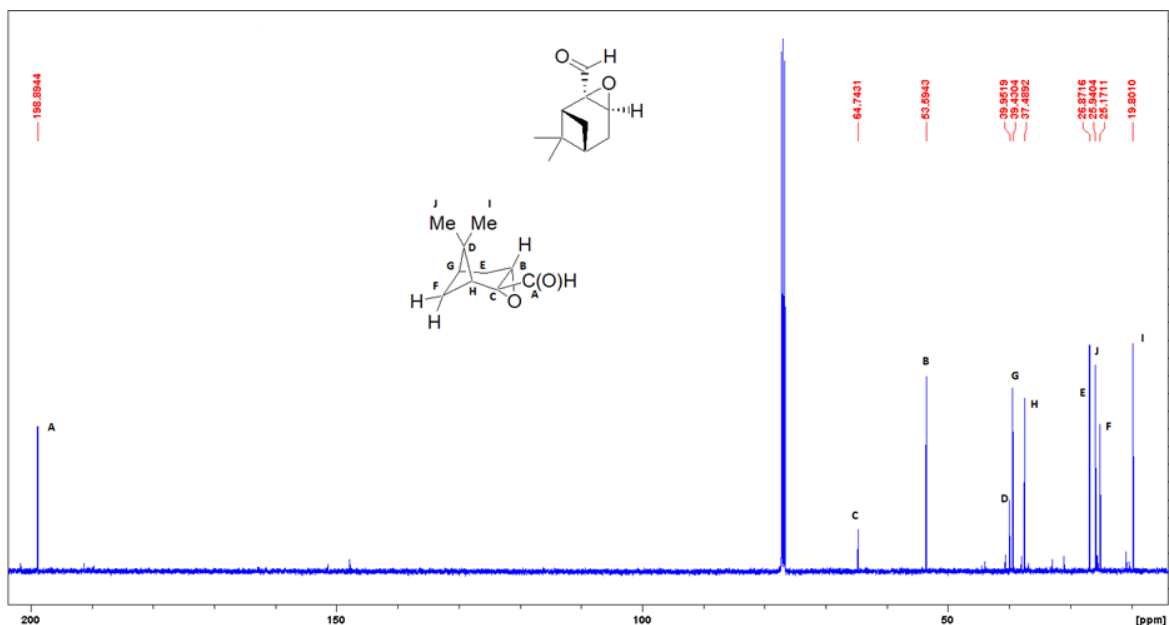
W celu określenia struktury nieznanego produktu o RT = 6,4 min. przeprowadzono biomimetyczną katalizę myrtenolu z użyciem tetrafenylporfiryny przez 24 godz. Po zakończeniu reakcji z mieszaniny wyizolowano produkt zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 3.4.17., po czym przeprowadzono analizę NMR. Analiza widm ¹H i ¹³C NMR wskazuje, że głównym produktem utleniania myrtenolu przy użyciu H₂TPP jest tlenek myrtenalu.

W widmie ^1H NMR można zaobserwować charakterystyczne przesunięcie chemiczne (9 ppm) protonu z grupy aldehydowej ze stałą sprzężenia $J_{\text{H-H}} = 0,6$ Hz (Ryc. 43). Sygnał protonu znajdującego się przy mostku epoksydowym znajduje się przy 3,56 ppm. Pełny opis widma protonowego przedstawia się następująco: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 9,06 (d, $J_{\text{H-H}} = 0,6$ Hz, 1H), 3,56 (dd, $J_{\text{H-H}} = 1,3$ Hz, $J_{\text{H-H}} = 2,9$ Hz, 1H), 2,57 (dd, $J_{\text{H-H}} = 5,7$ Hz, $J_{\text{H-H}} = 5,8$ Hz, 1H), 2,16-2,21 (m, 1H), 2,12-2,18 (m, 1H), 2,03-2,09 (m, 1H), 1,76-1,82 (m, 1H), 1,64 (d, $J_{\text{H-H}} = 10,5$ Hz, 1H), 1,34 (s, 3H), 0,80 (s, 3H).



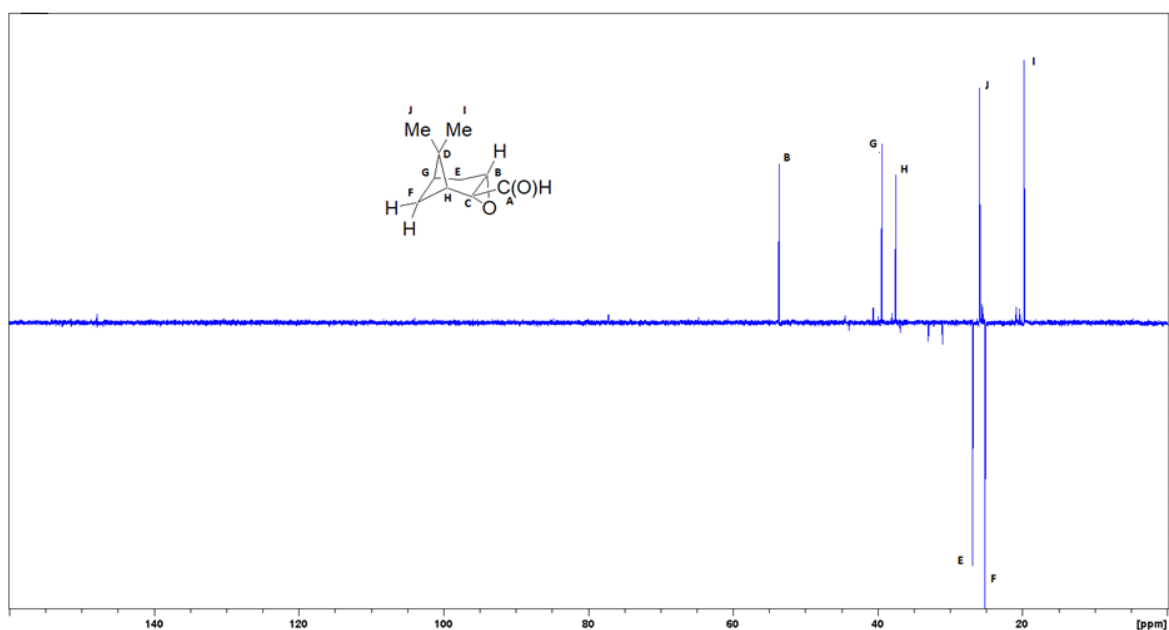
Rycina 43. Widmo ^1H NMR tlenku myrtenalu

Analiza widma ^{13}C NMR wskazuje na obecność 10-ciu atomów węgla w cząsteczce tlenku myrtenalu. Sygnał pochodzący od węgla wchodzącego w skład grupy aldehydowej znajduje się przy 198,9 ppm. Pełny opis widma węglowego przedstawia się następująco: ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 198,9, 64,7, 53,6, 40,0, 39,4, 37,5, 26,9, 25,2, 25,9, 19,8 (Ryc. 44).



Rycina 44. Widmo ^{13}C NMR tlenku myrtenalu

Porównanie widma $^{135}\text{DEPT}$ (Ryc. 45) i ^{13}C NMR (Ryc. 44) wskazuje na obecność dwóch czwartorzędowych (C i D) i dwóch drugorzędowych (E i F) atomów węgla w bicyklicznym pierścieniu tlenku myrtenalu. Atomy węgla oznaczone literami B, G, H, J i I są trzeciorzędowe.



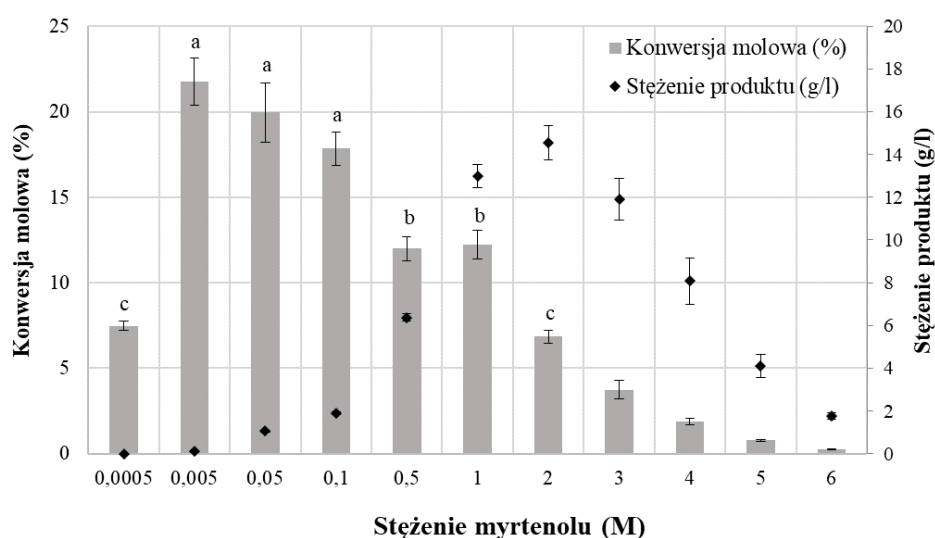
Rycina 45. Widmo $^{135}\text{DEPT}$ NMR tlenku myrtenalu

Analiza widm 2D NMR COSY (suplement ryc. 57), HMBC (suplement ryc. 58) i HSQC (suplement ryc. 59) potwierdziła strukturę tlenku myrtenalu, a analiza widma NOESY NMR pozwoliła na ustalenie względem siebie pozycji przestrzennej protonów (suplement ryc. 60).

W kolejnym etapie przeprowadzono optymalizację warunków fotokatalitycznej konwersji myrtenolu do tlenku myrtenalu. Wykorzystano tetrafenyloporfiryne jako katalizator biomimetyczny ze względu na najwyższą aktywność spośród badanych porfiryn oraz względnie wysoką stabilność.

4.3.4. Optymalizacja warunków katalizy biomimetycznej myrtenolu

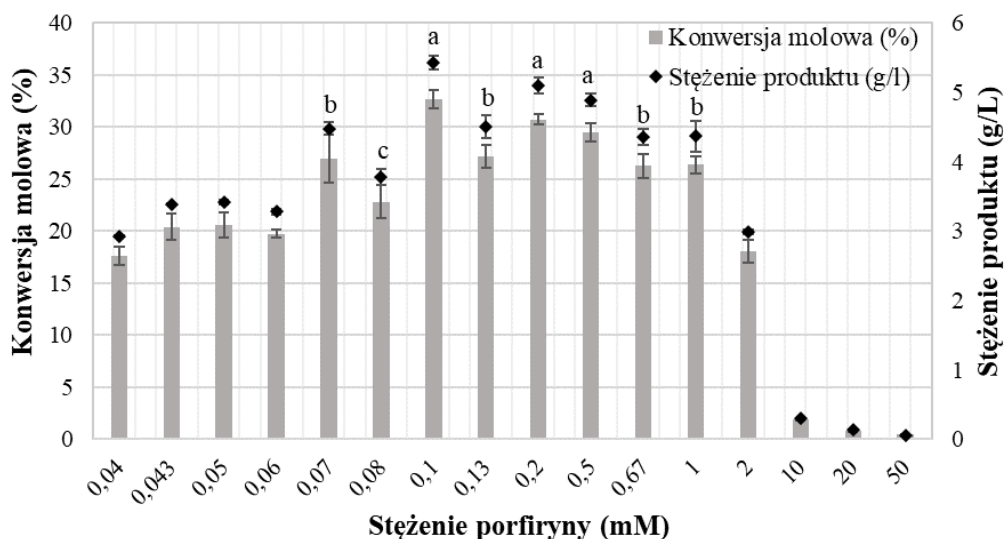
Najwyższą konwersję molową myrtenolu do tlenku myrtenalu (17,42%) osiągnięto przy 0,005 mM wyjściowym stężeniu substratu (Ryc. 46). Z kolei najwyższe końcowe stężenie produktu (18,2 g/L) w mieszaninie poreakcyjnej uzyskano przy 2 M stężeniu myrtenolu. Wraz ze wzrostem stężenia substratu powyżej 0,005 mM spada jego stopień konwersji molowej do tlenku myrtenalu. Z drugiej strony zwiększenie początkowego stężenia myrtenolu do 2 M skutkuje zwiększeniem uzyskiwanego stężenia produktu w g/L w mieszaninie poreakcyjnej. Powyżej tego stężenia nie obserwowano wzrostu, lecz spadek ilości uzyskiwanego tlenku myrtenalu. Do dalszych etapów optymalizacyjnych wybrano stężenie myrtenolu równe 0,1 M ze względu na wysoką konwersją molową substratu do produktu (14,3%) przy stężeniu w mieszaninie poreakcyjnej wynoszącym 2,5 g/L.



Rycina 46. Wpływ stężenia substratu na wydajność biokatalizy myrtenolu. Reakcję prowadzono w chloroformie przy 0,57 mM stężeniu H₂TPP przez 12 godz. Wartości średnie konwersji molowej z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy p<0,05

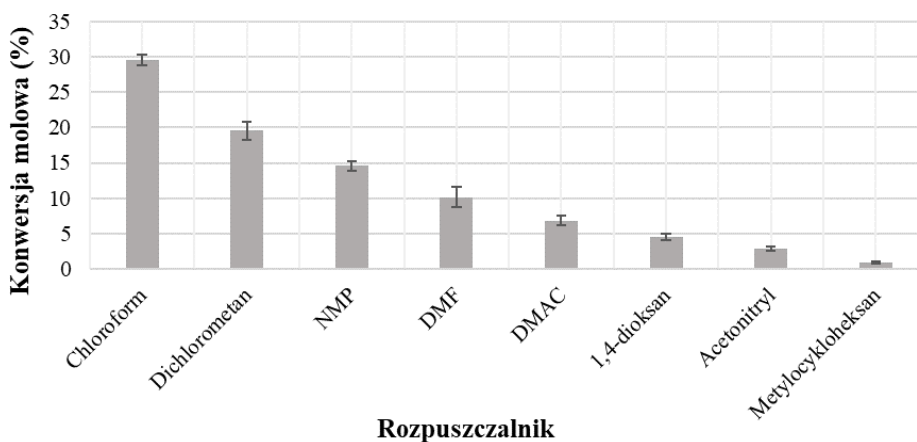
Kolejnym etapem optymalizacji biomimetycznej katalizy myrtenolu było określenie optymalnego stężenia tetrafenyloporfiryny. Zbadano wpływ biokatalizatora w zakresie 0,04 – 50 mM. Najwyższą konwersję molową myrtenolu do tlenku myrtenalu (30,8 – 32,7%) odnotowano w zakresie stężeń H₂TPP 0,1 – 0,5 mM (Ryc. 47). Stopień konwersji molowej wzrastał wraz ze wzrostem stężenia porfiryny do wartości 0,1 mM. Zwiększenie ilości

katalizatora biomimetycznego powyżej 2 mM powoduje drastyczny spadek wydajności fotoutleniania myrtenolu do tlenku myrtenalu. Do dalszych etapów optymalizacyjnych wybrano 0,2 mM stężenie H₂TPP.



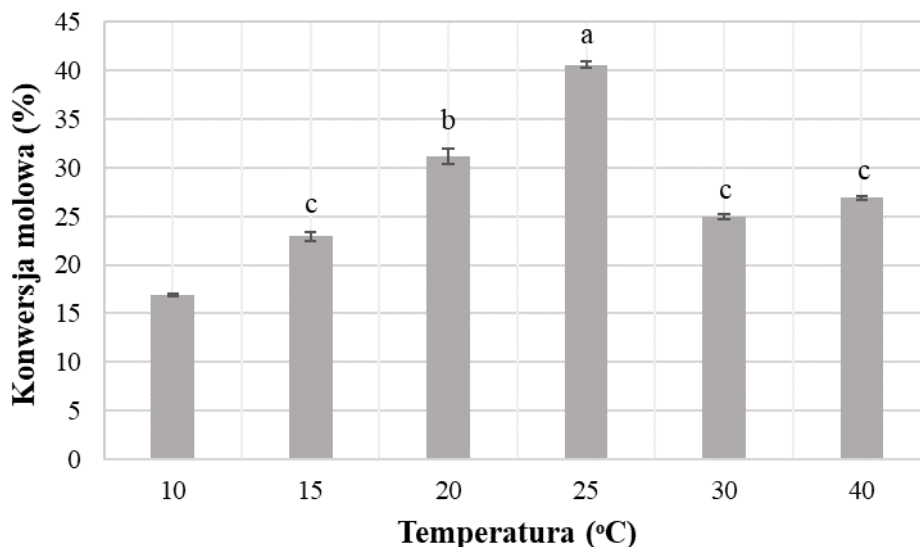
Rycina 47. Wpływ stężenia tetrafenyloporfiryny na wydajność biokatalizy myrtenolu. Reakcję prowadzono w chloroformie przy 0,1 M stężeniu myrtenolu przez 12 godz. Wartości średnie z małymi literkami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

W następnym etapie optymalizacji fotoutleniania myrtenolu określono wpływ rozpuszczalnika organicznego na wydajność biotransformacji. Najwyższą konwersję molową substratu do produktu (29,6%) uzyskano w chloroformie (Ryc. 48). Konwersję molową myrtenolu do tlenku myrtenalu powyżej 10% uzyskano w dichlorometanie (19,6%), NMP (14,6%) i DMF (10,1%). Tetrafenyloporfiryna wykazuje aktywność biokatalityczną poniżej 5% w 1,4-dioksanie (4,5%), acetonitrylu (2,8%) i metylocykloheksanie (0,9%).



Rycina 48. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na wydajność biokatalizy myrtenolu. Reakcję z 0,1 M stężeniem myrtenolu i 0,2 mM stężeniem H₂TPP prowadzono przez 12 godz.

Czynnikiem mającym istotny wpływ na wydajność reakcji biokatalitycznych jest także temperatura. W ostatnim kroku optymalizacyjnym przeprowadzono fotokatalizę myrtenolu do tlenku myrtenalu przy użyciu H₂TPP w temperaturze od 10 do 40°C. Najwyższą wydajność (40,6%) biotransformacji myrtenolu uzyskano w 25°C, natomiast najniższą (16,9%) w temperaturze 10°C (Ryc. 49). Prowadzenie fotoutleniania myrtenolu w temperaturze 30°C i 40°C skutkuje spadkiem konwersji molowej substratu odpowiednio o 38% i 32% w porównaniu do reakcji prowadzonej w optymalnej temperaturze 25°C.



Rycina 49. Wpływ temperatury na wydajność utleniania myrtenolu do tlenku myrtenalu przy użyciu H₂TPP. Reakcję prowadzono w chloroformie z 0,1 M stężeniem substratu i 0,2 mM stężeniem H₂TPP przez 12 godz. Wartości średnie z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy p<0,05

Podsumowując badania nad optymalizacją fotoutleniania myrtenolu w układzie biomimetycznym do tlenku myrtenalu można stwierdzić, że biokataliza do tlenku myrtenalu zachodzi z największą wydajnością przy 0,1 M stężeniu myrtenolu, 0,2 mM stężeniu tetrafenyloporfiryny w chloroformie, w temperaturze 25°C. W kolejnych eksperymentach postanowiono określić mechanizm biomimetycznej katalizy utleniania myrtenolu przy użyciu H₂TPP.

4.3.5. Mechanizm biomimetycznej katalizy myrtenolu

Określenie mechanizmu biomimetycznego utleniania myrtenolu do tlenku myrtenalu w układzie fotokatalitycznym rozpoczęto od zastosowania w roli substratów związków, które cechują się podobnym ułożeniem grupy hydroksylowej względem wiązania podwójnego (patrz Ryc. 12), jak ma to miejsce w cząsteczce myrtenolu. Reakcję prowadzono w zoptymalizowanych uprzednio warunkach. Nie uzyskano żadnych

produktów utlenienia badanych substratów w układzie stosowanym do biokatalizy myrtenolu. Przy zastosowaniu myrtenalu lub tlenku α -pinenu jako substratu, również nie otrzymano tlenku myrtenalu, ani innych produktów utleniania.

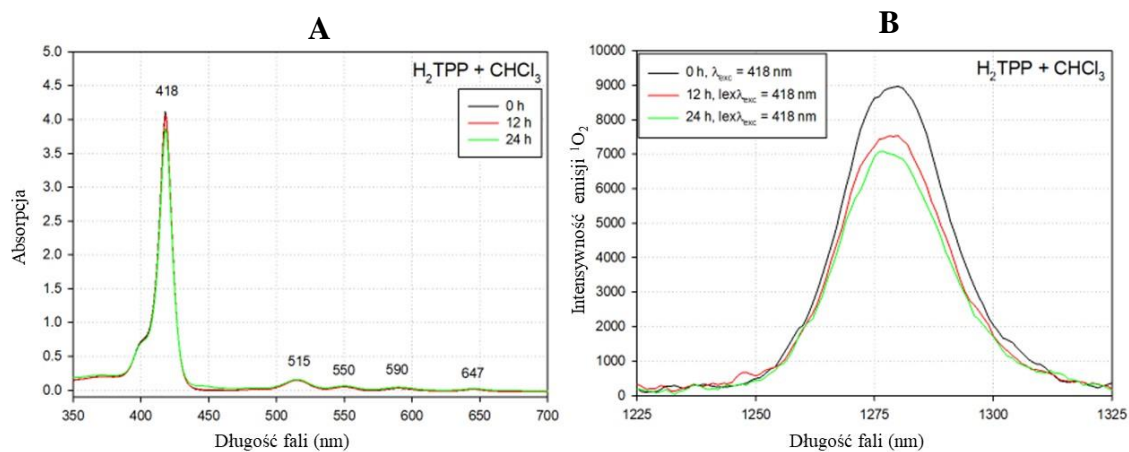
Określono zależność wydajności fotokatalitycznego utleniania myrtenolu od długości fali światła widzialnego poprzez przeprowadzenie fotokatalizy z zastosowaniem filtrów transmisji optycznej przy tym samym poziomie natężenia światła. Wyniki przedstawione w tabeli 27 wskazują, że fotoutlenianie myrtenolu do tlenku myrtenalu przebiega z najwyższą wydajnością 45,5% w całym zakresie długości fal światła widzialnego. Tetrafenylporfiryryna wykazuje podobną aktywność katalityczną w zakresie długości fal 425 – 600 nm. Co istotne, zastosowanie w fotoooksydacji światła o długości fali powyżej 650 nm skutkuje istotnym spadkiem aktywności katalitycznej porfiryryny.

Tabela 27. Zależność właściwości katalitycznych H₂TPP od długości fali światła widzialnego w reakcji utleniania myrtenolu

| Filtr transmisji optycznej (λ) | Konwersja molowa myrtenolu (%) |
|--|---------------------------------------|
| Brak filtra, pełne spektrum światła | 45,5 ± 2,1 ^a |
| 425 nm | 36,1 ± 1,6 ^b |
| 525 nm | 40,6 ± 3,2 ^b |
| 550 nm | 41,9 ± 2,4 ^b |
| 600 nm | 35,1 ± 1,8 ^b |
| 650 nm | 15,2 ± 2,6 ^c |
| 700 nm | 11,4 ± 1,3 ^c |

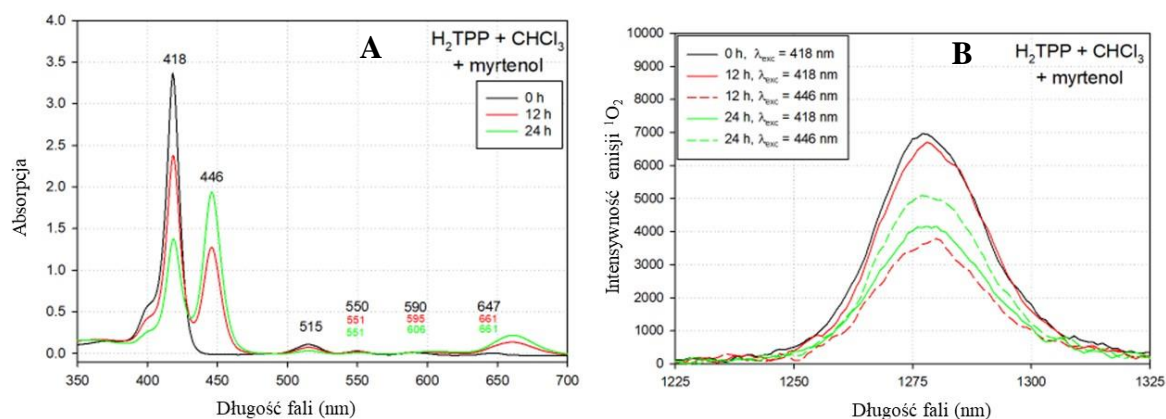
Średnie dla wyznaczonych wartości z różnymi literami w indeksie górnym oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

W celu określenia wpływu reaktywnych form tlenu na przebieg fotoooksydacji, zarejestrowano widma absorpcji UV-Vis porfiryryny i widma emisji fosforescencji ¹O₂ w chloroformie po 0, 12 i 24 godz. naświetlania. Na podstawie widma absorpcji można stwierdzić, że H₂TPP bez obecności myrtenolu wykazuje wysoką stabilność (Ryc. 50A) oraz zdolność do generowania tlenu singletowego (Ryc. 50B) w chloroformie, który jest środowiskiem fotokatalizy.



Rycina 50. Widmo absorpcji H₂TPP w chloroformie (A) i widmo emisji fosforescencji ¹O₂ generowanego przez wzbudzenie H₂TPP światłem o $\lambda = 418$ nm, po 0, 12 i 24 godz. naświetlania

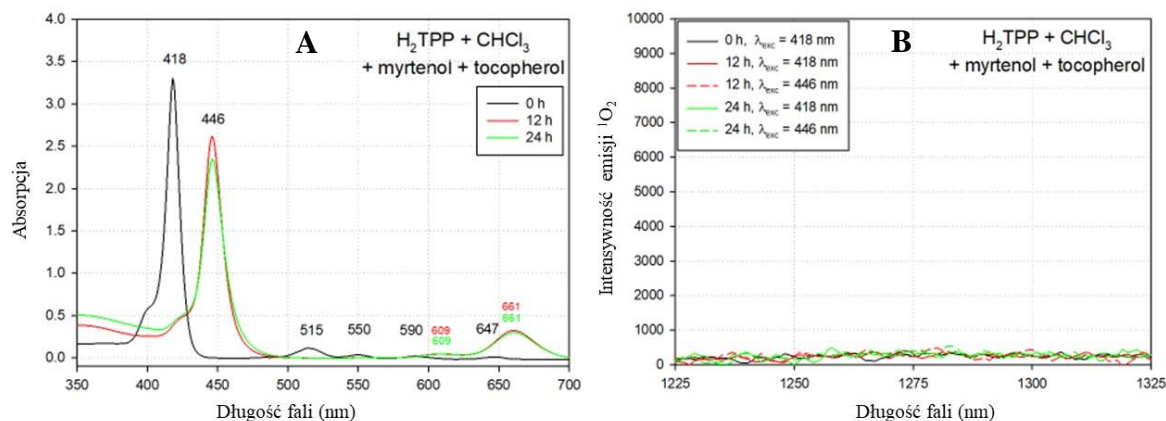
Naświetlanie porfiryny w obecności myrtenolu prowadzi do zmniejszenia intensywności pasma Soreta 418 nm i pojawienia się nowego pasma o długości fali 446 nm. Obserwowano również pojawianie się nowego pasma przy długości fali 661 nm (Ryc. 51A). W związku z pojawieniem się nowego pasma przy 446 nm, określono widmo fosforescencji tlenu singletowego indukowanego światłem o tej długości fali. Wykazano, że wraz z czasem trwania fotokatalizy myrtenolu zmniejsza się intensywność emisji tlenu singletowego wzbudzonego przy 418 nm. Co ważne, wraz z czasem trwania reakcji wzrasta intensywność emisji ¹O₂ wzbudzonego przy długości fali 446 nm (Ryc. 51B).



Rycina 51. Wpływ myrtenolu na widmo absorpcji H₂TPP w chloroformie i widmo fosforescencji ¹O₂ generowanego przez wzbudzenie H₂TPP światłem przy 418 nm i 446 nm, po 0, 12 i 24 godz. naświetlania

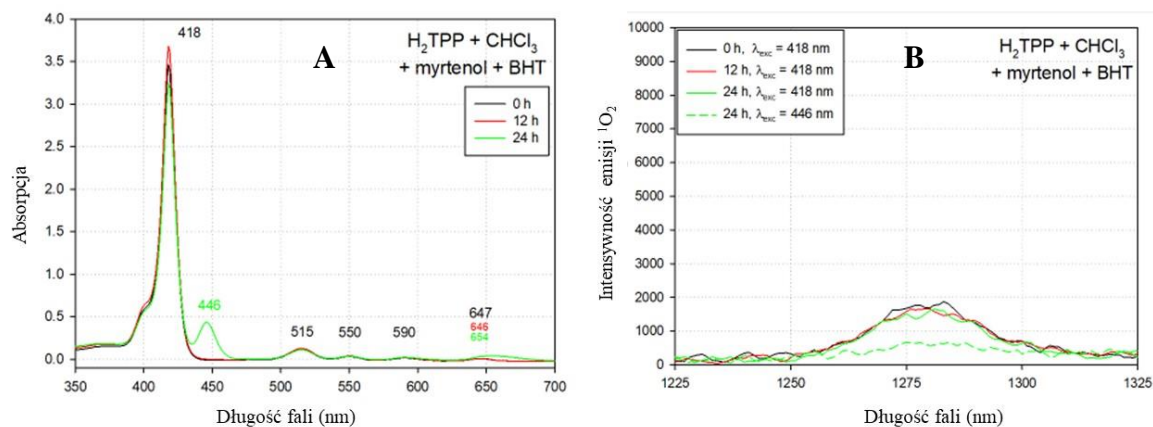
Biokataliza myrtenolu powyżej 12 godz. w obecności tokoferolu skutkuje całkowitym wygaszeniem pasma przy długości fali 418 nm w widmie absorpcji H₂TPP. Po 12 godz. fotoutleniania pojawia się pasmo przy długości fali 446 nm i nie zmienia ono swojej intensywności w trakcie przedłużającej się reakcji. Zaobserwowano również pasmo przy 661 nm (Ryc. 52A). W obecności tokoferolu nie obserwowano na widmie emisji pasma

odpowiadającego fosforescencji tlenu singletowego (Ryc. 52B). W układzie reakcyjnym myrtenol/H₂TPP z tokoferolem nie zaobserwowano także powstawania tlenku myrtenalu. Odnotowano powstawanie innego produktu o czasie retencji 8,7 min., którego wydajność wynosiła 5,6% po 12 godz. i 10,3% po 24 godz. reakcji. Na podstawie analiz widma MS można stwierdzić, że jest to nieznaną związek.



Rycina 52. Wpływ tokoferolu na widmo absorpcji H₂TPP w obecności myrtenolu w chloroformie i widmo emisji ¹O₂ generowanego przez wzbudzenie H₂TPP światłem 418 nm i 446 nm, po 0, 12 i 24 godz. naświetlania

Zastosowanie w biokatalizie BHT skutkuje niewielkimi zmianami w widmie absorpcji H₂TPP. Po 24 godz. reakcji pojawia się niewielkie pasmo przy długości fali 446 nm i nieznaczne przesunięcie pasma 647 nm w kierunku fal dłuższych, do 654 nm (Ryc. 53A). Na podstawie widma emisji ¹O₂ można stwierdzić, że BHT nie wygasza całkowicie tlenu singletowego (Ryc. 53B). Pomimo niewielkiej intensywności tlenu singletowego nie odnotowano powstawania żadnych produktów zarówno po 12, jak i 24 godz. prowadzenia biokatalizy.

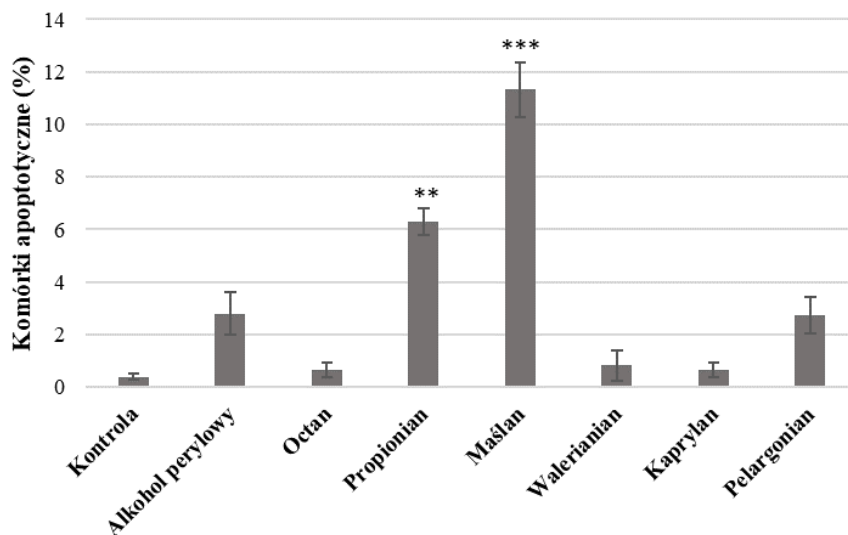


Rycina 53. Wpływ BHT na widmo absorpcji H₂TPP w obecności myrtenolu w chloroformie i widmo emisji ¹O₂ generowanego przez wzbudzenie H₂TPP światłem 418 nm i 446 nm, po 0, 12 i 24 godz. naświetlania

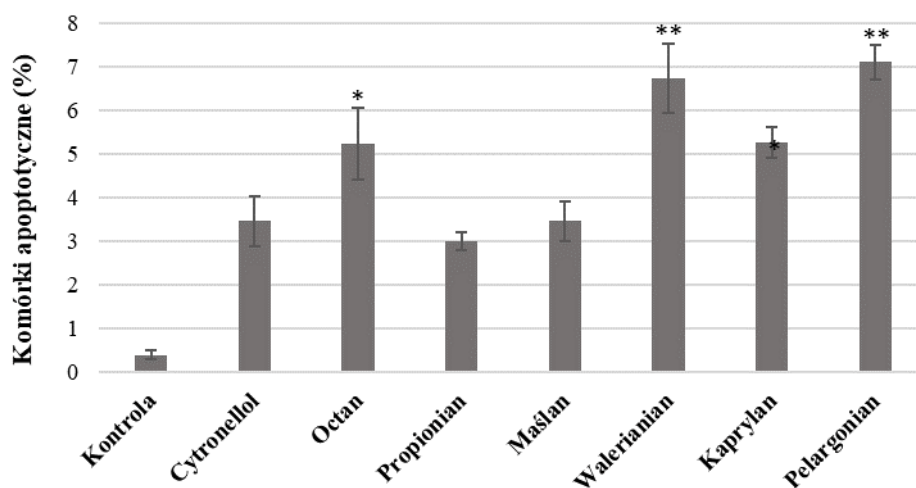
4.4. Aktywność biologiczna produktów biokatalizy alkoholi terpenowych

4.4.1. Aktywność antynowotworowa wobec komórek glejaka ludzkiego

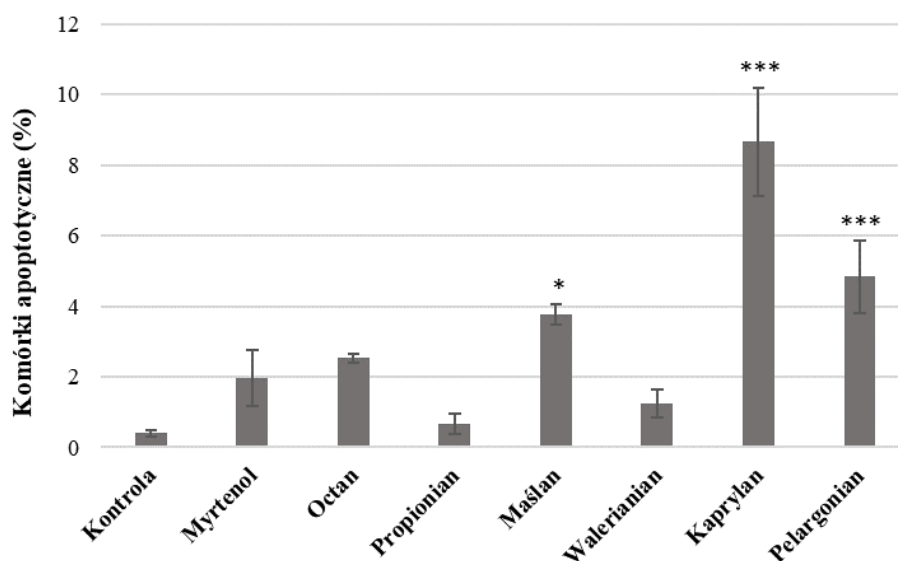
Aktywność biologiczna wszystkich 43 produktów biokatalizy i 7 alkoholowych prekursorów została określona w ludzkich liniach komórek gwiaździstego anaplastycznego (MOGGCCM, III° wg WHO) i glejaka wielopostaciowego (T98G, IV° wg WHO). Produkty biotransformacji odpowiednich alkoholi terpenowych zostały oczyszczone za pomocą chromatografii kolumnowej do czystości powyżej 94%. Oceniono potencjał związków terpenoidowych w indukcji śmierci komórkowej komórek nowotworowych. Badania wykazały unikalne działanie przeciwnowotworowe związków na komórki w zależności od ich stadium rozwoju. Wśród badanych związków znaczącą indukcję apoptozy w porównaniu do kontroli (inkubowanej bez dodatku terpenów) wykazano jedynie w przypadku linii T98G. Aktywność proapoptotyczną wobec komórek linii T98G wykazywały cytronellol, alkohol perylowy, myrtenol oraz ich estry. Nie zaobserwowano aktywności w indukcji śmierci komórkowej geraniolu, nerolu, farnesolu i nopolu oraz ich estrów ani epoksydu myrtenalu. Najlepszy efekt apoptotyczny, tj. 11,3%, obserwowano po inkubacji komórek z maślanem alkoholu perylowego i był on 4-krotnie wyższy w porównaniu z alkoholem perylowym (Ryc. 54). Podobnie estry cytronellolu (z kwasem pelargonowym, walerianowym czy octowym) powodowały istotne zwiększenie aktywności w indukowaniu apoptozy w porównaniu do prekursora (Ryc. 55). W przypadku estrów myrtenolu, kaprylan wykazywał 4-krotnie wyższą aktywność niż alkohol. Ponadto istotny wzrost komórek apoptotycznych względem alkoholu zaobserwowano również dla maślanu i pelargonianu myrtenolu (Ryc. 56). Badane związki nie powodowały indukcji autofagii i nekrozy komórek nowotworowych. Nie zaobserwowano liniowej zależności poziomu indukcji apoptozy komórek linii T98G od długości łańcucha węglowego w kwasie karboksylowym estrów.



Rycina 54. Wpływ alkoholu perylowego i jego estrów na liczbę komórek apoptotycznych w linii komórkowej T98G (glejak wielopostaciowy, stadium IV wg WHO). *wartości różniące się istotnie statystycznie od kontroli i alkoholu perylowego: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, test post-hoc Dunneta)



Rycina 55. Wpływ cytronellolu i jego estrów na liczbę komórek apoptotycznych w linii komórkowej T98G (glejak wielopostaciowy, stadium IV wg WHO). *wartości różniące się istotnie statystycznie od kontroli i cytronellolu: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, test post-hoc Dunneta)



Rycina 56. Wpływ myrtenolu i jego estrów na liczbę komórek apoptotycznych w linii komórkowej T98G (glejak wielopostaciowy, stadium IV wg WHO). *wartości różniące się istotnie statystycznie od kontroli i myrtenolu: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, test post-hoc Dunnetta)

4.4.2. Aktywność antymikrobiologiczna

W pierwszym etapie badania aktywności antymikrobiologicznej produktów biokatalizy określono ich działanie antybiofilmowe wobec *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *C. albicans*. Spośród pięćdziesięciu przebadanych terpenów tylko 18 wykazywało działanie redukujące wzrost mikroorganizmów. Najbardziej wrażliwym mikroorganizmem na terpeny był *S. aureus*. Najwyższą aktywnością charakteryzował się seskwiterpenowy farnesol, który powodował redukcję wzrostu *S. aureus* aż o 91,5%. Wykazano, że alkohol perylowy, nopol, cytronellol, geraniol i nerol redukują wzrost gronkowca złocistego od 74,8 do 85,7%. Z kolei myrtenol i jego pochodne nie wykazują aktywności wobec *S. aureus*. Spośród badanych estrów żaden nie wykazuje istotnie statystycznie wyższej aktywności hamującej wzrost gronkowca złocistego względem alkoholowego prekursora. Jedynie propionian alkoholu perylowego powoduje wyższą o 4% redukcję wzrostu *S. aureus* w porównaniu do alkoholu perylowego. Aktywność pozostałych estrów wahała się w granicach od 13,9 do 53,7% zahamowania wzrostu. Tylko cztery badane terpeny wykazywały aktywność antymikrobiologiczną wobec *P. aeruginosa*: epoksyd myrtenalu, cytronellol, geraniol i nerol. Spośród nich największą redukcję wzrostu o 76,6% i 86,5% odnotowano przy zastosowaniu odpowiednio geraniolu i nerolu. Cytronellol charakteryzował się redukcją wzrostu pałeczki ropy błękitnej na poziomie 54,3%. Myrtenol nie powodował redukcji wzrostu *P. aeruginosa*, ale produkt jego biokatalizy – epoksyd

myrtenalu charakteryzował się 17,5% zahamowaniem wzrostu bakterii. Farnesol, który charakteryzował się najwyższą aktywnością antybiofilmową wobec *S. aureus* nie wykazywał żadnej aktywności wobec *P. aeruginosa*. Terpeny wykazywały także aktywność w redukcji wzrostu *C. albicans*. Najwyższe zahamowanie wzrostu drożdżaków od 56,2 do 68% wykazywały alkohole takie jak nerol, cytronellol, farnesol i geraniol. Pozostałe aktywne związki w postaci nopolu, tlenu myrtenalu, maślanu myrtenolu i octanu alkoholu perylowego redukowały wzrost *C. albicans* od 30,9 do 36,3%. Co istotne, produkty biokatalizy myrtenolu i alkoholu perylowego w postaci maślanu myrtenolu, epoksydu myrtenalu i octanu alkoholu perylowego w odróżnieniu od alkoholowych prekursorów wykazywały aktywność wobec *C. albicans*. Szczegółowe wyniki aktywności związków zawarto w tabeli 28. Ze względu na to, że aktywność terpenów w teście AntiBioVol była zależna od lotności związków, w kolejnym doświadczeniu postanowiono zbadać ich aktywność biologiczną metodą dyfuzyjno-krażkową (DK).

Tabela 28. Aktywność antybiofilmowa alkoholi terpenowych i produktów ich biokatalizy

| Badany związek | Redukcja żywotności komórek w biofilmie (%) | | |
|--------------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
| Myrtenol | 0 | 0 | 0 |
| Maślan myrtenolu | 0 | 0 | 33,5 ± 6,2 ^a |
| Tlenek myrtenalu | 0 | 17,5 ± 4,8 ^a | 30,9 ± 10,2 ^a |
| Alkohol perylowy | 79,7 ± 8,1^a | 0 | 0 |
| Octan alkoholu perylowego | 17,4 ± 6,0 ^b | 0 | 30,9 ± 6,7 ^a |
| Propionian alkoholu perylowego | 83,7 ± 1,9 ^a | 0 | 0 |
| Nopol | 75,1 ± 3,6^a | 0 | 36,3 ± 9,8^a |
| Maślan nopolu | 53,7 ± 4,9 ^c | 0 | 0 |
| Walerianian nopolu | 53,6 ± 3,7 ^c | 0 | 0 |
| Kaprylan nopolu | 51,8 ± 2,9 ^c | 0 | 0 |
| Cytronellol | 83,2 ± 3,4^a | 54,3 ± 6,3^b | 66,3 ± 6,6^b |
| Geraniol | 74,8 ± 3,7^a | 76,6 ± 3,0^c | 68,0 ± 3,5^b |
| Propionian geraniolu | 15,3 ± 4,2 ^b | 0 | 0 |
| Nerol | 85,7 ± 0,6^a | 86,5 ± 2,7^c | 56,2 ± 2,9^b |
| Octan nerolu | 34,9 ± 9,7 ^d | 0 | 0 |
| Propionian nerolu | 32,0 ± 9,2 ^d | 0 | 0 |
| Maślan nerolu | 33,3 ± 3,9 ^d | 0 | 0 |
| Farnesol | 91,5 ± 1,1^e | 0 | 67,3 ± 5,8^b |
| Octan farnezolu | 21,7 ± 11,2 ^b | 0 | 0 |
| Propionian farnezolu | 13,9 ± 3,9 ^b | 0 | 0 |

Wartości średnie z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

W tabeli zawarto wyniki tylko dla produktów biokatalizy, które wykazywały aktywność biofilmową.

Wyniki aktywności antymikrobiologicznej uzyskane w metodzie DK są w dużej części zbieżne z tymi uzyskanymi metodą AntiBioVol. Strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów zaobserwowano u 23 spośród 50 badanych związków. W tym eksperymencie *S. aureus* był również najbardziej wrażliwy na działanie terpenów. Myrtenol nie powodował zahamowania wzrostu badanych szczepów w odróżnieniu od jego niektórych pochodnych. W metodzie DK wykazano, że maślan, kaprylan i pelargonian myrtenolu powodują występowanie stref zahamowania wzrostu *S. aureus* odpowiednio o średnicy 4, 9 i 5 mm. Działanie octanu myrtenolu skutkuje powstaniem strefy zahamowania wzrostu *P. aeruginosa* o średnicy 8 mm. Tak jak w metodzie AntiBioVol, tak w metodzie DK wykazano aktywność epoksydu myrtenalu wobec *P. aeruginosa* i *C. albicans* oraz maślanu myrtenolu wobec *C. albicans*. W metodzie DK alkohol perylowy wykazywał aktywność hamowania wzrostu wszystkich trzech badanych szczepów, z kolei aktywność propionianu alkoholu perylowego wykazana w metodzie AntiBioVol nie znalazła swojego odzwierciedlenia w strefie zahamowania wzrostu *S. aureus*. Spośród badanych związków, w metodzie DK, zaobserwowano także aktywność walerianianu geraniolu, kaprylanu i pelargonianu nerolu wobec *S. aureus*. Zarówno w metodzie AntiBioVol i DK najwyższą aktywnością wobec tego szczepu charakteryzuje się farnesol. Szczegółowe wyniki aktywności antymikrobiologicznej terpenów zawarto w tabeli 29.

Tabela 29. Aktywność produktów biokatalizy wobec mikroorganizmów określona metodą dyfuzyjno-krażkową

| Badany związek | Strefa zahamowania wzrostu (mm) | | |
|---------------------------|---------------------------------|----------------------|--------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
| Myrtenol | 0 | 0 | 0 |
| Epoksyd myrtenalu | 0 | 5 | 7 |
| Octan myrtenolu | 0 | 8 | 0 |
| Maślan myrtenolu | 4 | 0 | 9 |
| Kaprylan myrtenolu | 9 | 0 | 0 |
| Pelargonian myrtenolu | 5 | 0 | 0 |
| Alkohol perylowy | 7 | 8 | 9 |
| Octan alkoholu perylowego | 4 | 0 | 7 |
| Nopol | 8 | 0 | 10 |
| Maślan nopolu | 5 | 0 | 0 |
| Walerianian nopolu | 4 | 0 | 0 |
| Kaprylan nopolu | 5 | 0 | 0 |
| Cytronellol | 5 | 8 | 15 |
| Geraniol | 8 | 9 | 12 |
| Walerianian geraniolu | 5 | 0 | 0 |
| Nerol | 7 | 8 | 9 |
| Octan nerolu | 3 | 0 | 0 |
| Propionian nerolu | 3 | 0 | 0 |
| Maślan nerolu | 5 | 0 | 0 |
| Kaprylan nerolu | 3 | 0 | 0 |
| Pelargonian nerolu | 3 | 0 | 0 |
| Farnezoł | 12 | 0 | 10 |
| Octan farnezołu | 4 | 0 | 0 |
| Propionian farnezołu | 3 | 0 | 0 |

W tabeli zawarto wyniki tylko dla związków, dla których obserwowano strefy zahamowania wzrostu badanych szczepów.

W kolejnym eksperymencie postanowiono określić aktywność związków wobec dwóch gatunków grzybów nitkowatych *P. chrysogenum* i *A. niger*. W teście płytkowym w hodowli planktonicznej uzyskano podobne wyniki dla dwóch badanych gatunków. Spośród terpenów najwyższą aktywnością grzybobójczą i grzybostatyczną charakteryzowały się alkohole terpenowe. Cytronellol wykazywał działanie hamujące wzrost *P. chrysogenum* i *A. niger* przy minimalnym stężeniu (MIC) odpowiednio 128 µg/ml i 256 µg/ml, z kolei minimalne stężenie bójcze (MBC) dla obu gatunków wynosiło 512 µg/ml. Wartość MIC geraniolu i nopolu wobec obu szczepów wynosiła 256 µg/ml, a MBC 512 µg/ml. Myrtenol, alkohol perylowy i nerol hamowały wzrost grzybów w minimalnym stężeniu 512 µg/ml. Z kolei wartość MBC wynosiła 1024 µg/ml. W badanym zakresie stężeń 2 - 2048 µg/ml farnezoł nie wykazywał żadnej aktywności antygrzybowej. Spośród wszystkich produktów biokatalizy, aktywność grzybostatyczna wobec obu gatunków grzybów (MIC = 1024 µg/ml) została zaobserwowana jedynie w przypadku kaprylowych

i pelargonowych estrów wszystkich alkoholi terpenowych. W badanym zakresie stężeń nie wykazano MBC dla estrów kaprylowych i pelargonowych (Tab. 30).

Tabela 30. Aktywność antymikrobiologiczna alkoholi terpenowych i produktów ich biotransformacji wobec *P. chrysogenum* i *A. niger* w hodowli planktonicznej wyrażona w MIC i MBC ($\mu\text{g/ml}$)

| Badany związek | <i>P. chrysogenum</i> | | <i>A. niger</i> | |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | MBC ($\mu\text{g/ml}$) | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | MBC ($\mu\text{g/ml}$) |
| Amfoterycyna B | 0,2 | 0,78 | 0,2 | 0,78 |
| Myrtenol | 512 | 1024 | 512 | 1024 |
| Kaprylan myrtenolu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Pelargonian myrtenolu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Alkohol perylowy | 512 | 1024 | 512 | 1024 |
| Kaprylan alkoholu perylowego | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Pelargonian alkoholu perylowego | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Nopol | 256 | 512 | 256 | 512 |
| Kaprylan nopolu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Pelargonian nopolu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Cytronellol | 128 | 512 | 256 | 512 |
| Kaprylan cytronellolu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Pelargonian cytronellolu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Geraniol | 256 | 512 | 256 | 512 |
| Kaprylan geraniolu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Pelargonian geraniolu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Nerol | 512 | 1024 | 512 | 1024 |
| Kaprylan nerolu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Pelargonian nerolu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Farnezol | nw | nw | nw | nw |
| Kaprylan farnezołu | 1024 | nw | 1024 | nw |
| Pelargonian farnezołu | 1024 | nw | 1024 | nw |

nw – nie wykazano w badanym zakresie stężeń

W tabeli zawarto wyniki tylko dla związków, które wykazywały aktywność antymikrobiologiczną wobec *A. niger* i *P. chrysogenum*.

5. Dyskusja

Terpeny są najliczniejszą klasą naturalnych związków występujących na Ziemi. Od dawna są chętnie wykorzystywane przez ludzi jako związki smakowo-zapachowe i lecznicze. Alkohole terpenowe wykazują szeroki, a co istotne udowodniony przez wielu badaczy, potencjał terapeutyczny (Santos i in., 2019, Chen i in., 2021, Chen i Viljoen, 2010, Kamatou i Viljoen, 2008). Pomimo dużej liczby badań nad aktywnością terapeutyczną alkoholi i olejków eterycznych, wiedza na temat aktywności pochodnych alkoholi terpenowych – estrów i związków utlenionych jest ograniczona. Brakuje kompleksowych badań nad wpływem długości łańcucha kwasu karboksylowego dołączonego do cząsteczki alkoholu na aktywność biologiczną estru. Estry alkoholi terpenowych, jak i inne utlenione terpeny występują w olejkach eterycznych w niewielkich stężeniach, dlatego konieczna jest ich synteza (Olsen i in., 2006). Metody biokatalityczne oparte m.in. na lipazach, w odróżnieniu od metod chemicznych, pozwalają na bezpieczne, selektywne i zrównoważone otrzymywanie produktów bez negatywnego wpływu na ludzi, zwierzęta i planetę (Sheldon i Brady, 2019). Pomimo dużej liczby dostępnych komercyjnych lipaz nadal istnieje potrzeba odkrywania nowych źródeł wydajnych i tanich biokatalizatorów charakteryzujących się wysoką stabilnością operacyjną (Liu i Huang, 2010). Wykorzystanie enzymów związanych z grzybnią wydaje się najprostszym rozwiązaniem w biokatalitycznym otrzymywaniu estrów terpenoidowych ze względu na możliwość pominięcia etapu oczyszczania enzymu i jego naturalną immobilizację w strukturach grzybni.

Do enzymatycznej estryfikacji i transestryfikacji najczęściej wykorzystuje się lipazy komercyjne, np. z psychrofilnych drożdży *Candida antarctica* (Da Silva-Correa i in., 2020, Shahedi i in., 2019). Mikroorganizmy psychrofilne wzbudzają coraz większe zainteresowanie ze względu na szybkie tempo wzrostu i wysoką wydajność katalityczną w niskich temperaturach, dzięki czemu zużycie energii podczas otrzymywania biokatalizatora i samej biokatalizy jest znacznie niższe w porównaniu do procesów z biokatalizatorami mezofilnymi (Li i in., 2013). Hydrolazy z mikroorganizmów psychrofilnych umożliwiają także wydajną biokatalizę lotnych i termolabilnych terpenów w niskich temperaturach (De Pascale i in., 2008).

W pierwszym etapie badań dowiedziono po raz pierwszy, że psychrofilny szczep grzyba nitkowatego *Chrysosporium pannorum* A-1 wykazuje zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną (Tab. 10). Dotychczas szczep ten został opisany jako wydajny

biokatalizator oksydacyjnej biotransformacji α - i β -pinenu (Trytek i in., 2015, Trytek i in., 2016). Efektywna biosynteza enzymów jest osiągnięta w odpowiednio dobranych podłożach hodowlanych i zależy od temperatury, pH i czasu trwania hodowli, zaś grzyby psychrotroficzne charakteryzują się przystosowaniem do przetrwania w zimnym i ubogim w składniki odżywcze środowisku (Duarte i in., 2018). Hodowla *C. pannorum* A-1 w bogatym płynnym podłożu A (zawierającym m.in. 10% oliwy z oliwek) nie przekładała się zewnątrz- i wewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną. Podłoże A było z sukcesem stosowane do indukcji zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej innych grzybów: *P. chrysogenum* 9' (Bancerz i in., 2005), *Bjerkandera adusta* R59 (Bancerz i Ginalska, 2007) i *Rhizomucor variabilis* (Bancerz i in., 2015). W przypadku *C. pannorum* A-1 odpowiednim podłożem do indukcji aktywności lipolitycznej było podłoże BM (z 0,5% Tweenem 80) wg. Molinari i in. (2000). Obecność oliwy z oliwek (1%) lub kombinacji oliwy z oliwek i łatwo przyswajalnego źródła węgla (1% glukozy) w podłożu prowadziła do znacznego obniżenia pH płynu pohodowlanego wraz z czasem trwania hodowli (Tab. 11). Wraz ze spadkiem pH do 3 następował spadek aktywności lipolitycznej prawdopodobnie w skutek inhibicji enzymu przez pojawiające się kwasy organiczne. Wskazuje na to wysoka dodatnia korelacja ($r = 0,73$) pomiędzy zewnątrz- i wewnątrzkomórkową aktywnością lipolityczną a pH płynu pohodowlanego. Dodatkowo w przypadku podłoża BM2 nie stwierdzono aktywności lipolitycznej prawdopodobnie dlatego, że glukoza jest preferowanym źródłem energii dla komórki i jest przede wszystkim wykorzystywana do produkcji biomasy. To zjawisko przypominające represję kataboliczną może ograniczać wykorzystywanie oliwy, a co za tym idzie syntezę enzymów lipolitycznych. Falony i in. (2006) najwyższą aktywność lipazy zewnątrzkomórkowej *Aspergillus niger* uzyskali na podłożu złożonym z 2% oliwy z oliwek i 2% glukozy. Z wyżej przedstawionych danych wynika, że skład podłoża hodowlanego do efektywnej biosyntezy enzymów lipolitycznych powinien być dobierany indywidualnie dla każdego mikroorganizmu.

Zgodnie z oczekiwaniami, zewnątrzkomórkowy enzym o aktywności lipolitycznej z psychrotroficznego *C. pannorum* A-1 wykazywał maksymalną aktywność w temperaturze 20°C, jednak był również aktywny w szerokim zakresie temperatur od 15 do 50°C. Wyniki uzyskane w badaniach nad optimum pH aktywności hydrolazy są zgodne z wynikami wcześniejszych doświadczeń i wskazują, że inhibicja enzymu następuje przy pH poniżej 3 (Ryc. 13). Dlatego w kolejnym etapie badań podłoże suplementowano 1% węglanem wapnia w celu stabilizacji pH, aby uniknąć znacznego spadku pH podczas hodowli i tym samym inaktywacji hydrolaz. Utrzymanie wartości pH w optymalnym zakresie wzrostu

C. pannorum zapobiegło inhibicji aktywności lipolitycznej. Stabilizacja pH miała również pozytywny wpływ na ilość otrzymywanej biomasy grzybni w jednym cyklu hodowlanym na wszystkich trzech podłożach (Tab. 12). W niektórych badaniach opisywano pozytywny wpływ jonów Ca^{2+} w postaci rozpuszczalnej soli CaCl_2 zwiększających biosyntezę lipaz, np. z *Bacillus cereus* (Mazhar i in., 2018) czy *Penicillium camemberti* (Boratyński i in., 2018). Jednak w niniejszej pracy wzrost biosyntezy enzymów o aktywności lipolitycznej przez *C. pannorum* A-1 nie wydaje się być spowodowany bezpośrednio przez jony wapnia pochodzące z węglanu, ponieważ nie stwierdzono istotnego wpływu dodatku węglanu wapnia na aktywność grzybni hodowanej na podłożu BM (bez oliwy z oliwek i glukozy). Najprawdopodobniej buforująca właściwość CaCO_3 była kluczowa do utrzymania aktywności enzymów na podłożach BMC1 i BMC2. W przypadku biosyntezy hydrolaz przez *C. pannorum* Tween 80 okazał się lepszym induktorem niż oliwa z oliwek. Stwierdzono, że optymalne stężenie Tweenu 80 było silnie zależne od czasu hodowli. Istotny spadek aktywności lipolitycznej obserwowany wraz z czasem hodowli, zwłaszcza przy niskich stężeniach induktora (0,1% – 0,3%), był prawdopodobnie związany z wyczerpywaniem się induktora podczas przedłużającej się hodowli (Ryc. 15). Z kolei znaczny spadek biomasy grzybni w hodowli przedłużonej do 5 dni, zauważalny przy stężeniu Tweenu 80 do 0,7%, mógł być spowodowany autolizą grzyba na podłożu BMC pozbawionym źródła węgla (Tab. 13). Dlatego 4 dzień hodowli i podłoże zawierające 0,7% induktora są optymalnym wariantem dla produkcji enzymu o aktywności lipolitycznej przez *C. pannorum*.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono zagęszczanie białek z płynu po 4-dniowej hodowli *C. pannorum* A-1 na podłożu zawierającym 0,7% Tweenu 80. Do tego celu wykorzystano ultrafiltrację, wyparkę próżniową i wytrącanie rozpuszczalnikami organicznymi. W przypadku ultrafiltracji zaobserwowano 4-krotny spadek aktywności lipolitycznej ultrafiltratu i 3-krotny spadek zawartości białka w porównaniu do płynu wyjściowego. Spadek aktywności białka może być spowodowany siłą ścinającą generowaną przez układ oraz usunięciem jonów wpływających pozytywnie na aktywność enzymu (Rodriguez-Fernandez i in., 2013). Białko w postaci wolnej w roztworze charakteryzuje się wysoką wrażliwością na uszkodzenia mechaniczne. Z kolei zagęszczanie z użyciem wyparki próżniowej w 40°C skutkuje 20-krotnym spadkiem aktywności preparatu, co może mieć związek z niską stabilnością temperaturową wolnego enzymu (Ryc. 14). W przypadku hydrolazy z *C. pannorum* A-1 najbardziej optymalną metodą zagęszczenia preparatu jest wytrącanie rozpuszczalnikami organicznymi. Spośród badanych układów najwyższą

aktywność specyficzną uzyskano w wariacie wytrącania z acetonem w stosunku objętościowym płyn pochodłany : rozpuszczalnik = 1:3 (Tab. 14). Ta jednostopniowa procedura oczyszczania białka umożliwiła 78% odzysk aktywności całkowitej badanej hydrolazy i 2,3-krotne jej oczyszczenie. Wytrącanie białek z płynu po hodowli *C. pannorum* A-1 charakteryzuje się zmienną wydajnością i zależy od rodzaju rozpuszczalnika oraz stosunku objętościowego płyn pochodłany : rozpuszczalnik organiczny (Tab. 14). Wytrącanie lipaz rozpuszczalnikami organicznymi jest często stosowane przez badaczy. Patel i in. (2014) częściowo oczyścili i odseparowali alkaliczną lipazę z *Pseudomonas* sp. DMVR46 poprzez zastosowanie acetonu w stosunku objętościowym płynu pochodłanego do rozpuszczalnika 1:1,5. Wytrącanie acetonem połączone z chromatografią jonowymienną na anionicie DEAE-celulozie. Uzyskano około 28,9-krotne oczyszczenie z 29,7% odzyskiem. Z kolei maksymalną aktywność lipazy z *Burkholderia* sp. EQ3 odnotowano przy wytrąceniu acetonem w stosunku 1:1 do płynu pochodłanego. Układ ten charakteryzował się 78,6% odzyskiem i 4,2-krotnym oczyszczeniem białka (Ungcharoenwiwat i Kittikun, 2015). Veeraragavan i Gibbs (1989) wytrącili dwie lipazy z *Candida rugosa* etanolem w stosunku objętościowym płynu pochodłanego do alkoholu 1:2, po czym białka oczyścili za pomocą chromatografii jonowymiennej. Zastosowanie etanolu i chromatografii jonowymiennej pozwoliło na 5,8-krotne oczyszczenie lipazy I z 18% odzyskiem aktywności i 1,9-krotne oczyszczenie lipazy II z 25% odzyskiem aktywności.

Zewnątrzkomórkowy enzym o aktywności lipolitycznej z *C. pannorum* zachowuje aktywność hydrolityczną na wysokim poziomie jedynie w 5°C po 24 godz. inkubacji. W przypadku inkubacji w 40°C odnotowano 90% spadek aktywności (Ryc. 14). Świadczy to o niskiej stabilności temperaturowej wolnego enzymu, która była główną przyczyną spadku aktywności podczas zateżania na wyparce próżniowej. Podobną wrażliwość temperaturową wykazano w przypadku psychrofilnej lipazy z *Microbacterium luteolum*, która charakteryzuje się najwyższą aktywnością i stabilnością w 5°C, przy czym wraz ze wzrostem temperatury wartości tych parametrów spadają (Joseph i in., 2012).

W celu dobrania wydajnego biokatalizatora estryfikacji alkoholi terpenowych do dalszych badań, zarówno białka wytrącone acetonem z płynu pochodłanego, jak i biomasa grzybni zostały zliofilizowane i użyte w estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego. W przypadku estryfikacji z wykorzystaniem wytrąconych białek z płynu pochodłanego odnotowano wydajność reakcji na poziomie jedynie 1%. Może to być związane z niską stabilnością wolnych enzymów w rozpuszczalniku organicznym lub zaburzeniem równowagi reakcji przez powstającą wodę. Grzybnia *C. pannorum* A-1 otrzymana z podłoża

OM z dodatkiem oliwy z oliwek i CaCO_3 wykazywała najwyższy stopień konwersji molowej substratów do produktu (75% konwersji) oraz najwyższą początkową szybkość reakcji ($0,77 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) (Tab. 15). Warto zauważyć, że biokatalizator otrzymany z podłoża OM + 1% CaCO_3 + 1% oliwa z dodatkiem 1% glukozy również charakteryzował się wysoką aktywnością katalityczną i dużą ilością biomasy uzyskanej w jednym cyklu hodowlanym. Wzrost biomasy grzybni uzyskanej w jednym cyklu hodowlanym przy zachowaniu wysokiej aktywności biokatalitycznej jest szczególnie istotny w przypadku rozważania zastosowania liofilizowanej grzybni jako katalizatora na skalę przemysłową. W przeciwieństwie do wolnego enzymu, wysuszony i związany z biomasą enzym wykazuje mniejszą wrażliwość na zamrażanie i liofilizację oraz większą stabilność w rozpuszczalniku organicznym. Zastosowanie liofilizowanej hydrolazy związanej z grzybnią znacznie obniża koszty produkcji biokatalizatora, gdyż możliwe jest pominięcie izolacji i oczyszczania enzymu (Loo i in., 2014). Według przeprowadzonej kalkulacji kosztów na potrzeby tej pracy, koszt 1 grama biokatalizatora w formie grzybni *C. pannorum* A-1 wynosi maksymalnie 3,1 zł z uwzględnieniem wszystkich kosztów materiałowych i mediów. Lipazy komercyjne są co najmniej 4-krotnie droższe.

Biosynteza i aktywność katalityczna enzymów lipolitycznych może być modulowana w obecności jonów metali (Yao i in., 2021). Aktywność katalityczna hydrolazy związanej z grzybnią *C. pannorum* A-1 jest stymulowana przez jony Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} i Mg^{2+} , a inhibowana przez Fe^{2+} i Cu^{2+} (Tab. 16). Dodatkowo, w przypadku suplementacji podłoża jonami Fe^{2+} i Cu^{2+} , zaobserwowano spadek ilości biomasy o 18%. Lipazy mikrobiologiczne wykazują różną tolerancję na dodane jony. Przykładowo grzybowa lipaza z *Penicillium camemberti* AM83 wykazuje wyższą aktywność w obecności jonów Ca^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} (Boratyński i in., 2018). Aktywność lipolityczna hydrolazy z *Penicillium chrysogenum* 9' jest stymulowana obecnością jonów Ca^{2+} i Mn^{2+} , z kolei jony Ba^{2+} , Mg^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} i Cu^{2+} prowadzą do zmniejszenia aktywności enzymu (Bancerz i in., 2005). Lipaza pochodząca z *Burkholderia ubonensis* SL-4 jest aktywowana przez jony Ca^{2+} i Mn^{2+} , przy czym Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} i Fe^{3+} silnie hamują jej aktywność (Yang i in., 2016). Aktywacja tolerującej rozpuszczalnik organiczny lipazy z *Geobacillus stearothermophilus* AH22 następuje w obecności Co^{2+} , Cu^{2+} i Mn^{2+} , a inhibicja w obecności Zn^{2+} i Hg^{2+} (Ekinci i in., 2016). Obecność jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} powoduje zwiększenie aktywności lipazy z *Paenibacillus pasadenensis* CS0611 odpowiednio o 108% i 46%, przy czym hamowanie aktywności obserwowano przy inkubacji lipazy z Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} i Fe^{3+} (Gao i in., 2018). Największe znaczenie w aktywacji hydrolaz o aktywności lipolitycznej wydają się

mieć jony Mn^{2+} i Cu^{2+} , gdyż poza nielicznymi wyjątkami, w obecności tych jonów osiągnęto wzrost aktywności enzymatycznej.

Podjęto próbę powiązania aktywności biokatalitycznej z obecnością konkretnych grup funkcyjnych w strukturze biokatalizatora. Analiza spektrometryczna FTIR wykazała różnice w widmie dwóch biokatalizatorów w postaci grzybni z podłoża OM + 1% oliwa z oliwek + 1% $CaCO_3$ i OM + 1% oliwa z oliwek + 1% glukoza + 1% $CaCO_3$. Zaobserwowano u tych biokatalizatorów pasmo 1153 cm^{-1} , które wskazuje na możliwe przesunięcie pasma amidu III standardowo występującego przy 1404 cm^{-1} . Efekt ten jest zwykle obserwowany w przypadku zmian w środowisku chemicznym lub poprzez zmianę konformacji enzymu na skutek związania np. ze strukturami grzybni. Taka zmiana konformacyjna w amidzie III lipazy z *C. pannorum* A-1 może mieć korzystny wpływ na aktywność biokatalityczną. Podobną zależność wykazano dla lipazy związanej z resztkami komórkowymi *Yarrowia lipolytica* (Fraga i in., 2020). We wszystkich badanych biokatalizatorach występuje pasmo w okolicach 1650 cm^{-1} , które świadczy o obecności amidu I i jego konformacji w postaci α -helisy (Elliott i Ambrose, 1950). Warto także zwrócić uwagę na pasmo 711 cm^{-1} , które zaobserwowano w widmie biokatalizatorów charakteryzujących się wysoką aktywnością katalityczną, uzyskanych z podłoża OM, OM + 1% oliwa z oliwek + 1% $CaCO_3$ i OM + 1% oliwa z oliwek + 1% glukoza + 1% $CaCO_3$. To pasmo może mieć związek z obecnością grupy -NH przy centrum aktywnym biokatalizatora.

Skaningowa mikroskopia elektronowa sprzężona z systemem EDS (Spektroskopia Dyspersji Energii) pozwoliła na określenie składu pierwiastkowego oraz obserwacje morfologii biokatalizatorów uzyskanych z różnych podłoży. Najniższy wagowy (%) udział węgla w biokatalizatorze z podłoża OM + 1% $CaCO_3$ może wynikać z pozostałości nierozpuszczonego węglanu wapnia. Dowodzi temu zwiększony udział tlenu i wapnia względem pozostałych biokatalizatorów. Resztki węglanu występują także w biokatalizatorze z podłoża OM + 1% oliwa + 1% $CaCO_3$, gdzie wykazano 6,1% udział wapnia. Dodatek łatwo przyswajalnego źródła węgla w postaci glukozy powoduje przyspieszenie metabolizmu grzybni i prawie całkowite wykorzystanie węglanu wapnia do wiązania uwolnionych kwasów. Dowodzi to również, że nieprzyswajalna forma wapnia pochodzącego z węglanu nie wykazuje wpływu na indukcję aktywności estryfikacyjnej grzybni, w przeciwieństwie do jonów Ca^{2+} z $CaCl_2$ (Tab. 18). Wyższej zawartości azotu w biokatalizatorach z podłoża OM (8,5%) i podłoża OM + 1% oliwa + 1% glukoza + 1% $CaCO_3$ (8,1%), która przede wszystkim związana jest z zawartością białek w grzybni, nie można jednoznacznie przełożyć na ich wyższą aktywność katalityczną, ponieważ

biokatalizator z podłoża OM + 1% oliwa + 1% CaCO₃ z niższą zawartością azotu (6,8%) wykazywał porównywalną aktywność w reakcji estryfikacji. Konieczne byłoby przeprowadzenie dalszych badań w celu określenia korelacji pomiędzy zawartością azotu w grzybni a jej aktywnością biokatalityczną w reakcji estryfikacji. Obrazy ze skaningowej mikroskopii elektronowej przedstawiają charakterystyczne struktury strzępek grzybów nitkowatych, które można obserwować w pracach innych autorów (Jones i in., 2018). Warto zwrócić uwagę na różnice morfologiczne w strukturze grzybni uzyskanych z różnych podłoży hodowlanych. Grzybnie uzyskane z podłoży OM, OM + oliwa z oliwek + CaCO₃ i OM + oliwa z oliwek + glukoza + CaCO₃ (Ryc. 22-1, 22-5, 22-6) charakteryzują się znacznym usieciowaniem i wydają się mieć zwiększoną powierzchnię właściwą w porównaniu do pozostałych biokatalizatorów.

Estryfikacja cytronellolu i kwasu octowego przez biokatalizator w postaci grzybni *C. pannorum* A-1 przebiega z wysoką wydajnością w zakresie temperatur 30-70°C. Przy wzroście temperatury z 20°C do 70°C szybkość początkowa reakcji wzrosła dwukrotnie (z 0,27 μmol mg⁻¹ min⁻¹ do 0,58 μmol mg⁻¹ min⁻¹) (Ryc. 23). Podwyższenie temperatury zwiększa współczynnik dyfuzyjny substratów migrujących do miejsc aktywnych enzymów, zwiększając tym samym szybkość reakcji (Varma i Madras, 2008). Ponadto w wyższych temperaturach może dojść do termicznej inaktywacji enzymu wraz z czasem trwania reakcji. Warto zauważyć, że biomasa *C. pannorum* wykazywała stabilność do 70°C, gdyż nie zaobserwowano istotnego spadku konwersji molowej (95%) w stosunku do estryfikacji w 40°C. Generalnie biokatalizatory w formie liofilizowanej grzybni charakteryzują się wysoką termostabilnością w rozpuszczalnikach organicznych (Molinari i in., 2000, Molinari i in., 1995, Kirdi i in., 2017) ze względu na niską zawartość wody w środowisku, która zwiększa denaturację enzymu (Claon i Akoh, 1994) oraz naturalną immobilizację enzymu w strukturach grzybni wywierającą efekt ochronny (Gandhi i in., 2000). Liofilizowaną grzybnię *Rhizopus oryzae* wykorzystano w syntezie estrów smakowo-zapachowych, m.in. octanu i maślanu heksylu oraz octanu i maślanu geraniolu. Po 24 godz. reakcji w heptanie w temp. 50°C uzyskano ponad 95% konwersję molową geraniolu do octanu geranylu (Gandolfi i in., 2001). W estryfikacji alkoholu izoamylowego z kwasem octowym uzyskano 100% konwersję substratów dzięki zastosowaniu lipazy związanej z grzybnią *A. niger* NCIM 1207. Reakcję prowadzono w heksanie w 30°C przez dłuższy czas, 96 godz. (Mhetras i in., 2010). Wysoką wydajność estryfikacji (98%) cis-3-heksen-1-olu i kwasu octowego przy użyciu liofilizowanej grzybi *Aspergillus oryzae* uzyskano w temperaturze 70°C w ciągu 24 godz. (Kirdi i in., 2017).

Szybkość początkowa reakcji katalizowanej przez *C. pannorum* A-1 nie zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia substratu powyżej 50 mM, lecz pozostawała na stałym poziomie (ok. 0,31 – 0,27 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) (Ryc. 24). Wskazuje to na maksymalne wysycenie miejsca aktywnego enzymu przy stężeniu 50 mM i wyższym. Sugeruje to również, że aktywność katalityczna biokatalizatora w formie grzybni *C. pannorum* A-1 nie jest hamowana ani przez cytronellol ani przez kwas octowy pod warunkiem ich równego stosunku molowego. Wyniki uzyskane w tym eksperymencie różnią się od wyników opublikowanych przez innych autorów. Wzrost równomolowego stężenia geraniolu i kwasu octowego powyżej 50 mM powodował spadek konwersji molowej substratów i spadek początkowej szybkości reakcji estryfikacji katalizowanej przez biokatalizatory w formie liofilizowanej grzybni *A. oryzae* (Molinari i in., 2000) i *R. oryzae* (Molinari i in., 1995). Autorzy podkreślali negatywny wpływ wysokich stężeń kwasu octowego na aktywność katalityczną enzymu.

W niniejszej rozprawie doktorskiej, istotny spadek aktywności katalitycznej grzybni obserwowano dopiero przy zastosowaniu nadmiaru kwasu octowego (Ryc. 27). Podobną zależność zaobserwowali Mhetras i in. (2010) w estryfikacji alkoholu izoamylowego i kwasu octowego przez grzybnię *A. niger*. Nadmiar kwasu, który nie bierze udziału w reakcji, może powodować zakwaszenie wodnej mikropowłoki enzymu, co prowadzi do jego inaktywacji. Silny wpływ kwasu octowego na aktywność enzymatyczną odnotowali również inni badacze (Guvenc i in., 2003, Romero i in., 2007).

Zwiększenie ilości biokatalizatora *C. pannorum* A-1 powodowało zwiększenie konwersji molowej substratów w ciągu 24 godz. Początkowa szybkość reakcji była niezależna od ilości biomasy w mieszaninie reakcyjnej (Ryc. 25). Utrzymanie stałej początkowej szybkości reakcji niezależnie od ilości biokatalizatora pozwala na właściwe zaprojektowanie procesu katalizy poprzez dobór odpowiedniego stosunku substratu do biokatalizatora w celu zminimalizowania ograniczeń dyfuzyjnych w środowisku reakcji (Gomes i Woodley, 2019). W przypadku lipazy związanej z grzybnią *A. oryzae*, początkowa szybkość reakcji estryfikacji zależała od ilości biokatalizatora i była 3-krotnie niższa przy jego stężeniu 0,5% w/v niż przy 2% w/v (Molinari i in., 2000).

W celu określenia wpływu powierzchni wymiany masy między katalizatorem a środowiskiem reakcji na jej wydajność, estryfikację prowadzono z wytrząsaniem w zakresie 0 – 250 RPM. Co ciekawe, obroty mieszania układu reakcyjnego nie miały wpływu zarówno na początkową szybkość reakcji, jak i konwersję molową cytronellolu do octanu (Ryc. 26). Badania nad estryfikacją z wykorzystaniem lipaz związanych z grzybniami

innych gatunków nie uwzględniają wpływu obrotów mieszania na końcową wydajność. Oceny wpływu szybkości obrotów mieszania w zakresie 100 – 400 RPM na wydajność estryfikacji etanolu z kwasem lewulinowym dokonali Nandiwale i in. (2013). Z badań wynika, że synteza lewulinianu etanolu przy prędkości obrotów niższej niż 200 RPM zachodzi z niższym stopniem konwersji molowej substratów do estru. Estryfikacja z użyciem liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 może być prowadzona w heksanie bez wytrząsania bez wpływu na końcową wydajność reakcji, przez co możliwe jest obniżenie kosztów prowadzenia procesu.

Biokatalizator w formie liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 wykazywał wysoką aktywność estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego w hydrofobowych rozpuszczalnikach organicznych z $\log P$ powyżej 3,4. Wyniki tych badań (Ryc. 27) są zgodne z rezultatami uzyskanymi przez You i in. (2011). Aktywność katalityczna lipaz w reakcji estryfikacji jest skorelowana ze współczynnikiem podziału P n-oktanol-woda. Niskie wydajności uzyskuje się w przypadku zastosowania rozpuszczalników polarnych o $\log P < 2$ ze względu na zaburzenie struktury enzymu. W zakresie $\log P$ od 2 do 4 wpływ rozpuszczalnika jest nieprzewidywalny, a w $\log P$ powyżej 4 struktura białka jest nienaruszona (Kumar i in., 2016). W wariancie z octanem etylu jako rozpuszczalnikiem zamiast reakcji estryfikacji zachodziła transestryfikacja przy użyciu *C. pannorum* A-1. Zostało to potwierdzone w reakcji przeprowadzonej bez kwasu octowego (dane nie prezentowane).

Aktywność katalityczna enzymów w środowisku rozpuszczalników organicznych istotnie zależy od pH roztworu wodnego białka enzymatycznego przed jego liofilizacją. Efekt „pamięci pH” występuje z powodu jonizacji centrum aktywnego enzymu. Biokatalizator po liofilizacji zachowuje ten sam stan jonizacji co w środowisku wodnym, dzięki czemu możliwe jest manipulowanie aktywnością katalityczną enzymu w środowisku organicznym poprzez dobór optymalnego pH roztworu wodnego do liofilizacji (Zaks i Klibanov, 1985). Biokatalizator z *C. pannorum* A-1 wykazuje najwyższą aktywność katalityczną w przypadku liofilizacji z buforu o pH 5,0. Związany z grzybnią enzym z buforu o pH 5,0 charakteryzował się 26% wyższą wydajnością w porównaniu do enzymu bezpośrednio po zakończeniu hodowli (Ryc. 29). W przypadku inkubacji grzybni w buforach o pH 9,2, 10,0 i 10,7 następowała elucja białka związanego ze strukturami grzybni do środowiska buforu. Może świadczyć to o związaniu enzymu z grzybnią za pomocą wiązań jonowych stabilnych w zakresie pH 2,2 – 8,0 (Tab. 19). Stężenie białka w buforze o pH 9,2 po inkubacji grzybni było ponad 3-krotnie wyższe w porównaniu do buforu o pH 5,0. Dodatkowo aktywność katalityczna tego biokatalizatora była 8-krotnie

niższa w porównaniu do biokatalizatora bezpośrednio po hodowli (Ryc. 29 i Tab. 19). Spadek aktywności biokatalitycznej prawdopodobnie nie jest głównie związany z niekorzystną jonizacją miejsca aktywnego, ponieważ powtórna inkubacja grzybni w buforze o pH 5,0 nie skutkowała przywróceniem aktywności katalitycznej. Takie zjawisko prawdopodobnie zachodzi w $\text{pH} < 4$, co uwidacznia się spadkiem aktywności katalitycznej związanego z grzybnią enzymu. Inkubacja grzybni w buforze o pH powyżej 9,2 spowodowała uwolnienie enzymu do środowiska. Elektroforeza płynu po inkubacji grzybni w pH 9,2 wykazała obecność wielu białek, jednak spośród nich można zaobserwować dziewięć wyraźnych prążków (Ryc. 30). Analiza spektrometrii mas mieszaniny białkowej w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas IBB PAN w Warszawie nie wykazała podobieństwa uwolnionych białek do białek zdeponowanych w dostępnych bazach danych. Można stwierdzić, że hydrolaza zaangażowana w estryfikację alkoholi terpenowych znacząco różni się od scharakteryzowanych do tej pory biokatalizatorów. Sun i in. (2009) określili wpływ pH buforu przed liofilizacją na aktywność dwóch lipaz Lip1 i Lip2 z *Rhizopus chinensis* w syntezie estrów. Lip2 wykazywała maksymalną aktywność estryfikacji przy pH 6,0, z kolei Lip1 wykazywała optimum przy liofilizacji z buforu o pH 7,5. Lip2 zachowywała 80% i 71% swojej maksymalnej aktywności odpowiednio w pH 5,5 i 6,5. Inkubacja obu lipaz w alkalicznym pH powyżej 8 powodowała całkowitą utratę aktywności enzymatycznej poprzez znaczną zmianę stanu jonizacji grup aminowych w liofilizowanych białkach. Lipaza ze *Sporidiobolus pararoseus* charakteryzowała się najwyższą aktywnością katalityczną przy liofilizacji z buforu o pH 6,5 (Smaniotto i in., 2014). Z kolei inkubacja lipazy związanej z grzybnią *Aspergillus niger* MYA 135 w buforze o pH 4 przed liofilizacją prowadziła do zwiększonej aktywności hydrolitycznej i transestryfikacyjnej (Romero i in., 2013).

Na wydajność estryfikacji alkoholi terpenowych przy użyciu liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 istotny wpływ ma struktura przestrzenna reagentów. Spośród badanych pierwszorzędowych alkoholi najwyższą konwersję molową uzyskano dla monocyklicznego alkoholu perylowego, która przekraczała 91% (po czasie 20 godz.) dla wszystkich badanych kwasów karboksylowych (Tab.20). Porównanie wydajności estryfikacji cytronellolu i geraniolu może wskazywać na znaczenie liczby wiązań podwójnych w cząsteczce alkoholu oraz różną liczbę atomów węgla pomiędzy grupą hydroksylową a wiązaniem podwójnym. Z kolei w przypadku nerolu i geraniolu istotną rolę może odgrywać izomeria konformacyjna. Najniższą wydajność uzyskano dla alkoholi bicyklicznych, myrtenolu i nopolu, co mogło być spowodowane zawadą przestrzenną w dostępie substratów do centrum katalitycznego

enzymu. Zawada przestrzenna utrudniająca dostęp do centrum katalitycznego hydrolazy związanej z grzybnią *C. pannorum* A-1 może być również przyczyną jej śladowej aktywności katalitycznej wobec drugorzędowych alkoholi terpenowych i braku aktywności wobec trzeciorzędowego linalolu (Paroul i in., 2010). Podobne wyniki uzyskali Castro i in. (1992) w badaniach nad estryfikacją alkoholi terpenowych z użyciem immobilizowanej lipazy z *Mucor miehei*. Wysoką wydajność estryfikacji uzyskano dla alkoholi pierwszorzędowych, takich jak cytronellol, geraniol i nerol. Z kolei zastosowanie drugorzędowego mentolu i trzeciorzędowego linalolu nie prowadziło do powstania produktu. Na podstawie różnic w konwersji molowej (Tab. 20) różnych kwasów karboksylowych (C2-C9) w estryfikacji alkoholi terpenowych katalizowanej przez *C. pannorum* można stwierdzić, że wydajność reakcji wzrastała wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego. Taką samą zależność zaobserwowano w badaniach nad estryfikacją 1-heksanolu różnymi kwasami tłuszczowymi z wykorzystaniem immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica* (Diaz i in., 2010).

W celu potwierdzenia, że niska aktywność estryfikacji alkoholi drugo- i trzeciorzędowych związana jest raczej ze strukturą przestrzenną a nie toksycznością substratu, grzybnię poddano inkubacji z alkoholami terpenowymi oraz kwasami karboksylowymi. Spośród badanych związków tylko kwas octowy wykazuje negatywny wpływ na aktywność katalityczną liofilizowanej grzybni. Biokatalizator inkubowany z kwasem octowym charakteryzuje się niższą o 15% aktywnością w porównaniu do biokatalizatora nie poddanego działaniu żadnego związku (Tab. 21). Wyniki na temat negatywnego efektu kwasu octowego są zgodne z poprzednimi eksperymentami oraz doniesieniami innych autorów (Guvenc i in., 2003, Romero i in., 2007). Stwierdzono, że podobnie jak w przypadku cytronellolu, inne alkohole terpenowe nie wykazują negatywnego wpływu na aktywność estryfikacyjną grzybni.

Ze względu na śladową wydajność estryfikacji drugorzędowych alkoholi terpenowych postanowiono zbadać wpływ bioimprintingu na specyficzność substratową biokatalizatora w formie liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1. Molekularny bioimprinting jest strategią, która wpływa na aktywność katalityczną enzymów w środowisku niewodnym poprzez tworzenie zmian konformacyjnych w białkach na drodze tworzenia między białkiem a odpowiednim ligandem kompleksu podobnego do kompleksu enzym-substrat. Po utworzeniu kompleksu i wypłukaniu liganda enzym w rozpuszczalnikach organicznych nie powraca do swojej pierwotnej konformacji i zachowuje „aktywną” strukturę (Li i in., 2018). Bioimprinting hydrolazy związanej z grzybnią *C. pannorum* A-1 prowadzi do zwiększenia

aktywności katalitycznej jedynie wobec cytronellolu – alkoholu pierwszorzędowego. Spośród badanych czynników imprintujących największy wpływ na aktywność katalityczną odnotowano dla kwasu laurynowego i kaprylowego (Tab. 22). Istotny wpływ na powodzenie imprintingu miało środowisko procesu. Wykazano, że bioimprinting zachodzi z wyższą wydajnością w mieszaninach rozpuszczalników różniących się indeksem polarności. Bioimprinting kwasem laurynowym w mieszaninie 1,4-dioksanu z heksanem w proporcji 1 do 1 prowadzi do 2-krotnego zwiększenia aktywności estryfikacji cytronellolu z kwasem laurynowym (Tab. 23). Inkubacja grzybni w rozpuszczalnikach z wyjątkiem metanolu (i częściowo izopropanolu) nie wykazuje wpływu na aktywność katalityczną, co świadczy o wysokiej tolerancji biokatalizatora na rozpuszczalniki organiczne. Do tej pory nie było badań nad zmianą specyficzności substratowej enzymów za pomocą bioimprintingu. Stosunkowo wysoka wydajność estryfikacji II-rzędowego cykloheksanolu pozwala stwierdzić, że istotny wpływ na aktywność biokatalizatora ma nie tylko rzędowość alkoholu, ale również obecność innych grup funkcyjnych w sąsiedztwie grupy hydroksylowej w cząsteczce terpenoidu. Wyniki badań z tej rozprawy doktorskiej wskazują, że bioimprinting potęguje raczej konstytucyjną aktywność katalityczną, jednakże można także dostrzec pewne zmiany w specyficzności substratowej, które pozwalają stwierdzić, że w odpowiednio dobranym środowisku rozpuszczalników odcisk liganda w strukturze enzymu może dać bardziej wymierne efekty. Brandao i in. (2020) przeprowadzili bioimprinting kwasami tłuszczowymi dwóch lipaz – z *Burkholderia cepacia* (BCL) i z trzustki świń (PPE). Wykazano, że bioimprintowana kwasem laurynowym BCL charakteryzuje się około 70-krotnie wyższą aktywnością od lipazy wyjściowej. W przypadku PPE, bioimprinting kwasem palmitynowym powodował 3-krotnie wyższą aktywność katalityczną. Warto zwrócić uwagę na fakt, że autorzy wykorzystali enzymy wolne niezwiązane z żadnymi strukturami, przez co łatwiej ulegały one zmianom konformacyjnym niż enzym związany ze strukturami *C. pannorum* A-1.

Produktem ubocznym estryfikacji jest woda, która może prowadzić do zmiany równowagi reakcji w kierunku hydrolizy estru. Estryfikacja z wykorzystaniem liofilizowanej grzybni nie wymaga użycia dodatkowych czynników wiążących wodę, ponieważ jest ona pochłaniana przez struktury grzybni. Dlatego ważne jest określenie pojemności wodnej biokatalizatora, czyli objętości wody, która może być związana przez masę biokatalizatora w jednym cyklu biokatalitycznym bez istotnego spadku jego aktywności. Biokatalizator w postaci liofilizowanej grzybni *C. pannorum* A-1 zachowuje ponad 70% aktywności przy 15% v/w dodatku wody do mieszaniny reakcyjnej względem

biokatalizatora (Ryc. 31). Liu i Huang (2010) wykazali, że 15% dodatek wody do estryfikacji α -terpineolu z bezwodnikiem octowym katalizowanej przez lipazę z *Candida rugosa* w nadkrytycznym CO₂ prowadzi do spadku wydajności reakcji o 70%. W przypadku estryfikacji kwasu palmitynowego przez liofilizowaną grzybnię *Rhizopus oryzae* już 4% v/w dodatek wody powodował spadek aktywności biokatalizatora o 55% (Mendez i in., 2009). Bancercz i in. (2018) zastosowali grzybowe polisacharydy jako czynniki wiążące wodę w estryfikacji alkoholu butylowego z użyciem zewnątrzkomórkowej lipazy z *Rhizomucor variabilis*. Obecność polisacharydów w trakcie reakcji skutkowało zwiększeniem konwersji substratów do estru aż o 35%. Jednak z praktycznego punktu widzenia znacznie prostsze jest zastosowanie wysoko aktywnej grzybni ze względu na pominięcie etapu oczyszczania zarówno polisacharydów, jak i białka enzymatycznego. Z drugiej strony, woda odgrywa kluczową rolę w zachowaniu odpowiedniej struktury i aktywności enzymu (Adamczak i Bornscheuer, 2009), jednak niewielki dodatek wody do reakcji nie powoduje zwiększenia aktywności katalitycznej hydrolazy związanej z grzybnią *C. pannorum* A-1 (Ryc. 31). Jest to spowodowane wilgotnością resztkową grzybni na poziomie 3,4% (oznaczoną poprzez porównanie masy liofilizatu i liofilizatu suszonego w 105°C przez 3 godz.), która zapewnia niezbędną ilość wody dla optymalnej aktywności białka. Podobną wilgotność resztkową lipazy związanej z grzybnią *Geotrichum candidum* na poziomie 3,8% odnotowali Loo i in. (2014).

W projektowaniu procesu biokatalizy z udziałem immobilizowanych enzymów ważne jest określenie momentu dezaktywacji biokatalizatora. W przemyśle immobilizowany enzym jest zwykle wymieniany, gdy aktywność resztkowa wynosi od 50 do 10% aktywności początkowej (Basso i Serban, 2019). Mniejsza częstotliwość wymiany biokatalizatora znacznie obniża koszty biokatalizy. Wykazano, że biokatalizator w postaci grzybni *C. pannorum* A-1 zachowuje do 80% swojej początkowej aktywności po pięciu 24-godzinnych cyklach katalitycznych oraz 70% po dwóch kolejnych cyklach (Ryc. 32). Kiridi i in. (2017) podali, że lipaza związana z grzybnią *A. oryzae* zachowywała ok. 60% początkowej aktywności po pięciu 24-godzinnych cyklach reakcyjnych. Spadek aktywności biokatalizatora prawdopodobnie był spowodowany procesem filtracji i suszenia pomiędzy cyklami katalitycznymi oraz częstą ekspozycją na kwas octowy. Dlatego istnieje potencjalna możliwość zwiększenia cykli biokatalitycznych, poprzez dopracowanie procesu odzyskiwania i zwracania biokatalizatora do następnego cyklu reakcyjnego, a także poprzez kontrolowanie ilości kwasu octowego w tym procesie.

Związany z biomasą enzym o aktywności lipolitycznej z *C. pannorum* A-1 charakteryzował się również wysoką stabilnością podczas przechowywania w temperaturze -20°C . Ze względu na znaczny spadek aktywności biokatalizatora po rocznym okresie przechowywania w 4°C i 20°C (Ryc. 33), konieczne jest przechowywanie preparatu w stanie zamrożonym. Również lipaza związana z biomasą z mezofilnego grzyba *Geotrichum candidum* opisana przez Loo i in. (2014) wykazała spadek aktywności enzymu do 70% aktywności początkowej po 8 miesiącach przechowywania w 4°C .

Inną metodą otrzymywania pochodnych terpenów jest kataliza biomimetyczna przy użyciu porfiryn (Trytek i in., 2009, Martins i in., 2001), która pozwala na łagodne przeprowadzenie procesu utleniania z wykorzystaniem tlenu cząsteczkowego i światła. W badaniach wykorzystano trzy I-rzędowe alkohole terpenowe różniące się strukturą – bicykliczny myrtenol, monocykliczny alkohol perylowy i liniowy cytronellol. W pierwszym etapie badań wykorzystano 9 porfiryn komercyjnych i 3 pochodne protoporfiryny IX zsyntetyzowane we współpracy z Instytutem Chemii Organicznej PAN w Warszawie. Spośród badanych alkoholi terpenowych jedynie myrtenol ulegał przekształceniu do nieznanego produktu o czasie retencji 6,4 min. (Ryc. 34) i widmie masowym niemającym odpowiednika w dostępnych bazach danych (Ryc. 35). Najwyższe wydajności fotokatalizy myrtenolu po 4 godz. reakcji odnotowano dla tetrafenylporfiryny (H_2TPP) 13,2% i metoksyfenylporfiryny (H_2TPPOMe) 11,9% (Tab. 24). Niska aktywność katalityczna metaloporfiryn cynku była spowodowana prawdopodobnie silnymi zmianami ich właściwości fotofizycznych w układzie chloroform/myrtenol, a w przypadku ZnTPyP silnymi właściwościami elektronodonorowymi grupy pirydylowej (Magdaong i in., 2020, Taniguchi i in., 2021). Zerowa wydajność transformacji myrtenolu przy użyciu porfiryn żelaza III prawdopodobnie wynikała z braku ich aktywności fotokatalitycznej. Z kolei niska aktywność metyloestrowej pochodnej protoporfiryny IX może mieć związek z efektami bisterycznymi „masywnych” grup metyloestrowych (Trytek i in., 2005). Dotychczas jedyne badania nad fotokatalitycznym utlenieniem alkoholi terpenowych skupiały na wykorzystaniu porfiryn w obecności nadtlenu wodoru. Martins i in. (2001) przeprowadzili utlenianie (+)-3-karenu, nerolu i geraniolu przy użyciu kompleksów porfiryn manganu (III) w obecności nadtlenu wodoru jako utleniacza i octanu amonu jako kokatalizatora. Po 2 godz. reakcji uzyskano ponad 60% 6,7-epoksydu geraniolu i śladowe ilości epoksydu geranialu. Kolejne badania utleniania geraniolu do epoksydu przy użyciu porfiryn manganu skupiały się na zwiększeniu aktywności i stabilności biokatalizatora w obecności nadtlenu wodoru (Santo i in., 2005, Rebelo i in., 2005, De Paula i in., 2015). Nie ma dostępnych badań

nad katalizą biomimetyczną lub fotokatalitycznym utlenianiem myrtenolu, alkoholu perylowego czy cytronellolu.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono dobór porfiryny do fotokatalitycznej konwersji myrtenolu do nieznanego produktu o czasie retencji 6,4 min. W ostatecznym wyborze biomimetycznego katalizatora kierowano się wydajnością konwersji substratu oraz stabilnością w trakcie naświetlania promieniowaniem widzialnym. Najwyższą 66,2% aktywnością konwersji myrtenolu do produktu o $RT=6,4$ min po 24 godz. reakcji charakteryzowała się tetrafenylporfiryna. W przypadku H_2OEP , $H_2TPPOMe$ i $H_2TAlxPP$ podczas dobowego naświetlania można zaobserwować powstawanie kolejnego nieznanego produktu o $RT=7,5$ min w znacznych ilościach (Tab. 25). Największą stabilność w trakcie katalizy wykazuje H_2TF_5PP i $H_2TPPOMe$. W przypadku tetrafenylporfiryny widoczna jest zmiana widma absorpcji w końcowej fazie reakcji, jednak zmiany właściwości spektralnych porfiryny nie mają zasadniczego wpływu na jej aktywność katalityczną wobec myrtenolu. Trytek i in. (2005) przeprowadzili skryning siedmiu porfiryn do fotokatalitycznego utlenienia limonenu. Wykazali, że porfiryny znacznie różnią się między sobą aktywnością katalityczną. Fotoutlenianie limonenu przy użyciu tetrafenylporfiryny charakteryzowało się 60% konwersją substratu do produktów, głównie nieznanego o widmie masowym podobnym do werbenonu. Z kolei głównym produktem utleniania limonenu przez tetra-4-pirydyloporfirynę i tetra-4-metylofenylo-porfirynę był jak wykazano w innych badaniach, wodoronadtlenek limonenu (Trytek i in., 2007). Najniższą aktywnością katalityczną charakteryzowały się tetrafenylporfiryna cynku (II) i tetrafenylporfiryna kobaltu (II) z konwersją odpowiednio 6% i 0,1%.

Biotransformacja myrtenolu przy użyciu porfiryn w układzie fotokatalitycznym prowadzi do nowego związku o jonie masowym (MS) 166, co wskazuje na włączenie atomu tlenu do struktury myrtenolu. Przed przystąpieniem do dalszych badań przeprowadzono analizy 1D i 2D NMR (Ryc. 43–45 i suplement ryc. 57-60), które wykazały, że nieznanym produktem o $RT=6,4$ min. jest tlenek myrtenalu. Ze względu na obecność reaktywnych grup w cząsteczce tlenku myrtenalu, które mogą zwiększać działanie terapeutyczne wyjściowego substratu i stwarzają możliwość syntezy dużej liczby pochodnych, postanowiono zoptymalizować układ fotokatalitycznego utleniania myrtenolu przy użyciu H_2TPP .

Określono wpływ stężenia substratu, stężenia porfiryny, rodzaju rozpuszczalnika organicznego i temperatury na wydajność fotokatalitycznego utleniania myrtenolu. Najwyższą konwersję molową myrtenolu (18%) uzyskano z zastosowaniem 0,005 M myrtenolu (Ryc. 46). Z kolei najwyższe stężenie produktu ok. 18 g/l osiągnięto przy 2 M

stężeniu substratu. Może mieć to związek z faktem, że przy dużej liczbie cząsteczek myrtenolu zachodzi większa liczba zderzeń pomiędzy reaktywnymi formami tlenu (ROS) a cząsteczkami substratu. Jednak wraz ze wzrostem stężenia substratu konwersja molowa była coraz niższa ze względu przekroczenie maksymalnego stężenia wysycającego katalizator. Warto zwrócić uwagę na fakt, że monoterpény, w tym myrtenol, wykazują właściwości antyoksydacyjne, przez co mogą wygaszać ROS (Penuelas i Llusia, 2002). Trytek i in. (2009) określili wpływ stężenia α -pinenu na wydajność fotoutleniania przez immobilizowaną $H_2TMePyP$. Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia substratu do 75 mM wzrasta stopień konwersji molowej, po czym następuje jego znaczący spadek. Z kolei wydajność (mg/l) utleniania limonenu przez H_2TPP wzrasta liniowo przy wzroście stężenia substratu z 0,05% do 90%. Prowadzenie reakcji w 100% limonenu bez rozpuszczalnika prowadzi natomiast do znacznego spadku konwersji molowej limonenu (Trytek i in., 2005). Określona objętość rozpuszczalnika jest niezbędna do przeprowadzenia reakcji z zachowaniem wysokiej wydajności, gdyż wpływa ona na stabilność i tempo powstawania ROS, np. wolnych rodników tlenowych (Trytek i in. 2011).

Najwyższe wydajności biokonwersji myrtenolu do tlenku myrtenalu odnotowano w zakresie stężeń H_2TPP 0,1 – 0,5 mM. Przy najniższych stężeniach porfiryny obserwowano względnie niską wydajność katalizy, przy czym wraz ze wzrostem stężenia biokatalizatora wydajność wzrastała (Ryc. 47). Gdy stężenie katalizatora jest znacznie niższe od stężenia substratu, wydajność reakcji jest bezpośrednio zależna od stężenia katalizatora (Bełtowska-Brzezinska, 2009). Z kolei drastyczny spadek wydajności fotokatalizy przy najwyższych stężeniach porfiryny może wynikać z aglomeracji jej cząsteczek w obecności myrtenolu, w wyniku czego dochodzi do częściowej inaktywacji centrów aktywnych biokatalizatora (Prościński i in. 1997, Trytek i in. 2011). Trytek i in. (2005) wykazali, że konwersja limonenu do karwonu i wodoronadtlenku limonenu przez H_2TPP zachodzi z najwyższą wydajnością przy stosunku molowym katalizatora do substratu wynoszącym 1 : 2. Z kolei najwyższą wydajność konwersji α -pinenu do pinokarwonu i *trans*-pinokarweolu przez immobilizowaną $H_2TMePyP$ uzyskano przy 8-krotnym nadmiarze substratu w stosunku do porfiryny (Trytek i in. 2009). W niniejszej pracy najwyższy stopień konwersji myrtenolu do tlenku myrtenalu uzyskano przy 8-krotnym nadmiarze substratu w stosunku do porfiryny.

W optymalizacji procesów fotochemicznych kluczowe znaczenie ma selekcja właściwego rozpuszczalnika organicznego. Od jego rodzaju zależą właściwości cząsteczek występujących w stanie wzbudzonym i podstawowym, takie jak energia stanu elektronowego, rozkład gęstości elektronowej, geometria, usytuowanie stanów

wzbudzonych o różnej konfiguracji elektronów, moment dipolowy oraz polaryzowalność (Dyson i Jessop 2016). Wysokie wydajności reakcji uzyskano w rozpuszczalnikach silnie hydrofobowych ze względu na fakt, że zarówno myrtenol jak i H₂TPP są nierozpuszczalne w wodzie. Najlepszym rozpuszczalnikiem do fotoutlenienia myrtenolu jest chloroform (Ryc. 48), prawdopodobnie ze względu na jego właściwość utrzymywania długich czasów życia reaktywnych form tlenu (Trytek i in., 2011).

Tetrafenyloporfiryne w procesie konwersji myrtenolu do tlenku myrtenalu wykazuje najwyższą aktywność katalityczną w 25°C (Ryc. 49). Prowadzenie reakcji w stosunkowo niskiej temperaturze jest szczególnie korzystne przy produkcji związków termolabilnych lub charakteryzujących się dużą lotnością takich jak terpeny. Ponadto, ekonomika procesu jest wysoka ze względu na temperaturę zbliżoną do temperatury otoczenia co eliminuje konieczność stosowania ciepłarki czy układu chłodzenia.

Porfiryne wykazują aktywność katalityczną zwłaszcza w stanie wzbudzonym pod wpływem działania światła widzialnego. Do celów fotochemicznych interesujący jest tylko obszar do 700 nm, ponieważ generalnie fotony o niższej energii nie mogą wywołać fotochemicznych zmian strukturalnych, zaś fotony o długości fali poniżej 300 nm nie są wykrywalne w wiązce światła słonecznego bezpośrednio docierającego do powierzchni Ziemi (Pohlmann i in., 1997). Z tego powodu określono aktywność katalityczną H₂TPP w zakresie długości fal 425 – 700 nm, który obejmuje także zakres widma absorpcji porfiryne. Najwyższą aktywność katalityczną H₂TPP wykazuje przy pełnym spektrum światła widzialnego (Tab. 27). W zakresie fal od 425 do 600 nm nie wykazano istotnych różnic w wydajności fotokonwersji myrtenolu. Wyniki są zbieżne z badaniami nad wpływem długości fali światła na wydajność fotooksydacji limonenu przez H₂TPP (Trytek i in., 2007).

Biokataliza prowadzona przy użyciu H₂TPP i substratów z podobnym ułożeniem grupy hydroksylowej względem wiązania podwójnego wykazała, że tlenek myrtenalu nie powstaje dzięki charakterystycznemu ugrupowaniu enolowemu. Przy zastosowaniu myrtenalu lub tlenku α -pinenu, również nie otrzymano tlenku myrtenalu ani innych produktów, dlatego związki te nie są produktami pośrednimi fotoutleniania myrtenolu z użyciem H₂TPP. Produkt ten może powstawać bezpośrednio z myrtenolu prawdopodobnie poprzez tworzenie nietrwałego jonorodnika i przy udziale rodników tlenowych. Możliwe, że taka forma przejściowa tlenku myrtenalu powstaje w wyniku oddziaływania cząsteczki myrtenolu ze wzbudzoną cząsteczką porfiryne. Wskazuje na to zmiana widma absorpcji H₂TPP w końcowej fazie reakcji (Ryc. 51). Widoczne są: przesunięcie pasma Soreta

w stronę fal dłuższych oraz zmiany w zakresie pasma Q – tworzą się dwa pasma przy 600 i 661 nm, które są charakterystyczne dla dikationu protoporfiryny (H_4TPP^{2+}). Wolne rodniki tlenowe mogą powstawać albo w mechanizmie polegającym na transferze elektronu ze wzbudzonej porfiryry lub/i także w wyniku działania tlenu singletowego 1O_2 , który tworzy się w mechanizmie transferu energii ze wzbudzonej porfiryry na tlen cząsteczkowy.

W celu oceny zdolności tetrafenylporfiryry do generowania tlenu singletowego monitorowano luminescencję 1O_2 przy 1274 nm. Obecność myrtenolu w układzie katalitycznym zmniejsza intensywność pasma fosforescencji 1O_2 generowanego przez H_2TPP , co jest widoczne na początku reakcji (po czasie 0 godz.) (Ryc. 50 i 51). To wskazuje na zaangażowanie tlenu singletowego w biokatalizę oraz w pewnym stopniu potwierdza właściwości antyoksydacyjne substratu. Z drugiej strony zastosowanie wygaszacza tlenu singletowego w formie tokoferolu skutkowało uzyskaniem nieznanego produktu biokatalizy o czasie retencji $RT=8,7$ min, który nie był obserwowany do tej pory w żadnym z układów. Wygaszenie tlenu singletowego przez tokoferol mogło doprowadzić do inicjacji innego mechanizmu katalitycznego; całkowite przejście H_2TPP w formę dikationu H_4TPP^{2+} już po 12 godz. (Rys. 52) wskazuje, na większy udział w tym mechanizmie transferu protonów z rozpuszczalnika (lub formy przejściowej substratu) na porfiryrynę (Munoz i in., 2008).

Analiza widm absorpcji i widm emisji tlenu singletowego układów z tokoferolem i bez obecności tego wygaszacza (Rys. 52, 51) wskazuje na to, że mechanizm biomimetycznego utleniania myrtenolu do tlenku myrtenalu jest złożony i ściśle powiązany z protonacją pierścienia pirolowego porfiryryny. Prawdopodobnie opiera się na konkurencyjnym udziale tlenu singletowego oraz rodników ponadtlenkowych ($O_2^{\cdot-}$) i hydroksylowych (OH^{\cdot}), przy czym przejście kationów H^+ przez porfiryrynę wydaje się mieć związek z rodnikowym mechanizmem niezależnym od tlenu singletowego. Wyniki doświadczenia z dodatkiem do układu reakcyjnego BHT jako inhibitora wolnych rodników (wygaszacza ROS) są zgodne z powyższymi przypuszczeniami. Obecność BHT skutkowało zahamowaniem protonowania porfiryryny (Ryc. 53) i tworzenia jakichkolwiek produktów utlenienia myrtenolu. Biotransformacja myrtenolu do tlenku myrtenalu może zatem obejmować dwa różne szlaki reakcji: bezpośrednie utlenienie myrtenolu tlenem singletowym oraz pozyskiwanie elektronu z myrtenolu przez wzbudzony dikation H_2TPP , a następnie generowanie i późniejszą rekombinację rodnikowych związków pośrednich (Trytek i in., 2011).

W ostatnim etapie badań określono aktywność biologiczną produktów biokatalizy wobec komórek nowotworowych glejaka ludzkiego i mikroorganizmów patogennych dla ludzi. W tym celu produkty biokatalizy oczyszczono za pomocą cieczej chromatografii

kolumnowej do czystości powyżej 94%. Najlepszym eluentem do oczyszczenia estrów była mieszanina heksanu z octanem etylu w stosunku 10 do 1, a do oczyszczenia epoksydu myrtenalu mieszanina heksanu i MTBE w stosunku 30 do 1.

Spośród badanych 50 związków tylko 16 wykazywało aktywność apoptotyczną wobec komórek glejaka w IV stadium rozwoju. W przypadku komórek w III stadium nie odnotowano żadnej aktywności biologicznej związków. Najwyższą indukcję apoptozy, tj. 11,3% zaobserwowano po inkubacji komórek linii T98G z maślanem alkoholu perylowego (Ryc. 58). Wyższą aktywność estrów od alkoholowego prekursora wykazywały również walerianian, kaprylan i pelargonian cytronellolu (Ryc. 55), propionian alkoholu perylowego (Ryc. 54) oraz maślan, kaprylan i pelargonian myrtenolu (Ryc. 56). Tlenek myrtenalu nie wykazywał aktywności antynowotworowej. Alkohol perylowy wykazuje wysoką aktywność antyglejakową szczególnie w momencie podania donosowego. Jest on jedynym związkiem podawanym donosowo w terapiach przeciwnowotworowych, który przeszedł badania kliniczne (Chen i in., 2018). Badania wykazały, że wyłączone leczenie glejaka alkoholem perylowym umożliwia utrzymanie pacjentów w stanie remisji klinicznej nawet przez 4 lata (De Fonseca i in., 2013). Eksperymenty na liniach komórkowych wykazały, że alkohol perylowy zaburza regulację szlaku miewalonianu i Ras-Raf-MEK-ERK w komórkach glejaka linii U87 i U343. Dodatkowo alkohol wpływa na potranslacyjną modyfikację H-Ras i Rac1 (Afshordel i in., 2015). Co ciekawe, w badaniach prezentowanych w niniejszej pracy alkohol perylowy wykazywał stosunkowo niską ok. 3% aktywność w indukcji śmierci komórkowej. Co ważne, badane związki nie indukowały ani nekrozy ani autofagii, co jest korzystne ze względu na uniknięcie stanów zapalnych i martwiczych tkanek, a nawet całych narządów (Jakubowicz-Gil i in., 2017). Do tej pory brak jest prac związanych z określeniem aktywności antyglejakowej innych alkoholi terpenowych, jednak pilotażowe badania własne wskazują, że wysoki potencjał antynowotworowy posiadają również cytronellol i myrtenol oraz ich niektóre estry.

Badania antymikrobiologiczne (Tab. 28 i 29) wykazały, że najbardziej wrażliwym na terpeny gatunkiem był *Staphylococcus aureus*. Najwyższą aktywność wykazywał farnezoł, a zaraz za nim inne alkohole terpenowe z wyjątkiem myrtenolu. Co ciekawe, żaden produkt biokatalizy myrtenolu nie wykazywał aktywności antybiofilmowej wobec *S. aureus*. W przypadku produktów biokatalizy tylko propionian alkoholu perylowego wykazywał nieznacznie wyższą aktywność antybiofilmową od alkoholu. Wobec drożdżaków *C. albicans* zaobserwowano aktywność wszystkich alkoholi terpenowych oprócz alkoholu perylowego i myrtenolu. Jednak ich pochodne otrzymane w wyniku biotransformacji, takie

jak maślan myrtenolu, epoksyd myrtenalu i octan alkoholu perylowego wykazywały około 30% aktywność wobec komórek biofilmu. Najniższą wrażliwość na związki wykazywała pałeczka *P. aeruginosa*. W metodzie BioAntiVol aktywność wobec pałeczki ropy błękitnej wykazywały epoksyd myrtenalu, cytronellol, geraniol i nerol, z kolei w metodzie DK, oprócz wymienionych związków, aktywność wykazały również alkohol perylowy i octan myrtenolu. Różnice w aktywności badanych terpenów wobec mikroorganizmów w dwóch metodach mogą wynikać z różnej lotności związków. W metodzie dyfuzyjno-krażkowej (DK) związki naniesione na krażki bibułowe mogły bezpośrednio oddziaływać na komórki z ominięciem parowania. Z kolei różna wrażliwość drobnoustrojów na badane związki może wynikać z budowy ich ściany komórkowej. Najbardziej wrażliwy *S. aureus* jest bakterią Gram-dodatnią i nie posiada zewnętrznej błony komórkowej. Z kolei ściana *P. aeruginosa*, bakterii Gram-ujemnej, dodatkowo złożona jest z zewnętrznej błony, która może utrudniać terpenom wnikanie do środka komórki lub oddziaływanie bezpośrednio z wewnętrzną błoną komórkową. Ściana komórkowa drożdżaków *C. albicans* składa się ze ściany zewnętrznej zbudowanej z mannanów i białek, ściany wewnętrznej zbudowanej z α - i β -glukanów i chityny oraz błony komórkowej stanowiącej dwuwarstwę lipidową. W przypadku badań antygrzybiczych wobec *A. niger* i *P. chrysogenum* w hodowli wgłębnej na płytkach wielodołkowych wykazano, że wszystkie estry kaprylowe i pelargonowe hamują wzrost grzybów w takim samym stężeniu 1024 $\mu\text{g/ml}$. Co ciekawe, w tym teście jedynym alkoholem, który nie wykazywał aktywności, był farnesol. W badaniach własnych potwierdzono wysoką aktywność antymikrobiologiczną alkoholi terpenowych obserwowaną przez innych autorów (Kotan i in., 2007, Shin i Lim, 2004, Chen i Viljoen, 2010, Singh i in., 2016, Figueiredo i in., 2020, Ansani i in., 2018) i wykazano, że niektóre nowe produkty ich biokatalizy wykazują wyższą aktywność od swoich prekursorów. Jednak mechanizm działania tych związków zarówno wobec komórek nowotworowych, jak i przeciw drobnoustrojom wymaga dalszych badań.

6. Wnioski

1. Liofilizowana grzybnia *C. pannorum* A-1 jest wydajnym katalizatorem estryfikacji alkoholi terpenowych i kwasów karboksylowych.
2. Stabilizacja pH węglanem wapnia oraz dodatek oliwy z oliwek zwiększa aktywność biokatalityczną grzybni oraz wydajność uzyskiwanej biomasy katalizatora.
3. Estryfikacja cytronellolu z kwasem octowym zachodzi z największą wydajnością w heksanie zawierającym 3% w/v biokatalizatora, z dwukrotnym nadmiarem alkoholu do kwasu w 30°C bez konieczności mieszania układu.
4. Biokatalizator w postaci grzybni *C. pannorum* A-1 wykazuje śladową aktywność estryfikacji drugorzędowych alkoholi terpenowych i brak aktywności wobec alkoholi trzeciorzędowych. Wydajność biokatalitycznej estryfikacji pierwszorzędowych alkoholi terpenowych wzrasta wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego kwasu użytego do estryfikacji.
5. Biokatalizator jest stabilny w rozpuszczalnikach organicznych, wysokiej temperaturze (do 70°C) i w obecności kwasu octowego. Charakteryzuje się także dużą pojemnością wodną.
6. Grzybnia *C. pannorum* A-1 może być z powodzeniem wykorzystana w minimum 7 cyklach katalitycznych.
7. Inkubacja grzybni w buforze o pH powyżej 9,2 prowadzi do uwolnienia białek z grzybni do buforu.
8. Bioimprinting hydrolazy związanej z grzybnią *C. pannorum* A-1 zwiększa jedynie aktywność wobec alkoholu pierwszorzędowego.
9. Biokatalizator zachowuje ponad 80% wyjściowej aktywności po rocznym przechowywaniu w -20°C.
10. Spośród cytronellolu, alkoholu perylowego i myrtenolu tylko myrtenol ulega biomimetycznej oksydacji przy użyciu porfiryn w układzie fotokatalitycznym.
11. Najbardziej wydajnym biomimetycznym katalizatorem fotoutlenienia myrtenolu jest 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryna (H₂TPP).
12. Nowym produktem utleniania myrtenolu w układzie biomimetycznym jest tlenek myrtenalu.
13. Biomimetyczna kataliza myrtenolu zachodzi z największą wydajnością w chloroformie przy 0,1 M stężeniu substratu, 0,1-0,2 mM stężeniu H₂TPP w 25°C.

14. Podstawowy mechanizm biotransformacji myrtenolu przy użyciu H₂TPP opiera się na konkurencyjnym udziale reaktywnych form tlenu: tlenu singletowego (¹O₂) oraz rodników tlenowych.
15. Niektóre produkty biokatalizy wykazują wyższą aktywność biologiczną zwłaszcza wobec komórek glejaka anaplastycznego oraz umiarkowaną wobec mikroorganizmów.
16. Brak liniowej korelacji pomiędzy długością łańcucha węglowego kwasu karboksylowego a aktywnością estrów w stosunku do komórek ludzkiego glejaka wskazuje, że optymalna dla aktywności antynowotworowej długość łańcucha węglowego jest indywidualną właściwością estrów konkretnego alkoholu terpenowego.

7. Część wyników rozprawy doktorskiej jest przedmiotem

publikacji w czasopismach z listy JCR:

1. **Kutyla, M.;** Trytek, M.; Buczek, K.; Tomaszewska, E.; Muszyński, S. Biomass of a psychrophilic fungus as a biocatalyst for efficient direct esterification of citronellol. *Bioenergy Res.* **2022**, 15, 399-411. IF₂₀₂₁ = 3,852.
2. **Kutyla, M.;** Maciejczyk, A.; Trytek, M.; Jakubowicz-Gil, J. Biocatalytic synthesis of terpene esters and their biological activity in human glioma cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2022**, 23, 760-765. IF₂₀₂₁ = 2,829.

udzielonych patentów:

1. **Kutyla, M.;** Trytek, M. Sposób otrzymywania biokatalizatorów z grzybów mezofilnych. Pat. 240994. **2022**.
2. **Kutyla, M.;** Fiedurek, J.; Trytek, M.; Sposób otrzymywania biokatalizatorów z grzybów psychrofilnych. Pat. 240995, **2022**.

publikacji w monografiach krajowych:

1. **Kutyla, M.;** Trytek, M. Liofilizowana grzybnia *Chrysosporium pannorum* A-1 jako wydajny biokatalizator syntezy estrów terpenowych W: Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, *Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie*, praca zbiorowa pod redakcją Doroty Kołodyńskiej, **2021**, 54-57, ISBN 978-83-227-9503-3.

komunikatów konferencyjnych:

1. **Kutyla, M.;** Trytek, M.; Buczek, K.; Gromada, A. Production of terpene esters by esterification catalysed by mycelium of *Chrysosporium pannorum* A-1. 2019 International Conference on Biotechnology and Bioengineering, September 25-28, 2019, Poznań, Polska. Poster.
2. **Kutyla, M.;** Trytek, M. Liofilizowana grzybnia *Chrysosporium pannorum* A-1 jako wydajny biokatalizator syntezy estrów terpenowych. Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, Lublin, 28 czerwca 2021. Komunikat ustny.
3. **Kutyla, M.;** Stankevič, M.; Pięt, M.; Trytek, M. Biocatalytic preparation of a myrtenol derivative with potential anticancer properties. 5th Symposium on Biotransformation for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, 13-15 czerwca 2022, Jura Krakowsko-Częstochowska. Poster.

8. Bibliografia

1. Achmon, Y.; Ben-Barak Zelas, Z.; Fishman, A. Cloning Rosa hybrid phenylacetaldehyde synthase for the production of 2-phenylethanol in a whole cell *Escherichia coli* system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 3603–3611.
2. Adamczak, M.; Bornscheuer, U.W. Improving ascorbyl oleate synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids and water activity control by salt hydrates. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 257–261.
3. Adams, J.P.; Brown, M.J.B.; Diaz-Rodriguez, A.; Lloyd, R.C.; Roiban, G.D. Biocatalysis: a pharma perspective. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2421–2432.
4. Afshordel, S.; Kern, B.; Clasohm, J.; König, H.; Priestler, M.; Weissenberger, J.; Kögel, D.; Eckert, G.P. Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation – Impact of Ras-/Rho-prenylation. *Pharmacol. Res.* **2015**, *91*, 69–77.
5. Ahmad, S.B.; Rehman, M.U.; Fatima, B.; Ahmad, B.; Hussain, I.; Ahmad, S.P.; Farooq, A.; Muzamil, S.; Razzaq, R.; Rashid, S.M.; Ahmad, B.S. Antifibrotic effects of D-limonene (5(1-methyl-4-[1-methylethenyl]) cyclohexane) in CCl₄ induced liver toxicity in Wistar rats. *Environ. Toxicol.* **2018**, *33*, 361–369.
6. Ahuja, I.; Rohlo, J.; Bones, A.M. Defence mechanisms of Brassicaceae: Implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2010**, *30*, 311–348.
7. Amini, R.; Asle-Rousta, M.; Aghazadeh, S. Hepatoprotective effect of limonene against chronic immobilization induced liver damage in rats. *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* **2020**, *393*, 2053–2059.
8. Anandakumar, P.; Kamaraj, S.; Vanitha, M.K. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. *J. Food Biochem.* **2020**. 00:e13566.
9. Anis, E.; Zafeer, M.F.; Firdaus, F.; Islam, S.N.; Fatima, M.; Hossain, M.M. Evaluation of phytomedicinal potential of perillyl alcohol in an in vitro Parkinson's Disease model. *Drug Dev. Res.* **2018**, *79*, 218–24.
10. Ansari, M.A.; Fatima, Z.; Ahmad, K.; Hameed, S. Monoterpenoid perillyl alcohol impairs metabolic flexibility of *Candida albicans* by inhibiting glyoxylate cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *495*, 560–566.
11. Ansari, M.A.; Fatima, Z.; Hameed, S. Anticandidal effect and mechanisms of monoterpenoid, perillyl alcohol against *Candida albicans*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162465.
12. Arcens, D.; Grau, E.; Grelier, S.; Cramail, H.; Peruch, F. Impact of fatty acid structure on CALB-catalyzed esterification of glucose. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2020**, 1900294.
13. Arroyo, J.; Bonilla, P.; Moreno-Exebio, L.; Ronceros, G.; Tomás, G.; Huamán, J.; Ruez, E.; Quino, M.; Rodriguez-Calzado, J. (2013). Gastroprotective and antisecretory effect of a phytochemical made from matico leaves (*Piper aduncum*). *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública* **2013**, *30*, 608–615.
14. Bacanlı, M.; Anlar, H.G.; Aydın, S.; Çal, T.; Arı, N.; Ündeğer Bucurgat, Ü.; Başaran, A.A.; Başaran, N. D-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *110*, 434–442.
15. Balkema-Boomstra, A.G.; Zijlstra, S.; Verstappen, F.W.A.; Inggamer, H.; Mercke, P.E.; Jongsma, M.A.; Bouwmeester, H. Role of Cucurbitacin C in Resistance to Spider Mite (*Tetranychus urticae*) in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 225–235.
16. Bancierz, R.; Ginalska, G. A novel thermostable lipase from Basidiomycete *Bjerkandera adusta* R59: characterisation and esterification studies. *J. Ind. Microbiol. Biotchnol.* **2007**, *34*, 553–560.
17. Bancierz, R.; Ginalska, G.; Fiedurek, J.; Gromada, A. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *32*, 53–260.
18. Bancierz, R.; Osińska-Jaroszuk, M.; Jaszek, M.; Janusz, G.; Stefaniuk, D.; Sulej, J.; Janczarek, M.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Rogalski, J. New alkaline lipase from *Rhizomucor variabilis*: biochemical properties and stability in the presence of microbial EPS. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2015**, *63*, 67–76.
19. Bancierz, R.; Osińska-Jaroszuk, M.; Jaszek, M.; Sulej, J.; Wiater A.; Matuszewska, A.; Rogalski, J. Fungal polysaccharides as a water-adsorbing material in esters production with the use of lipase from *Rhizomucor variabilis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *118*, 957–964.
20. Basso, A.; Serban, S. Industrial applications of immobilized enzymes—a review. *Mol. Catal.* **2019**, *479*, 110607.
21. Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses. *Wiley – VCH – Verlag*, Morlenbach. **2001**. ISBN:978-3-527-61237-6.
22. Bejeshk, M.A.; Samareh Fekri, M.; Najafipour, H.; Rostamzadeh, F.; Jafari, E.; Rajizadeh, M.A.; Masoumi-Ardakani, Y. Anti-inflammatory and anti-remodeling effects of myrtenol in the lungs of

- asthmatic rats: Histopathological and biochemical findings. *Allergol. Immunopathol. (Madr)* **2019**, *47*, 185-193.
23. Beller, H.R.; Lee, T.S.; Katz, L. Natural products as biofuels and biobased chemicals: fatty acids and isoprenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 1508-1526.
 24. Beltowska-Brzezinska, M. Podstawy kinetyki chemicznej. Skrypt do wykładów. *Wydział Chemii UAM* **2009**, Poznań.
 25. Berchtold, C.M.; Chen, K.S.; Miyamoto, S.; Gould, M.N. Perillyl alcohol inhibits a calcium dependent constitutive nuclear factor-kappa B pathway. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 8558-8566.
 26. Bhattamisra, S.K.; Yan, V.L.Y.; Lee, C.K.; Kuean, C.H.; Candasamy, M.; Liew, Y.K.; Sahu, P.S. Protective activity of geraniol against acetic acid and *Helicobacter pylori*-induced gastric ulcers in rats. *J. Tradit. Complement. Med.* **2019**, *9*, 206-214.
 27. Bian, G.; Deng, Z.; Liu, T. Strategies for terpenoid overproduction and new terpenoid discovery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *48*, 234-241.
 28. Bicas, J.L.; Dionisio, A.P.; Pastore, G.M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavour industry. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4518-4531.
 29. Block, A.K.; Vaughan, M.M.; Schmelz, E.A.; Christensen, S.A. Biosynthesis and function of terpenoid defence compounds in maize (*Zea mays*). *Planta* **2019**, *249*, 21-30.
 30. Boncan, D.A.T.; Tsang, S.S.K.; Li, C.; Lee, I.H.T.; Lam, H-M.; Chan, T-F.; Hui, J.H.L. Terpenes and terpenoids in plants: interactions with environment and insects. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7382.
 31. Borrelli, G.M.; Trono, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 20774-20840.
 32. Boratyński, F.; Szczepańska, E.; Grudniewska, A.; Gniłka, R.; Olejniczak, T. Improving of hydrolases biosynthesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. *Sci Rep.* **2018**, *8*, 10157.
 33. Brandao, L.M.S.; Barbosa, M.S.; Souza, R.L.; Pereira, M.M.; Lima, A.S.; Soares, C.M.F. Lipase activation by molecular bioimprinting: The role of interactions between fatty acids and enzyme active site. *Biotechnol. Progress.* **2020**, *37*, e3064.
 34. Brożyna, M.; Żywicka, A.; Fijałkowski, K.; Gorczyca, D.; Oleksy-Wawrzyniak, M.; Dydak, K.; Migdał, P.; Dudek, B.; Bartoszewicz, M.; Junka, A. The novel quantitative assay for measuring the antibiofilm activity of volatile compounds (AntiBioVol). *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 7343.
 35. Bustos-Segura, C.; Kulheim, C.; Foley, W.J. Effects of terpene chemotypes of *Melaleuca alternifolia* on two specialist leaf beetles and susceptibility to myrtle rust. *J. Chem. Ecol.* **2015**, *41*, 937-947.
 36. Byers, K.J.R.P.; Bradshaw, H.D.; Riffell, J.A. Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*). *J. Exp. Biol.* **2013**, *217*, 614-623.
 37. Cai, Y.; Liu, Y.; Lu, Y.; Gao, G.; He, M. Ionic manganese porphyrins with S-containing counter anions: mimicking cytochrome P450 activity for alkene epoxidation. *Catal. Lett.* **2008**, *124*, 334-339.
 38. Canbek, M.; Uyanoglu, M.; Canbek, S.; Ceyhan, E.; Ozen, A.; Durmus, B.; Turgak, O. The effect of geraniol on liver regeneration after hepatectomy in rats. *In Vivo* **2017**, *31*, 209-213.
 39. Cascone, P.; Iodice, L.; Maffei, M.E.; Bossi, S.; Arimura, G.-I.; Guerrieri, E. Tobacco overexpressing β -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. *J. Plant Physiol.* **2015**, *173*, 28-32.
 40. Castro, H.F.; Anderson, W.; Moo-Youn, M.; Legge, R.L. Partitioning of water during the production of terpene esters using immobilized lipase. *Prog. Biotechnol.* **1992**, *8*, 475-482.
 41. Cavalcanti, B.B.; Diniz-Neto, H.; da Silva-Rocha, W.P.; Lima, E.O.; Filho, J.M.B.; de Castro, R.D.; Sampaio, F.C.; Guerra, F.Q.S. Inhibitory effect of (-)-myrtenol alone and in combination with antifungal agents on *Candida* spp. *Res. Soc. Dev.* **2021**, *10*, e35101522434.
 42. Chang, W.-C.; Song, H.; Liu, H.-W.; Liu, P. Current development in isoprenoid precursor biosynthesis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 571-579.
 43. Chatterjee, T.; Bhattacharyya, D.K. Synthesis of terpene esters by an immobilized lipase in a solvent-free system. *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20*, 865-868.
 44. Chen, C.; Song, Q. Responses of the pollinating wasp *ceratosolen solmsi marchali* to odor variation between two floral stages of *Ficus hispida*. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 1536-1544.
 45. Chen, J.; Fan, X.; Zhou, L.; Gao, X. Treatment with geraniol ameliorates methionine-choline-deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *31*, 1357-1365.
 46. Chen, T.C.; de Fonseca, C.O.; Levin, D.; Schönthal, A.H. The monoterpene perillyl alcohol: anticancer agent and medium to overcome biological barriers. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2167.
 47. Chen, T.C.; da Fonseca C.O.; Schönthal, A.H. Intranasal perillyl alcohol for glioma therapy: molecular mechanisms and clinical development. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3905.
 48. Chen, W.; Viljoen, A.M. Geraniol—a review of a commercially important fragrance material. *S. Afr. J. Bot.* **2010**, *76*, 643-651.

49. Christianson, D.W. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11570–11648.
50. Cock, I.E. The phytochemistry and chemotherapeutic potential of *Tasmannia lanceolata* (Tasmanian pepper): A review. *Pharmacogn. Commun.* **2013**, *3*, 13–25.
51. Converti, A.; Del Borghia, A.; Gandolfi, R.; Molinari, F.; Palazzia, E.; Perego, P.; Zillia, M. Simplified kinetics and thermodynamics of geraniol acetylation by lyophilized cells of *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 216–223.
52. Cordeiro, L.; Figueiredo, P.; Souza, H.; Sousa, A.; Andrade-Júnior, F.; Barbosa-Filho, J.; Lima, E. Antibacterial and antibiofilm activity of myrtenol against *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 133.
53. Crowell, P.L.; Siar Ayoubi, A.; Burke, Y.D. Antitumorigenic effects of limonene and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, *401*, 131–136.
54. Da Costa, C.P.; Jones, C.M.; Breedlove, J.R.; Trammell, G.T. Cucumber beetle resistance and mite susceptibility controlled by the bitter gene in *Cucumis sativus* L. *Science* **1971**, *172*, 1145–1146.
55. da Fonseca, C.O.; Masini, M.; Futuro, D.; Caetano, R.; Gattass, C.R.; Quirico-Santos, T. Anaplastic oligodendroglioma responding favourably to intranasal delivery of perillyl alcohol: A case report and literature review. *Surg. Neurol.* **2006**, *66*, 611–615.
56. da Fonseca, C.O.; Schwartzmann, G.; Fischer, J.; Nagel, J.; Futuro, D.; Quirico-Santos, T.; Gattass, C.R. Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. *Surg. Neurol.* **2008**, *70*, 259–266.
57. da Silva, A.C.; Lopes, P.M.; de Azevedo, M.M.; Costa, D.C.; Alviano, C.S.; Alviano, D.S. Biological activities of alpha-pinene and beta-pinene enantiomers. *Molecules* **2012**, *17*, 6305–6316.
58. da Silva, B.C.; Paula, C.R.; Auler, M.E.; Ruiz Lda, S.; Dos Santos, J.I.; Yoshioka, M.C.; Fabris, A.; Castro, L.G.; Duarte, A.J.; Gambale, W. Dermatophytosis and immunovirological status of HIV-infected and AIDS patients from Sao Paulo city. *Brazil. Mycoses* **2014**, *57*, 371–376.
59. Da Silva Correa, L.; Henriques, R.O.; Rios, J.V.; Lerin, L.A.; de Oliveira, D.; Furigo, A. Lipase-catalyzed esterification of geraniol and citronellol for the synthesis of terpenic esters. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2020**, *190*, 574–583.
60. Danielson, P.B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr. Drug Metab.* **2002**, *3*, 561–597.
61. de Britto, R.M.; da Silva-Neto, J.A.; Mesquita, T.R.R.; de Vasconcelos, C.M.L.; de Almeida, G.K.M., de Jesus, I.C.G.; dos Santos, P.H.; Souza, D.S.; dos Santos, R.M.; de Sá, L.A.; dos Santos, F.S.M.; Pereira-Filho, R.N.; Albuquerque-Júnior, R.L.C.; Quintans-Júnior, L.J.; Guatimosim, S.; Lauton-Santos, S. Myrtenol protects against myocardial ischemia reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *111*, 557–566.
62. Del Toro-Arreola, S.; Flores-Torales, E.; Torres-Lozano, C.; Del Toro-Arreola, A.; Tostado-Pelayo, K.; Ramirez-Dueñas, M.G. Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *Int. Immunopharmacol.* **2005**, *5*, 829–838.
63. Demissie, Z.A.; Erland, L.A.E.; Rheault, M.R.; Mahmoud, S.S. The biosynthetic origin of irregular monoterpenes in *Lavandula*: isolation and biochemical characterisation of a novel cis-prenyl diphosphate synthase genes, lavandulyl diphosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 6333–6341.
64. De Pascale, D.; Cusano, A.M.; Autore, F.; Parrilli, E.; Di Prisco, G.; Marino, G.; Tutino, M.L. The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family. *Extremophiles* **2008**, *12*, 311–323.
65. De Paula, R.; Santos, I.C.M.S.; Simoes, M.M.Q.; Neves, M.G.P.M.S.; Cavaleiro, J.A.S. An immobilized imidazolyl manganese porphyrin for the oxidation of olefins. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2015**, *404*, 156–166.
66. Dias, L.D.; Batista de Carvalho, A.L.M.; Pinto, S.M.A.; Aquino, G.L.B.; Calvete, M.J.F.; Rossi, L.M.; Marques, M.P.M.; Pereira, M.M. Bioinspired-metalloporphyrin magnetic nanocomposite as a reusable catalyst for synthesis of diastereomeric (-)-isopulgeol epoxide: anticancer activity against human osteosarcoma cells (MG-63). *Molecules* **2019**, *24*, 52.
67. Diaz, M.D.R.; Gomez, J.M.; Diaz-Suelto, B.; Garcia-Sans, A. Enzymatic synthesis of short-chain esters in n-hexane and super-critical carbon dioxide: effect of the acid chain length. *Eng. Life Sci.* **2010**, *10*, 171–176.
68. Dodson, C.H.; Dressler, R.L.; Hills, H.G.; Adams, R.M.; Williams, N.H. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* **1969**, *164*, 1243–1249.
69. Dötterl, S.; Jurgens, A.; Seifert, K.; Laube, T.; Weissbecker, B.; Schutz, S. Nursery pollination by a moth in *Silene latifolia*: The role of odours in eliciting antennal and behavioural responses. *New Phytol.* **2006**, *169*, 707–718.
70. Duarte, A.W.F.; dos Santos, J.A.; Vianna, M.V.; Vieira, J.M.F.; Mallagutti, V.H.; Inforsato, F.J.; Wentzel, L.C.P.; Lario, L.D.; Rodrigues, A.; Pagnocca, F.C.; Junior, A.P.; Sette, L.D. Cold-adapted enzymes

- produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2018**, *38*, 600-619.
71. Dyson P.J.; Jessop, P.G. Solvent effects in catalysis: rational improvements of catalysts via manipulation of solvent interactions. *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 3302-3316
 72. Echeverrigaray, S.; Michelim, L.; Longaray Delamare, A.; Andrade, C.; Pinto da Costa, S.; Zacaria, J. The effect of monoterpenes on swarming differentiation and haemolysin activity in *Proteus mirabilis*. *Molecules* **2008**, *13*, 3107–3116.
 73. Eitenmiller, R.R.; Vakil, J.R.; Shani, K.M. Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. *J. Food Sci.* **1970**, *35*, 130-133.
 74. Elanur, A.; Hasan, T.; Fatime, G. Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of α -pinene on N2a neuroblastoma cells. *Biologia* **2013**, *68*, 1004–1009.
 75. Elliott, A.; Ambrose, E.J. Structure of synthetic polypeptides. *Nature* **1950**, *165*, 921–922.
 76. Erickson, A.A.; Paul, V.J.; van Alstyne, K.L.; Kwiatkowski, L.M. Palatability of macroalgae that use different types of chemical defenses. *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32*, 1883–1895.
 77. Falony, G.; Armas, J.C.; Mendoza, J.C.D.; Hernandez, J.L.M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, *44*, 235–240.
 78. Felipe, C.F.B.; Albuquerque, A.M.S.; de Pontes, J.L.X.; de Melo, J.I.V.; Rodrigues, T.; de Sousa, A.M.P.; Monteiro, A.B.; Ribeiro, A.; Lopes, J.P.; de Menezes, I.R.A.; de Almeida, R.N. Comparative study of alpha- and beta-pinene effect on PTZ-induced convulsions in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2019**, *33*, 181–190.
 79. Feng, L.; Wang, K.-Y.; Joseph, E.; Zhou, H.-C. Catalytic porphyrin framework compounds. *Trends Chem.* **2020**, *6*. doi:10.1016/j.trechm.2020.01.003.
 80. Figueiredo, R.D.A.; Ortega, A.C.; González Maldonado, L.A.; Castro, R.D.; Ávila-Campos, M.J.; Rossa, C.; Aquino, S.G. Perillyl alcohol has antibacterial effects and reduces ROS production in macrophages. *J. Appl. Oral. Sci.* **2020**, *28*, e20190519.
 81. Fischer, H.; Orth, H. Die Chemie des Pyrrols, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, II, **1937**.
 82. Fraga, L.J.; da Penha, A.C.B.; Akil, E.; Silva, K.A.; Amara, P.F.F. Catalytic and physical features of a naturally immobilized *Yarrowia lipolytica* lipase in cell debris (LipImDebri) displaying high thermostability. *3 Biotech* **2020**, *10*, 454.
 83. Galaev, Y.; Mattiasson, B. Smart polymers for bioseparation and bioprocessing, ed.I. *Taylor and Francis*, London, **2004**.
 84. Gandhi, N.N.; Patil, N.S.; Sawant, S.B.; Joshi, J.B.; Wangikar, P.P.; Mukesh, D. Lipase-catalyzed esterification. *Cat. Rev.* **2000**, *42*, 439-480.
 85. Gandolfi, R.; Converti, A.; Pirozzi, D.; Molinari, F. Efficient and selective microbial esterification with dry mycelium of *Rhizopus oryzae*. *J. Biotechnol.* **2001**, *92*, 21-26.
 86. Gao, J.; Ou, X.; Xu, P.; Zong, M.; Lou, W. Cloning, overexpression, and characterization of a novel organic solvent-tolerant lipase from *Paenibacillus pasadenensis* CS0611. *Chin. J. Catal.* **2018**, *39*, 937–945.
 87. Garcia, D.G.; Amorim, L.M.; de Castro Faria, M.V.; Freire, A.S.; Santelli, R.E.; Da Fonseca, C.O.; Quirico-Santos, T.; Burth, P. The anticancer drug perillyl alcohol is a Na/K-ATPase inhibitor. *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, *345*, 29–34.
 88. Garcia-Sánchez M.A.; Gonzalez-Rojas. F.; Menchaca-Campos. E.C.; Tello-Solís, S.R.; Quiroz-Segoviano, R.I.; Diaz-Alejo, L.A.; Salas-Bañales, E.; Campero, A. Crossed and linked histories of tetrapyrrolic macrocycles and their use of engineering pores within sol-gel matrices. *Molecules* **2013**, *18*, 588-653.
 89. Gershenzon, J.; Dudareva, N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 408.
 90. Gomes, M.D.; Woodley, J.M. Considerations when measuring biocatalyst performance. *Molecules* **2019**, *24*, 3573.
 91. Govindarajan, M.; Rajeswary, M.; Hoti, S.L.; Bhattacharyya, A.; Benelli, G. Eugenol, alpha pinene and beta-caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 807–815.
 92. Guvenc, A.; Kapucu, N.; Mehmetoglu, U. Optimization of the enzymatic production of isoamyl acetate with Novozyme 435 from *Candida antarctica*. *Chem. Eng. Commun.* **2003**, *190*, 948-961.
 93. Heiling, S.; Schuman, M.C.; Schoettner, M.; Mukerjee, P.; Berger, B.; Schneider, B.; Jassbi, A.R.; Baldwin, I.T. Jasmonate and ppH systemin regulate key malonylation steps in the biosynthesis of 17-hydroxygeranylinalool diterpene glycosides, an abundant and effective direct defense against herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell* **2010**, *22*, 273–292.

94. Hemmerlin, A.; Rivera, S.B.; Erickson, H.K.; Poulter, C.D. Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the big sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32132-32140.
95. Hua, D.; Xu, P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 654–660.
96. Hwang, J.Y.; Park, J.; Seo, J.H.; Cha, M.; Cho, B.K.; Kim, J.; Kim, B.G. Simultaneous synthesis of 2-phenylethanol and l-homophenylalanine using aromatic transaminase with yeast Ehrlich pathway. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 1323–1329.
97. Imam, H.T.; Marr, P.C.; Marr, A.C. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. *Green Chem.* **2021**, *23*, 4980-5005.
98. Iwai, M.; Okumura, S.; Tsujisaka, Y. Synthesis of terpene alcohol esters by lipase. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 2731-2732.
99. Jakubowicz-Gil, J.; Bądziul, D.; Langner, E.; Wertel, I.; Zając, A.; Rzeski, W. Temozolomide and sorafenib as programmed cell death inducers of human glioma cells. *Pharmacol. Rep.* **2017**, *69*, 779-787.
100. Jia, Q.D.; Kollner, T.G.; Gershenzon, J.; Chen, F. MTPSLs: new terpene synthases in nonseed plants. *Trends Plant. Sci.* **2018**, *23*, 121-128.
101. Jia, S.S.; Xi, G.P.; Zhang, M.; Chen, Y.B.; Lei, B.; Dong, X.S.; Yang, Y.M. (2013). Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. *Oncol. Rep.* **2013**, *29*, 349–354.
102. Jones, M.; Bhat, T.; Kandare, E.; Thomas, A.; Joseph, P.; Dekiwadia, C.; Yuen, R.; John, S.; Ma, J.; Wang, C.-H. Thermal degradation and fire properties of fungal mycelium and mycelium - biomass composite materials. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 17583.
103. Joseph, B.; Shrivastava, N.; Ramteke, P.W. Extracellular cold-active lipase of *Microbacterium luteolum* isolated from Gangotri glacier, western Himalaya: isolation, partial purification and characterization. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2012**, *10*, 137-144.
104. Kamatou, G.P.P.; Viljoen, M. Linalool – a review of a biologically active compound of commercial importance. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 1183-1192.
105. Kessler, A.; Heil, M. The multiple faces of indirect defences and their agents of natural selection. *Funct. Ecol.* **2011**, *25*, 348–357.
106. Khoshnazar, M.; Bigdeli, M.R.; Parvardeh, S.; Pouriran, R. Attenuating effect of α -pinene on neurobehavioural deficit, oxidative damage and inflammatory response following focal ischaemic stroke in rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, *71*, 1725–1733.
107. Kim, D.S.; Lee, H.J.; Jeon, Y.D.; Kee, J.Y.; Kim, H.J.; Shin, H.J.; Kang, J.W.; Lee, B.S.; Kim, S.-H.; Kim, S.-J.; Park, S.-H.; Choi, B.-M.; Park, S.P.; Um, J.-Y.; Hong, S.-H. Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *Am. J. Chinese Med.* **2015**, *43*, 731–742.
108. Kirdi, R.; Akacha, N.B.; Bejaoui, H.; Messaoudi, Y.; Romano, D.; Molinari, F.; Gargouri, M. Mycelium-bound lipase from *Aspergillus oryzae* as an efficient biocatalyst for cis-3-hexen-1-yl acetate synthesis in organic solvent. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2017**, *10*, 13-19.
109. Kobayashi, Y.; Sato, H.; Yorita, M.; Nakayama, H.; Miyazato, H.; Sugimoto, K.; Jippo, T. Inhibitory effects of geranium essential oil and its major component, citronellol, on degranulation and cytokine production by mast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80*, 1172–1178.
110. Kotan, R.; Kordali, S.; Cakir, A.; Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z. Naturforsch. C.* **2007**, *62*, 507–513.
111. Kovac, J.; Simunovic, K.; Wu, Z.; Klancnik, A.; Bucar, F.; Zhang, Q.; Mozina, S.S. Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)-alpha-pinene in *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122871.
112. Kreiner, M.; Parker, M.C. Protein-coated microcrystals for use in organic solvents: Application to oxidoreductases. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1571–1577.
113. Kumar, A.; Dhar, K.; Kanwar, S.S.; Arora, P.K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, 2.
114. Kurek, E.; Kornilłowicz-Kowalska, T.; Słomka, A.; Melke, J. Characteristics of soil filamentous fungi communities isolated from various micro-relief forms in the high Arctic tundra (Bellsund region, Spitsbergen), *Pol. Polar Res.* **2007**, *28*, 57-73.
115. Kusuhara, M.; Urakami, K.; Masuda, Y.; Zangiacomini, V.; Ishii, H.; Tai, S.; Maruyama, K.; Yamaguchi, K. Fragrant environment with alpha-pinene decreases tumor growth in mice. *Biomed. Res.* **2012**, *33*, 57–61.
116. Kutyla, M.; Fiedurek, J.; Gromada, A.; Jędrzejewski, K.; Trytek, M. Mutagenesis and adaptation of the psychrotrophic fungus *Chrysosporium pannorum* A-1 as a method for improving β -pinene bioconversion. *Molecules* **2020**, *25*, 2589.

117. Ladkau, N.; Schmid, A.; Buhler, B. The microbial cell-functional unit for energy dependent multistep biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *30*, 178–89.
118. Lee, J.S.; Pan, J.J.; Ramamoorthy, G.; Poulter, C.D. Structure-function studies of *Artemisia tridentata* farnesyl diphosphate synthase and chrysanthemyl diphosphate synthase by site-directed mutagenesis and morphogenesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 14556-14567.
119. Lei, Y.; Fu, P.; Jun, X.; Cheng, P. Pharmacological properties of geraniol - A review. *Planta Med.* **2019**, *85*, 48-55.
120. Leite, A.M.; Lima, E.O.; Souza, E.L.; Diniz, M.F.; Trajano, V.N.; Medeiros, I.A. Inhibitory effect of α - and β -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2007**, *43*, 121–126.
121. Li, H.; Li, J.; Dong, Y.; Hao, H.; Ling, Z.; Bai, H.; Wang, H.; Cui, H.; Shi, L. Time-series transcriptome provides insights into the gene regulation network involved in the volatile terpenoid metabolism during the flower development of lavender. *BMC Plant Biol.* **2019**, *19*, 313.
122. Li, K.; Wang, J.; He, Y.; Cui, G.; Abdulrazaq, M.A.; Yan, Y. Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles. *Chem. Eng. J.* **2018**, *351*, 258-268.
123. Li, M.; Yang, L.R.; Xu, G.; Wu, J.P. Screening, purification and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254. *Bioresour. Technol.* **2013**, *148*, 114-120.
124. Lin, B.-X.; Zhang, Z.-J.; Liu, W.-F.; Dong, Z.-Y.; Tao, Y. Enhanced production of N-acetyl-d-neuraminic acid by multi-approach whole-cell biocatalyst. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 4775–84.
125. Lipke, A.; Trytek, M.; Fiedurek, J.; Majdan, M.; Janik, E. Spectroscopic and biocatalytic properties of a chlorophyll-containing extract in silica gel. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1052*, 158-164.
126. Lira, M.H.P.D.; Andrade Júnior, F.P.D.; Moraes, G.F.Q.; Macena, G.D.S.; Pereira, F.D.O.; Lima, I.O. Antimicrobial activity of geraniol: An integrative review. *J. Essent. Oil Res.* **2020**, *32*, 187–197.
127. Liu, K.J.; Huang, Y.R. Lipase-catalyzed production of a bioactive terpene ester in supercritical carbon dioxide. *J. Biotechnol.* **2010**, *146*, 215-220.
128. Loo, J.L.; Khoramnia, A.; Lai, O.M.; Long, K.; Ghazali, H.M. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Geotrichum candidum*. *Molecules* **2014**, *19*, 8556-8570.
129. Lowe, R.F.; Russell, M.F.; Southwell, I.A.; Robinson, C.J.; Day, J. Composition of an Essential Oil from *Agonis fragrans* J.R. Wheeler et N.G. Marchant. *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19*, 342-344.
130. Lu, X.G.; Zhan, L.B.; Feng, B.A.; Qu, M.Y.; Yu, L.H.; Xie, J.H. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World J. Gastroenterol.* **2004**, *10*, 2140–2144.
131. Ma, Y.; Bian, J.; Zhang, F. Inhibition of perillyl alcohol on cell invasion and migration depends on the Notch signaling pathway in hepatoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2016**, *411*, 307–315.
132. Magdaong, N.C.M.; Taniguchi, M.; Diers, J.R.; Niedzwiedzki, D.M.; Kirmaier, C.; Lindsey, J.S.; Bocian, D.F.; Holten D. Photophysical properties and electronic structure of zinc(II) porphyrins bearing 0–4 meso-phenyl substituents: zinc porphine to zinc tetraphenylporphyrin (ZnTPP). *J. Phys. Chem. A* **2020**, *124*, 7776-7794.
133. Magnard, J.L.; Rocca, A.; Caissard, J.C.; Vergne, P.; Sun, P.L.; Hecquet, R.; Dubois, A.; Hibrand-Saint Oyant, L.; Jullien, F.; Nicole, F.; Raymond, O.; Huguet, S.; Bultenwenc, R.; Meyer, S.; Claudel, P.; Jeauffre, J.; Rohmer, M.; Foucher, F.; Huguency, P.; Bendahmane, M.; Baudino, S. Biosynthesis of monoterpene scent compounds in roses. *Science* **2015**, *349*, 81-83.
134. Mahmoud, A.L. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Lett. Appl. Microbiol.* **1994**, *19*, 110–113.
135. Makarska, M.; Radzki, S. Water-soluble porphyrins and their metal complexes. *Annales UMCS, sectio AA – Chemia* **2004**, *57*, 332-363.
136. Marchetti, L.; Levine, M. Biomimetic catalysis. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1090-1118.
137. Marques, H.M.; Brown, K.L. Molecular mechanics and molecular dynamics simulations of porphyrins, metalloporphyrins, heme proteins and cobalt corrinoids. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *225*, 123-158.
138. Martins, R.L.; Neves, M.S.; Silvestre, A.D.; Silva, A.S.; Cavaleiro, J.S. Oxidation of aromatic monoterpenes with hydrogen peroxide catalysed by Mn(III) porphyrin complexes. *J. Mol. Catal. A Chem.* **1999**, *137*, 41-47.
139. Martins, R.L.; Neves, M.S.; Silvestre, A.D.; Simoes, M.Q.; Silva, A.S.; Tome, A.C.; Cavaleiro, J.S.; Tagliatesta, P.; Crestini, C. Oxidation of unsaturated monoterpenes with hydrogen peroxide catalysed by manganese(III) porphyrin complexes. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2001**, *172*, 33-42.
140. Matsumoto, T.; Yamada, R.; Ogino, H. Chemical treatments for modification and immobilization to improve the solvent stability of lipase. *World J. Microb. Biot.* **2019**, *35*, 193.

141. Matsuo, A.L.; Figueiredo, C.R.; Arruda, D.C.; Pereira, F.V.; Scutti, J.A.B.; Massaoka, M.H.; Travassos, L.R.; Sartorelli, P.; Lago, J.H. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *411*, 449–454.
142. Mazhar, H.; Abbas, N.; Zamir, T.; Hussain, Z.; Ali, S.S. Optimization study of lipolytic enzyme from *Bacillus cereus*, PCSIR NL-37. *Punjab Univ. J. Zool.* **2018**, *33*, 217–224.
143. Mączka, W.; Wińska, K.; Grabarczyk, M. One hundred faces of geraniol. *Molecules* **2020**, *25*, 3303.
144. Mehta, A.; Bodh, U.; Gupta, R. Fungal lipases: a review. *J. Biotech. Res.* **2017**, *8*, 58–77.
145. Mello, C.P.; Quirico-Santos, T.; Amorim, L.F.; Silva, V.G.; Fragel, L.M.; Bloom, D.C.; Paixao, I.P. Perillyl alcohol and perillidic acid exert efficient action upon HSV-1 maturation and release of infective virus. *Antivir. Ther.* **2020**, *25*, 1–11.
146. Mendez J.; Canela, R.; Torres, M. Kinetic study of palmitic acid esterification catalyzed by *Rhizopus oryzae* resting cells. *Acta Biol. Colomb.* **2009**, *14*, 161 – 172.
147. Mewalal, R.; Rai, D.K.; Kainer, D.; Chen, F.; Kulheim, C.; Peter, G.F.; Tuskan, G.A. Plant-derived terpenes: a feedstock for specialty biofuels. *Trends Biotechnol.* **2017**, *35*, 227–240.
148. Mhetras, N.; Patil, S.; Gokhale, D. Lipase of *Aspergillus niger* NCIM 1207: a potential biocatalyst for synthesis of isoamylacetate. *Indian J. Microbiol.* **2010**, *50*, 432–437.
149. Mimica-Dukić, N.; Bugarin, D.; Grbović, S.; Mitić-Culafić, D.; Vuković-Gaćić, B.; Orčić, D.; Jovin, E.; Couladis, M. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules* **2010**, *15*, 2759–2770.
150. Molinari, F.; Gandolfi, R.; Converti, Z.; Zilli, M. Mycelium-bound carboxylesterase from *Aspergillus oryzae*: an efficient catalyst for acetylation in organic solvent. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 626–630.
151. Molinari, F.; Marianelli, G.; Aragozzini, F. Production of flavour esters by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 967–973.
152. Molinari, F.; Villa, R.; Aragozzini, F. Production of geranyl acetate and other acetates by direct esterification catalyzed by mycelium of *Rhizopus delemar* in organic solvent. *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20*, 41–44.
153. Morrissey, J.P.; Osbourn, A.E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 708–724.
154. Mosquera, M.E.G.; Jiménez, G.; Tabernero, V.; Vinuesa-Vaca, J.; García-Estrada, C.; Kosalková, K.; Sola-Landa, A.; Monje, B.; Acosta, C.; Alonso, R.; Valera, M.A. Terpenes and terpenoids: Building blocks to produce biopolymers. *Sustain. Chem.* **2021**, *2*, 467–492.
155. Moss, G. P. IUPAC. Nomenclature of tetrapyrroles. *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 779–832.
156. Munoz, Z.; Cohen, A.S.; Nguyen, L.M.; McIntosh, T.A.; Hoggard, P.E. Photocatalysis by tetrphenylporphyrin of the decomposition of chloroform. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 337–343.
157. Murali, R.; Karthikeyan, A.; Saravanan, R. Protective effects of D-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *112*, 175–181.
158. Murali, R.; Saravanan, R. Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed. Prev. Nutr.* **2012**, *2*, 269–275.
159. Nandiwale, K.Y.; Niphadkar, P.S.; Deshpande, S.S.; Bokade, V.V. Esterification of renewable levulinic acid to ethyl levulinate biodiesel catalyzed by highly active and reusable desilicated H-ZSM-5. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2014**, *89*, 1507–1515.
160. Ngan, L.T.M.; Moon, J.-K.; Kim, J.-H.; Shibamoto, T.; Ahn, Y.-J. Growth-inhibiting effects of *Paeonia lactiflora* root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 1575–1583.
161. Nieuwenhuizen, N.J.; Wang, M.Y.; Matich, A.J.; Green, S.A.; Chen, X.; Yauk, Y.-K.; Beuning, L.L.; Nagegowda, D.A.; Dudareva, N.; Atkinson, R.G. Two terpene synthases are responsible for the major sesquiterpenes emitted from the flowers of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 3203–3219.
162. Ninkuu, V.; Zhang, L.; Yan, J.; Fu, Z.; Yang, T.; Zeng, H. Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5710.
163. Ogah, E.O.; Smart, L.E.; Woodcock, C.M.; Caulfield, J.C.; Birkett, M.A.; Pickett, J.A.; Nwilene, F.E.; Bruce, T.J.A. Electrophysiological and behavioral responses of female African rice gall midge, *Orseolia oryzivora* Harris and Gagné, to host plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* **2016**, *43*, 13–16.
164. Oldfield, E.; Lin, F.-Y. Terpene biosynthesis: Modularity rules. *Angew. Chem. Int Ed.* **2012**, *51*, 1124–1137.
165. Olsen, T.; Kerton, F.; Marriott, R.; Grogan, G. Biocatalytic esterification of lavandulol in supercritical carbon dioxide using acetic acid as the acyl donor. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 621–625.

166. Ozkaya, A.; Sahin, Z.; Gorgulu, A.O.; Yuce, A.; Celik, S. Geraniol attenuates hydrogen peroxide-induced liver fatty acid alterations in male rats. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* **2017**, *6*, 29–35.
167. Papadopoulou, K.; Melton, R.E.; Leggett, M.; Daniels, M.J.; Osbourn, A.E. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12923–12928.
168. Paroul, N.; Biasi, A.; Rovani, A.C.; Prigol, C.; Dallago, R.; Treichel H.; Cansian R.L.; Oliveira, J.V.; de Oliveira, D. Enzymatic production of linalool esters in organic and solvent-free system. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2010**, *33*, 583–589.
169. Patel, V.; Nambiar, S.; Madamwar, D. An extracellular solvent stable alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. DMVR46: partial purification, characterization and application in non-aqueous environment. *Process Biochem.* **2014**, *49*, 1673–1681.
170. Paul, V.J.; van Alstyne, K.L. Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda*, spp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1992**, *160*, 191–203.
171. Pedersen, J.N.; Liu, S.; Zhou, Y.; Balle, T.; Xu, X.; Guo, Z. Synergistic effects of binary ionic liquid-solvent systems on enzymatic esterification of esculin. *Food Chem.* **2020**, *310*, 125858.
172. Peñuelas, J.; Llusà, J. Linking photorespiration, monoterpenes and thermotolerance in *Quercus*. *New Phytol.* **2002**, *155*, 227–237.
173. Peralta-Yahya, P.P.; Ouellet, M.; Chan, R.; Mukhopadhyay, A.; Keasling, J.D.; Lee, T.S. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 483.
174. Pereira, C.V.; Silva, J.M.; Rodrigues, L.; Reis, R.L.; Paiva, A.; Duarte, A.R.C.; Matias, A. Unveil the anticancer potential of limonene based therapeutic deep eutectic solvents. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14926.
175. Pereira, F.O.; Mendes, J.M.; Lima, I.O.; Mota, K.S.L.; Oliveira, W.A.; Lima, E.O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharm. Biol.* **2015**, *53*, 228–234.
176. Pichersky, E.; Raguso, R.A. Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytol.* **2018**, *220*, 692–702.
177. Pinheiro, M.A.; Magalhaes, R.M.; Torres, D.M.; Cavalcante, R.C.; Mota, F.S.; Oliveira Coelho, E.M.; Moreira, H.P.; Lima, G.C.; Araujo, P.C.; Cardoso, J.H.; Souza, A.N.C.; Diniz, L.R.L. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. *Pharmacogn. Mag.* **2015**, *11*, 123–130.
178. Plata-Rueda, A.; Campos, J.M.; Rolim, G.D.S.; Martínez, L.C.; Dos Santos, M.H.; Fernandes, F.L.; Serrão, J.E.; Zanoncio, J.C. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *156*, 263–270.
179. Pohlmann, B.; Scharf, H. D.; Jarolimek, U.; Mauermann, P. Photo-chemical production of fine chemicals with concentrated sunlight. *Sol. Energy* **1997**, *61*, 159–168.
180. Prasad, S.N.; Muralidhara. Neuroprotective effect of geraniol and curcumin in an acrylamide model of neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: relevance to neuropathy. *J. Insect. Physiol.* **2014**, *60*: 7–16.
181. Prościński, K.; Sternik, D.; Radzki, S. Optical absorption study of porphyrin aggregation. *UMCS Report, Faculty of Chemistry* **1997**, *53*.
182. Qi, F.; Yan, Q.; Zheng, Z.; Liu, J.; Chen, Y.; Zhang, G. Geraniol and geranyl acetate induce potent anticancer effects in colon cancer Colo-205 cells by inducing apoptosis, DNA damage and cell cycle arrest. *J. BUON.* **2018**, *23*, 346–352.
183. Rabi, T.; Bishayee, A. D-limonene sensitizes docetaxel-induced cytotoxicity in human prostate cancer cells: Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *J. Carcinog.* **2009**, *8*, 9.
184. Rajizadeh, M.A., Najafipour, H.; Fekr, M.S.; Rostamzadeh, F.; Jafari, E.; Bejesh, M.A.; Masoumi-Ardakani, Y. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of myrtenol in the rats with allergic asthma, *Iran. J. Pharm. Res.* **2019**, *18*, 1488–1498.
185. Raz, K.; Levi, S.; Gupta, P.K.; Major, D.T. Enzymatic control of product distribution in terpene syntheses: insights from multiscale simulations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2020**, *65*, 248–258.
186. Rebelo, S.L.H.; Pereira, M.M.; Simoes, M.M.Q.; Neves, M.G.P.M.S.; Cavaleiro, J.A.S. Mechanistic studies on metalloporphyrin epoxidation reactions with hydrogen peroxide: evidence for two active oxidative species. *J. Catal.* **2005**, *234*, 76–87.
187. Rekha, K.R.; Selvakumar, G.P. Gene expression regulation of Bcl2, Bax and cytochrome-C by geraniol on chronic MPTP/probenecid induced C57BL/6 mice model of Parkinson's disease. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *217*, 57–66.
188. Rekha, K.R.; Selvakumar, G.P.; Santha, K.; Sivakamasundari, R.I. Geraniol attenuates alpha-synuclein expression and neuromuscular impairment through increase dopamine content in MPTP intoxicated mice by dose dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *440*, 664–670.

189. Rodríguez-Fernández, D.E.; Parada, J.L.; Medeiros, A.B.P.; de Carvalho, J.C.; Lacerda, L.G.; Rodríguez-León, J.A.; Soccol, C.R. Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation. *Process Biochem.* **2013**, *48*, 374-379.
190. Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical proces. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *64*, 1-22.
191. Romero, C.M.; Pera, L.M.; Loto, F.V.; Costas, L.; Baigori, M.D. Pretreatment of an induced mycelium-bound lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 improves its hydrolytic and synthetic Activity. *Catal Lett.* **2013**, *143*, 469-475.
192. Romero-Fernández, M.; Paradisi, F. Protein immobilization technology for flow biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 1-8.
193. Romero, M.D.; Calvo, L.; Alba, C.; Deneshfar, A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. *J. Biotechnol.* **2007**, *127*, 269-277.
194. Roy, J.J.; Abraham, T.E. Strategies in making cross-linked enzyme crystals. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3705–3721.
195. Rudolf, J.D.; Chang, C.Y. Terpene synthases in disguise: Enzymology, structure, and opportunities of non-canonical terpene synthases. *Nat. Product Rep.* **2020**, *37*, 425–463.
196. Sadraei, H.; Asghari, G.; Emami, S.; Inhibitory effect of *Rosa damascena* Mill flower essential oil, geraniol and citronellol on rat ileum contraction. *Res. Pharm. Sci.* **2013**, *8*, 17–23.
197. Salehi, B.; Upadhyay, S.; Orhan, I.E.; Jugran, A.K.; Jayaweera, S.L.D.; Dias, D.A.; Sharopov, F.; Taheri, Y.; Martins, N.; Baghalpour, N.; Cho, W.C.; Sharifi-Rad, J. Therapeutic potential of α - and β -pinene: a miracle gift of nature. *Biomolecules* **2019**, *9*, 738.
198. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *New York: Cold spring harbor laboratory press.* **1989**.
199. Santo, I.C.M.S.; Rebelo, S.L.H.; Balula, M.S.S.; Martins, R.R.L.; Pereira, M.M.M.S.; Simoes, M.M.Q.; Neves, M.G.P.M.S.; Cavaleiro, J.A.S.; Cavaleiro, A.M.V.; Association of Keggin-type anions with cationic meso-substituted porphyrins: synthesis, characterization and oxidative catalytic studies. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2005**, *231*, 35-45.
200. Santos, E.H.; Carvalho, C.; Terzi, C.M.; Nakagaki, S. Recent advances in catalyzed sequential reactions and the potential use of tetrapyrrolic macrocycles as catalysts. *Molecules* **2018**, *23*, 2796.
201. Santos, P.L.; Matos, J.P.S.C.F.; Picot, L.; Almeida, J.R.G.S.; Quintans, J.S.S.; Quintans-Júnior, L.J. Citronellol, a monoterpene alcohol with promising pharmacological activities - A systematic review. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *123*, 459-469.
202. Schenning, A.P.H.J.; Spelberg, J.H.L.; Hubert, D.H.W.; Feiters, M.C.; Molte, R.J.M. A supramolecular cytochrome P450 mimic. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 871–880.
203. Schmid, R.D.; Verger, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem.* **1998**, *37*, 1608–1633.
204. Selvaraj, A.; Jayasree, T.; Valliammai, A.; Pandian, S.K. Myrtenol attenuates MRSA biofilm and virulence by suppressing sarA expression dynamism. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2027.
205. Selvaraj, A.; Valliammai, A.; Sivasankar, C.; Suba, M.; Sakthivel, G.; Pandian, S.K. Antibiofilm and antivirulence efficacy of myrtenol enhances the antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21975.
206. Shahedi, M.; Yousefi, M.; Habibi, Z.; Mohammadi, M.; As'habi, M.A. Co-immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase and *Candida antarctica* lipase B and optimization of biocatalytic biodiesel production from palm oil using response surface methodology. *Renew. Energy* **2019**, *141*, 847-857.
207. Shanmugapriya, S.; Subramanian, P.; Kanimozhi, S. Geraniol inhibits endometrial carcinoma via downregulating oncogenes and upregulating tumour suppressor genes. *Indian J. Clin. Biochem.* **2017**, *32*, 214–219.
208. Sheldon, R.A.; Brady, D. Broadening the scope of biocatalysis in sustainable organic synthesis. *ChemSusChem* **2019**, *12*, 1-24.
209. Sheldon, R.A.; Brady, D. The limits to biocatalysis: pushing the envelope. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6088-6104.
210. Sheldon, R.A.; van Pelt, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223-6235.
211. Sheldon, R.A.; Woodley, J.M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801-838.
212. Shibasaki, T.; Mori, H.; Ozaki, A. Enzymatic production of trans-4-hydroxy-l-proline by regio- and stereospecific hydroxylation of l-proline. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 746–50.
213. Shin, S.; Lim, S.; Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *97*, 1289–1296.

214. Singh, B.; Sharma, R.A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech* **2015**, *5*, 129–151.
215. Singh, S.; Fatima, Z.; Hameed, S. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. *Arch. Microbiol.* **2016**, *198*, 459–472.
216. Smaniotta, A.; Skovronski, A.; Rigo, E.; Tsai, S.M.; Durrer, A.; Foltran, L.L.; Paroul, N.; Di Luccio, M.; Oliveira, J.V.; de Oliveira, D.; Treichel, H. Concentration, characterization and application of lipases from *Sporidiobolus pararoseus* strain. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45*, 294–302.
217. Sohrabi, R.; Huh, J.H.; Badiyan, S.; Rakotondraibe, L.H.; Kliebenstein, D.J.; Sobrado, P.; Tholl, D. In planta variation of volatile biosynthesis: an alternative biosynthetic route to the formation of the pathogen-induced volatile homoterpene DMNT via triterpene degradation in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **2015**, *27*, 874–890.
218. Srinivasan, S.; Muruganathan, U. Antidiabetic efficacy of citronellol, a citrus monoterpene by ameliorating the hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *250*, 38–46.
219. Stepanova, R.; Inagi, H.; Sugawara, K.; Asada, K.; Nishi, T.; Ueda, D.; Yasuno, Y.; Shinada, T.; Miki, K.; Fujihashi, M.; Sato, T. Characterization of class IB terpene synthase: The first crystal structure bound with a substrate surrogate. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 1517–1525.
220. Su, Y.-W.; Chao, S.-H.; Lee, M.-H.; Ou, T.-Y.; Tsai, Y.-C. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E2 production in macrophages. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1666–1671.
221. Sun, S.Y.; Xu, Y.; Wang, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 2607–2612.
222. Sumorek-Wiadro, J.; Zając, A.; Bądziul, D.; Langner, E.; Skalicka-Woźniak, K.; Maciejczyk, A.; Wertel, I.; Rzeski, W.; Jakubowicz-Gil, J. Coumarins modulate the anti-glioma properties of temozolomide. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *881*, 173207.
223. Sundin, T.; Peffley, D.M.; Hentosh, P. Disruption of an hTERT-mTOR-RAPTOR protein complex by a phytochemical perillyl alcohol and rapamycin. *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, *375*, 97–104.
224. Tamborini, L.; Romano, D.; Pinto, A.; Contente, M.; Iannuzzi, M.C.; Conti, P.; Molinari F. Biotransformation with whole microbial systems in a continuous flow reactor: resolution of (RS)-flurbiprofen using *Aspergillus oryzae* by direct esterification with ethanol in organic solvent. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 6090–6093.
225. Taniguchi, M.; Lindsey, J.S.; Bocian, D.F.; Holten, D. Comprehensive review of photophysical parameters (ϵ , Φ_f , τ_s) of tetraphenylporphyrin (H₂TPP) and zinc tetraphenylporphyrin (ZnTPP) – Critical benchmark molecules in photochemistry and photosynthesis. *J. Photochem. Photobiol. C* **2021**, *46*, 100401.
226. Thomsett, M.R.; Moore, J.C.; Buchard, A.; Stockman, R.A.; Howdle, S.M. New renewably-sourced polyesters from limonene-derived monomers. *Green Chem.* **2019**, *21*, 149–156.
227. Trytek, M.; Paduch, R.; Pięt, M.; Koziel, A.; Kandefer-Szerszeń, M.; Szajnecki, Ł.; Gromada, A. Biological activity of oxygenated pinene derivatives on human colon normal and carcinoma cells. *Flavour Fragr. J.* **2018**, *33*, 428–437.
228. Trytek, M.; Fiedurek, J.; Gromada, A. Effect of some abiotic stresses on the biotransformation of α -pinene by a psychrotrophic *Chrysosporium pannorum*. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *112*, 86–93.
229. Trytek, M.; Fiedurek, J.; Lipke, A.; Radzki, S. Porphyrins incorporated to SiO₂ gels as fluorescent materials and efficient catalyst in biomimetic photocatalytic systems. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2009**, *51*, 272–286.
230. Trytek, M.; Fiedurek, J.; Polska, K.; Radzki, S. A photoexcited porphyrin system as a biomimetic catalyst for D-limonene biotransformation. *Catal. Lett.* **2005**, *105*, 119–126.
231. Trytek, M.; Fiedurek, J.; Radzki, S. A novel porphyrin-based photocatalytic system for terpenoids production from (R)-(+)-limonene. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 131–137.
232. Trytek, M.; Janik, E.; Maksymiec, W.; Fiedurek, J.; Lipke, A.; Majdan, M. The spectra and catalytic studies of chlorophylls and pheophytins in mimetic biotransformation of α -pinene. *J. Photochem. Photobiol.* **2011**, *223*, 14–24.
233. Trytek, M.; Jędrzejewski, K.; Fiedurek, J. Bioconversion of α -pinene by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *42*, 181–188.
234. Ungcharoenwiwat, P.; Kikkikun, A.H. Purification and characterization of lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 isolated from wastewater from a canned fish factory and its application for the synthesis of wax esters. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *115*, 96–104.
235. Varma, M.N.; Madras, G. Kinetics of synthesis of butyl butyrate by esterification and transesterification in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 1135–1144.

236. Vasconcelos, T.B.; Ribeiro-Filho, H.V.; Lucetti, L.T.; Magalhães, P.J.C. B-citronellol, an alcoholic monoterpene with inhibitory properties on the contractility of rat trachea. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2016**, *49*, e4800.
237. Veeraragavan, K.; Gibbs, B.F. Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugose*. *Biotechnol. Lett.* **1989**, *11*, 345-348.
238. Velikova, V.; Muller, C.; Ghirardo, A.; Rock, T.M.; Aichler, M.; Walch, A.; Schmitt-Kopplin, P.; Schnitzler, J.P. Knocking down of isoprene emission modifies the lipid matrix of thylakoid membranes and influences the chloroplast ultrastructure in poplar. *Plant Physiol.* **2015**, *168*, 859-870.
239. Vespermann, K.A.C.; Paulino, B.N.; Barcelos, M.C.S.; Pessôa, M.G.; Pastore, G.M.; Molina, G. Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 1805-1817.
240. Viana, A.F.; da Silva, F.V.; Fernandes, H.B.; Oliveira, I.S.; Braga, M.A.; Nunes, P.I.; Viana, D.A.; de Sousa, D.P.; Rao, V.S.; Oliveira, R.C.; Almeida Santos, F. Gastroprotective effect of (-)-myrtenol against ethanol-induced acute gastric lesions: possible mechanisms. *J. Pharm. Pharmacol.* **2016**, *68*, 1085-1092.
241. Viollon, C.; Chaumont, J.P. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **1994**, *128*, 151-153.
242. Völler, J.-S. Shortcut for isoprenoid biosynthesis. *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 104.
243. Vranova, E.; Coman, D.; Gruissem, W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu. Rev. Plan. Biol.* **2013**, *64*, 665-700.
244. Wang, Q.; Quan, S.; Xiao, H. Towards efficient terpenoid biosynthesis: Manipulating IPP and DMAPP supply. *Bioresour. Bioprocess.* **2019**, *6*, 6.
245. Wegener, R.; Schulz, S.; Meiners, T.; Hadwich, K.; Hilker, M. Analysis of volatiles induced by oviposition of elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* on *Ulmus minor*. *J. Chem. Ecol.* **2001**, *27*, 499-515.
246. Weng, J.-K.; Philippe, R.N.; Noel, J.P. The rise of chemodiversity in plants. *Science* **2012**, *336*, 1667-1670.
247. Weston-Green, K.; Clunas, H. Naranjo J.C. (2021) A review of the potential use of pinene and linalool as terpene-based medicines for brain health: discovering novel therapeutics in the flavours and fragrances of cannabis. *Front. Psychiatry* **2021**, *12*, 583211.
248. Wiseman, D.A.; Werner, S.R.; Crowell, P.L. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *320*, 1163-1170.
249. Wittig, C.; Scheuer, C.; Parakenings, J.; Menger, M.D.; Laschke, M.W. Geraniol suppresses angiogenesis by downregulating vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGFR-2 signaling. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e01319469.
250. Xu, H.; Moghe, G.D.; Wiegert-Rininger, K.; Schillmiller, A.L.; Barry, C.S.; Last, R.L.; Pichersky, E. Coexpression analysis identifies two oxidoreductases involved in the biosynthesis of the monoterpene acid moiety of natural pyrethrin insecticides in *Tanacetum cinerariifolium*. *Plant Physiol.* **2018**, *176*, 524-537.
251. Yang, N.Y.; Zhou, G.S.; Tang, Y.P.; Yan, H.; Guo, S.; Liu, P.; Duan, J.A.; Song, B.S.; He, Z.Q. Two new alpha-pinene derivatives from *Angelica sinensis* and their anticoagulative activities. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 692-695.
252. Yang, W.; He, Y.; Xu, L.; Zhang, H.; Yan, Y. A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: identification, characterization and application for biodiesel production. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *126*, 76-89.
253. Yao, W.; Liu, K.; Liu, H.; Jiang, Y.; Wang, R.; Wang, W.; Wang, T. A valuable product of microbial cell factories: microbial lipase. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 743377.
254. Ye, Z.; Liang, Z.; Mi, Q.; Guo, Y. Limonene terpenoid obstructs human bladder cancer cell (T24 cell line) growth by inducing cellular apoptosis, caspase activation, G2/M phase cell cycle arrest and stops cancer metastasis. *J. BUON* **2020**, *25*, 280-285.
255. Yoon, W.J.; Lee, N.H.; Hyun, C.G. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E₂, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. *J. Oleo Sci.* **2010**, *59*, 415-421.
256. You, P.; Su, E.; Yang, X.; Mao, D.; Wei, D. *Carica papaya* lipase-catalyzed synthesis of terpene esters. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *71*, 152-158.
257. Yu, L.; Yan, J.; Sun, Z. D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 2339-2346.

258. Yu, X.; Lin, H.; Wang, Y.; Lv, W.; Zhang, S.; Qian, Y.; Deng, X.; Feng, N.; Yu, H.; Qian, B. D-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer. *OncoTargets Ther.* **2018**, *11*, 1833–1847.
259. Yuri, T.; Danbara, N.; Tsujita-Kyutoku, M.; Kiyozuka, Y.; Senzaki, H.; Shikata, N.; Kanzaki, H.; Tsubura, A. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *84*, 251–260.
260. Zafeer, M.F.; Firdaus, F.; Ahmad, F.; Ullah, R.; Anis, E.; Waseem, M.; Ali, A.; Hossain, H.M. Perillyl alcohol alleviates amyloid- β peptides-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 1029–1038.
261. Zajkoska, P.; Rebro, M.; Rosenberg, M. Biocatalysis with immobilized Escherichia coli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 1441–1455.
262. Zaks, A.; Klibanov, A.M. Enzyme-catalyzed proces in organic-solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192–3196.
263. Zhou, F.; Pichersky, E. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2020**, *55*, 1–10.
264. Zhao, L.; Chang, W.-C.; Xiao, Y.; Liu, H.-W.; Liu, P. Methylethritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 497–530.
265. Zhou, Y.P.; Stuart-Williams, H.; Grice, K.; Kayler, Z.E.; Zavadlav, S.; Vogts, A.; Rommerskirchen, F.; Farquhar, G.D.; Gessler, A. Allocate carbon for a reason: priorities are reflected in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of plant lipids synthesized via three independent biosynthetic pathways. *Phytochemistry* **2015**, *111*, 14–20.
266. Zhang, Z.; Guo, S.; Liu, X.; Gao, X. Synergistic antitumor effect of alpha-pinene and beta-pinene with paclitaxel against non-small-cell lung carcinoma (NSCLC). *Drug Res.* **2015**, *65*, 214–218.
267. Zucca, P.; Neves, C.M.B.; Simoes, M.M.Q.; Neves, M.G.P.S.; Cocco, G.; Sanjust, E. Immobilized lignin peroxidase-like metalloporphyrins as reusable catalyst in oxidative bleaching of industrial dyes. *Molecules* **2016**, *21*, 964.

9. Spis tabel

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Aktywność terpenów wobec wybranych owadów | 19 |
| Tabela 2. Systematyka szczepów wykorzystanych w badaniach nad selekcją biokatalizatora do estryfikacji alkoholi terpenowych | 49 |
| Tabela 3. Systematyka gatunków wykorzystanych w badaniach nad aktywnością biologiczną produktów biokatalizy | 50 |
| Tabela 4. Skład podłoża stałych stosowanych do przechowywania mikroorganizmów..... | 50 |
| Tabela 5. Skład podłoża stałego stosowanego do wstępnej oceny aktywności lipolitycznej grzybów | 51 |
| Tabela 6. Skład płynnego podłoża glukozowo-maltozowego (M), podłoża (A) (Bancerz i in., 2005) i podłoża podstawowego (BM) (Molinari i in., 2000) stosowanych do hodowli grzybów..... | 52 |
| Tabela 7. Rodzaje zmodyfikowanego podłoża BM i ich akronimy | 53 |
| Tabela 8. Skład żelu zagęszczającego i separującego wykorzystanych w elektroforezie PAGE | 57 |
| Tabela 9. Końcowe stężenia terpenów i amfoterycyny B uzyskanych w poszczególnych dołkach płytki 96-dołkowej..... | 66 |
| Tabela 10. Aktywność lipolityczna wybranych gatunków grzybów nitkowatych po 24-godzinnej inkubacji na stałym podłożu P1 | 72 |
| Tabela 11. Wpływ składu podłoża i czasu hodowli na aktywność hydrolazy, suchą masę <i>C. pannorum</i> A-1 oraz pH płynu pohodowlanego..... | 73 |
| Tabela 12. Wpływ suplementacji podłoża 1% CaCO ₃ na aktywność hydrolityczną enzymu i suchą masę grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 oraz pH płynu pohodowlanego | 75 |
| Tabela 13. Wpływ stężenia Tweenu 80 na pH płynu pohodowlanego oraz suchą masę grzybni <i>C. pannorum</i> A-1..... | 77 |
| Tabela 14. Aktywność lipolityczna (U/ml), specyficzna (U/mg) i stężenie białka wytrąconego rozpuszczalnikami organicznymi z płynu pohodowlanego pochodzącego z 4-dniowej hodowli <i>C. pannorum</i> A-1 na podłożu BMC1 | 78 |
| Tabela 15. Wpływ składu podłoża hodowlanego na aktywność estryfikacyjną biokatalizatora w formie grzybni <i>C. pannorum</i> A-1. Hodowlę prowadzono w 20°C przez 4 dni. Reakcję estryfikacji prowadzono w heksanie z 2% w/v biokatalizatora i równomolowym (50 mM) stężeniem cytronellolu i kwasu octowego w temp. 40°C przez 8 godzin | 79 |
| Tabela 16. Wpływ jonów metali na biomasę i aktywność katalityczną grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 | 79 |
| Tabela 17. Rozkład pasm w widmach FTIR-ATR grzybni uzyskanej na różnych podłożach | 80 |
| Tabela 18. Zawartość pierwiastków w grzybniach uzyskanych z podłoży hodowlanych | 84 |
| Tabela 19. Porównanie stężenia białka w buforach o pH 2,2, 5 i 9,2 po zakończeniu inkubacji z aktywnością biokatalityczną grzybni otrzymanej po inkubacji w tych roztworach | 90 |
| Tabela 20. Wydajność estryfikacji z użyciem biokatalizatora w formie grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 w zależności od struktury pierwszorzędowych alkoholi terpenowych i długości łańcuchów węglowych w kwasach karboksylowych..... | 92 |
| Tabela 21. Wpływ inkubacji grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 z kwasami karboksylowymi i alkoholami terpenowymi przed liofilizacją na wydajność estryfikacji cytronellolu z kwasem octowym..... | 93 |
| Tabela 22. Bioimprinting biokatalizatora w formie grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 kwasem kaprylowym, oleinowym i laurynowym (6,7%) w izopropanolu i mieszaninie izopropanolu z heksanem w proporcji 50:50 | 94 |
| Tabela 23. Bioimprinting biokatalizatora w formie grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 kwasem laurynowym w mieszaninach rozpuszczalników organicznych | 95 |
| Tabela 24. Konwersja molowa alkoholi terpenowych (%) w układzie biomimetycznym z wykorzystaniem porfiryn komercyjnych i pochodnych protoporfiryny IX | 99 |
| Tabela 25. Konwersja molowa myrtenolu (%) w układzie biomimetycznym do głównego produktu o czasie retencji RT = 6,4 min | 105 |
| Tabela 26. Konwersja molowa myrtenolu (%) w układzie biomimetycznym do produktu o czasie retencji RT = 7,5 min | 105 |
| Tabela 27. Zależność właściwości katalitycznych H ₂ TPP od długości fali światła widzialnego w reakcji utleniania myrtenolu..... | 111 |
| Tabela 28. Aktywność antybiofilmowa alkoholi terpenowych i produktów ich biokatalizy..... | 117 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 29. Aktywność produktów biokatalizy wobec mikroorganizmów określona metodą dyfuzyjno-krążkową | 119 |
| Tabela 30. Aktywność antymikrobiologiczna alkoholi terpenowych i produktów ich biotransformacji wobec <i>P. chrysogenum</i> i <i>A. niger</i> w hodowli planktonicznej wyrażona w MIC i MBC (µg/ml) | 120 |

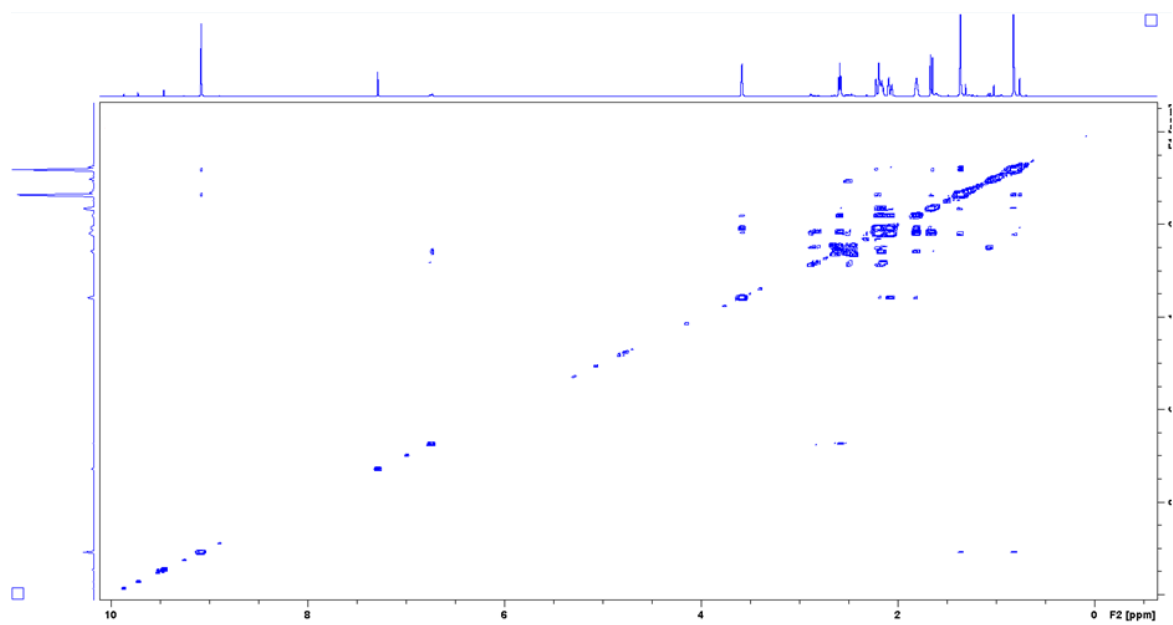
10. Spis rycin

| | |
|---|----|
| Rycina 1. Biosynteza prekursorów izoprenoidowych (IPP i DMAPP) (Ninkuu i in., 2021, zmodyf.) | 14 |
| Rycina 2. Biosynteza różnych klas terpenów z IPP i DMAPP (Ninkuu i in., 2021, zmodyf.) | 15 |
| Rycina 3. Podział biokatalizy (Sheldon i Brady 2018, zmodyf.) | 21 |
| Rycina 4. Metody immobilizacji enzymów (Imam i in., 2021, zmodyf.) | 23 |
| Rycina 5. Możliwe modyfikacje strukturalne alkoholi terpenowych..... | 26 |
| Rycina 6. Główne szlaki utleniania katalizowane przez enzymy cytochromu P450 (Zucca i in., 2016, zmodyf.) | 29 |
| Rycina 7. Nomenklatura porfiryn według: (A) Fishera – A-D – pozycje pierścieni pirolu, 1-8 położenie atomów węgla (pozycje β), α , β , δ , γ – położenie atomów węgla (pozycje meso); (B) IUPAC – 1-20 położenie atomów węgla (5, 10, 15, 20 – pozycje meso) (Marques i Brown, 2002, zmodyf.)..... | 30 |
| Rycina 8. Biomimetyczna epoksydacja eteru benzylowego (-)izopulegolu katalizowana przez porfiryne manganu (III) (Dias i in. 2019, zmodyf.)..... | 31 |
| Rycina 9. Wzory strukturalne α -, β -pinenu i limonenu..... | 32 |
| Rycina 10. Struktury chemiczne porfiryn wykorzystanych w biomimetycznej katalizie alkoholi terpenowych | 48 |
| Rycina 11. Struktury alkoholi terpenowych użytych w estryfikacji z kwasami karboksylowymi z zastosowaniem liofilizowanej grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 jako biokatalizatora..... | 59 |
| Rycina 12. Struktury związków wykorzystanych w badaniach nad mechanizmem fotoutleniania myrtenolu.. | 63 |
| Rycina 13. Wpływ temperatury (A) i pH (B) na zewnątrzkomórkową aktywność hydrolityczną enzymu z <i>C. pannorum</i> A-1. Średnie dla wyznaczonych wartości z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 74 |
| Rycina 14. Aktywność preparatu lipolitycznego po 24-godz. inkubacji w poszczególnych temperaturach ... | 74 |
| Rycina 15. Wpływ stężenia Tweenu 80 i czasu hodowli na zewnątrz- (A) i wewnątrzkomórkową aktywność hydrolityczną enzymu z <i>C. pannorum</i> A-1. Wartości średnie oznaczone literą a różnią się istotnie od pozostałych średnich przy $p < 0,05$ | 76 |
| Rycina 16. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM..... | 80 |
| Rycina 17. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM + 1% oliwa..... | 81 |
| Rycina 18. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM + 1% oliwa + 1% glukoza..... | 81 |
| Rycina 19. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM + 1% CaCO ₃ | 81 |
| Rycina 20. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM + 1% oliwa + 1% CaCO ₃ | 82 |
| Rycina 21. Widmo FTIR-ATR grzybni uzyskanej na podłożu OM + 1% oliwa + 1% glukoza + 1% CaCO ₃ | 82 |
| Rycina 22. Obrazy SEM powierzchni biokatalizatorów uzyskanych z różnych podłoży hodowlanych | 85 |
| Rycina 23. Wpływ temperatury na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię <i>C. pannorum</i> A-1. Reakcję prowadzono w n-heksanie z 2% w/v biokatalizatora i 50 mM równomolowym stężeniem substratów przez 24 godz. Słupki reprezentują konwersję molową, linia wskazuje początkową szybkość reakcji. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 86 |
| Rycina 24. Wpływ stężenia substratów na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię <i>C. pannorum</i> A-1. Reakcję prowadzono przy równomolowych stężeniach substratów w n-heksanie z 2% w/v biokatalizatora przez 24 godz. w 30°C. Słupki reprezentują konwersję molową, linia wskazuje początkową szybkość reakcji. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 86 |
| Rycina 25. Wpływ ilości biokatalizatora na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię <i>C. pannorum</i> A-1. Reakcję prowadzono w n-heksanie z 50 mM równomolowym stężeniem substratów przez 24 godz. w 30°C. Słupki reprezentują konwersję molową, linia wskazuje początkową szybkość reakcji. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 87 |
| Rycina 26. Wpływ szybkości mieszania na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię <i>C. pannorum</i> A-1. Reakcję prowadzono w n-heksanie z 50 mM równomolowym stężeniem substratów, 3% w/v biokatalizatora przez 24 godz. w 30°C. Słupki reprezentują konwersję molową, linia wskazuje początkową szybkość reakcji. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 87 |
| Rycina 27. Wpływ rozpuszczalnika organicznego na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię <i>C. pannorum</i> A-1. Reakcję prowadzono z 50 mM równomolowym stężeniem substratów, 3% w/v biokatalizatora przez 24 godz. w 30°C. Słupki reprezentują | |

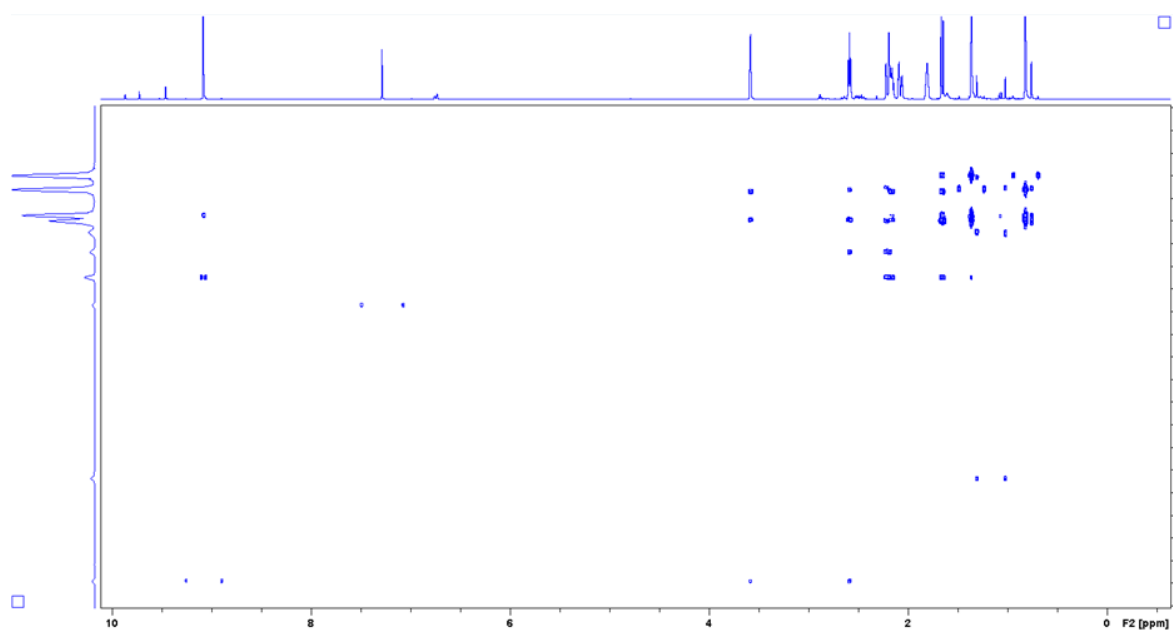
| | |
|--|-----|
| konwersję molową, punkty wskazują początkową szybkość reakcji. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 88 |
| Rycina 28. Wpływ stosunku molowego cytronellolu do kwasu na wydajność estryfikacji β -cytronellolu i kwasu octowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię <i>C. pannorum</i> A-1. Reakcję prowadzono z 3% w/v biokatalizatora przez 24 godz. w 30°C. Małe litery oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 89 |
| Rycina 29. Wpływ 3-godz. inkubacji grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 przed liofilizacją w buforach o różnym pH na konwersję molową β -cytronellolu i kwasu octowego. Reakcję prowadzono z 50 mM równomolowym stężeniem substratów, 3% w/v biokatalizatora przez 6 godz. w 30°C. Kontrola – grzybnia nie poddawana inkubacji. Wartości średnie wydajności reakcji z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 90 |
| Rycina 30. Profil białkowy uzyskany po elektroforezie SDS-PAGE płynu po inkubacji grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 w buforze o pH 9,2..... | 91 |
| Rycina 31. Wpływ dodatku wody do reakcji estryfikacji na aktywność biokatalityczną grzybni <i>C. pannorum</i> A-1..... | 96 |
| Rycina 32. Stabilność operacyjna grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 w kolejnych 24-godzinnych cyklach biokatalitycznych. Estryfikację prowadzono w optymalnych warunkach w 30°C. Wartości średnie z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 97 |
| Rycina 33. Wpływ temperatury przechowywania na aktywność grzybni <i>C. pannorum</i> A-1 w reakcji estryfikacji cytronellolu i kwasu octowego. Wartości średnie z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 97 |
| Rycina 34. Przykładowy chromatogram uzyskany po biomimetycznej katalizie myrtenolu | 98 |
| Rycina 35. Widmo masowe głównego produktu utleniania myrtenolu o czasie retencji RT = 6,4 min. | 98 |
| Rycina 36. Zmiana barwy H ₂ OEP po 1, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)..... | 100 |
| Rycina 37. Zmiana barwy H ₂ TPP po 1, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)..... | 100 |
| Rycina 38. Zmiana barwy ZnTPyP po 2, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)..... | 101 |
| Rycina 39. Barwy H ₂ TF ₅ PP po 2, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)..... | 102 |
| Rycina 40. Zmiana barwy H ₂ TPPOMe po 1, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)..... | 102 |
| Rycina 41. Zmiana barwy H ₂ TAlxPP po 1, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji po 4, 8 i 24 godz. reakcji (B)..... | 103 |
| Rycina 42. Zmiana barwy PPIX(Me) ₂ (A), PPIX(OH) ₂ (C) i PPIX[P(O)(OEt) ₂] ₂ (E) po 1, 4, 8 i 24 godz. fotokatalizy myrtenolu (A) oraz widma absorpcji PPIX(Me) ₂ (B), PPIX(OH) ₂ (D) i PPIX[P(O)(OEt) ₂] ₂ (F) po 4, 8 i 24 godz. reakcji | 104 |
| Rycina 43. Widmo ¹ H NMR tlenku myrtenalu | 106 |
| Rycina 44. Widmo ¹³ C NMR tlenku myrtenalu | 107 |
| Rycina 45. Widmo ¹³⁵ DEPT NMR tlenku myrtenalu..... | 107 |
| Rycina 46. Wpływ stężenia substratu na wydajność biokatalizy myrtenolu. Reakcję prowadzono w chloroformie przy 0,57 mM stężeniu H ₂ TPP przez 12 godz. Wartości średnie konwersji molowej z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 108 |
| Rycina 47. Wpływ stężenia tetrafenyloporfiryny na wydajność biokatalizy myrtenolu. Reakcję prowadzono w chloroformie przy 0,1 M stężeniu myrtenolu przez 12 godz. Wartości średnie z małymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 109 |
| Rycina 48. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na wydajność biokatalizy myrtenolu. Reakcję z 0,1 M stężeniem myrtenolu i 0,2 mM stężeniem H ₂ TPP prowadzono przez 12 godz. | 109 |
| Rycina 49. Wpływ temperatury na wydajność utleniania myrtenolu do tlenku myrtenalu przy użyciu H ₂ TPP. Reakcję prowadzono w chloroformie z 0,1 M stężeniem substratu i 0,2 mM stężeniem H ₂ TPP przez 12 godz. Wartości średnie z różnymi literami oznaczają różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ | 110 |
| Rycina 50. Widmo absorpcji H ₂ TPP w chloroformie (A) i widmo emisji fosforescencji ¹ O ₂ generowanego przez wzbudzenie H ₂ TPP światłem o $\lambda = 418$ nm, po 0, 12 i 24 godz. naświetlania | 112 |

| | |
|--|-----|
| Rycina 51. Wpływ myrtenolu na widmo absorpcji H ₂ TPP w chloroformie i widmo fosforescencji ¹ O ₂ generowanego przez wzbudzenie H ₂ TPP światłem przy 418 nm i 446 nm, po 0, 12 i 24 godz. naświetlania | 112 |
| Rycina 52. Wpływ tokoferolu na widmo absorpcji H ₂ TPP w obecności myrtenolu w chloroformie i widmo emisji ¹ O ₂ generowanego przez wzbudzenie H ₂ TPP światłem 418 nm i 446 nm, po 0, 12 i 24 godz. naświetlania..... | 113 |
| Rycina 53. Wpływ BHT na widmo absorpcji H ₂ TPP w obecności myrtenolu w chloroformie i widmo emisji ¹ O ₂ generowanego przez wzbudzenie H ₂ TPP światłem 418 nm i 446 nm, po 0, 12 i 24 godz. naświetlania. | 113 |
| Rycina 54. Wpływ alkoholu perylowego i jego estrów na liczbę komórek apoptotycznych w linii komórkowej T98G (glejak wielopostaciowy, stadium IV wg WHO). *wartości różniące się istotnie statystycznie od kontroli i alkoholu perylowego: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (ANOVA, test post-hoc Dunneta)..... | 115 |
| Rycina 55. Wpływ cytronellolu i jego estrów na liczbę komórek apoptotycznych w linii komórkowej T98G (glejak wielopostaciowy, stadium IV wg WHO). *wartości różniące się istotnie statystycznie od kontroli i cytronellolu: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (ANOVA, test post-hoc Dunneta) | 115 |
| Rycina 56. Wpływ myrtenolu i jego estrów na liczbę komórek apoptotycznych w linii komórkowej T98G (glejak wielopostaciowy, stadium IV wg WHO). *wartości różniące się istotnie statystycznie od kontroli i myrtenolu: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (ANOVA, test post-hoc Dunneta) | 116 |
| Rycina 57. Widmo 2D NMR COSY tlenku myrtenalu | 161 |
| Rycina 58. Widmo 2D NMR HMBC tlenku myrtenalu | 161 |
| Rycina 59. Widmo 2D NMR HSQC tlenku myrtenalu | 162 |
| Rycina 60. Widmo 2D NMR NOESY tlenku myrtenalu..... | 162 |

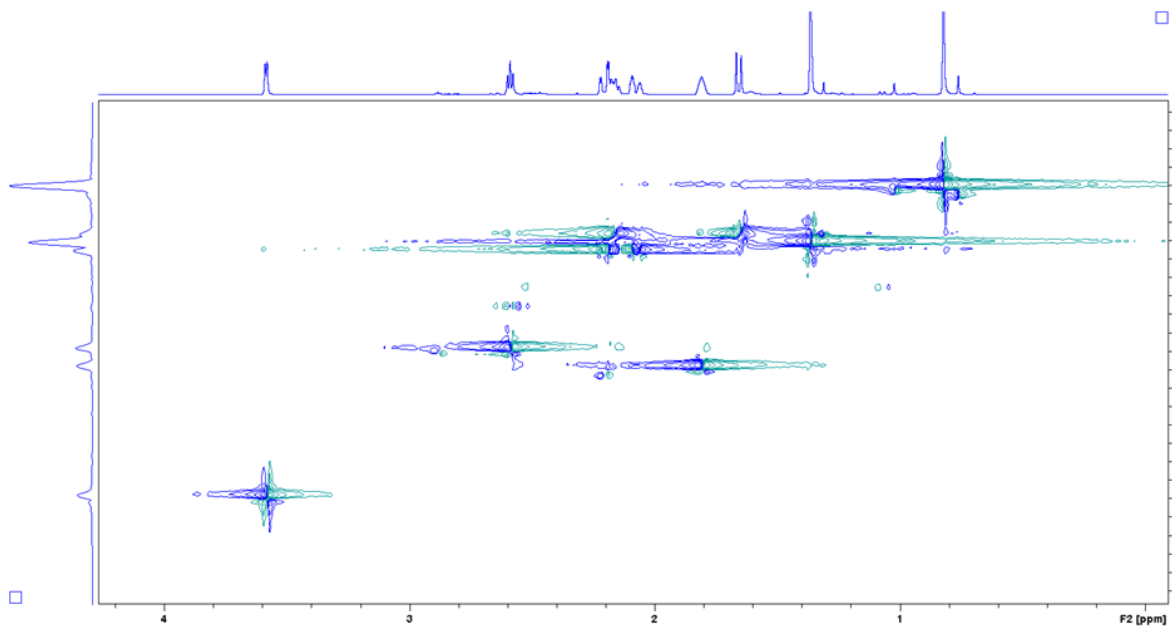
11. Supplement



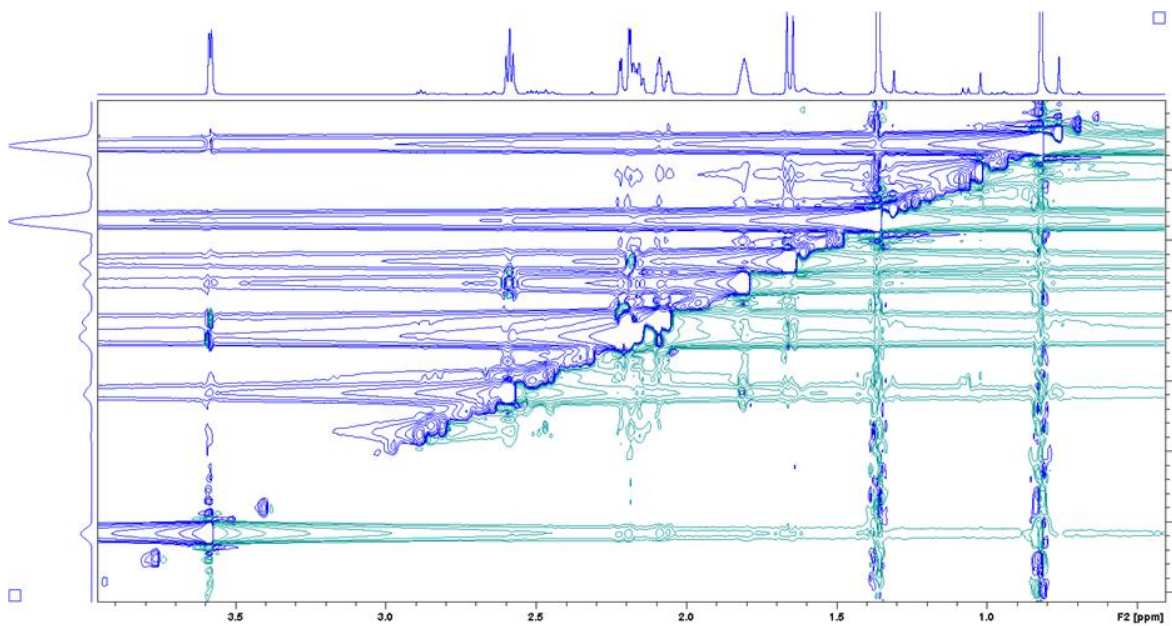
Rycina 57. Widmo 2D NMR COSY tlenku myrtenalu



Rycina 58. Widmo 2D NMR HMBC tlenku myrtenalu



Rycina 59. Widmo 2D NMR HSQC tlenku myrtenalu



Rycina 60. Widmo 2D NMR NOESY tlenku myrtenalu

12. Aneks – życiorys naukowy

Życiorys naukowy

Dane personalne:

Imię i nazwisko: **Mateusz Kutyla**

Wykształcenie:

2009 – 2012 – II Liceum Ogólnokształcące w Zespole Szkół nr 1 im. Legionów Polskich w Kozienicach, profil biologiczno-chemiczny.

2012 – uzyskanie pozytywnych wyników z egzaminów maturalnych z przedmiotów: język polski (poziom podstawowy i rozszerzony), język angielski (poziom podstawowy), biologia (poziom rozszerzony).

2012 – 2015 – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, studia stacjonarne I^o, kierunek: biotechnologia.

2015 – uzyskanie tytułu **licancjat**, praca pt.: „Mikroorganizmy jako broń biologiczna” wykonana w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii pod opieką promotorską dr hab. Jolanty Kutkowskiej, prof. UMCS.

2015 – 2017 – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, studia stacjonarne II^o, kierunek: biotechnologia, specjalność: biotechnologia medyczna.

2017 – uzyskanie tytułu zawodowego **magistra**, praca pt.: „Mutagenizacja i adaptacja psychrotroficznego grzyba *Chrysosporium pannorum* w celu zwiększenia wydajności biotransformacji β -pinenu” wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej pod opieką promotorską prof. dr hab. Jana Fiedurka.

2017 – obecnie – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, studia stacjonarne III^o, kierunek: biotechnologia

2020 – obecnie – Zatrudnienie na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej na stanowisku **asystenta**

Udział w grantach naukowych:

1. Stypendysta w projekcie badawczym nr 2015/17/B/NZ9/03607 pt. „Aktywność biologiczna i mechanizmy działania związków porfirynoidowych przeciwko wewnątrzkomórkowym patogenom pszczelim z rodzaju *Nosema*”. 07/2016 – 07/2017;
2. Uzyskanie grantu indywidualnego dla młodych pracowników i doktorantów Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS. Tytuł projektu: „Badania nad zastosowaniem psychrofilnego grzyba nitkowatego *Chrysosporium pannorum* A-1 jako biokatalizatora reakcji estryfikacji alkoholi terpenowych” w latach 2019-2020;
3. Uzyskanie grantu zespołowego dla młodych pracowników i doktorantów Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS. Tytuł projektu: „Enzymatyczna synteza nowych estrów alkoholi terpenowych oraz określenie ich zdolności do indukcji śmierci komórkowej ludzkich komórek glejaka” w 2020 roku. Współwykonawca: mgr Aleksandra Maciejczyk;
4. Uzyskanie grantu indywidualnego dla młodych pracowników i doktorantów Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS. Tytuł projektu: „Indukcja lipaz związanych z grzybnią jako biokatalizatorów reakcji estryfikacji I, II i III rzędowych alkoholi terpenowych” w 2022 roku.

Publikacje naukowe:

Czasopisma recenzowane z listy MNiSW:

1. Muszyński, S.; Dobrowolski, P.; Kasperek, K.; Knaga, S.; Kwiecień, M.; Donaldson, J.; **Kułyła, M.**; Kapica, M.; Tomaszewska, E. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) probiotics supplementation on bone quality characteristics in young Japanese quail (*Coturnix japonica*): the role of sex on the action of the gut-bone axis. *Animals* **2020**, 10, 440.
2. **Kułyła, M.**; Fiedurek, J.; Gromada, A.; Jędrzejewski, K.; Trytek, M. Mutagenesis and adaptation of the psychrotrophic fungus *Chrysosporium pannorum* A-1 as a method for improving β -pinene bioconversion. *Molecules* **2020**, 25, 2589.
3. Buczek, K.; Deryło, K.; **Kułyła, M.**; Rybicka-Jasińska, K.; Gryko, D.; Borsuk, G.; Rodzik, B.; Trytek, M. Impact of protoporphyrin lysine derivatives on the ability of *Nosema ceranae* spores to infect honeybees. *Insects* **2020**, 11, 504.

4. **Kutyla, M.;** Trytek, M.; Buczek, K.; Tomaszewska, E.; Muszyński, S. Biomass of a psychrophilic fungus as a biocatalyst for efficient direct esterification of citronellol. *Bioenergy Res.* **2022**, 15, 399-411.
5. **Kutyla, M.;** Maciejczyk, A.; Trytek, M.; Jakubowicz-Gil, J. Biocatalytic synthesis of terpene esters and their biological activity in human glioma cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2022**, 23, 760-765.

Rozdziały w monografiach:

1. Jędrzejewski, K.; Fiedurek, J.; Rusinek, P.; **Kutyla M.** Wpływ stresu oksydacyjnego na biotransformację β -pinenu przy użyciu psychrotroficznego grzyba *Chrysosporium pannorum*. Mikrobiologia oraz metody analityczne w nauce Wydawnictwo Tygiel, Lublin 2016, 197-213.
2. **Kutyla, M.;** Trytek, M. Liofilizowana grzybnia *Chrysosporium pannorum* A-1 jako wydajny biokatalizator syntezy estrów terpenowych, str. 54-57, Praca zbiorowa: *Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie*, pod red. Doroty Kołodyńskiej, Lublin 2021. ISBN 978-83-227-9503-3.
3. Gładysz-Płaska, A.; Iwan, J.; Hubicki, Z.; **Kutyla, M.;** Trytek, M. Zastosowanie biosorbentu i żywicy jonowymiennej do usuwania jonów toru, str. 238-242, Praca zbiorowa: *Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie*, pod red. Doroty Kołodyńskiej, Lublin 2021. ISBN 978-83-227-9503-3.

Doniesienia zjazdowe:

1. Trytek, M.; Skowronek, M.; Podkościelna, B.; Gawdzik, B.; Gromada, A.; **Kutyla, M.;** Fiedurek, J. Bioconversion of inulin by *A. niger* inulinase immobilized on reactive epoxy-functionalized polymers. 4th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, Trzebnica, Poland 25-27 June 2018. Poster.
2. **Kutyla, M.;** Fiedurek, J.; Trytek, M.; Gromada, A.; Jędrzejewski, K. Mutagenesis and adaptation of psychrotrophic fungus *Chrysosporium pannorum* A-1 for improvement of β -pinene bioconversion. 4th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, Trzebnica, Poland 25-27 June 2018. Poster.
3. Trytek, M.; Buczek, K.; **Kutyla, M.;** Rybicka-Jasińska, K.; Borsuk, G.; Gryko, D. “Effect of visible light on the activity of porphyrins against *Nosema microsporidia*” Symposium on Dyes & Pigments, Sevilla, Spain, 8-11 September 2019, Book of Abstracts, O6.2.5.

4. Frant, M.; Paduch, R.; Trytek, M.; **Kutyla, M.**; Pięt, M.; Kandefer-Szerszeń M. "Biological activity of selected porphyrins in human colorectal cancer cells in vitro". Symposium on Dyes & Pigments, Sevilla, Spain, 8-11 September 2019, Book of Abstracts, P1.4.3. Poster.
5. **Kutyla, M.**; Trytek, M.; Buczek, K.; Gromada, A. Production of terpene esters by esterification catalysed by mycelium of *Chrysosporium pannorum* A-1. 2019 International Conference on Biotechnology and Bioengineering, Poznań, Poland 25-28 September 2019. Poster.
6. **Kutyla, M.**; Trytek, M. Liofilizowana grzybnia *Chrysosporium pannorum* A-1 jako wydajny biokatalizator syntezy estrów terpenowych. Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, Lublin 28 czerwca 2021. Wystąpienie ustne.
7. Gładysz-Płaska, A.; Iwan, J.; Hubicki, Z.; **Kutyla, M.**; Trytek, M. Zastosowanie biosorbentu i żywicy jonowymiennej do usuwania jonów toru. Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, Lublin 28 czerwca 2021. Poster.
8. **Kutyla, M.**; Stankevič, M.; Pięt, M.; Trytek, M. Biocatalytic preparation of a myrtenol derivative with potential anticancer properties. 5th Symposium on Biotransformation for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, 13-15 czerwca 2022, Jura Krakowsko-Częstochowska. Poster.
9. Viana, A.F.S.; Fernandes, H.B.; Sousa, C.F.A.; **Kutyla, M.**; Stankevič, M.; Trytek, M.; Oliveira, R.C.M. Gastroprotective effect of a chemical substance derived from the biotransformation of (-)-myrtenol in an experimental model of ethanol induced gastric lesions in mice. III Biotec Meeting 2022, Teresina, Brazylia, 17-19 listopada 2022. Rozszerzony abstract.

Nagrody i wyróżnienia:

1. Nagroda zespołowa Rektora UMCS za rok akademicki 2021/2022 za patenty dotyczące sposobu otrzymywania biokatalizatorów grzybowych.

Patenty:

1. **Kutyla, M.**; Trytek, M. Sposób otrzymywania biokatalizatorów z grzybów mezofilnych. P.240994. **2022.**
2. **Kutyla, M.**; Fiedurek, J.; Trytek, M.; Sposób otrzymywania biokatalizatorów z grzybów psychrofilnych. P.240995, **2022.**

Wyjazdy i staże:

07/2014 – 08/2014 – Praktyka w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach w Zakładzie Chorób Ryb, Zakładzie Anatomii Patologicznej i Pracowni Mikroskopii Elektronowej.

05/2019 – 07/2019 – Staż naukowy w Zakładzie Biologii Środowiskowej i Apidologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Dydaktyka:

1. „**Mikrobiologia Przemysłowa**” dla studentów II roku I° kierunku **Biotechnologia**;
2. „**Mikrobiologia Przemysłowa KP**” dla studentów I roku II° kierunku **Biologia spec. mikrobiologia**;
3. „**Grzyby w biotechnologii**” dla studentów I roku I° kierunku **Biotechnologia**;
4. „**Inżynieria Procesów Biotechnologicznych**” dla studentów III roku I° kierunku **Biotechnologia**;
5. „**Genetyka KR**” dla studentów II roku I° kierunku **Biologia**.

Dodatkowa działalność:

Organizacyjna i popularyzatorska:

1. Organizacja i czynny udział w Nocy Biologów w latach 2018-2022;
2. Organizacja i czynny udział w Drzwiach Otwartych UMCS w latach 2018-2021;
3. Organizacja i czynny udział w zajęciach ze Szkołami Partnerskimi UMCS w roku 2022;
4. Czynny udział w warsztatach organizowanych w ramach III Green Week 2022;
5. Czynny udział w warsztatach organizowanych w ramach Lubelskiego Festiwalu Nauki w 2022;
6. Ekspert medialny Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS;
7. Opiekun infrastruktury w Laboratorium Podstawowym Pracowni Inżynierii Bioprocusowej Instytutu Nauk Biologicznych;
8. Wygłoszenie referatu pt.: „Gdzie się piwo warzy tam się dobrze darzy – czyli słów kilka o piwowarstwie” na sesji naukowej Lubelskiego Towarzystwa Naukowego, 21 lutego 2020 roku.
9. Członek Kolegium Dziekańskiego w roku akademickim 2022/2023;
10. Opiekun Koła Naukowego Mikrobiologów „Bakcyl”.

Podnoszenie kwalifikacji poprzez udział w szkoleniach:

1. Udział w szkoleniu „Jak z sukcesem przygotować wniosek o grant”, Kraków 13.03.2018 r.;
2. Udział w seminarium „Najnowsze rozwiązania technologiczne w chemii analitycznej”, Lublin 16.10.2018 r.;
3. Udział w szkoleniu „Prawo autorskie i własności intelektualnej”, Lublin 11.12.2018 r.;
4. Udział w seminarium „Innowacyjne rozwiązania do hodowli komórek ssaczy”, Lublin 17.10.2019 r.
5. Udział w seminarium „From the Lab to the Manufacturing floor – Monitoring Fermentation with a Biological Perspective” 25.05.2021 r.
6. Udział w szkoleniu „Prosty język w komunikacji publicznej”, Lublin 19.01.2022 r.;
7. Udział w szkoleniu „Koniec semestru - sposoby wsparcia studentów w radzeniu sobie z zaliczeniami i egzaminami w trakcie pierwszej sesji”, Lublin 01.02.2022 r.;
8. Udział w szkoleniu „Fundamentals of Western Blotting Course”, on-line, 09.06.2022 r.;
9. Udział w Warsztatach analitycznych zorganizowanych przez firmę MS Spektrum w EcoTech Complex Lublin, 21.06.2022 r.;
10. Udział w szkoleniu “Szkolenie dla opiekunów lat i kierunków”, Lublin, 20.09.2022 r.;
11. Udział w warsztatach „Statystyka w R i RStudio”, Lublin, 27-29.09.2022 r.;
12. Udział w wykładzie „Planowanie kariery zawodowej naukowców”, Lublin, 27.10.2022 r.;
13. Uprawnienia do obsługi autoklawów.