



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Chemii

Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii

Nowe podejście w analizie związków biologicznie aktywnych przy wykorzystaniu laserowej jonizacji/desorpcji wspomaganą matrycą (MALDI)

Autoreferat

Paweł Piotr Pomastowski

Dziedzina nauk chemicznych

Dyscyplina: chemia

Toruń 2019

1. Imię i nazwisko

Paweł Piotr Pomastowski

2. Posiadane dyplomy i stopnia naukowe

2012–2016– Studia doktoranckie w zakresie chemii w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky na Wydziale Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł rozprawy doktorskiej: „*Synteza i charakterystyka nanokompozytów bazujących na wiązaniu kationów metali z białkami*”, praca obroniona z wyróżnieniem 14.12.2016 r.; promotor: Prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski, dr h. c. mult., czł. koresp. PAN

2010–2012– Dzielne dwuletnie uzupełniające studia magisterskie w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky na Wydziale Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł pracy: „*Wpływ heterogeniczności powierzchni biokoloidów na ich rozdzielanie elektroforetyczne*”, praca obroniona z wyróżnieniem 20.06.2012 r.; promotor: Prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski, dr h. c. mult., czł. koresp. PAN

2008–2010– Trzyletnie dziennie studia zawodowe w Katedrze Chemii Nieorganicznej i koordynacyjnej na Wydziale Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł pracy: „*Odrębność metod ALD oraz CVD*”, praca obroniona 30.06.2010 r.; promotor: Dr Aleksandra Radtke

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

1.01.2017 – obecnie Adiunkt naukowy, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

1.10.2016 – 30.11.2016 Asystent naukowy, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

(a) tytuł osiągnięcia naukowego:

monotematyczny cykl publikacji zatytułowany:

„Nowe podejście w analizie związków biologicznie aktywnych przy wykorzystaniu laserowej jonizacji/desorpcji wspomaganej matrycą (MALDI)”

(b) wykaz powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

Publikacje [H1-H11] wchodzące w skład jednotematycznego cyklu prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego pochodzą z czasopism znajdujących się na liście JCR (ang. *Journal Citation Reports*). Jestem autorem do korespondencji w przypadku 1 publikacji

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

[H11]. W publikacjach **H1-H11** mój wkład w autorstwo wynosił od 55% do 85%, zaś średni udział procentowy wyniósł 67,09%. W przypadku publikacji **H1-H11** podałem Impact Factor (IF) odnoszący się do roku wydania publikacji, punktację MNiSW odnoszącą się do roku wydania publikacji, a także liczbę cytowań na podstawie bazy danych *Web of Science* na dzień 21.02.2019.

[H1] K. Meller, **P. Pomastowski**, M. Szumski, B. Buszewski, „*Preparation of an improved hydrophilic monolith to make trypsin-immobilized microreactors*”, *J. Chromatogr. B*, 2017, 1043, 128-137; IF = 2,441; CI = 7; PM = 30

Wkład w autorstwo 70%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz instrumentalnych, dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H2] A. Rogowska, K. Rafińska, **P. Pomastowski**, J. Walczak, V. Railean-Plugaru, M. Buszewska-Forajta, B. Buszewski, „*Silver nanoparticles functionalized with ampicillin*”, *Electrophoresis*, 2017, 38(21), 2757-2764; IF = 2,744; CI = 2; PM = 25

Wkład w autorstwo 55%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz spektrometrycznych oraz spektroskopowych, dyskusji i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H3] A. Król, **P. Pomastowski**, K. Rafińska, V. Railean-Plugaru, J. Walczak, B. Buszewski „*Microbiology neutralization of zearalenone using Lactococcus lactis and Bifidobacterium sp*”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, 410(3), 943-952; IF = 3,430; CI = 0; PM = 35

Wkład w autorstwo 65%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz, dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H4] A. Król, **P. Pomastowski**, K. Rafińska, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski, „*Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism*”, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2017, 249:37-52; IF = 7,223; CI = 13; PM = 40

Wkład w autorstwo 70%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu interpretacji uzyskanych danych, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H5] H. Al-Suod, **P. Pomastowski**, M. Ligor, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski, „*New approach for fast identification of cyclitols by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry*”, *Phytochem. Anal.*, 2018, 29(5), 528-537; IF = 2,292; CI = 1; PM = 30

Wkład w autorstwo 55%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz, dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H6] V. Railean-Plugaru, **P. Pomastowski**, T. Kowalkowski, M. Sprynskyy, B. Buszewski, „*Physicochemical study of natural fractionated biocolloid by Asymmetric Flow Field-*

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Flow Fractionation in tandem to various complimentary techniques using biologically synthesised silver nanocomposites”, Anal. Bioanal. Chem., 2018, 410(11), 2837–2847; IF = 3,420; CI = 0; PM = 30

Wkład w autorstwo 70%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz spektrometrycznych oraz spektroskopowych, dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H7] M. Szultka-Młyńska, **P. Pomastowski**, B. Buszewski, „*Application of solid phase microextraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry in the determination of antibiotic drugs and their metabolites in human whole blood and tissue samples*”, J. Chromatogr. B., 2018, 1086:153-165; IF= 2,603; CI = 1; PM = 30

Wkład w autorstwo 70%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu i wykonaniu analiz przy wykorzystaniu techniki laserowej desorpcji/ionizacji próbki wspomaganą matrycą, dyskusji i interpretacji uzyskanych wyników, uczestniczeniu w napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H8] A. Rogowska, **P. Pomastowski**, M. Złoch, V. Railean-Plugaru, A. Król, K. Rafińska, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, „*The influence of different pH on the electrophoretic behaviour of Saccharomyces cerevisiae modified by calcium ions*”, Sci. Rep., 2018, 8(1), 1-10; IF = 4,259; CI = 1; PM = 40

Wkład w autorstwo 60%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz spektrometrycznych, spektroskopowych oraz elektroforetycznych, dyskusji i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H9] A. Król, V. Railean-Plugaru, **P. Pomastowski**, M. Złoch, B. Buszewski, *Mechanism study of intracellular zinc oxide nanocomposites formation*, Coll. Surf. A, 2018, 553, 349-358; IF = 2,714; CI = 0; PM = 30

Wkład w autorstwo 70%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz, dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H10] G. Sagandykova, **P. Pomastowski**, R. Kaliszan, B. Buszewski, „*Modern analytical methods for consideration of natural biological activity*”, Trends Anal. Chem. 2018, 109, 198-213; IF = 7,621; CI = 0; PM = 50

Wkład w autorstwo 60%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, uczestniczeniu w dyskusji uzyskanych danych literaturowych, uczestniczeniu w napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H11] **P. Pomastowski**, B. Buszewski, „*Complementarity of matrix- and nanostructure-Assisted Laser Desorption/Ionization Approaches*”, Nanomaterials, 2019, 9(2), 1-24; IF = 3,504; ;CI = 0; PM = 35

Wkład w autorstwo 85%

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, kierowaniu projektem naukowym obejmującym założenia opisane w tej pracy, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analizy danych literaturowych, dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy, korespondencji z redaktorem czasopisma oraz recenzentami.

PODUSMOWANIE

Publikacje [H1-H11] tworzące osiągnięcie habilitacyjne wykazują następujące wskaźniki bibliometryczne:

- sumaryczny współczynnik oddziaływania IF (wg. listy JCR): **40,59**
- średnia wartość IF (wg. listy JCR): **3,690**
- sumaryczna punktacja MNiSW: **370**
- średnia liczba punktów MNiSW: **33,64**

4.2. Autoreferat wraz z omówieniem osiągnięcia naukowego

Wykaz skrótów

Skrót	Znaczenie
1,5-DAN	1,5-diaminonaftalen
16S rDNA	Sekwencjonowanie genu 16S rRNA
2D-GE	dwuwymiarowa elektroforeza żelowa (ang. <i>two-dimensional gel electrophoresis - mass spectrometry</i>)
A4F	Frakcjonowanie w asymetrycznym polu sił przepływu (ang. <i>asymmetric flow field flow fractionation</i>)
AgNPs	Nanocząstki srebra (ang. <i>silver nanoparticles</i>)
ALD	Wytwarzanie warstw atomowych (ang. <i>atomic layer deposition</i>)
BAEE	Ester etylowy N- α -benzoilo-L-argininy
BLAS	Baza danych BLAS (ang. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BSA	Albumina surowicy bydźcey (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
CN	Kazeina (ang. <i>casein</i>)
CVD	Chemiczne osadzanie z fazy gazowej (ang. <i>chemical vapour deposition</i>)
CZE	Strefowa elektroforeza kapilarna (ang. <i>capillary zone electrophoresis</i>)
CZE-MS	Strefowa elektroforeza kapilarna połączona ze spektrometrem mas (ang. <i>capillary zone electrophoresis - mass spectrometry</i>)
DHB	Kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy
DIT	Ditranol
DLS	Dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>dynamic light scattering</i>)
DLVO	Teoria Derjaguina, Landau, Verwey, Overbeek
ESI	Elektrosprej (ang. <i>electrospray</i>)
FAO	Organizacja do spraw żywienia i rolnictwa (ang. <i>Food and Agriculture Organization</i>)
FTIR	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
GMA-EDMA	Monolityczny kopolimer metakrylanu glicydyłu i dimetakrylanu glikolu etylenowego
HCCA	Kwas alfa-cyano-4-hydroksycynamonowy (ang. <i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

HEMA-MBA	Metakrylan 2-hydroksyetylu jako funkcjonalny monomer i N,N'-metylenobis (akryloamid)
IMERs	Mikroreaktory enzymatyczne z immobilizowanymi enzymami (ang. <i>immobilized enzyme reactors</i>)
LC-MS	Chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrem mas (ang. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LIFT	Laserowa technologia jonizacji/fragmentacji (ang. <i>laser ionization/fragmentation technology</i>)
LTF	Laktoferyna (ang. <i>lactoferrin</i>)
MALDI	Laserowa jonizacja/desorpcja próbki wspomagana matrycą (ang. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MALDI TOF MS	Spektrometryczna metoda laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomagana matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight analyzer mass spectrometry</i>)
MALDI TOF-TOF MS	Spektrometryczna metoda laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomagana matrycą z tandemowym analizatorem czasu przelotu (ang. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization with tandem time-of-flight analyzer mass spectrometry</i>)
MS	Spektrometria mas (ang. <i>mass spectrometry</i>)
NALDI	Laserowa jonizacja/desorpcja wspomagana nanostrukturami (ang. <i>nanostructure-assisted laser desorption/ionization</i>)
NCBiR	Narodowe Centrum Badań i Rozwoju
NCN	Narodowe Centrum Nauki
NMR	Magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PCM	Polska Kolekcja Mikroorganizmów (ang. <i>Polish Collection of Microorganisms</i>)
PMF	Peptydowy odcisk palca (ang. <i>peptides molecular fingerprint</i>)
QSAR	Teoretyczne relacje aktywność biologiczna – struktura (ang. <i>quantitative structure–activity relationship models</i>)
SA	Kwas synapinowy (ang. <i>sinapic acid</i>)
sDHB	Mieszanka kwasu 2,5-dihydroksybenzoesowy i kwasu 2-hydroksy-5-metoksybenzoesowego w stosunku 9:1
SDS-PAGE	Gradientowa elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących (ang. <i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM	Skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. <i>scanning electron microscopy</i>)
SPE	Ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid phase extraction</i>)
SPME	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (ang. <i>solid phase microextraction</i>)
T1	Mikroreaktor na bazie łańcucha z dwoma jednostkami węglowymi
TEM	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>transmission electron microscopy</i>)
TFA	Kwas trifluorooctowy (ang. <i>trifluoroacetic acid</i>)
TOF	Analizator czasu przelotu (ang. <i>time-of-flight</i>)
TOF-TOF	Tandemowy analizator czasu przelotu (ang. <i>tandem time-of-flight</i>)
TS1	Mikroreaktor na bazie łańcucha z dwunastoma jednostkami węglowymi
UV-VIS	Spektrofotometria (ang. <i>ultraviolet–visible spectroscopy</i>)

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

ZEA

Zearalenon

ZnO NPs

Nanocząstki tlenku cynku (ang. *zinc oxide nanoparticles*)

Wprowadzenie

W 2010 roku ukończyłem studia licencjackie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, a następnie rozpocząłem studia magisterskie na specjalności chemia środowiska. Przedmiotem pracy dyplomowej, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego, było określenie wpływu heterogeniczności powierzchni biokolloidów na ich rozdzielanie elektroforetyczne. Podczas realizacji pracy magisterskiej odbyłem miesięczny staż w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wojewódzkiego Szpitala Zespołonego im. L. Rydygiera w Toruniu. Podczas pobytu poszerzyłem swoją wiedzę z zakresu hodowli, analizy i identyfikacji mikroorganizmów przy wykorzystaniu klasycznych metod posiewowych. Tytuł magistra uzyskałem w czerwcu 2012 roku. Wyniki mojej pracy prezentowałem na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Ukazały się one także drukiem w formie publikacji naukowej [1]. W tym samym roku zostałem słuchaczem Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemii, UMK w Toruniu. Rozpocząłem realizację pracy doktorskiej pod tytułem: „*Synteza i charakterystyka nanokompozytów bazujących na wiązaniu kationów metali z białkami*”, bezpośrednio pod kierunkiem prof. dr hab. B. Buszewskiego. Przedmiotem badań była synteza nanokompleksowych związków kazeiny z srebrem i cynkiem, laktoferryiny z srebrem oraz opis mechanizmu wiązania jonów metali przez białka wyizolowane z mleka krowiego. Opracowałem nową procedurę frakcjonowania izoform kazeiny (CN). Ponadto, opisałem kinetykę wiązania jonów srebra do laktoferryiny (LTF) i kazeiny oraz dodatkowo jonów cynku do kazeiny. Podczas realizacji pracy doktorskiej opisałem mechanizm molekularny formowania się kompleksów metali przy wykorzystaniu technik instrumentalnych, połączonych z metodami obliczeniowymi. Dodatkowo, wykazałem działanie antybakteryjne nanokompleksów Ag-LTF wobec patogenów o znaczeniu klinicznym. Opracowanie metody otrzymywania antybakteryjnych białkowych nanokompozytów metali stwarzają możliwości do ich zastosowania przemysłowego, produkcji na dużą skalę jako preparatów stosowanych do leczenia trudno gojących się ran, odleżyn, oparzeń, jak również miejscowego leczenia infekcji gardła. Natomiast, otrzymane kompleksy kazeiny z cynkiem posiadają potencjał komercjalizacyjny w przemyśle farmaceutycznym i niewątpliwie mogą stanowić cenny materiał do dalszych medycznych badań nad suplementacją cynku. Wynikiem prowadzonych badań było zgłoszenie patentowe (nr P.418480) oraz szereg publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym m.in. [2][3][4]. Są to jedne z pierwszych prac na świecie poświęcone temu tematowi. W realizacji badań duże znaczenie miały projekty badawcze, w których pełniłem rolę kierownika i wykonawcy. Był to m.in. grant NCN Preludium (2013/11/N/ST4/01835), granty UMK: 1513-Ch, 2082-Ch, oraz 2 Stypendia Marszałka Województwa Kujawsko-Pomorskiego, które w 50% przeznaczyłem na realizację badań. W roku akademickim 2012/2013, zrealizowałem badania w ramach międzynarodowego stażu naukowego pod kierunkiem prof. F. Killára (Uniwersytet w Peczu, Węgry) w ramach projektu CEEPUS III. Ponadto, w tym okresie odbyłem szkolenia operatora MALDI TOF/TOF MS

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

oraz połączenia nLC-MS w Bremie w Niemczech. W trakcie realizacji rozprawy doktorskiej zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta na Wydziale Chemii UMK w Toruniu w ramach projektu Symfonia-1 (NCN 2013/08/W/NZ8/0070) kierowanego przez prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego. Tytuł doktora nauk chemicznych uzyskałam w grudniu 2016 roku. Pracę doktorską wyróżniono odrębną uchwałą Wydziału Chemii UMK w Toruniu. Rozprawa doktorska uzyskała również szereg nagród i wyróżnień, m.in. nagrodę firmy Leco i Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą rozprawę doktorską z chemii analitycznej oraz Oddziału Polskiej Akademii Nauk w Gdańsku za najlepszą pracę twórczą opublikowaną w 2016.

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk chemicznych, zostałem zatrudniony w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu na stanowisku adiunkta naukowego, rozpoczynając tym samym badania naukowe, które stanowią podstawę rozprawy habilitacyjnej.

W lutym 2017 roku zostałem stypendystą Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w ramach programu START, natomiast w czerwcu 2018 zostałem kierownikiem projektu Opus 14 z Narodowego Centrum Nauki nr NCN 2017/27/B/ST4/02628 (2018–2021), pt. „*Synteza kompleksowych związków srebra i cynku na bazie kazein i białek serwatki oraz nanocząstek srebra i tlenku cynku przez probiotyczne bakterie kwasu mlekowego*”.

Ponadto, w marcu 2017 roku odbyłem wizytę naukową na Uniwersytecie Pukyong National University, Intelligent Systems Laboratory w Busan w Republice Korei Południowej, natomiast w lipcu 2018 roku na Uniwersytecie Babes-Bolyai, Raluca Ripan Institute for Research in Chemistry w Cluj Napoca (Rumunia). W latach 2016-2019 sprawowałem opiekę nad rozprawami doktorskimi: mgr A. Król, mgr A. Rogowskiej, mgr A. Rodzik oraz dr Viorici Railean-Plugaru. W listopadzie 2018 uchwałą Rady Wydziału Chemii UMK w Toruniu nr 7/2018/19 zostałem promotorem pomocniczym wszczętego przewodu doktorskiego mgr Gulyaim Sagandykova.

W tym okresie równolegle zajmowałem się również badaniami jako wykonawca w ramach następujących projektów: BIOSTRATEG 2 z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju nr BIOSTRATEG2/298205/9/NCBR/2016 (2016-2019), OPUS z Narodowego Centrum Nauki nr NCN 2016/21/B/ST4/02130 (2016-2019), Sonata z Narodowego Centrum Nauki nr NCN 2016/21/D/ST4/03730 (2016-2019). Efektem było opublikowanie szeregu prac naukowych z tego zakresu m.in. [5][6] oraz dokonanie dwóch zgłoszeń patentowych (P.421739, P.425990) oraz dwóch depozytów patentowych szczepów bakterii kwasu mlekowego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów.

Laserowa desorpcja/ionizacja próbki wspomagana matrycą

Problematyczny charakter współczesnych badań analitycznych związany jest głównie ze złożonością analizowanych matryc biologicznych i bardzo niskim stężeniem badanych analitów, których ilość jest zazwyczaj mała i często reprezentatywna dla kilku komórek (np. lizatów komórkowych). **Konsekwencją wyżej wymienionych cech matryc biologicznych jest potrzeba poszukiwania wysoce skutecznych, wydajnych i czułych**

metod analitycznych pozwalających z jednej strony na wykrywanie makrocząsteczek, a z drugiej strony analizę związków niskocząsteczkowych. Wymagania te mogą być spełnione przez zastosowanie technik spektrometrycznych. Spektrometria masowa (MS, ang. *mass spectrometry*) obok technik spektroskopowych takich jak: magnetyczny rezonans jądrowy (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*), spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR, ang. *Fourier-transform infrared spectroscopy*), spektrofotometria (UV-VIS, ang. *ultrafiolet-visible*) czy spektroskopia fluorescencyjna jest podstawową metodą identyfikacji substancji biologicznie aktywnych. Jej zaletą jest bardzo wysoka czułość, która w połączeniu z innymi technikami analitycznymi, takimi jak: chromatografia cieczowa (LC-MS, ang. *liquid chromatography - mass spectrometry*) lub elektroforeza kapilarna (np. metoda strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE-MS, ang. *capillary zone electrophoresis - mass spectrometry*) i dwuwymiarowa elektroforeza żelowa (2D-GE, ang. *two-dimensional gel electrophoresis - mass spectrometry*) daje możliwości przeprowadzenia analizy bardzo złożonych mieszanin, np. peptydów i białek, takich jak frakcje kazeinowe, a nawet mieszanina natywnych białek mikroorganizmów [7]. Pomimo ogromnej różnorodności technik spektrometrii masowej schemat konstrukcji we wszystkich aparatach jest podobny. Głównymi elementami są: źródło jonów (zachodzi w nim jonizacja cząsteczki), analizator (następuje w nim rozdzielanie jonów za względu na masę i ładunek, m/z), detektor oraz rejestrator [8].

Laserowa desorpcja/ionizacja próbki wspomagana matrycą, MALDI (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*) jest jedną z metod jonizacji, w której jony są wytwarzane za pomocą lasera, głównie pracującego w zakresie UV. MALDI jest techniką jonizacji rozwijaną w spektrometrii mas od połowy lat 80-tych, najczęściej w połączeniu z analizatorem czasu przelotu (TOF, ang. *time-of-flight*) pojedynczym bądź tandemowym (TOF-TOF) wymagających do pracy najczęściej wysokiej próżni [9]. Umożliwia ona analizę labilnych cząsteczek w fazie gazowej w postaci tzw. „jonów pseudomolekularnych”. Dlatego też MALDI, podobnie jak elektrosprej (ESI, ang. *electrospray*), należy do grupy miękkich technik jonizacji. Z drugiej strony, zaletą MALDI w porównaniu z techniką jonizacji ESI jest większa tolerancja na obecność soli lub detergentów w próbkach w przypadku analizy białek wyizolowanych z różnych matryc biologicznych i oczyszczonych technikami elektroforetycznymi, np. za pomocą dwuwymiarowej elektroforezy żelowej. Jonizacja MALDI jest wynikiem promieniowania laserowego w wyniku krystalizacji mieszaniny próbki i matrycy. Matryca pośredniczy w przekazywaniu energii do badanej substancji oraz ułatwia jonizację i desorpcję próbki. Celem matrycy jest jonizacja cząsteczek, które nie mogą pochłaniać promieniowania laserowego. Dlatego też jonizacja w MALDI przebiega pośrednio [10].

W ostatnich latach laserowa desorpcja/ionizacja próbki wspomagana matrycą stała się głównym narzędziem do badania makrocząsteczek biologicznych takich jak lizaty komórkowe czy białka, zwłaszcza w oznaczaniu ich mas cząsteczkowych, profili molekularnych, struktury i modyfikacji potranslacyjnych [7]. Niestety, ze względu na kluczową rolę matrycy, którą zwykle jest kwas organiczny o niskiej masie cząsteczkowej, metody przygotowania próbki jak i interpretacja widm masowych w zakresie mas poniżej m/z 500 są trudne i problematyczne. Dlatego też, analiza związków o niskiej masie cząsteczkowej

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

w układzie wspomaganym matrycą, jak i interpretacja procesów fizykochemicznych, w których one uczestniczą jest aktualnym problemem badawczym.

Cele badań, realizowanych w ramach rozprawy habilitacyjnej

Powodem podjęcia niniejszych badań realizowanych w ramach rozprawy habilitacyjnej oraz opisanych w pracach **H1-H11** [11,13,15, 17-22, 25-26] zgłoszonych do postępowania awansowego było opracowanie nowych metod przygotowania próbek oraz analizy biologicznie aktywnych związków takich jak:

- białka: albumina surowicy bydłowej, BSA (ang. *bovine serum albumin*), białkowe lizaty komórkowe (bakteryjne, drożdżowe), nanocząstki metali i ich tlenki
- związki niskocząsteczkowe: wybrane antybiotyki, cyklitole, zearalenon

w układach natywnych matryc biologicznych jak również w połączeniu z układami biokolooidalnymi:

- nanocząstki: srebra, AgNPs (ang. *silver nanoparticles*) oraz tlenku cynku, ZnO NPs (ang. *zinc oxide nanoparticles*)
- komórki bakteryjne i drożdżowe

przy wykorzystaniu technologii laserowej jonizacji/desorpcji wspomaganiej matrycą oraz w połączeniu z wybranymi technikami instrumentalnymi:

- metodami spektroskopowymi (UV-VIS, FTIR)
- dynamicznym rozpraszaniem światła DLS (ang. *dynamic light scattering*)
- mikroskopowymi: (mikroskopia fluorescencyjna, skaningowa mikroskopia elektronowa SEM (ang. *scanning electron microscopy*), transmisyjna mikroskopia elektronowa TEM (ang. *transmission electron microscopy*)
- elektroforetycznymi: gradientowa elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, ang. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) oraz strefową elektroforezą kapilarną (ang. *capillary zone electrophoresis*).
- frakcjonowaniem w asymetrycznym polu sił przepływu (ang. *asymmetric flow field flow fractionation*; A4F)

Mając na uwadze powyższe zagadnienia celem realizowanych w ramach rozprawy habilitacyjnej badań było:

1. Opracowanie selektywnych metod przygotowania materiału białkowego z zastosowaniem mikroreaktorów enzymatycznych z immobilizowanymi enzymami, oraz klasycznego trawienia enzymatycznego przy wykorzystaniu tripsyny jako metody odniesienia do analizy MALDI MS. Dodatkowo, etap ten obejmował również dobór parametrów analitycznych przygotowania próbki do analizy MALDI MS takich jak: rodzaj i stężenie matrycy, rodzaj rozpuszczalnika, wybór płytki oraz sposobu nakładania próbki i matrycy **H1, H11** [11,25].

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

2. Opracowanie selektywnych metod analizy związków niskocząsteczkowych **H11** [25], takich jak: antybiotyki m.in. amoksycylina, cefotaksym, ciprofloksacyna, metronidazol **H7** [20], ampicylina **H2** [13], cyklitole (D-*chiro*-inozytol, L-*chiro*-inozytol, D-pinitol) **H5** [18] oraz mykotoksyna, zearalenon **H3** [15] przy zastosowaniu spektrometru MALDI TOF-TOF MS oraz referencyjnych metod instrumentalnych. Kolejny etap badań stanowił zastosowanie opracowanych procedur analitycznych w analizie wyżej wymienionych związków izolowanych bezpośrednio z matryc biologicznych: antybiotyków z krwi ludzkiej **H7** [20], zearalenonu izolowanego z pożywki mikrobiologicznej M9 **H3** [15] oraz cyklitoli analizowanych bezpośrednio w ekstraktach roślinnych *Medicago sativa* L. **H5** [18].
3. Opracowanie selektywnej metody identyfikacji mikroorganizmów dla bakterii środowiskowych izolowanych z:
 - mleka krowiego: *Bifidobacterium* sp. **H3** [15] *Lactococcus lactis* oraz *Lactobacillus casei* [12], *Lactococcus lactis* 56 [16]
 - twarogu *Lactobacillus paracasei* LB3 **H9** [26]
 - drożdży *Saccharomyces cerevisiae* izolowanych z produktów spożywczych **H8** [21]

przy wykorzystaniu spektrometrycznej techniki MALDI TOF MS w wariacie domowych repozytoriów widm [27], [28] oraz platformy Biotyper w połączeniu ze sekwencjonowaniem 16S rDNA w przypadku identyfikacji molekularnej bakterii oraz 28S rDNA w przypadku analizy drożdży [14]. Następnie, dla otrzymanych i zdeponowanych szczepów mikroorganizmów było planowane opracowanie:

- metody zewnątrzkomórkowej syntezy nanocząstek tlenku cynku ZnO NPs (ang. *zinc oxide nanoparticles*) przy wykorzystaniu szczepu *L. lactis* 56 **H9** [26] o ściśle określonych właściwościach fizykochemicznych oraz o określonej aktywności biologicznej **H4** [17]
 - metody elektroanalizy przy wykorzystaniu strefowej elektroforezy kapilarnej zidentyfikowanego szczepu *L. lactis* [24] oraz drożdży *S. cerevisiae* **H8** [21].
4. Opracowanie metody badania oddziaływania biokoloidów:
 - komórek bakteryjnych: *L. lactis* z jonami srebra [16], drożdży *S. cerevisiae* z jonami cynku **H8** [21], bakterii *L. lactis* i *L. casei* z jonami srebra [12], bakterii *Bacillus subtilis* z jonami i nanocząstkami srebra [23], *L. lactis* oraz *Bifidobacterium* sp. z cząsteczkami zearalenonu **H3** [15]
 - nanocząstek srebra z peptydami **H6** [19] oraz z ampicyliną **H2** [13]

przy wykorzystaniu spektrometrycznej techniki MALDI TOF MS w połączeniu z technikami instrumentalnymi jako nowe podejście w opisie procesów wiązania/biosorpcji oraz aktywności biologicznej biokoloidów **H10** [22].

Przygotowanie próbek – współczesne strategie analityczne stosowane w analizie białek za pomocą laserowej desorpcji/ionizacji próbki wspomaganą matrycą

Białka są liczną i ważną grupą cząsteczek, odgrywającą niezwykle istotną rolę w komórkach i tkankach. Identyfikacja i analiza białek stała się kluczowym punktem nie tylko w biochemii, ale również w chemii analitycznej i medycynie. Istnieje wiele dobrze znanych metod powszechnie stosowanych do rozdzielania białek (np. SDS-PAGE, ogniskowanie izoelektryczne, czy dwuwymiarowa elektroforeza żelowa), wykrywania specyficznych białek w próbce (immunoblotowanie) oraz do identyfikacji białek (np. degradacja Edmana i spektrometria mas) [29]. Od końca lat 80-tych, analiza jakościowa biopolimerów jest zdominowana przez spektrometrię mas i metodę tzw. peptydowego odcisku palca (ang. PMF, *peptide mass fingerprint*). Polega ona na początkowym trawieniu białka specyficznym enzymem (najczęściej trypsyną), a następnie spektrometrycznym oznaczeniu powstałych fragmentów polipeptydowych, które są dla niego charakterystyczne [7]. Identyfikacja poszczególnych białek odbywa się na podstawie porównania otrzymanego widma MS z proteomiczną bazą danych. Tradycyjne procedury dotyczące proteolizy obejmują prowadzenie reakcji w jednorodnym roztworze rozpuszczonego enzymu (z dodatkiem jego inhibitora) oraz badanego białka. Metoda ta posiada szereg ograniczeń, a do najbardziej istotnych należy zaliczyć czasochłonność (długi czas inkubacji enzymu z białkiem, 12-24 godzin) oraz zanieczyszczenie próbki fragmentami pochodzącymi z autolizy (samotrawienia) proteaz. W tym miejscu istotną rolę mogą pełnić mikroreaktory enzymatyczne z immobilizowanymi enzymami (ang. IMERs, *immobilized enzyme reactors*), służące do prowadzenia biokatalitycznej hydrolizy zarówno białka wcześniej wydzielonego z mieszaniny, jak i trawienia wcześniej nierozdzielonej mieszaniny białek występujących w próbce (strategia „shotgun”) **H11** [25].

Dlatego też, jednym z głównym celów prac wchodzących w cykl publikacji **H1-H11** było opracowanie metody wytwarzania zminiaturyzowanego układu analitycznego na bazie kapilary kwarcowej ze złożem monolitycznym z unieruchomioną (immobilizowaną) trypsyną do trawienia wielkocząsteczkowych struktur białkowych takich jak transferyna [30] czy BSA **H1** [11], wykorzystanych jako metoda przygotowania materiału białkowego do spektrometrycznej analizy MALDI TOF-TOF MS.

W ramach przeprowadzonych badań zsyntetyzowałem złożę (nośnik) wykazujące dobrą przepuszczalność, rozwiniętą powierzchnię właściwą i duże obsadzenie grupami funkcyjnymi zdolnymi do związania trypsyny. W badaniach wykorzystałem monolityczny kopolimer metakrylanu glicydyli i dimetakrylanu glikolu etylenowego (GMA-EDMA) oraz metakrylan 2-hydroksyetylu jako funkcjonalny monomer i N,N'-metylenobis (akryloamid) (HEMA-MBA) jako hydrofilowy środek sieciujący. Wbudowane w nośnik grupy epoksydowe zostały poddane modyfikacjom mającym na celu utworzenie łańcucha dystansującego i ostateczne związanie trypsyny. Pierwszym etapem była aminoliza grup epoksydowych prowadzona 1,6-diaminaheksanem, następnie przyłączenie aldehydu glutarowego i związanie enzymu poprzez jego grupy aminowe (reszty lizyny). Powstałe w toku wyżej opisanych reakcji niestabilne wiązania iminowe zostały zredukowane za pomocą cyjanoborowodoru sodu. Zabieg ten zwiększył trwałość układu i zapobiegł wymywaniu enzymu ze złoża. Z kolei utworzony łańcuch dystansujący pomiędzy nośnikiem a biokatalizatorem zwiększył dostępność cząsteczek substratu dla centrów aktywnych trypsyny i zmniejszył zawady steryczne, co doprowadziło do zwiększenia wydajności reakcji enzymatycznej. Sprawność

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

mikroreaktora oceniłem przeprowadzając rozkład substratu wzorcowego trypsyny (estru etylowego N- α -benzoilo-L-argininy (BAEE) poprzez chromatograficzne rozdzielanie produktów reakcji i pomiar powierzchni piku pochodzącego od substratu. Efektywność trawienia weryfikowałem za pomocą gradientowej SDS-PAGE połączonej z detekcją stężenia białka za pomocą FTIR. Natomiast, produkty hydrolizy BSA (jako substratu wielkocząsteczkowego) zbadałem odpowiednio za pomocą spektrometru MALDI TOF-TOF MS. Uzyskane wyniki wskazują, że najodpowiedniejsza proporcja zastosowanego trójskładnikowego rozpuszczalnika porogenu wynosi: 40% 1-dekanol, 20% woda i 20% 2-propanol. Otrzymany monolit HEMA-MBA wykazywał niższą adsorpcję BSA w porównaniu GMA-EDMA. Podczas eksperymentu dowiodłem, że BSA jest mniej zatrzymywany na monolicie HEMA-MBA złoża w porównaniu z kopolimerem GMA-EDMA. Sugeruje to, że HEMA-MBA wykazuje wystarczający charakter hydrofilowy, aby uniknąć hydrofobowej retencji białka w kapilarze. W drugim etapie badań przeprowadziłem reakcję enzymu na grupach hydroksylowych poprzez aktywację złoża 1,1'-karbonylo-diimidazolem. Przetestowałem dwie metody unieruchamiania enzymu. Pierwsze podejście polegało na bezpośrednim przyłączeniu trypsyny do grup hydroksylowych łańcucha HEMA o dwóch węglach (mikroreaktor T1). W drugiej strategii zastosowałem 5-amino-1-pentanol, aby utworzyć ramię rozdzielające o długości 12 atomów (mikroreaktor TS1). Analiza chromatograficzna eluatów z mikroreaktorów T1 i TS1 wykazała, że mikroreaktor T1 wykazywał wyższą aktywność względem BAEE niż mikroreaktor TS1. Jednakże, trawienie BSA, a następnie analiza MALDI TOF-TOF zebranych eluatów skutkowało pokryciem sekwencji wynoszącym 43,9% i 35,7% w przypadku mikroreaktora TS1 i T1 **H1** [11], [30]. Analiza uzyskanych frakcji strawionego BSA była możliwa dzięki odpowiedniemu doborowi matrycy: nasycony roztwór HCCA (kwas alfa-cyjano-4-hydroksycynamonowy) oraz mieszaniny rozpuszczalników 0,1% TFA (kwas trifluoroctowy) oraz acetonitryl wymieszane w stosunku objętościowym 30:70. Najefektywniejszą metodą nanoszenia próbki okazała się metoda suchej kropli przy wcześniejszym zmieszaniu w stosunku objętościowym 1:1 matrycy i hydrolizatów BSA i nałożeniu mieszaniny na płytkę *AnchorChip H1* [11], [30]. Matryce stosowane w technice MALDI to substancje, które dobrze pochłaniają promieniowanie UV, łatwo ulegają sublimacji, a po desorpcji dostarczają duże ilości jonów (protonów) potrzebnych do jonizacji analitu. Najczęściej stosowanymi matrycami w MALDI są kwasy α -cyjano-4-hydroksycynamonowe umożliwiające analizę białek, peptydów i lipidów głównie we wspomnianej strategii *bottom-up* poprzez zastosowanie klasycznego trawienia w roztworze trypsyny lub IMERs **H11** [25].

Dla strategii *top down*, najczęściej stosowaną matrycą jest kwas synapinowy (SA, ang. *sinapic acid*), umożliwiający analizę białek i peptydów >3 kDa. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach zastosowanie SA umożliwiło identyfikację masy molekularnej frakcji kazein [4], laktoferryiny [2], BSA **H1** [11] czy anhidrazy węglanowej [31]. Zastosowanie kwasu 2,5-dihydroksybenzoesowego (DHB) pozwala na analizę białek i peptydów >3 kDa, polimerów polarnych i fosfolipidów izolowanych z mleka krowiego [32], natomiast ditranol (DIT) pozwala na wykrywanie polimerów niepolarnych i glikolipidów, a 1,5-diaminonaftalen (1,5-DAN) jest wykorzystywany w sekwencjonowaniu *de novo* peptydów **H11** [25].

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Oprócz wyboru matrycy, na wynik analizy duży wpływ ma również metoda nakładania próbki. Najczęściej stosowaną metodą nakładania matrycy na płytkę MALDI jest metoda suchej kropli. Zaletami tej metody są stabilność próbek w czasie oraz możliwość przemywania wytrąconych kryształów wodą w celu usunięcia soli **H11** [25]. Dodatkowo, stosuje się metodę odparowywania w próżni, gdzie po nałożeniu kropli na płytce rozpuszczalnik jest natychmiast odparowywany w próżni, co pozwala na bardziej równomierne rozłożenie, np. w przypadku analizy mieszanin lipidowych. W metodzie cienkowarstwowej (np. metody trójwarstwowe, kanapkowe) matrycę i próbkę nakłada się oddzielnie w szybko odparowującym rozpuszczalniku, a następnie nakłada na próbkę. Uzyskana w ten sposób wysoka jednorodność warstwy matrycy umożliwia wysoką powtarzalność analizy **H11** [25].

Podczas jonizacji MALDI mogą powstawać jony dodatnie i ujemne. W przypadku próbek biologicznych powstają różnego rodzaju addukty: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oraz $[M+K]^+$. Jony zawierające cząsteczkę matrycy lub cząsteczki powstałe w wyniku jej rozkładu są zazwyczaj formowane w niskiej wydajności. Do stabilizacji jonów otrzymanych z DIT bardzo często stosuje się dodatek kationów srebra $[M+Ag]^+$. W innych przypadkach pod wpływem wysokiej temperatury może wystąpić utrata wody z cząsteczki $[M-H_2O+H]^+$. Najczęstszymi sygnałami znajdowanymi na widmach MALDI są intensywny pik molekularny typu $[M+H]^+$ oraz niewielka liczba wielokrotnie naładowanych jonów typu $[M+nH]^{n+}$ i $[nM+H]^+$. Ostatnie dwa typy jonów powstają częściej w wyniku jonizacji peptydów i cząsteczek o dużej masie cząsteczkowej. Czasami powstają jony molekularne typu $[M]^+$ **H11** [25].

Technika MALDI jest jedną z miękkich metod jonizacji. Dodana w nadmiarze matryca oddziela cząsteczki badanej substancji od siebie i bez fragmentacji przekazuje pochłoniętą przez nie energię. Ponieważ główna część energii cieplnej jest przekształcana w energię drgań wiązań chemicznych, pochłanianych przez cząsteczki matrycy, analit nie ulega degradacji. Z drugiej strony, jony o niskiej masie cząsteczkowej, w tych warunkach, ulegają fragmentacji. Zjawisko to tłumaczy się tym, że duże cząsteczki mają wiele możliwości drgań, tak aby pochłonięta energia została rozproszona bez zerwania wiązań chemicznych **H11** [25].

W MALDI zjawisko fragmentacji białek, jak i polipeptydów praktycznie nie występuje, w związku z czym w widmach nie obserwuje się sygnałów z jonów fragmentacyjnych (wynikających z rozpadu cząsteczek w jonizatorze). Przypadkiem wymagającym szczególnej uwagi jest tzw. klaster (ang. *matrix-cluster*), czyli kombinacja kilku jonów będących częścią sygnałów dających na widmie sygnał matrycy, znacznie utrudniająca interpretację uzyskanych wyników. Choć intensywność sygnałów pochodzących z matrycy maleje wraz ze wzrostem masy, to w przypadku małej ilości strawionego białka (w rzędzie pikomoli) mogą one kolidować z sygnałami pochodzącymi z fragmentów polipeptydów w zakresie masy do około 2 kDa. Cząsteczki matrycy HCCA oraz jony K^+ , Na^+ i H^+ tworzą klastry. Całkowite wyeliminowanie jonów sodu i potasu z układu (np. z użytego roztworu) jest praktycznie niemożliwe (np. z powodu zastosowania szkła laboratoryjnego), dlatego na widmach MALDI obecne są również piki klastrów HCCA. Kompleksy te (klastry) powstają w wyniku oddziaływania kationów omawianych metali z grupą karboksylową lub π -elektronami pierścienia aromatycznego cząsteczki HCCA (tzw. struktury kanapkowe) i w zależności od liczby cząsteczek wchodzących w skład klastra mogą przyjmować różne

masy. Klastry matrycowe powstają w obecności związków organicznych – podczas współkryształizacja HCCA z analitem, powodując tłumienie (supresję jonów) i trudności w analizie związków niskocząsteczkowych **H11** [25].

Analiza związków niskocząsteczkowych w MALDI

Wykrywanie związków o niskiej masie cząsteczkowej w MALDI-MS jest aktualnym wyzwaniem analitycznym. Zastosowanie MALDI do analizy związków o masie cząsteczkowej <700 Da powoduje supresję sygnału. Jest to spowodowane wysokim poziomem tła w obszarze niskiej masy (do m/z 800), wpływając tym samym na obniżenie czułości pomiaru. Kolejnym problemem jest kwasowość roztworu matrycy, która może prowadzić do degradacji analitu **H11** [25]. Pomimo tych ograniczeń, w ramach realizowanych badań z powodzeniem opracowałem metody identyfikacji związków niskocząsteczkowych przy wykorzystaniu techniki laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomaganą matrycą.

*Pierwszą z nich była szybka i czuła procedura analityczna oparta na MALDI TOF-TOF MS, która została zastosowana po raz pierwszy do identyfikacji trzech cyklitol (D-chiro-inozytol, L-chiro-inozytol, D-pinitol) z różnych części lucerny Alfalfa (*Medicago sativa L.*) Alfalfa jest przedmiotem wielu badań ze względu na korzystne właściwości prozdrowotne i liczne składniki chemiczne. Wśród tych składników są cyklitole, które przyciągnęły uwagę ze względu na różnorodność posiadanych właściwości biologicznie aktywnych [6]. Ekstrakty roślinne zostały przygotowane i oczyszczone przy użyciu ekstrakcji Soxhleta i ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. *solid phase extraction*). Następnie próbki rozpuściłem w matrycy kwasu α -cyjano-4-hydroksycynamonowego (HCCA, ang. *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*), dobrałem warunki ich nakładania na płytkę i poddałem analizie MALDI TOF-TOF MS stosując tryb jonizacji dodatniej. W oparciu o masy cząsteczkowe oraz informacje o otrzymanych jonach fragmentarycznych i chemię cyklitoli z powodzeniem zidentyfikowałem D-chiro-inozytol, L-chiro-inozytol oraz D-pinitol w ekstraktach pozyskanych z liści, łodygi i kwiatów lucerny. Uzyskane wyniki wykazały, że MALDI TOF MS jest szybkim i czułym narzędziem do identyfikacji cyklitoli w natywnych ekstraktach roślinnych **H5** [18].*

*Drugą, opracowaną przeze mnie metodą identyfikacji związków o masach niskocząsteczkowych było zastosowanie techniki MALDI w identyfikacji ampicyliny **H2** [13] oraz antybiotyków m.in. amoksycyliny, cefotaksymu, ciprofloksacyny, metronidazolu i ich metabolitów izolowanych z krwi i tkanek ludzkich poprzez zastosowanie metod bezpośrednich oraz techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej, SPME (ang. *solid phase microextraction*) **H7** [20]. SPME jest techniką przygotowania próbki, w której stosuje się włókna kwarcowe pokryte odpowiednią fazą stacjonarną, w moim przypadku łańcuchami oktadecylowymi. Gdy włókno jest wprowadzane do próbki, pewna ilość docelowego analitu przemieszcza się z matrycy do fazy stacjonarnej polimeru pokrywającego włókno, aż do uzyskania stanu równowagi [20]. W celu opracowania metody identyfikacji antybiotyków zastosowałem trzy matryce: HCCA, DHB i sDHB (mieszanina 9:1 DHB i kwasu 2-hydroksy-5-metoksybenzoesowego). DHB i sDHB okazały się najlepszymi matrycami w analizie antybiotyków, ze względu na ich naturę krystalizacji oraz stosunkowo*

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

niski efekt supresji w zakresie <800 m/z . Zastosowanie tych matryc zapewniło stabilną jonizację, wysoką odtwarzalność i rozdzielczość zarejestrowanych widm MS. Podczas pomiarów wybranych antybiotyków w próbkach osocza ludzkiego najbardziej intensywnymi jonami były addukty sodowe antybiotyków $[M+Na]^+$. Jony $[M+H]^+$ zostały również zidentyfikowane, jednakże w porównaniu z adduktami sodowymi, charakteryzowały się one mniejszą intensywnością. Badania pozwoliły na określenie struktury potencjalnych metabolitów antybiotyków. Uzyskane wyniki stanowią punkt wyjścia do wykorzystania techniki MALDI w analizie rzeczywistych próbek w laboratoriach klinicznych jako narzędzie do monitorowania antybiotyków podczas terapii **H7** [20].

Trzecim typem analitu o niskocząsteczkowej masie, dla którego opracowałem procedurę jego analizy za pomocą spektrometru MALDI TOF MS był zearalenon – mykotoksyna produkowana przez mikroorganizmy z rodziny *Fusarium*. Widma MS zarejestrowałem przy wykorzystaniu matrycy HCCA. Zearalenon został pozyskany bezpośrednio z pożywki mikrobiologicznej M9. Uzyskane wyniki pozwoliły na monitorowanie zmian w profilach molekularnych bakterii poddanych działaniu tej mykotoksyny **H3** [15].

Identyfikacja mikroorganizmów za pomocą MALDI TOF MS.

Szybkie wykrywanie i identyfikacja mikroorganizmów jest trudnym i ważnym aspektem w szerokim zakresie dziedzin, od medycyny po przemysł. Aktualnym, „złotym standardem” diagnostyki mikrobiologicznej są czasochłonne techniki biologii molekularnej takie jak sekwencjonowanie konserwatywnych genów bakterii 16S rDNA [14]. Z drugiej zaś strony, spektrometryczna technologia laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomagana matrycą zyskuje na popularności, jako alternatywa dla sekwencjonowania genetycznego. Z punktu widzenia zakażeń ogólnoustrojowych wywołanych obecnością bakterii o znaczeniu klinicznym technika MALDI zyskała uznanie jako szybka i precyzyjna metoda diagnostyczna [14]. Szybkość, precyzja oraz szereg informacji molekularnych jaki można uzyskać jest niewątpliwą zaletą tej metody. Potencjał MALDI TOF/TOF MS powoduje, że możliwe jest rozszerzenie zastosowań na inne obszary analizy mikrobiologicznej, farmakologii, technologii żywienia czy analizy środowiskowej. Pomimo coraz częstszego stosowania techniki MALDI w identyfikacji bakterii klinicznych, identyfikacja gatunków środowiskowych jest nadal ograniczona. Wynika to z faktu, że komercyjne bazy danych stosowane w podejściu MALDI są uboższe w porównaniu z repozytoriami typu BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) stosowanymi do identyfikacji drobnoustrojów za pomocą 16S rDNA [14].

W ramach prac badawczych wchodzących w cykl publikacyjny **H1-H11** opracowałem procedury identyfikacji bakterii środowiskowych przy wykorzystaniu techniki MALDI TOF MS na bazie domowych repozytoriów widm MS oraz przy zastosowaniu referencyjnej techniki sekwencjonowania 16S rDNA. Dzięki temu, byłem w stanie zidentyfikować i zdeponować wyizolowane z mleka krowiego probiotyczne szczepy *Lactococcus lactis* oraz *Lactobacillus casei* w lokalnej kolekcji Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu [12]. Ponadto, wykorzystałem MALDI TOF MS wraz z platformą Biotyper do identyfikacji szeregu bakterii środowiskowych wyizolowanych z mleka krowiego *Bifidobacterium sp.* [15], *Lactococcus lactis* 56 [16], twarogu *Lactobacillus*

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

paracasei LB3 **H9** [26] oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae* izolowanych z produktów spożywczych **H8** [21]. Wybrane unikalne szczepy bakterii probiotycznych zdeponowałem w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM, ang. *Polish Collection of Microorganisms*) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu w formie depozytów patentowych:

- *L. paracasei* LB3 o numerze depozytu patentowego B/00146
- *L. lactis* 56 o numerze depozytu patentowego B/00116

Następnie, dla wybranych szczepów mikroorganizmów opracowałem metodę zewnątrzkomórkowej syntezy nanocząstek tlenku cynku przy wykorzystaniu szczepu *L. lactis* 56 **H9** [26] o ściśle określonych właściwościach fizykochemicznych oraz o określonej aktywności biologicznej **H4** [17]. Opisałem również kinetykę syntezy ZnO NPs. Dane kinetyczne pokazały, że proces tworzenia się ZnO NPs jest heterogeniczny i dwuetapowy. Ponadto, w celu opisu mechanizmu tworzenia się nanocząstek tlenku cynku wykorzystałem szereg metod instrumentalnych, takich jak: FTIR, analizę spektrofluorometryczną, skaningową i transmisyjną mikroskopie elektronową. Ponadto, badałem aktywność przeciwbakteryjną ZnO NPs wobec dwóch bakterii, Gram (+) i Gram (-), lekoopornych i klinicznie istotnych szczepów bakterii przy wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej. Ponadto, uzyskane wyniki pozwoliły po raz pierwszy na opis mechanizm biosyntezy ZnO NP przy wykorzystaniu szczepu *L. lactis* 56. Wykazałem, że karboksylowa grupa funkcyjna jest w większości zaangażowana w tworzenie ZnO NPs. Uzyskane nanocząstki tlenku cynku stanowią punkt wyjścia do przyszłych badań nad zastosowaniem nanocząstek metali oraz ich tlenków dla metody laserowej jonizacji/desorpcji wspomagananej nanostrukturami, NALDI (ang. *nanostructure-assisted laser desorption/ionization*) **H11** [25], **H4** [17].

W kolejnym etapie badań opracowałem metodę elektroanalizy zidentyfikowanego szczepu *L. lactis* **H11** [25] oraz drożdży *S. cerevisiae* **H8** [21] przy wykorzystaniu strefowej elektroforezy kapilarnej. Korzystając ze wcześniejszych doświadczeń współpracowników [33] i własnych [28] oraz uzyskanych wyników wykazałem, że komórki bakterii oraz drożdży zawieszane w roztworze soli metalu dwuwartościowego (wapnia i cynku) o pH wyższym niż pK grup funkcyjnych bakterii ulegają spontanicznemu procesowi agregacji **H11** [25], **H8** [21]. Zgodnie z teorią elektrokinetyczną, zdeprotonowane grupy funkcyjne biokoloidów znajdujące się na powierzchni komórek bakteryjnych - głównie karboksylowe oraz aminowe - umożliwiają utworzenie serii stabilizujących układ mostków kationowych, tworząc tym samym klaster (agregat) mikroorganizmów [34]. Dodatkowo, w przypadku wykorzystania jonów wapnia jako stabilizatora oraz zastosowanie nieliniowego systemu buforowego umożliwia zatężenie utworzonych agregatów bakteryjnych podczas analizy elektroforetycznej. Zjawisko to umożliwia oczyszczenie i zagęszczenie komórek bakteryjnych, stanowiące punkt wyjścia do ich identyfikacji za pomocą MALDI TOF MS szczególnie w pożądaną wczesnej fazie wzrostu mikroorganizmów **H8** [21].

Badanie procesów sorpcyjnych w układach biokoloidalnych przy wykorzystaniu techniki laserowej desorpcji/ionizacji próbki wspomaganą matrycą

Zastosowanie właściwości sorpcyjnych biokoloidów w medycynie, przemyśle spożywczym, ochronie środowiska naturalnego czy diagnostyce laboratoryjnej jak również wielu innych aspektach życia człowieka, wymusza na współczesnej nauce dokładniejsze zbadanie i wyjaśnienie mechanizmów zaangażowanych w ten proces. Dotychczas prowadzone badania skupiają się na wykorzystaniu pojemności sorpcyjnej systemów biokoloidalnych, podczas gdy badanie natury tego zjawiska często zostaje pomijane. Główną grupę biokoloidów stanowią mikroorganizmy takie jak bakterie czy drożdże. Z punktu widzenia zastosowania ich jako sorbentów stanowią obiecującą grupę przede wszystkim z uwagi na ich niewielki rozmiar, różnorodność, powszechne występowanie, zdolność do wzrostu w kontrolowanych warunkach oraz ich odporność i możliwość przystosowania się do wielu zmian w warunkach środowiska [35]. Powierzchnię drobnoustrojów stanowi ściana komórkowa, która jest stosunkowo sztywną barierą zapewniającą komórkom separację ze środowiskiem zewnętrznym. Ta struktura komórkowa ma za zadanie nie tylko chronić drobnoustroje przed uszkodzeniami zewnętrznymi, ale także utrzymywać prawidłowy turgor i kształt oraz zapobiegać przedostawaniu się zbyt dużych cząstek do ich wnętrza [34]. W przypadku bakterii wyróżnić można dwa rodzaje ścian komórkowych różnicujące komórki bakteryjne: Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Ściana bakterii Gram-dodatnich złożona jest w głównej mierze z licznych warstw peptydoglikanu - mureiny, do której podłączone są kwasy tejchojowe. Z kolei w komórkach bakterii Gram-ujemnych w bezpośrednim sąsiedztwie błony komórkowej mieści się przestrzeń periplazmatyczna, nad którą znajduje się pojedyncza warstwa mureiny, a nad nią z kolei umiejscowiona jest lipidowo-białkowa błona zewnętrzna [34]. W przypadku drożdży ściana komórkowa składa się głównie z polisacharydów (glukan, chityna i mannan) i białek **H8** [21]. Powierzchniowe komponenty drobnoustrojów mogą być rozpatrywane jako układy składające się z rdzenia i określonej powierzchniowej grupy funkcyjnej. W przypadku polisacharydów za rdzeń uważa się heksagonalny pierścień węglowy [34]. Dotychczas prowadzone badania spektroskopowe wykazały, że składniki budujące komórki mikroorganizmów zawierają grupy karboksylowe, karbonylowe, hydroksylowe, siarczanowe, sulfhydrylowe, iminowe, amidowe, aminowe, fosforanowe, tioeterowe, fenolowe, imidazolowe, fosforanowe i fosfodiesterowe [29]. Te powierzchniowe grupy funkcyjne ulegając reakcjom protonacji i deprotonacji nadają komórkom powierzchniowym ładunek elektryczny. Obecność ładunku na powierzchni mikroorganizmów warunkuje powstawanie podwójnej warstwy elektrycznej i potencjału zeta. Potencjał zeta definiowany jest jako potencjał elektrokinetyczny obecny na granicy pomiędzy jonami związanymi nieruchomo w warstwie adsorpcyjnej zwanej warstwą Sterna oraz swobodnymi przeciwnymi w warstwie dyfuzyjnej [1]. W rzeczywistości większość drobnoustrojów posiada ujemny ładunek powierzchniowy. **Ta cecha drobnoustrojów sprawia, że możliwa staje się efektywna biosorpcja metali oraz związków niskocząsteczkowych na ich powierzchni.** Proces biosorpcji może być prosto zdefiniowany jako zjawisko usuwania substancji z roztworu przez materię biologiczną. Jednakże w rzeczywistości jest to fizyko-chemiczny proces, w który zaangażowanych jest wiele skomplikowanych mechanizmów obejmujących między innymi: adsorpcję powierzchniową,

absorpcję, wymianę jonową, chemisorpcję, reakcje kompleksowania, strącanie czy transport wewnątrzkomórkowy. W procesie biosorpcji zaangażowanych jest więc wiele mechanizmów, z których każdy działa niezależnie. Należy pamiętać, że w przypadku żywych mikroorganizmów w biosorpcję zaangażowane mogą być również procesy metaboliczne.

Dlatego też, jednym z głównych zadań wchodzących w cykl prac **H1-H11** było opracowanie efektywnej metody badania zjawiska biosorpcji kationów srebra przez oznaczone za pomocą techniki MALDI TOF MS szczepy bakterii: *Lactococcus lactis* i *Lactobacillus casei*. Opisałem mechanizm sorpcji kationów srebra przez bakterie *L. lactis* i *L. casei*. Do oznaczenia stężenia srebra zaabsorbowanego przez bakterie, wykorzystałem technikę spektrometrii mas sprzężoną z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS, ang. *inductively coupled plasma – mass spectrometry*). Analizę rozkładu ładunku przeprowadziłem metodą DLS. Zmiany w ultrastrukturze komórek *Lactococcus lactis* i *Lactobacillus casei* po traktowaniu kationami srebra zbadano za pomocą transmisyjnej obserwacji mikroskopem elektronowym. Do opisu mechanizmu sorpcji zastosowałem technikę FTIR oraz laserową desorpcję/ionizację próbki wspomaganą matrycą. Zastosowanie MALDI TOF MS pozwoliło na obserwację zmian w profilu molekularnym bakterii poddanych działaniu jonów srebra [12].

Biosorpcja jonów metali na powierzchni komórek mikroorganizmów może skutkować wystąpieniem następczych interakcji powierzchniowych. Przykładem takiego zjawiska jest agregacja komórek pod wpływem powierzchniowej modyfikacji za pomocą jonów metali dwuwartościowych [24] **H8** [21]. Najczęściej stosowanym modelem teoretycznym do opisu zjawiska agregacji jest teoria DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) [34]. Wiele jonów metali takich jak: Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} zostało opisanych jako czynniki indukujące agregację komórek drożdży. Jednakże na podstawie uzyskanych wyników badań przy wykorzystaniu MALDI TOF MS, strefowej elektroforezy kapilarnej oraz technik spektroskopowych i mikroskopowych, wykazałem, że jony wapnia są efektywnymi promotorami spontanicznej i trwałej termodynamicznie agregacji **H8** [21]. Hipotetyczne wyjaśnienie tego zjawiska opiera się na założeniu, że agregacja komórek następuje na skutek tworzenia serii mostków kationowych pomiędzy zdeprotonowanymi grupami karboksylowymi na powierzchni komórek za pośrednictwem jonów wapnia [34].

Biosorpcji na komórkach bakteryjnych podlegają również niskocząsteczkowe związki, takie jak wspomniane wyżej mykotoksyny. Mykotoksyny są to naturalne związki niskocząsteczkowe wytwarzane jako wtórne metabolity przez grzyby nitkowane należące głównie do rodzajów *Penicillium*, *Aspergillus* i *Fusarium*. Substancje te stanowią jedną z głównych klas naturalnie występujących toksycznych substancji zanieczyszczających żywność i pasze na całym świecie. Organizacja do spraw żywienia i rolnictwa (ang. *Food and Agriculture Organization*, FAO) oszacowała, że około 25% produkowanej żywności jest zanieczyszczona co najmniej jedną mykotoksyną. Do organizmu ludzkiego toksyczne produkty przemiany materii grzybów pleśniowych mogą przedostać się drogą bezpośrednią poprzez spożycie zanieczyszczonych produktów pochodzenia roślinnego, bądź też pośrednio na skutek konsumpcji żywności pochodzenia zwierzęcego takiej jak mleko, jaja czy mięso pochodzące od zwierząt karmionych skażoną paszą [36]. Jedną z najczęściej badanych mykotoksyn jest zearalenon (ZEA), który jako ksenoestrogen po długotrwałym spożyciu

z pokarmem nawet w niewielkich dawkach prowadzi do zaburzeń naturalnej gospodarki hormonalnej co może skutkować licznymi chorobami układu rozrodczego takimi jak nowotwory hormonozależne, np. rak szyjki macicy, jajników czy prostaty [37]. Działanie takie ZEA wynika z jego ogromnego podobieństwa w budowie strukturalnej do estradiolu - głównego hormonu wytwarzanego przez jajniki, co umożliwia mu wiązanie się z receptorami estrogenu w komórkach docelowych ssaków [38]. Ze względu na dużą dostępność i niekorzystne działanie mykotoksyn na zdrowie ludzi i zwierząt poszukiwanie nowych metod detoksyfikacji skażonej żywności wzbudza coraz większe zainteresowanie. Zastosowanie w tym celu mikroorganizmów wydaje się być interesujące, jednakże mechanizm wiązania mykotoksyn przez komórki w dalszym ciągu pozostaje nieznany, a wyjaśnienie natury tego zjawiska ma kluczowe znaczenie na późniejsze wykorzystanie drobnoustrojów jako neutralizatorów w przemyśle spożywczym.

Dlatego też, w ramach niniejszych badań przeprowadziłem proces biosorpcji (neutralizacji) mykotosyny zearalenonu przez wyizolowane bakterie *Lactococcus lactis* i *Bifidobacterium sp.* Przeprowadzone przeze mnie badania z zastosowaniem techniki FT-IR wykazały, że biosorpcja zearalenonu przez bakterie *L. lactis* i *Bifidobacterium sp.* związana jest głównie z hydrofobowymi oddziaływaniami π - π pomiędzy biosorbentem, a sorbowanymi cząsteczkami. Dodatkowo, rejestracja widm MS za pomocą techniki MALDI TOF MS w poszczególnych etapach procesu biosorpcji pozwoliła na identyfikację zmian zachodzących w profilach molekularnych bakterii, a w związku z tym w metabolizmie mikroorganizmów na skutek prowadzonego procesu biosorpcji. Ponieważ komponenty takie jak: białka, tłuszcze i cukry, które składają się na komórkę bakteryjną mają wpływ na otrzymanie unikalnego widma MS, możliwe staje się uzyskanie wglądu w bezpośrednio w metabolizm mikroorganizmu **H3** [15].

Proces biosorpcji jonów metali przez komórki mikroorganizmów może prowadzić również do otrzymywania nanostruktur. Konsekwencja oddziaływania jonów metali z komponentami komórkowymi może skutkować syntezą nanocząstek metali:

- (i) syntezą wewnątrzkomórkową polegającą na specyficznym procesie biosorpcji poprzez przenoszenie jonów do wnętrza komórki, gdzie następuje ich redukcja w obecności enzymów, koenzymów, bądź innych substancji;
- (ii) syntezą zewnątrzkomórkową opierającą się na wychwytywaniu jonów metali na powierzchni komórek, a następnie ich redukcji lub redukcji jonów metali przez uprzednio wydzielone przez mikroorganizmy metabolity, enzymy [39].

W ramach przeprowadzonych badań zsyntetyzowałem bioaktywne kompozyty srebra poprzez wykorzystanie zdeponowanego szczepu *Lactococcus lactis* 56. Uzyskane AgNPs scharakteryzowałem za pomocą technik spektroskopowych (FTIR, technik fluorescencyjnych) oraz spektrometrycznych. Zastosowanie techniki MALDI TOF-TOF MS oraz programów modelowych **H10** [22] pozwoliło mi na identyfikację izotopów srebra [^{107}Ag]⁺ i [^{109}Ag]⁺ oraz atomowych klastrów srebrowych [Ag_n]⁺ w uzyskanych nanokompozytach srebrowych [16].

Uzyskane wyniki badań spowodowały przeprowadzenie dalszych studiów nad naturą uzyskanych nanokompozytów srebrowych. Dlatego też, w celu rozdzielenia uzyskanych metalokompozytów srebrowych wykorzystałem technikę A4F. Kolejno, w celu

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

fizykochemicznego scharakteryzowania otrzymanych nanokompozytów srebra zastosowałem komplementarne techniki, takie jak: transmisyjna spektroskopia elektronowa, spektroskopia FTIR i MALDITOF-TOF MS. W wyniku analizy spektrometrycznej wykazałem złożoność struktury frakcji nanokompozytów srebra. Zastosowanie laserowej technologii jonizacji/fragmentacji (LITF, ang. *laser ionization/fragmentation technology*) pozwoliło mi na identyfikację sekwencji aminokwasowych połączonych z klastrami srebrowymi. Ponadto, w wyniku uzyskanych danych dowiodłem, że mechanizm frakcjonowania srebrowych biokoloidów zależy nie tylko od wielkości cząstek, ale także od rodzaju powierzchniowych depozytów organicznych **H6** [19].

Kolejny etap badań dotyczył wykorzystania uzyskanych biokoloidów AgNPs jako biosorbentów zdolnych do wiązania komercyjnie dostępnych antybiotyków (proces funkcjonalizacji) tetracykliny [40] oraz ampicyliny **H2** [13]. Prowadzone badania potwierdziły synergistyczne działanie przeciwbakteryjne ampicyliny i nanocząstek srebra. Zastosowanie nanocząstek metali i ich tlenków z zaadsorbowaną na ich powierzchni warstwą antybiotyku zwiększyło ich potencjał antyseptyczny. Jednakże dotychczasowe badania skupiają się głównie na ocenie zdolności antybakteryjnych takich kompleksów podczas gdy sam mechanizm wiązania antybiotyków na powierzchni nanocząstek metali pozostaje niewyjaśniony. Dokładniejsze zbadanie tego mechanizmu wpływa na wybór odpowiednich warunków procesu sorpcji pozwalających na stworzenie trwałych kompleksów oraz doboru właściwych parametrów ich przechowywania. To z kolei umożliwiłoby zastosowanie ich jako potencjalnego środka o właściwościach antyseptycznych w medycynie oraz pozwoliło by na zbadanie mechanizmów ich antybakteryjnego działania. Proces biosorpcji jest zjawiskiem złożonym, a dokładne mechanizmy biorące w nim udział w dalszym ciągu pozostają niewyjaśnione. Zrozumienie tego mechanizmu ma kluczowe znaczenie dla późniejszego ulepszania biosorbentów i doboru odpowiednich warunków procesowych w celu zwiększenia wydajności biosorpcji. Najczęściej stosowanymi metodami do opisu natury zjawisk sorpcyjnych są badania izotermi i kinetyki wiązania oraz teoretyczne relacje aktywność biologiczna – struktura (modele QSAR, ang. *quantitative structure–activity relationship models*) **H10** [22]. Jednakże tego typu badania nie są w stanie wyjaśnić rzeczywistych procesów molekularnych zachodzących na granicy faz. Zastosowanie, w ramach prac badawczych, złożonego podejścia bazującego na komplementarnym zastosowaniu klasycznych modeli sorpcyjnych z metodami instrumentalnymi, w szczególności spektrometrycznej technologii laserowej jonizacji/desopcji próbki wspomaganą matrycą pozwoliło na fizykochemiczną charakterystykę i opis procesu funkcjonalizacji ampicyliny do nanocząstek srebra **H2** [13].

Inne osiągnięcia nie wchodzące w skład cyklu prac habilitacyjnych.

Do najważniejszych osiągnięć należy opublikowanie 13 prac z listy JCR po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych, spoza cyklu prac **H1-H11**, których to łączny współczynnik wpływu (*impact factor*) wynosi 40,27 punktów. Najważniejsza z tych prac [23] dotyczyła określania wpływu jonów srebra, nanocząstek srebra, antybiotyków i sfunkcjonalizowanych nanocząstek srebra tetracykliną na proces biosorpcji przez modelowy szczep bakterii *Bacillus*

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

subtilis. Pomimo, że nanocząsteczki srebra są najbardziej rozpowszechnionym produktem nanotechnologii, mechanizmy leżące u podstaw toksyczności mikrobiologicznej AgNP pozostają przedmiotem intensywnych badań. W tym celu została wykorzystana transmisyjna mikroskopia elektronowa i technika MALDI TOF MS dla komórek traktowanych nanocząsteczkami srebra (natywnymi oraz sfunkcjonalizowanymi tetracykliną) i jonami srebra. Uzyskane wyniki dowodzą, że *B. subtilis* wykazuje wysoką odporność na nanocząsteczki srebra i zjawisko to jest związane z następującymi procesami:

- (i) inicjacją tworzenia się endospor,
- (ii) redukcją Ag^+ uwolnionego z nanocząstek,
- (iii) modyfikacją powierzchni AgNPs.

Przeprowadzona przez mnie analiza MALDI TOF MS wykazała, że profile molekularne bakterii *B. subtilis* traktowanych jonami srebra różnią się znacząco od widm komórek kontrolnych oraz komórek traktowanych AgNPs i antybiotykiem, co może sugerować, że jony srebra w najwyższym stopniu modyfikują komponenty komórkowe bakterii. Uzyskane dane pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu oddziaływania pomiędzy AgNPs a komórkami *B. subtilis* [23].

Elementy nowości, wkład do dyscypliny i podsumowanie osiągnięcia naukowego

- (1) Po raz pierwszy opracowałem zminiaturyzowany przepływowy układ trawienia enzymatycznego na bazie kapilary kwarcowej, polimeru HEMA-MBA oraz trypsyny wykorzystany do spektrometrycznej analizy MALDI TOF-TOF MS jako nowatorski etap przygotowania próbek.
- (2) Po raz pierwszy opracowałem selektywne metody analizy związków niskocząsteczkowych, takich jak: antybiotyki, cyklitole oraz zearalenon izolowanych bezpośrednio z matryc biologicznych przy wykorzystaniu techniki MALDI TOF-TOF MS.
- (3) Opracowałem oryginalne selektywne metody identyfikacji mikroorganizmów dla bakterii środowiskowych izolowanych z matryc środowiskowych przy wykorzystaniu techniki MALDI TOF-TOF MS. W wyniku przeprowadzonych badań dokonałem depozycji patentowej dwóch szczepów probiotycznych bakterii kwasu mlekowego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów.
- (4) Po raz pierwszy przeprowadziłem zewnątrzkomórkową syntezę nanocząstek tlenku cynku przy wykorzystaniu szczepu *L. lactis* 56. Ponadto, dokonałem próby opisu mechanizmu tworzenia ZnO NPs.
- (5) Po raz pierwszy opracowałem metodę elektroanalizy bakterii *L. lactis* modyfikowanych przez jony cynku oraz drożdży *S. cerevisiae* modyfikowanych przez kationy wapnia przy wykorzystaniu strefowej elektroforezy kapilarnej. Uzyskane wyniki stanowią punkt wyjścia do utworzenia połączenia techniki CZE z MALDI TOF MS.
- (6) Zsyntetyzowałem nanocząstki srebra przy wykorzystaniu szczepu *L. lactis*, a także po raz pierwszy opracowałem metodę identyfikacji jonów srebra oraz klastrów srebrnych połączonych z peptydami przy wykorzystaniu MALDI TOF-TOF MS.

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

- (7) Po raz pierwszy opracowałem metody badania procesów biosorpcji przez mikroorganizmy układów niskocząsteczkowych: zearalenonu, ampicyliny oraz jonów metali: wapnia i srebra za pomocą techniki MALDI TOF MS.

Zakończenie

Realizacja przeprowadzonych badań była możliwa dzięki przyznanym środkom finansowym, tj. projektowi BIOSTRATEG 2 z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju nr BIOSTRATEG2/298205/9/NCBR/2016 (2016-2019), projektowi OPUS z Narodowego Centrum Nauki nr NCN 2016/21/B/ST4/02130 (2016-2019), w których pełniłam rolę wykonawcy. Ponadto, kontynuacja badań jest możliwa dzięki przyznanemu projektowi Opus 14 przez Narodowe Centrum Nauki nr NCN 2017/27/B/ST4/02628 (2018–2021), w którym pełnię funkcję kierownika.

W latach 2016-2018 brałam także udział w badaniach z zakresu identyfikacji mikroorganizmów za pomocą sprzężonych technik separacyjnych, analizy związków biologicznie aktywnych w żywności, charakterystyki i oceny właściwości przeciwbakteryjnych nanocząstek srebra wytwarzanych przez promieniowce acidofilne czy zastosowaniu technik łączonych w badaniach metabolomicznych i poszukiwaniu wskaźników chorób nowotworowych.

W latach 2016-2019 regularnie uzyskiwałam nagrody zespołowe bądź wyróżnienia JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej. Ponadto, w 2018 roku zostałam wyróżniona trzyletnim Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców (na lata 2018-2021).

Perspektywa badawcza

W najbliższym czasie planuję opracowanie nowej metody przygotowania matryc NALDI, opartych na nanocząstkach metali i ich tlenków. Nanocząstki tlenku cynku, złota i srebra zostaną syntetyzowane chemicznie i osadzone na klasycznych płytkach MALDI i arkuszach ze stali nierdzewnej odpowiednio przyciętych i wypolerowanych na lustrzaną powierzchnię. Przygotowane matryce NALDI zostaną przetestowane pod kątem analizy związków niskocząsteczkowych: flawonoidów, cyklotoli, cukrów i lipidów pochodzących z różnych matryc biologicznych (ekstrakty roślinne, mocz). Opracowana metoda zostanie zastosowana do badań przesiewowych flawonoidów, cyklotoli i cukrów w roślinach oraz poszukiwania potencjalnych biomarkerów lipidowych poprzez analizę moczu. Kolejnym zastosowaniem przygotowanych matryc w toku przyszłych badań będzie obrazowanie tak zwanego „ukrytego odcisku palca” (ang. *latent fingerprint*), który jest atrakcyjny zarówno dla medycyny sądowej, jak i dla diagnostyki medycznej.

Ponadto, planuję kontynuację badań nad nanokompozytami metali otrzymanymi w ramach kierowanego przeze mnie projektu Opus, m.in. pod kątem ich cytotoksyczności względem wybranych linii komórkowych oraz modelu mysiego. Planuję również badania nad połączeniem technik elektroforetycznych oraz technik biologii molekularnej z MALDI TOF-

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

TOF MS w celu m.in. zbadania mechanizmów antybakteryjnego działania otrzymanych nanokompozytów srebra i laktoferryiny (Ag-LTF) oraz biologicznie aktywnych nanocząstek metali i ich tlenków. Zastosowanie techniki MALDI TOF-TOF MS, elektroforezy kapilarnej oraz cytometrii przepływowej pozwoli na interpretacje i zbadanie mechanizmów wyjaśniających zjawisko lekooporności i lekowrażliwości patogenów.

Zamierzam przeprowadzić hodowlę wybranych linii komórkowych w obecności nanokompozytów metali i ich tlenków oraz wybranych antybiotyków. Stanowiąc będzie to dodatkowy aspekt planów badawczych. Integralną częścią planów badawczych będzie walidacja uzyskanych wyników, tak by możliwe było zaadaptowanie opracowanych procedur dla potrzeb diagnostyki klinicznej. Uzyskane wyniki przyczynią się do pogłębienia dotychczasowej wiedzy na temat oddziaływań bakterii i komórek eukariotycznych z antybiotykami, białkami, kationami metali czy nanocząstkami metali i ich tlenków.

Szczegółowy wykaz całkowitego dorobku naukowego

Dane bibliometryczne:

- Całkowita liczba publikacji ze współczynnikiem IF: **35**
- Sumaryczny IF publikacji (wg roku wydania): **122,32**
- Sumaryczna liczba punktów wg klasyfikacji MNiSW: **1186**
- Liczba cytowań (baza *Web of Science*): (bez autocytowań): **187**
- Indeks Hirscha: **11**

Literatura

1. Pomastowski, P.; Dziubakiewicz, E.; Buszewski, B. Potencjał zeta - jego rola i znaczenie. *Anal. Nauk. i Prakt.* **2012**, nr 2, 19–23.
2. Pomastowski, P.; Sprynskyy, M.; Žuvela, P.; Rafińska, K.; Milanowski, M.; Liu, J.J.J.; Yi, M.; Buszewski, B. Silver-Lactoferrin Nanocomplexes as a Potent Antimicrobial Agent. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 7899–7909.
3. Pomastowski, P.; Sprynskyy, M.; Buszewski, B. The study of zinc ions binding to casein. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, 120.
4. Pomastowski, P.; Walczak, J.; Gawin, M.; Bocian, S.; Piekoszewski, W.; Buszewski, B. HPLC separation of casein components on a diol-bonded silica column with MALDI TOF/TOF MS identification. *Anal. Methods* **2014**, 6, 5236–5244.
5. Buszewski, B.; Piekoszewski, W.; Pomastowski, P.; Rafińska, K.; Sugajski, M.; Kowalkowski, T. *Modern Analytical Methods of Speciation and Determination of Trace Elements in Inorganic, Organic, and Biological Samples*; 2017; ISBN 9781119133780.
6. Rafińska, K.; Pomastowski, P.; Wrona, O.; Górecki, R.; Buszewski, B. Medicago sativa as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. *Phytochem. Lett.* **2017**, 20.
7. Pomastowski, P.; Buszewski, B. Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, 53.
8. Glish, G.L.; Vachet, R.W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 2, 140–150.
9. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass

- spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2018**, 2, 151–153.
10. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R.C.; Chait, B.T. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1193A–1203A.
 11. Meller, K.; Pomastowski, P.; Szumski, M.; Buszewski, B. Preparation of an improved hydrophilic monolith to make trypsin-immobilized microreactors. *J. Chromatogr. B* **2017**, 1043, 128–137.
 12. Milanowski, M.; Pomastowski, P.; Railean-Plugaru, V.; Rafińska, K.; Ligor, T.; Buszewski, B. Biosorption of silver cations onto *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus casei* isolated from dairy products. *PLoS One* **2017**, 12.
 13. Rogowska, A.; Rafińska, K.; Pomastowski, P.; Walczak, J.; Railean-Plugaru, V.; Buszewska-Forajta, M.; Buszewski, B. Silver nanoparticles functionalized with ampicillin. *Electrophoresis* **2017**, 38.
 14. Buszewski, B.; Rogowska, A.; Pomastowski, P.; Złoch, M.; Railean-Plugaru, V. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *J. AOAC Int.* **2017**, 100.
 15. Król, A.; Pomastowski, P.; Rafińska, K.; Railean-Plugaru, V.; Walczak, J.; Buszewski, B. Microbiology neutralization of zearalenone using *Lactococcus lactis* and *Bifidobacterium* sp. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410.
 16. Railean-Plugaru, V.; Pomastowski, P.; Meller, K.; Złoch, M.; Rafinska, K.; Buszewski, B. *Lactococcus lactis* as a safe and inexpensive source of bioactive silver composites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, 101, 7141–7153.
 17. Król, A.; Pomastowski, P.; Rafińska, K.; Railean-Plugaru, V.; Buszewski, B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, 249.
 18. Al-Suod, H.; Pomastowski, P.; Ligor, M.; Railean-Plugaru, V.; Buszewski, B. New approach for fast identification of cyclitols by MALDI-TOF mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **2018**, 29.
 19. Railean-Plugaru, V.; Pomastowski, P.; Kowalkowski, T.; Sprynskyy, M.; Buszewski, B. Physicochemical study of natural fractionated biocolloid by asymmetric flow field-flow fractionation in tandem with various complementary techniques using biologically synthesized silver nanocomposites. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410.
 20. Szultka-Młyńska, M.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Application of solid phase microextraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry in the determination of antibiotic drugs and their metabolites in human whole blood and tissue samples. *J. Chromatogr. B* **2018**, 1086.
 21. Rogowska, A.; Pomastowski, P.; Złoch, M.; Railean-Plugaru, V.; Król, A.; Rafińska, K.; Szultka-Młyńska, M.; Buszewski, B. The influence of different pH on the electrophoretic behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* modified by calcium ions. *Sci. Rep.* **2018**, 8.
 22. Sagandykova, G.N.; Pomastowski, P.P.; Kaliszan, R.; Buszewski, B. Modern analytical methods for consideration of natural biological activity. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2018**, 109.
 23. Rafińska, K.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Study of *Bacillus subtilis* response to different forms of silver. *Sci. Total Environ.* **2019**, 661, 120–129.
 24. Buszewski, B.; Król, A.; Pomastowski, P.; Railean-Plugaru, V.; Szultka-Młyńska, M. Electrophoretic Determination of *Lactococcus lactis* Modified by Zinc Ions. *Chromatographia* **2019**, 82, 347–355.
 25. Pomastowski, P.; Buszewski, B. Complementarity of Matrix- and Nanostructure-Assisted Laser Desorption/Ionization Approaches. *Nanomaterials* **2019**, 9, 260.

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

26. Król, A.; Railean-Plugaru, V.; Pomastowski, P.; Złoch, M.; Buszewski, B. Mechanism study of intracellular zinc oxide nanocomposites formation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2018**, 553.
27. Pomastowski, P.; Railean-Plugaru, V.; Buszewski, B. *Microbial analysis of escherichia coli atcc, lactobacteria and saccharomyces cerevisiae using capillary electrophoresis approach*; 2016; Vol. 1483;.
28. Pomastowski, P.; Szultka-Młyńska, M.; Kupczyk, W.; Jackowski, M.; Buszewski, B. Evaluation of Intact Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Capillary Electrophoresis Detection of Controlled Bacterial Clumping. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **2015**, 6, 1–7.
29. Ryan, D.J.; Spraggins, J.M.; Caprioli, R.M. Protein identification strategies in MALDI imaging mass spectrometry: a brief review. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, 48, 64–72.
30. Meller, K.; Pomastowski, P.; Grzywiński, D.; Szumski, M.; Buszewski, B. Preparation and evaluation of dual-enzyme microreactor with co-immobilized trypsin and chymotrypsin. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1440, 45–54.
31. Žuvela, P.; Liu, J.J.; Yi, M.; Pomastowski, P.P.; Sagandykova, G.; Belka, M.; David, J.; Bączek, T.; Szafranski, K.; Żołnowska, B.; et al. Target-based drug discovery through inversion of quantitative structure-drug-property relationships and molecular simulation: CA IX-sulphonamide complexes. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2018**, 33, 1430–1443.
32. Walczak, J.; Pomastowski, P.; Bocian, S.; Buszewski, B. Determination of phospholipids in milk using a new phosphodiester stationary phase by liquid chromatography-matrix assisted desorption ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1432.
33. Dziubakiewicz, E.; Buszewski, B. Capillary electrophoresis of microbial aggregates. *Electrophoresis* **2014**, 35, 1160–1164.
34. Buszewski, B.; Pomastowski, P. Wpływ heterogeniczności powierzchni biokoloidów na ich rozdzielanie elektroforetyczne. *Wiadomości Chem.* **2015**, [Z] 69, 9-10.
35. Volesky, B.; Holan, Z.R. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* **1995**, 11, 235–250.
36. Taheur, F. Ben; Fedhila, K.; Chaieb, K.; Kouidhi, B.; Bakhrouf, A.; Abrunhosa, L. Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, 251, 1–7.
37. Mokoena, M.P.; Chelule, P.K.; Gqaleni, N. *Reduction of Fumonisin B 1 and Zearalenone by Lactic Acid Bacteria in Fermented Maize Meal*; 2005; Vol. 68;.
38. Pajewska, M.; Łojko, M.; Cendrowski, K.; Sawicki, W.; Kowalkowski, T.; Buszewski, B.; Gadzała-Kopciuch, R. The determination of zearalenone and its major metabolites in endometrial cancer tissues. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410, 1571–1582.
39. Railean-Plugaru, V.; Pomastowski, P.; Wypij, M.; Szultka-Mlynska, M.; Rafinska, K.; Golinska, P.; Dahm, H.; Buszewski, B. Study of silver nanoparticles synthesized by acidophilic strain of Actinobacteria isolated from the of Picea sitchensis forest soil. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, 120.
40. Buszewski, B.; Rafińska, K.; Pomastowski, P.; Walczak, J.; Rogowska, A. Novel aspects of silver nanoparticles functionalization. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, 506.

