

## Załącznik 2a

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*  
*Wydział Nauk o Żywności*  
*Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności*  
*Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności*

**AUTOREFERAT PRZEDSTAWIAJĄCY  
OPIS OSIĄGNIĘĆ I DOROBKU NAUKOWO-BADAWCZEGO**

**Dr inż. Iwona Gientka**

Warszawa, 2019r.

## Spis treści

1.	Dane osobowe.....	3
2.	Posiadane dyplomy, tytuły i stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3.	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych i innych.....	3
4.	Wykazanie osiągnięcia o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017r. poz. 1789).....	4
	4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
	4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.....	4
	4.3. Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	
	4.3.1. Wprowadzenie.....	6
	4.3.2. Cel naukowy oraz omówienie wyników badań wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	10
	4.3.3. Podsumowanie.....	27
5.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	32
6.	Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego.....	41

### **1. Dane osobowe**

Imię i nazwisko:      Iwona Gientka

Miejsce pracy:      Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

### **2. Posiadane dyplomy, tytuły i stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

- **Doktor nauk rolniczych (z wyróżnieniem)** w zakresie technologii żywności i żywienia. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności. Tytuł rozprawy doktorskiej: "*Wpływ kwasu p-aminobenzoesowego na metabolizm komórkowy drożdży*". Promotor: dr hab. Wanda Duszkiewicz-Reinhard, prof. SGGW, 2007r.
- **Studia podyplomowe** z zakresu: Ochrona Własności Intelektualnej, Uniwersytet Warszawski, Wydział Prawa i Administracji. 2015r.
- **Studia podyplomowe** z zakresu: Przygotowanie pedagogiczne, Kuratorium Oświaty w Bydgoszczy. 2002r.
- **Magister inżynier biotechnologii**, specjalizacja: biochemia techniczna, Politechnika Łódzka, Wydział Chemii Spożywczej i Biotechnologii. Tytuł pracy magisterskiej: "*Oznaczanie struktury inhibitorów proteiny wirusa HIV*". Promotor: prof. dr hab. inż. Grzegorz Bujacz. 2000r.

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych i innych**

- od 01.01.2010r. do chwili obecnej

**Adiunkt:** Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

- 2007-2009r.

**Asystent:** Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

(w tym urlopy wychowawcze: 3.09-15.12.2008r. oraz 1.02-15.09.2009r.)

- 2004r.  
**Staż naukowy:** Lund University, Department of Applied Microbiology, Szwecja (6 miesięcy)
- 2005r.  
**Staż naukowy:** Lund University, Department of Applied Microbiology, Szwecja (3 miesiące)
- 2001-2002r.  
**Nauczyciel stażysta** przedmiotów zawodowych: technologia żywności, analiza żywności, technologia specjalizacyjna - przetwórstwo mięsa i analiza żywności. Technikum Spożywcze w Zespole Szkół Spożywczych w Bydgoszczy

**4. Wykazanie osiągnięcia o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017r. poz. 1789)**

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

**Potencjał biotechnologiczny wybranych drożdży niekonwencjonalnych do biosyntezy egzopolisacharydów oraz tłuszczów**

**4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczególnym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy**

- H-1. Gientka I.\*, Klusek E. 2013.** Kefir jako źródło drożdży tolerujących duże stężenia etanolu. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. 575:43-51  
MNiSW = 9<sup>a</sup>, IF 2013 = 0<sup>b</sup>  
*Swój wkład w powstawanie pracy szacuję na 80%.*
- H-2. Gientka I.\*, Madejska A. 2013.** Ocena przydatności szczepów drożdży wyizolowanych z kefirów do syntezy polimerów zewnątrzkomórkowych. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. 574:19-27  
MNiSW = 9<sup>a</sup>, IF 2013 = 0<sup>b</sup>  
*Swój wkład w powstawanie pracy szacuję na 80%.*
- H-3. Gientka I.\*, Kot A.M., Błażej S. 2014.** Selekcja szczepów drożdży z rodzajów *Candida* oraz *Cryptococcus* w kierunku biosyntezy zewnątrzkomórkowych polimerów w podłożach z sacharozą. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. 577:33-41  
MNiSW = 9<sup>a</sup>, IF 2014 = 0<sup>b</sup>

*Swój wkład w powstawanie pracy szacuję na 75%.*

- H-4. Gientka I.\***, Błażej S., Stasiak-Róžańska L., Chlebowska-Śmigiel A. **2015**. Exopolysaccharides from yeast: insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical composition and functional properties – review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 14(4):283–292

MNiSW = 15<sup>a</sup>; IF<sub>2015</sub> = 0<sup>b</sup>

*Swój wkład w powstawanie pracy szacuję na 85%.*

- H-5. Gientka I.\***, Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Róžańska L., Bednarska A.A., Błażej S. **2016**. The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. *Electronic Journal of Biotechnology*. 22:31-37

*Swój wkład w powstawanie pracy szacuję na 70%.*

- H-6. Gientka I.\***, Kieliszek M., Jermacz K., Błażej S. **2017**. Identification and characterization of oleaginous yeast isolated from kefir and its ability to accumulate intracellular fats in deproteinated potato wastewater with different carbon sources. *BioMed Research International*. Article ID 6061042, 19 pages

MNiSW = 25<sup>a</sup>; IF<sub>2017</sub> = 2,583<sup>b</sup>

*Swój wkład w powstawanie pracy szacuję na 70%.*

- H-7. Gientka I.\***, Aleksandrak-Piekarczyk T., Bzducha-Wróbel A., Synowiec A., Błażej S. **2019**. Deproteinated potato wastewater as a sustainable nitrogen source in *Trichosporon domesticum* yeast lipids biosynthesis. *Potato Research*. <https://doi.org/10.1007/s11540-018-9408-x>

MNiSW = 30<sup>a</sup>; IF<sub>2018</sub> = 0,771<sup>b</sup>

*Swój wkład w powstawanie pracy szacuję na 65%.*

- H-8. Gientka I.\***, Gadaszewska M., Błażej S., Kieliszek M., Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Róžańska L., Kot A.M. **2017**. Evaluation of lipid biosynthesis ability by *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* strains in medium with glycerol. *European Food Research Technology*. 243(2):275-286.

MNiSW = 30<sup>a</sup>; IF<sub>2017</sub> = 1,919<sup>b</sup>

*Swój wkład w powstawanie pracy szacuję na 55%.*

- H-9. Gientka I.\***, Duda M., Bzducha-Wróbel A., Błażej S. **2019**. Deproteinated potato wastewater as a low-cost nitrogen substrate for very high yeast biomass quantities: starting point for scaled-up application. *European Food Research Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03231-1>

MNiSW = 30<sup>a</sup>; IF<sub>2018</sub> = 1,919<sup>b</sup>

*Swój wkład w powstawanie pracy szacuję na 65%.*

Mój wkład w powstawanie w/w publikacji obejmował autorstwo hipotez i koncepcji badań, planowanie doświadczeń, analizę piśmiennictwa, wykonanie większości doświadczeń, opracowanie wyników i ich analizę statystyczną, graficzne przedstawienie, sformułowanie wniosków, napisanie i redakcję manuskryptu i wykonanie korekt po recenzjach. W wszystkich w/w publikacjach byłam autorem korespondencyjnym.

Dane scjentometryczne **cyklu publikacji** będących podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych:

Liczba punktów zgodnie z wykazem czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach wg. Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 12 grudnia 2016 r. (Dz. U. 2016 r. poz. 2154) oraz wg Komunikatu MNiSW z dnia 26.01.2017 – **172<sup>a</sup>**

Sumaryczny *Impact Factor* (IF)\* z roku publikacji – **8,718<sup>b</sup>**

*\*Autor korespondencyjny publikacji*

*<sup>a</sup> Zgodnie z wykazem czasopism opublikowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w dniu 12 grudnia 2016 r. (Dz. U. 2016 r. poz. 2154) oraz wg Komunikatu MNiSW z dnia 26.01.2017.*

*<sup>b</sup> Impact Factor podany jest dla roku opublikowania artykułu (w przypadku publikacji z roku 2019, dla których IF nie został obliczony podano IF dla roku 2017)*

### **4.3. Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

---

#### **4.3.1. Wprowadzenie**

Tradycja praktycznego zastosowania drożdży jest wyznacznikiem nieformalnego podziału tej grupy mikroorganizmów na konwencjonalne i niekonwencjonalne. Drożdże z rodzaju *Saccharomyces* są powszechnie akceptowane i bezpieczne, co wynika z wielowiekowej tradycji ich stosowania w produkcji żywności i napojów alkoholowych. Aparat enzymatyczny drożdży konwencjonalnych nie pozwala m.in. na ich wykorzystanie do utylizacji uciążliwych odpadów czy biosyntezy cennych metabolitów bez ingerencji w ich geny. Z drugiej strony różnorodność świata grzybów mikroskopowych jest ogromna i w naturalny sposób prowadzi do pytań o możliwości biotechnologicznego wykorzystania takich gatunków drożdży, które nazywane są dzikimi bądź niekonwencjonalnymi. Stanowią one niedostatecznie poznany zasób naturalny, który może mieć liczne zastosowania w nauce. Ponadto wykorzystanie mikroorganizmów niemodyfikowanych genetycznie ułatwia ich wykorzystanie w polskiej i europejskiej rzeczywistości gospodarczej. Użytecznych biotechnologicznie szczepów drożdży poszukuje się w różnych środowiskach, od lodów Arktyki przez nisze ekologiczne o dużym zasoleniu, do przemysłowo skażonych wód i gleb lub np. odpadów popłytacyjnych zakładów metalurgicznych.

Środowisko żywności jest naturalnym siedliskiem wszelkich mikroorganizmów w tym jednokomórkowych eukariotów. Jednym z produktów będących naturalnym siedliskiem drożdży jest kefir. Kefir to popularny napój fermentowany, wywodzący się z Kaukazu o wielowiekowej tradycji wytwarzania metodami domowymi a od kilkudziesięciu lat technikami przemysłowymi (Assadi i wsp. 2000). Podstawą otrzymania produktu o najlepszych cechach jakościowych jest odpowiednia jakość surowca mlecznego oraz ziarna kefirowe. Kefir jest produkowany głównie z mleka krowiego, owczego, koziego lub bawolego. Ponadto napój sojowy i permeat serwatki były również stosowane jako substraty do produkcji kefiru (Londero i wsp. 2012, Gamba i wsp. 2016). Ziarna kefirowe, zwane również grzybkami kefirowymi, to przykłady złożonego konsorcjum grzybów i bakterii. Zoogłę kefirów stanowią bakterie mlekowe, octowe i drożdże (Simova i wsp. 2002, Garrote i wsp. 2001, Garrote i wsp. 2010), powiązane sobą matrycą polisacharydu, który stanowi kefiran wytwarzany przez bakterie mlekowe (Otes i Cagindi, 2003, Lopitz-Otsoa i wsp. 2006; Furuno i Nakanishi, 2012). W moich badaniach przyjąłem **hipotezę, że mikroflorę drożdżową kefirów mogą stanowić szczepy przydatne do biosyntezy składników żywności**. W tym zakresie, z kefirów naturalnych dostępnych na rynku polskim, izolowałam i identyfikowałam szczepy drożdży a następnie badałam ich potencjał biotechnologiczny. Charakterystycznymi cechami kefiru jest kwaśny smak, lekkie gazowanie (0,08-0,2% CO<sub>2</sub>) oraz zawartość alkoholu od 0,1% do 2,5% (Simova i wsp.

2002; Otes i Cagindi, 2003; Farnworth, 2005; Latorre-Garcia i wsp, 2007; Zajsek i Gorsek, 2010). To doprowadziło do **hipotezy, że drożdże kefirowe mogą fermentować laktozę, a ponadto wśród nich mogą być również szczepy odporne na duże stężenia etanolu**. W tym zakresie scharakteryzowałam izolaty drożdży kefirowych pod kątem oporności na etanol oraz ich uzdolnienia fermentacyjne.

Polimery zewnątrzkomórkowe (EPS, ang. *extracellular polymeric substances*) wytwarzane przez drobnoustroje uczestniczą w tworzeniu biofilmów (nadając błonom biologicznym trójwymiarową heterogenną postać) i pełnią funkcje ochronne komórek – przed odwodnieniem oraz przed stresem osmotycznym wywołanym solą (Breierova i wsp, 2005). Przypisuje im się również właściwości glebotwórcze (Turkiewicz, 2006). Należą do nich m.in. ksantan, dektran, gelan (bakteryjne), pullulan czy skleroglukan (pleśniowe). Roztwory wodne egzopolisacharydów charakteryzują się wysoką lepkością i pseudoplastycznością co determinuje ich zastosowanie w przemyśle spożywczym, jak również w farmaceutycznym i kosmetycznym. Pozakomórkowe polimery syntetyzuje nieliczna grupa drożdży, które należą do rodzajów *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* i *Sporobolomyce* [H-4]. W kolejnej **hipotezie założyłam, że wśród szczepów drożdży wyizolowanych z kefirów są wydajni producenci egzopolisacharydów**. W tym zakresie badania polegały na analizie uzdolnień izolatów do wytwarzania EPS w różnych pożywkach ze szczególnym uwzględnieniem wpływu różnych źródeł węgla i azotu na ich biosyntezę.

Tłuszcze mikrobiologiczne, nazywane single cell oils (SCO) wytwarzane są przez mikroorganizmy olejogenne czyli takie, które zdolne są do biosyntezy i akumulacji lipidów powyżej 20% s.s. Olejogenne drożdże należą głównie do rodzajów *Cryptococcus*, *Yarrowia*, *Lipomyces* *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* oraz *Trichosporon* (Kot 2015a). Podczas syntezy lipidów *de novo* substratem jest źródło węgla przy czym mogą to być substancje hydrofilowe jak węglowodany m.in. glukoza, sacharoza lub alkohole, np. glicerol (Papanikolaou 2011). Do tej pory badano różne odpadowe źródła węgla, m.in. melasę buraczaną (Johnson i wsp. 1995), hydrolizaty wytlóków trzciny cukrowej (Li i wsp. 2010) oraz glicerynę odpadową powstająca podczas produkcji biodiesla (Cutzu i wsp. 2013). Skład lipidów, tj. udział poszczególnych kwasów tłuszczowych determinuje możliwość wykorzystania tłuszczu mikrobiologicznego. Udział niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych ukierunkowuje wykorzystanie żywieniowe i wtedy oleje mikrobiologiczne mogą stanowić zastępnik drogich olejów roślinnych, bądź stanowić źródło konkretnego kwasu tłuszczowego. Natomiast duży udział nasyconych kwasów tłuszczowych może predystynować oleje mikrobiologiczne do wykorzystania ich jako biodiesla. Biodiesel to paliwo alternatywne, tzw. zielone paliwo służące do zasilania silników z zapłonem samoczynnym, tj. silników Diesla. Są to estry metylowe (FAME, ang. Fatty Acids Methyl Esters) lub etylowe kwasów tłuszczowych (FAEE, ang. Fatty Acids Ethyl Esters), które otrzymuje się w wyniku reakcji transestryfikacji glicerydów odpowiednio metanolem lub etanolem w obecności katalizatorów kwaśnych lub zasadowych w fazie homogenicznej lub heterogenicznej



(Lewandowski i Ryms, 2013). Z danych literaturowych jednoznacznie wynika, że do wydajnych producentów tłuszczu należą drożdże dzikie, tzw. drożdże czerwone, które zdolne są do biosyntezy barwników karotenoidowych. Należą one m.in. do rodzajów *Rhodotorula* i *Sporobolomyces*. Jako **kolejną hipotezę badawczą przyjęto, że wśród szczepów wyizolowanych z kefirów oraz szczepów drożdży czerwonych są szczepy olejogenne.**

Wydajna biosynteza lipidów oraz ich skład zależy od uwarunkowań genetycznych oraz warunków hodowli. Przy nadal dużej podaży olejów roślinnych tania pożywka i duży plon biomasy to ekonomiczne fundamenty uzasadniające otrzymywanie olejów mikrobiologicznych, a zwłaszcza w aspekcie przeznaczenia ich na biopaliwo. Tanich składników pożywek poszukuje się w odpadach przemysłu spożywczego.

Przemysł krochmalniczy produkuje odpady płynne uciążliwe dla środowiska. Produkcja skrobi ziemniaczanej w krajach UE-27 przekracza 1,7 mln ton rocznie. Według najnowszego raportu, zatytułowanego "Potato Starch Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2017-2022", światowy rynek skrobi ziemniaczanej osiągnął w roku 2016 wielkość 3,52 miliona ton i oczekuje się, że przekroczy 4,10 mln ton do 2022r. Szacuje się, że podczas przetwarzania skrobi 1000 ton ziemniaków powstaje około 600m<sup>3</sup> uciążliwych płynnych odpadów (Bzducha-Wróbel i wsp. 2015). Można zatem obliczyć, że produkcja 1000 ton skrobi generuje ok. 3000m<sup>3</sup> wody sokowej (przy założeniu 20% zawartości skrobi w ziemniakach). Oznacza to, że światowy przemysł skrobiowy wytworzy ponad 12,6 mln m<sup>3</sup> wody sokowej w 2020r. Koagulacja termiczna ścieków ziemniaczanych pozwala na odzyskanie białek ziemniaczanych, które są wykorzystywane do karmienia zwierząt. Pomimo tego nadal pozostaje do zagospodarowania odbiałczona woda sokowa (ang: DPW – deproteinated potato wastewater). Najczęściej wykorzystuje się do zraszania pól i łąk, co może intensyfikować niekorzystne dla środowiska naturalnego procesy eutrofizacji wód (Kot i wsp. 2015b). W związku z tym **założono, że możliwe jest wykorzystanie ziemniaczanej odpadowej wody sokowej (DPW) jako składnika pożywek dla drożdży olejogennych wyselekcjonowanych spośród drożdży kefirowych oraz czerwonych.** W tym zakresie badania polegały na określeniu wpływu różnych czynników na biosynteze lipidów przez olejogenne szczepy drożdży z gatunków *Rhodotorula* i *Sporobolomyces* oraz izolatów drożdży kefirowych z jednoczesną waloryzacją odpadu przemysłu krochmalniczego.

Skład lipidów determinuje możliwość wykorzystania tłuszczu mikrobiologicznego. Zatem w kolejnej **hipotezie badawczej założono, że można określić przydatność tłuszczu badanych drożdży do celów żywieniowych lub technicznych.** W tym zakresie analizowano udział kwasów tłuszczowych oraz obliczano parametry możliwego do uzyskania biodiesla.

#### 4.3.2. **Cel naukowy oraz omówienie wyników badań**

Celem naukowym osiągnięcia, będącego podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego zgodnie w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017r. poz. 1789), było:

- A-1.** uzyskanie szczepów z kefirów oraz ich identyfikacja,
- A-2.** określenie przydatności szczepów drożdży wyizolowanych z kefirów do biosyntezy egzopolisacharydów w podłożach z różnymi źródłami węgla i azotu,
- A-3.** określenie przydatności wybranych drożdży niekonwencjonalnych do biosyntezy tłuszczów z jednoczesną waloryzacją odpadu przemysłu krochmalniczego,
- A-4.** ocena przydatności tłuszczów pozyskiwanych z wybranych drożdży niekonwencjonalnych do celów żywieniowych,
- A-5.** ustalenie przydatności tłuszczów pozyskiwanych z wybranych drożdży niekonwencjonalnych do otrzymywania biodiesla.

Sformułowane cele doprowadziły do weryfikacji hipotez naukowych określonych w rozdziale 4.2.1 niniejszego autoreferatu.

#### **Ad. A-1.      Uzyskanie szczepów z kefirów oraz ich identyfikacja**

Materiał do izolacji szczepów drożdży stanowiły dostępne na rynku polskim kefiry naturalne w czasie ich przydatności do spożycia. Szczepy drożdży izolowano z wykorzystaniem wybiórczego podłoża Sabourauda z chloramfenikolem, a następnie uzyskiwano czyste kultury poprzez wielokrotne pasażę [**H-1, H-3, H-6, H-7**]. Ostatecznie **wyizolowano stabilne i pasażowalne czyste kultury drożdży.**

Początkowo identyfikacje izolatów prowadzono w oparciu o określenie cech morfologicznych, asymilacyjnych, fermentacyjnych oraz z wykorzystaniem testów Api 20 AUX (BioMerieux). W kolejnym etapie badań zastosowano do identyfikacji szczepów metody biologii molekularnej i określono ich przynależność taksonomiczną [**H-6 i H-7**]. Amplifikowano i sekwencjonowano fragmenty DNA kodujące region ITS1&ITS2 leżący pomiędzy genami kodującymi podjednostki 18S i 26S rDNA. Region ten występuje w wielu kopiach, a zmienność sekwencji ITS jest na tyle duża, że umożliwia rozróżnienie blisko spokrewnionych gatunków. Obecność licznych kodujących sekwencji regionu ITS1 i ITS2 w bioinformatycznej bazie danych GenBank® potwierdziło właściwe uszeregowanie izolatów w odpowiednich grupach fizjologicznych. Zidentyfikowano następujące szczepy drożdży:

- *Candida inconspicua* IG11,
- *Debaryomyces hansenii* 1 (syn. *Candida guilliermondii* 1)\*,

- *Debaryomyces hansenii* IG01 (syn. *Candida famata*)\*,
- *Debaryomyces hansenii* IGII (syn. *Candida guilliermondii* 2)\*,
- *Kazachstania unispora* IG16 (syn. *Saccharomyces cerevisiae*)\*,
- *Kluyveromyces marxianus* IG1 (syn. *Candida kefir*)\*,
- *Zygotorulaspora florentina* IG12 (syn. *Cryptococcus albidus*)\* [H-6]
- *Trichosporon domesticum* PCM 2960 [H-7]
- *Kluyveromyces lactis*
- *Cryptococcus humicolus* [H-1].

\* synonimy oznaczają stosowane nazwy izolatów, które zostały opublikowane przed identyfikacją z wykorzystaniem narzędzi molekularnych (tj. przed rokiem 2017).

**Sekwencje amplikonów szczepów:** *Candida inconspicua* IG11, *Debaryomyces hansenii* 1, *Debaryomyces hansenii* IG01, *Debaryomyces hansenii* IGII, *Kazachstania unispora* IG16, *Kluyveromyces marxianus* IG1, *Trichosporon domesticum* oraz *Zygotorulaspora florentina* IG1 **zostały zgłoszone do National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank®** w Japonii a każdy z nich otrzymał swój numer akcesyjny [Załącznik 4: II.N.]

Zasilanie baz danych sekwencjami zwiększa ogólnodostępne zasoby, stanowi wkład w opis natury oraz ułatwia identyfikacje mikroorganizmów przez innych badaczy. Jeden ze szczepów – ***Trichosporon domesticum* - zdeponowano w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM)**, należącej do Światowej Federacji Kolekcji Kultur (WFCC, ang. *World Federation of Culture Collection*) - **pod numerem PCM 2960** [Załącznik 4: II.O.] Pozostałe szczepy zdeponowano w Muzeum Czystych Kultur ZBiMŻ SGGW. Poszerza to rezerwę mikroorganizmów referencyjnych i ułatwia dostęp do nich dla innych badaczy.

Większość zidentyfikowanych drożdży była wcześniej izolowana z kefirów bądź ziaren kefirowych, przez innych naukowców co znalazło się w ich publikacjach (Fleet 1990; Assadi i wsp. 2000; Simova i wsp. 2002; Farnworth, 2005; Witthuhn i wsp. 2005; Lopitz-Otsoa i wsp. 2006; Latorre-Garcia i wsp. 2007 Garfalo i wsp. 2015). Natomiast **po raz pierwszy stwierdzono w kefirach obecność drożdży z gatunków *Zygotorulaspora florentina* [H-6] oraz *Trichosporon domesticum* [H-7]**. W 2003r. Fröhlich-Wyder wyizolował szczep *Zygosaccharomyces florentinus* z kefiru. Warto zauważyć, że Kurtzman (2003) na podstawie analizy podobieństwa zaproponował wydzielenie nowego rodzaju: *Zygotorulaspora*, przy czym do tej pory akceptowane są dwa gatunki: *Zygotorulaspora florentinus* (*Zygosaccharomyces florentinus*) i *Zygotorulaspora mrakii* (*Zygosaccharomyces mrakii*). Drożdże z gatunku *Zygotorulaspora florentina* były wykorzystywane do mieszanej fermentacji alkoholowej wraz z *Saccharomyces cerevisiae* (Lencioni i wsp. 2016).

Dotychczas nie opisano występowania przedstawicieli *Trichosporon domesticum* w kefirach. Szczepy z rodzaju *Trichosporon* znajdowano natomiast w następujących produktach mlecznych: tradycyjnym fermentowanym mongolskim mleku krowim (Bai i wsp. 2010), w serze typu bryndza (Laurenčík i wsp. 2008, Pangallo i wsp. 2014),

w hiszpańskich dojrzewających serach z mleka owczego (Padilla i wsp. 2014), w białym marynowanym serze serbskim i świeżym miękkim serze chorwackim (Golić i wsp. 2013) oraz w chhurpi – popularnym w północno-wschodnich Indiach serze przygotowywanym z maślanki (Rai i wsp. 2016). Ponadto drożdże tego rodzaju izolowano z fermentowanych warzyw w krajach afrykańskich oraz azjatyckich (Ongol i Masano 2009; Lim i Tay 2011; Pedersen i wsp. 2012; Zhao i wsp. 2016).

Według piśmiennictwa naukowego drożdże z rodzaju *Trichosporon* mogą być przyczyną infekcji powierzchniowych, jak i głębokich. Przedstawiciele *Trichosporon* dzieli się na co najmniej cztery odrębne serotypy: I, II, III i I-III (Nishiura i wsp. 1997, Sugita i wsp. 1997). Jednym z czynników patogeniczności jest zdolność do tworzenia biofilmów (Messier i wsp. 2011). Infekcje są raczej trudne do leczenia, gdyż struktura biofilmu ogranicza penetrację leków. Iturrieta-González i wsp. (2014) sklasyfikowali ponad 60 patogennych izolatów *Trichosporon* (pobranych od hospitalizowanych) w następujący sposób: o niskiej zdolności do wytwarzania biofilmu, gdy  $A_{570} < 1$ ; średniej, gdy  $A_{570} \geq 1,01 \div 2,49$  oraz wysokiej, gdy  $A_{570} \geq 2,5$ . Po przeprowadzeniu doświadczeń stwierdzono, że **zdolność szczepu drożdży *T. domesticum* PCM 2960 do tworzenia biofilmu jest niewielka** ( $Ab_{S600} = 0,630 \pm 0,035$ ). Uzasadnia to twierdzenie, że **szczep nie spełnia tego kryterium patogenności [H-7]**.

Tolerancja na etanol gwarantuje przetrwanie komórek w środowisku o wysokim stężeniu alkoholu i jest ważną cechą drożdży stosowanych w przemyśle fermentacyjnym. Drożdże kefirowe korzystają głównie z uzdolnień bakterii mlekowych do asymilacji laktozy żyjąc z nimi w symbiotycznym układzie ziaren kefirowych. Wykazano, że drożdże izolowane z kefirów posiadają zdolność asymilacji laktozy [H-6] jak również jej fermentacji [H-1], co stanowi o ich potencjale biotechnologicznym w zagospodarowaniu uciążliwej serwatki. **Największą opornością na etanol (20%) wykazały się komórki szczepu *Kluyveromyces lactis***. Cecha ta oraz zdolność do fermentacji laktozy, sugerują możliwość wykorzystania potencjału etanolotwórczego tego szczepu. Komórki innych izolatów wykazały mniejszą oporność na etanol i wytworzyły kolonie w podłożach zawierających 8, 10,16 lub 18% etanolu [H-1]. **Udowodniono, że kefir może być źródłem szczepów drożdży tolerujących wysokie stężenia alkoholu etylowego.**

Wyizolowane drożdże niekonwencjonalne stanowiły materiał biologiczny w doświadczeniach mających na celu określenie ich biotechnologicznej przydatności tj. uzdolnień fermentacyjnych i oporności na etanol [H-1], zdolności do wytwarzania egzopolisacharydów [H-2, H-3 i H-5] oraz tłuszczów wewnątrzkomórkowych [H-6 i H-7].

**Ad. A-2.      Określenie przydatności szczepów drożdży wyizolowanych z kefirów do biosyntezy egzopolisacharydów w podłożach z różnymi źródłami węgla i azotu**

Wytwarzanie egzopolisacharydów związane jest z metabolizmem wtórnym drożdży, a ich struktura i właściwości fizyczne zależą od wielu czynników, do których zaliczane są skład podłoża hodowlanego oraz warunki fermentacji takie jak: pH, temperatura, obecność tlenu (Rusinova-Videva 2010) i inne. Roztwory wodne drożdżowych EPS charakteryzują się wysoką lepkością i pseudoplastycznością, co oznacza, że mogą być wykorzystywane jako zagęstniki, środki żelujące, emulgatory, substancje pianotwórcze lub klarujące (Kuncheva i wsp. 2007) w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Zewnątrzkomórkowy glukomannan *C. utilis* tworzy kompleksy z jonami metali i może wychwytywać reaktywne formy tlenu (Van Bogaert i wsp. 2009), fosfomannan *P. holstii* jest inhibitorem heparanazy o aktywności przeciwnowotworowej (Khachigian i Parish 2004), zaś mannan *R. glutinis* AHU 3479 stanowi immunoreaktywny antygen w serologicznej diagnostyce leptospirozy (Matsuo i wsp. 2000).

Egzopolisacharydy drożdżowe chociaż jeszcze dalekie od powszechnego wykorzystania na skalę przemysłową są obiecującą perspektywą, szczególnie w technologii żywności. Warto zatem poszukiwać wydajnych drożdżowych producentów EPS. Szczepów producenckich poszukiwano w środowisku arktycznym, izolując je m.in. z piór pingwinów i gleby arktycznej (Pavlova i wsp. 2004; Pavlova i wsp. 2009), porostów lub mchów (Pavlova i wsp. 2004; Rusinova-Videva, 2011). Wyizolowane szczepy zimnolubnych drożdży, zdolne do wytwarzania dużych ilości EPS, należały do rodzajów *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* oraz *Rhodotorula*. Źródłem drożdży charakteryzujących się potencjałem wytwarzania biopolimerów była także gleba, np. wydajne szczepy *Rhodotorula* izolowano z ziemi ogrodowej (Ibrahim i wsp. 2012). Drożdże niekonwencjonalne wyizolowane z kefirów przebadano na zdolność do biosyntezy EPS w różnych warunkach a wyniki opublikowano w pracach H-2, H-3, H-5.

Szczepy drożdży kefirowych wykazały zdolność do wytwarzania polimerów zewnątrzkomórkowych oznaczanych jako surowe (tj. bez etapu odbiałczania), przy czym wydajność zależała od wielu czynników. Hodowla drożdży w podłożach z glukozą, tj. YPD oraz YM po 48h skutkowała wytworzeniem EPS od ilości śladowych do 1375 mg·dm<sup>-3</sup> w zależności od szczepu drożdży i podłoża. Stwierdzono, że komórki drożdży były istotnie (P=0,05) bardziej produktywne (od 81 mg·g<sub>s.s.</sub><sup>-1</sup> (*K. lactis*) do 157 mg·g<sub>s.s.</sub><sup>-1</sup> (*C. kefir*)) jeśli mnożyły się w podłożu YPD. Za przyczynę zmniejszonej produktywności w podłożu YM uznano większą zawartość azotu organicznego, a w konsekwencji mniej korzystny stosunek początkowy C:N [H-2].

Sacharoza uznana jest za najbardziej optymalne źródło węgla do produkcji EPS dla większości szczepów producenckich. W podłożu zawierającym sacharozę w stężeniu 4% zimnolubne szczepy *Cryptococcus laurentii* AL<sub>62</sub>, *Sporobolomyces salmonicolor* AL<sub>1</sub> oraz *Sporobolomyces salmonicolor* AL<sub>36</sub> wytwarzają ponad 5g EPS/L. Glukoza w identycznym stężeniu zmniejsza zawartość wydzielonych polimerów do niewiele ponad 3 g/L (Pavlova i wsp. 2004; Pavlova i wsp. 2009). Stosując sacharozę

w podłożach z peptonem w syntezie EPS przez drożdże kefirowe nie zauważono istotnych zależności, które można byłoby sprowadzić do ogólnego wniosku [H-3]. Dopiero zmiana źródła azotu na siarczan amonu w stężeniu 0,2% (podłoże mineralne MS) istotnie zwiększyła wydajność biosyntezy EPS w tym samym czasie, np. ponad dwukrotnie w przypadku szczepu *C. guilliermondii* 1. W porównaniu do podłoża z peptonem podłoże mineralne (z siarczanem amonu) istotnie obniżyło plon biomasy i wartość tego parametru nie przekroczyła  $7,5 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$  dla każdego szczepu. Zastosowanie innych soli amonowych np.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  lub  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  w pożywkach zdefiniowanych skutkuje większym przyrostem biomasy ale jednocześnie obserwuje się obniżenie wydajności biosyntezy polimerów (Grigorova i wsp. 1999). Najwięcej egzopolisacharydów wytworzyły szczepy *C. guilliermondii* oraz *C. famata*, które do 48h hodowli wyprodukowały odpowiednio 1640 oraz 1596  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Wydłużenie hodowli do trzeciej doby skutkowało istotnym zwiększeniem zawartości EPS w przypadku wszystkich przebadanych szczepów drożdży kefirowych. Mnożeniu komórek towarzyszyło szybkie i znaczące zakwaszenia środowiska tak, że początkowa wartość pH 5,6 podłoża MS obniżała się po 48h nawet do 2,01, a w kolejnym dniu do 1,94. Fenomen silnego zakwaszenia obserwowano także podczas hodowli drożdży, które nie były izolowane z kefirów, np. *C. utilis* ATCC 9905. Podłoża zawierające organiczne źródła azotu (pepton i ekstrakt drożdżowy) raczej ulegały alkalizacji, dla przykładu wynosiło ono nawet  $7,81 \pm 0,02$  (*Cryptococcus humicolus*), bądź nie zmieniały się istotnie ( $P=0,05$ ) [H-3]. Rezultatem tej części badań było **wyselekcjonowanie dwóch szczepów charakteryzujących się najlepszymi uzdolnieniami do wytwarzania EPS, tj: *Candida famata* i *Candida guilliermondii* 1.**

Doceniając istotność źródła węgla dla biosyntezy EPS w kolejnych eksperymentach podłoże mineralne suplementowano sacharozą, laktozą, maltozą, sorbitolem lub glicerolem, badając ich wpływ na produktywność *Candida famata* i *Candida guilliermondii* [H-5]. Szczep *C. famata* podczas hodowli w różnych wariantach podłoża charakteryzował się zbliżoną plennością biomasy ( $4,13 \pm 0,04 \div 6,60 \pm 0,05 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) natomiast plon szczepu *C. guilliermondii* wyróżnił się korzystnie w wariantach z sacharozą, maltozą i glicerolem. Źródło węgla w podłożu mineralnym istotnie determinowało wydajność biosyntezy EPS obu izolatów. Największą zawartość EPS ( $2,10$  oraz  $2,98 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) wywołało zastosowanie maltozy. Surowe EPS wytworzone przez badane szczepy i precypitowane z płynu pofermentacyjnego zmrożonym etanolem (cz.d.a.) w stosunku 4:1, to białe proszki tworzące w wodzie lepkie roztwory. Taka właściwość substancji predestynuje je wykorzystania jako środków zagęszczających lub stabilizujących. Zawartość węglowodanów w 100  $\text{g}_{\text{s.s.}}$  surowych preparatów EPS otrzymanych w podłożach z sacharozą obu szczepów była zbliżona i wynosiła powyżej 49g. Po zastosowaniu pożywki z maltozą zawartość węglowodanów w EPS wytworzonym przez *C. famata* wynosiła średnio  $61,5 \pm 4,3\%$  a przez *C. guilliermondii*  $65,4 \pm 4,3\%$ . Oznacza to, że udział węglowodanów zwiększył się odpowiednio o 24 i 33%. Wykazano zatem, że **maltoza stosowana jako źródło węgla w pożywce**

skutkowało zwiększeniem udziału węglowodanów w surowych preparatach EPS [H-5]. Preparaty EPS zawierają obok węglowodanów również białka i sole mineralne (Pavlova i wsp. 2004). Cukry mogące stanowić polisacharyd to glukoza, mannoza, galaktoza, fukoza, arabinoza, ksyloza, przy czym największy udział procentowy stanowią mannoza i glukoza. Uważa się, że większość egzopolisacharydów drożdżowych to mannany bądź glukomannany. Należy stwierdzić, iż wielu badaczy klasyfikuje EPS zawierające powyżej 50% mannozy jako posiadające aktywność biologiczną [H-4]. Oprócz cukrów polimery mogą zawierać cząsteczki kwasów cukrowych. Stwierdzono m.in. obecność kwasu glukuronowego, stanowiącego ponad 6% EPS pochodzącego z *R. rubra* GED10 (Simova i wsp. 2004).

Wyniki opisane w publikacji [H-5] jednoznacznie wskazują na ścisłą zależność zawartości EPS od czasu hodowli i ten parametr powinien być zoptymalizowany względem szczepu. Synteza polimerów zewnątrzkomórkowych zaczyna się w momencie wyczerpania źródła azotu z końcem fazy logarytmicznej, najczęściej po 2 dniach hodowli i zachodzi w stacjonarnej fazie wzrostu. W przypadku *C. famata* biosynteza EPS trwała do 96h osiągając zawartość  $2,10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  ( $Y_{p/x}=0,321$ ), a po tym czasie zawartość polisacharydów istotnie zmniejszała się. Maksymalna produktywność specyficzna szczepu *C. guilliermondii*  $Y_{p/x}$  wynosiła 0,505 oraz  $Y_{p/s}=0,083$  i przypadła na 72h hodowli. Później te parametry pikowały w dół, co wynikało z istotnego ( $P=0,05$ ) zmniejszenia ilości EPS. Jako, że równoległe obserwowano zwiększenie zawartości cukrów redukujących w płynie hodowlanym sformułowano następującą hipotezę: EPS stanowi źródło węgla dla komórek drożdży *C. famata*. W opinii niektórych badaczy większość mikroorganizmów nie posiada takich enzymów i z tego względu nie traktuje się ich jako substancji zapasowych (Wolfaardt i wsp. 1999, Donot i wsp. 2012). Do tej pory opisano, że zaledwie kilka gatunków drożdży posiada odpowiednie enzymy umożliwiające hydrolizę własnych egzopolimerów (Breierova i wsp. 2005, Badel i wsp. 2011).

W związku z powyższym, postanowiono dostępnymi metodami sprawdzić czy komórki badanych izolatów mają zdolność do wykorzystania wytworzonych przez siebie polimerów zewnątrzkomórkowych jako składników odżywczych [H-5]. W tym celu przeniesiono komórki drożdży (z warunków odpowiadających największej produktywności EPS) do podłoża mineralnego zawierającego jako jedyne źródło węgla surowy EPS w stężeniu 1%. Następnie hodowano przez okres 96h w temperaturze 28°C w mikrocelkach urządzenia Bioscreen C zapewniającego bezinwazyjne odczyty OD. Wyznaczone krzywe wzrostu pozwoliły stwierdzić, że długość trwania lag-fazy była długa i przekraczała 46h w przypadku *C. guilliermondii* oraz 42 w przypadku *C. famata*. Następnie komórki drożdży zaczęły się dzielić, weszły w logarytmiczną fazę wzrostu a ich właściwa szybkość wzrostu wynosiła odpowiednio  $0,0138\text{h}^{-1}$  oraz  $0,0068\text{h}^{-1}$ . Powtórzone doświadczenie w większej skali, t.j. w kolbach na wytrząsarkach, potwierdziło wzrost badanych szczepów. Przyrost liczby komórek (metoda płytkowa) w czasie hodowli się zwiększył ( $\Delta \log \text{ jtk } C. \text{ famata}/\text{ml} = 4,49 \pm 0,09$  a  $\Delta \log \text{ jtk } C. \text{ guilliermondii}$

/ml =  $4,35 \pm 0,10$ ). Zatem drożdże syntetyzują odpowiednie enzymy, które prowadzą degradację EPS do asymilowanych monosacharydów. **Wykazano, że drożdże *C. famata* i *C. guilliermondii* wykorzystują wytworzony przez siebie EPS jako źródło węgla, zatem w przypadku tych szczepów stanowi on materiał zapasowy.**

Zaobserwowano, że wzrostowi drożdży w podłożach mineralnych towarzyszy duże zakwaszenie środowiska. Takie zjawisko podczas hodowli ukierunkowanych na drożdżową biosyntezę EPS obserwowano wcześniej, np. dla przedstawicieli rodzaju *Cryptococcus* (Pavlova i wsp. 2004), *Pseudozyma antarctica* A<sub>104</sub>, *Sp. salmonicolor* AL<sub>1</sub>, *R. minuta* (Poli i wsp. 2010). Sugeruje się (Cho i wsp. 2001), że szybkie wykorzystanie jonów amonowych skutkuje wyrzutem protonów z komórek drożdży co prowadzi do zakwaszenia. Należy podkreślić, niskie pH jest koniecznym warunkiem do biosyntezy EPS. Podczas hodowli *R. acheniorum* MC w której stosowano ciągłe zobojętnianie zoptymalizowanego podłoża za pomocą CaCO<sub>3</sub> uzyskano duży plon biomasy natomiast wydajność syntezy EPS była bardzo niska (Grigorova i wsp, 1999). W moich badaniach wykazałam, że siła zakwaszenia płynu hodowlanego uzależniona była od źródła azotu przy czym była istotnie większa w przypadku zastosowania soli nieorganicznych [**H-2, H-3, H-5**].

Uzupełnieniem tej części badań jest praca przeglądowa opisująca aktualny stan wiedzy dt. omawianego nurtu badawczego [**H-4**]. Omówiono w niej właściwości funkcjonalne egzopolisacharydów drożdżowych, możliwości ich zastosowań i źródła izolacji wydajnych szczepów produkujących EPS. Przedyskutowano wpływ składników pożywek, jak również czynników środowiskowych na biosyntezę EPS. Przeanalizowano również literaturę naukową opisującą budowę chemiczną egzopolisacharydów drożdżowych.

### **Ad. A-3.      Określenie przydatności wybranych drożdży niekonwencjonalnych do biosyntezy tłuszczów z jednoczesną waloryzacją odpadowej ziemniaczanej wody sokowej**

W zakresie określenia przydatności wybranych drożdży niekonwencjonalnych do biosyntezy tłuszczów badano wpływ uwarunkowań środowiskowych na lipidogenezę drożdży wyizolowanych z kefirów [**H-6 i H-7**] oraz szczepów drożdży czerwonych [**H-8, H-9**].

Szczepy drożdży czerwonych stanowiły: *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 pochodzące z American Type Culture Collection, *Rhodotorula glutinis* var. *rubescens* LOCKR13, *Rhodotorula aurantiaca* LOCKR17, *Rhodotorula minuta* LOCKR19, *Sporobolomyces salmonicolor* LOCK53 pochodzące z Politechniki Łódzkiej, oraz *Rhodotorula glutinis* RhIX, *Rhodotorula gracilis* RhVII i *Rhodotorula rubra* RhVIII pochodzące z Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Kurtzman i Fell (1998) podają, że *R. rubra* i *R. mucilaginosa* to jeden gatunek. Aby upewnić się mam do czynienia z różnymi gatunkami w pierwszym etapie prac postanowiłam scharakteryzować wszystkie szczepy drożdży czerwonych za pomocą



analizy restrykcyjnej. Po elektroforetycznym rozdzieleniu produktów reakcji PCR stwierdzono, że ich masa molekularna dla szczepu *S. salmonicolor* wynosiła 600 pz. zaś dla wszystkich przedstawicieli rodzaju *Rhodotorula* masy te wynosiły ok. 630 pz. Podobne wielkości, po zastosowaniu identycznych starterów (ITS1 i ITS4) uzyskali m.in.: Esteve-Zarzoso i wsp. (1999) dla różnych szczepów *Rhodotorula* (od 610 do 675 pz.), Guillamón i wsp. (1998) dla *Rhodotorula minuta* (660pz.), Arroyo-López i wsp. (2006) dla szczepu *Rhodotorula glutinis* (640 pz.) oraz Stringini i wsp. (2008) dla *R. mucilaginosa* (640pz). Analiza restrykcyjna DNA trawionych enzymem *HinfI* wykazała obecność dwóch fragmentów o wielkościach ok.: 400 i 220 pz. dla szczepów *R. minuta*, *R. aurantiaca* i *R. rubra*. Dla szczepu *S. salmonicolor* uzyskano 3 fragmenty (280, 250 i 130 pz.), co było zbliżone do wyników uzyskanych dla *Sporidiobolus salmonicolor* (Esteve-Zarzoso i wsp., 1999). W wyniku trawienia DNA szczepów *R. glutinis*, *R. mucilaginosa*, *R. gracilis*, *R. glutinis* var. *rubescens* uzyskano trzy prążki o masach 340, 225 i 75 pz, co było zgodne z danymi opublikowanymi przez Arroyo-López i wsp. (2006). Odmienne wyniki dla szczepu *R. glutinis* uzyskali Guillamón i wsp. (1998), którzy wykazali obecność tylko 2 prążków. W wyniku trawienia restrykcyjnego enzymem *HaeIII* fragmentów DNA drożdży *R. gracilis*, *R. glutinis*, *R. mucilaginosa* i *R. glutinis* var. *rubescens* obserwowano wystąpienie dwóch fragmentów o wielkościach 430 i 210 pz., a w przypadku szczepów *R. minuta*, *R. rubra* i *R. aurantiaca* ok. 400 i 210 pz. Trawienie enzymem *HaeIII* DNA szczepu *Sporobolomyces salmonicolor* skutkowało trzema słabo widocznymi prążkami o wielkościach ok. 410, 135 i 100 pz. zbliżonych do rezultatów przedstawionych przez Esteve-Zarzoso i wsp. [1999]. **Wykazano, że analiza PCR z wykorzystaniem starterów ITS1 i ITS4 może być wykorzystywana do rozróżnienia drożdży z rodzaju *Rhodotorula* i *Sporobolomyces*.** Zastosowanie wybranych enzymów nie pozwoliło na pełne rozróżnienie międzygatunkowe badanych szczepów rodzaju *Rhodotorula*, gdyż skutkowało otrzymaniem identycznych wzorów restrykcyjnych, tj. 400 i 200pz (*HinI*) oraz 400 i 210pz (*HeaIII*) dla szczepów *R. aurantiaca*, *R. minuta*, *R. rubra* oraz 340, 225 i 75pz. (*HinI*) i 430 i 210pz. (*HeaIII*) dla szczepów *R. glutinis*, *R. glutinis* var. *rubescens* i *R. mucilaginosa*. Powstawanie identycznych wzorów restrykcyjnych dla poszczególnych szczepów jest wynikiem dużego podobieństwa w ich genomie. Podobnie duże podobieństwo powstałych wzorów DNA strawionego przez enzymy: *HinI*, *HeaIII* oraz *CfoI* DNA szczepów *R. glutinis* oraz *R. mucilaginosa* stwierdzili także inni (Esteve-Zarzoso i wsp. 1999). Rozróżniającym od pozostałych drożdży *Rhodotorula* wzorem prążków charakteryzował się szczep *R. gracilis*. Natomiast **uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały zróżnicowanie genetyczne szczepów *R. rubra* i *R. mucilaginosa* [H-8].**

Następnie badano wpływ glicerolu na lipidogenezę u drożdży czerwonych. Szczepy drożdży wykazały zdolność wzrostu na podłożach z glicerolem [H-8]. Hodowle prowadzone w płynnym podłożu YPGly w mikrocelkach urządzenia Bioscreen C jak również w kolbach charakteryzowały się klasycznym przebiegiem krzywych wzrostu dla hodowli okresowych, podczas których uwidoczniły się poszczególne fazy:

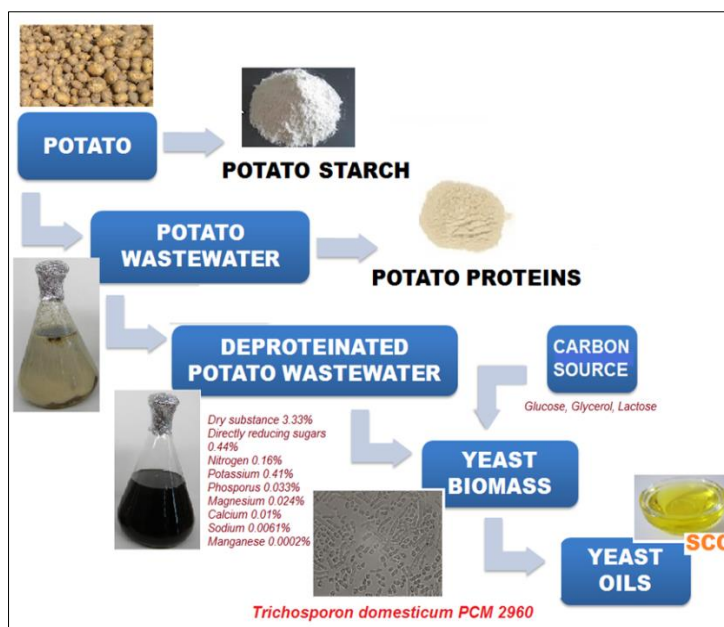
adaptacyjna, akceleracji, wzrostu logarytmicznego, opóźnionego wzrostu i stacjonarna. Najszybszym wzrostem charakteryzowały się komórki drożdży *R. rubra* ( $\mu_{\max}=0,163 \text{ h}^{-1}$ ) oraz *R. mucilaginosa* ( $\mu_{\max}=0,144 \text{ h}^{-1}$ ). Osiągnęły także największy plon biomasy spośród przebadanych, co korelowało ze zużyciem glicerolu 69,4% oraz 87,8%. Najmniejszą zdolnością do asymilacji glicerolu wykazał się szczep *S. salmonicolor* ( $\mu_{\max}=0,043 \text{ h}^{-1}$ ), czas generacji był najdłuższy, plon biomasy najmniejszy co było skutkiem niewielkiego zużyciem glicerolu (ok. 10 %).

Zbliżoną i jednocześnie największą (ponad 32%<sub>o.s.s.</sub>) zawartością tłuszczów po hodowli (72h) w podłożach z glicerolem oraz peptonem i ekstraktem drożdżowym charakteryzowała się biomasa szczepów *R. glutinis* var. *rubescens*, *R. gracilis* oraz *R. minuta*. Komórki *R. rubescens* w najkrótszym czasie zgromadziły ponad 30% tłuszczu w s.s. Istotne zwiększenie udziału tego składnika, z 19,5%<sub>o.s.s.</sub> do ponad 30%<sub>o.s.s.</sub>, obserwowano dla komórek *R. minuta* między 2 a 3 dobą. Kryterium olejogenności w tym wariantcie spełnił jeszcze szczep *R. aurantiaca* (24,3%<sub>o.s.s.</sub>) [H-8]. Wydajność objętościowa (wolumetryczna) biosyntezy tłuszczu ( $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) informuje jaką ilość tłuszczu można uzyskać z 1 litra podłoża. Ten parametr lepiej obrazuje przydatność podłoża do gromadzenia lipidów, gdyż uwzględnia on plon uzyskanej biomasy. Dobrze uwidoczniły się te zależności u drożdży *R. minuta*, gdyż zgromadziły one prawie 33% s.s. tłuszczów, charakteryzowały się największym współczynnikiem tłuszcz/glicerol ( $Y_{L/S}$ ) a obliczona dla nich wydajność objętościowa wynosiła tylko  $1,82 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Przyczyn należy upatrywać w niskim plonie biomasy i najmniejszej szybkości właściwej ( $\mu_{\max}$ ) wzrostu [H-8].

Wszystkie badane drożdże wyizolowane z kefirów asymilowały glicerol, zaś najszybciej mnożyły się *D. hansenii* 1, *C. inconspicua* oraz *K. unispora*. Ich plon biomasy był mniejszy od tego, który uzyskiwano w identycznych podłożach z glukozą. Wydajność objętościową biosyntezy lipidów oznaczono w zakresie od 0,5 (*K. marxianus*) do  $3,28 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (*Debaryomyces hansenii* 1) [H-6]. Szczep *Trichosporon domesticum* wyróżniła największa plenność biomasy spośród szczepów kefirowych hodowanych w podłożach peptonowych (z glukozą -  $18,65 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , laktozą -  $14,64 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , glicerolem -  $12,45 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), przy czym wysoką wydajność biosyntezy tłuszczów odnotowano w przypadku stosowania glukozy ( $5,8 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) [H-7]. Glukoza determinowała także największą wydajność objętościową tłuszczu szczepów *D. hansenii* 1 oraz IG 01, odpowiednio  $6,31 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  oraz  $5,65 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Tak duże wydajności były skutkiem dużego plonu biomasy komórek o dużej zawartości tłuszczu. W przypadku szczepu *K. marxianus* laktoza okazała się źródłem węgla promującym syntezę lipidów a ich końcowa wydajność objętościowa wyniosła  $4,76 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  zaś gdy użyto glicerolu wynosiła tylko  $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  [H-6].

Opracowanie tanich pożywek to pierwszy krok prowadzący do obniżenia kosztów procesów biotechnologicznych. Stosowanie odpadów przemysłu rolno-spożywczego jest długotrwałą praktyką, która oprócz czynnika ekonomicznego niesie za sobą realną ulgę dla środowiska naturalnego. **Koncepcja moich badań obejmowała próbę zastosowania ziemniaczanej wody sokowej jako składnika podłoży**

przeznaczonych do hodowli biomasy drożdży niekonwencjonalnych zasobnej w tłuszcz (Rysunek 1).



**Rysunek 1.** Schematyczne przedstawienie koncepcji zastosowania odbiałzonej ziemniaczanej wody sokowej uzupełnionej o źródło węgla jako pożywki do hodowli drożdży olejogennych na przykładzie *Trichosporon domesticum* PCM 2960 [H-7].

We wszystkich badaniach stosowano ścieki ziemniaczane pozyskane z linii technologicznej przedsiębiorstwa PEPEES S.A. (Łomża, Polska) po etapie wytrącania białek metodą koagulacji kwasowo-termicznej. Po przetransportowaniu odpadu do ZBiMŻ ścieki sterylizowano (121°C/0,1MPa/20 min) przy użyciu autoklawu a jałowe przechowywano w temperaturze pokojowej. Bezpośrednio przed przygotowaniem podłoża separowano metodą wirowania wytrącone podczas sterylizacji osady. Ze względu na możliwą obecność pozostałości białek ziemniaka - w szczególności o małej masie, np. wyjątkowo termostabilnego inhibitora karboksypeptydazy ziemniaczanej o masie cząsteczkowej 4,3 kDa (Bártová i Bárta, 2008) - przeprowadzono analizę elektroforetyczną. Analiza elektroforetyczna wody sokowej bezpośrednio przez przygotowanie podłoża hodowlanych nie potwierdziła obecności białek o wadze mniejszej niż 250 kDa [H-6]. Suchej substancja w ziemniaczanej odbiałzonej wodzie sokowej (DPW) stanowiła przeciętnie  $33,26 \pm 0,43 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Zawartość cukrów bezpośrednio redukujących wynosiła  $4,4 \pm 0,03 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$ , i jak podaje Kurcz i wsp. (2016) jest reprezentowana głównie przez glukozę, ramnozę i galaktozę. Średnia zawartość azotu wynosiła  $1,62 \pm 0,06 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Ścieki zawierały potas w stężeniach ponad 0,4%, co wynikało z dużej zawartości tego pierwiastka w surowcu roślinnym. Przeciętna zawartość fosforu, magnezu, wapnia, sodu oraz manganu przedstawiała się odpowiednio:  $0,33 \pm 0,02$ ;  $0,24 \pm 0,03$ ;  $0,10 \pm 0,01$ ;  $0,061 \pm 0,005$  oraz  $0,002 \pm 0,0002 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$  [H-7, H-8, H-9].

Celem prowadzenia hodowli skutkującej dużym plonem konieczna jest suplementacja DPW przyswajalnym źródłem węgla. W przypadku drożdży czerwonych jaki i kefirowych badano wpływ glukozy, laktozy oraz glicerolu. Stwierdzono, że plon biomasy drożdży kefirowych po hodowli w DPW suplementowanej glukożą, laktozą a także glicerolem był dość podobny niezależnie od szczepu (zakres  $9,87 \div 12,4 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) ale jednocześnie mniejszy niż plon biomasy po hodowli w podłożach kontrolnych, tj. z peptonem i ekstraktem ( $9,8 \div 14,8 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) [H-6]. Szczep *T. domesticum* PCM 2960 był zdolny do wzrostu w podłożu przygotowanym na bazie DPW, przy czym osiągał największe plony biomasy (ponad  $11 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$  po 96h) podczas obecności glicerolu. Natomiast najbardziej zasobne w tłuszcz komórki (prawie  $28\%_{\text{os.s.}}/2,75 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), obserwowano, gdy inkubowano je w wodzie sokowej suplementowanej glukożą. Glicerol nie miał pozytywnego wpływu na biosyntezę lipidów i zaobserwowano 20% lipidów w s.s. biomasy *T. domesticum*. W konsekwencji wydajność objętościowa  $2,38 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  była istotnie ( $P=0,05$ ) niższa w porównaniu do parametrów osiąganych w hodowlach z glukożą [H-7]. Zaobserwowano ogólną tendencję wyrównania średniej wydajność wolumetryczną tłuszczu z 1 litra podłoża DPW. Zakres ten dla badanych drożdży kefirowych zawierał się od 1,79 do  $2,38 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Należy zauważyć, że stosowanie czystej postaci glicerolu jako surowca do produkcji SCO jest zbyt kosztowne. Tanim źródłem glicerolu w podłożach hodowlanych może tzw. frakcja glicerynowa (odpad glicerynowy). W dużych rafineriach jest ona poddawana zabiegom oczyszczania, jednak ze względu na dużą energochłonność oraz koszty zakupu instalacji mniejsze przedsiębiorstwa produkujące biodiesel mają poważne kłopoty z jej utylizacją (Gaca 2006, Cutzu i wsp. 2013). Odpad glicerynowy zawiera głównie glicerol (50–70%), metanol (10–20%), sole (5–10%), wodę (3–10%) oraz wolne kwasy tłuszczowe (1–5%) (Chatzifragkou i Papanikolaou, 2012; Quispe i wsp. 2013). Obecność tych substancji może wpływać na wzrost drożdży i biosyntezę tłuszczów, choć w przypadku szczepów drożdży z rodzaju *Rhodotorula* nie obserwowano negatywnych efektów nawet gdy stosowano duże stężenie wymienionych substancji (Munch i wsp. 2015). Autorem koncepcji połączenia odpadu przemysłu skrobiowego oraz odpadu z produkcji biodiesla w postaci pożywek do hodowli drożdży jest prof. dr hab. Stanisław Błażej. Pomysł jednoczesnego wykorzystania tych dwóch odpadów płynnych do konstruowania pożywek ukierunkowanych na wzrost drożdży olejogennych został zgłoszony (autorzy: Iwona Gientka, Stanisław Błażej, Anna Bzducha-Wróbel) jako wynalazek do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej (Nr. zgłoszenia 408730) pod tytułem „Sposób otrzymywania biomasy drożdży olejogennych” W roku 2017 przydzielono na wynalazek prawo wyłączne Nr. 229064 [Załącznik 4, II.B.2.]. Zagadnienia opisane patentem były rozwijane przez dr inż. Annę M. Kot w ramach pracy doktorskiej zatytułowanej „Biosynteza tłuszczu oraz karotenoidów przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* w podłożach z ziemniaczaną wodą sokową i glicerolem”, której byłam promotorem pomocniczym [Załącznik 5, I.10.].

Analiza doniesień literaturowych upewniła mnie, że największą wydajność biosyntezy lipidów u grzybów obserwowano w przypadkach kiedy źródłem węgla były węglowodany, a w szczególności glukoza. Zastosowanie glukozy ujawniło większe różnice w uzdolnieniach poszczególnych drożdży niekonwencjonalnych do biosyntezy tłuszczów [H-6, H-7]. Kiedy glukoza była źródłem węgla w podłożach z peptonem i ekstraktem drożdżowym (YP) komórki *D. hansenii* 1 korzystnie wyróżniły się ponad 46% udziałem tłuszczów w komórkach [H-6]. Warunek olejogenności w tym wariacie podłoża spełniły także szczepy *D. hansenii* IG 01, *C. inconspicua* IG 11, *Z. florentina* IG 12 oraz *K. marxianus* IG 1. Natomiast w wariacie podłoża z glukozą i odbiałczoną wodą sokową udział tłuszczów powyżej 20%<sub>s.s.</sub> wyróżnił jedynie biomasę *D. hansenii* IG 01 oraz *K. marxianus* IG 1. Przydatność podłoża wyrażona wydajnością wolumetryczną wynosiła odpowiednio 2,80 oraz 3,56 g<sub>s.s.</sub>·dm<sup>-3</sup> i zauważono, że były to wartości istotnie mniejsze od tych, które szczepy osiągnęły w podłożach z ekstraktem drożdżowym i peptonem [H-6]. Szczep *T. domesticum* zgromadził w komórkach ponad 27% kiedy był hodowany z udziałem glukozy [H-7]. **Spośród badanych izolatów wyselekcjonowano *Kl. marxianus* IG 1, *T. domesticum* PCM 2960, *D. hansenii* IG 01 jako te, które są zdolne do biosyntezy tłuszczu wewnątrzkomórkowego podczas hodowli w podłożu skonstruowanym w oparciu o odbiałczoną ziemniaczaną wodę sokową i glukozę.** Zawartość tłuszczów w biomasie izolatów uzależniona była od czasu trwania hodowli i zwiększała się po 72h we wszystkich wariantach. Wyniki te potwierdzają znaną teorię o biosyntezie tłuszczów w późnej fazie wzrostu stacjonarnego. Na tym etapie badań nie prowadzono oznaczeń związanych z szybkością akumulacji źródła węgla i azotu. Natomiast istotny (P=0,05) przyrost plonu biomasy oraz zawartości tłuszczów między 3 a 4 dobą w podłożach DPW suplementowanych laktozą sugeruje, że była ona najwolniej asymilowana. Odwrotnie w podłożach z glicerolem biosynteza tłuszczów przez szczepy kefirowe w czwartej dobie nie była już tak duża [H-6]. Powiększenie skali hodowli poprzez zmianę warunków hodowli *T. domesticum* PCM 2960 z kolb (100cm<sup>3</sup>) na bioreaktor (3000cm<sup>3</sup>) zapewniło jej lepsze natlenienie (2 vvm) i mieszanie. Uzyskano wtedy większy plon biomasy i w rezultacie po 96h charakteryzowała się ona ponad 33% udziałem lipidów. Po przeniesieniu do bioreaktora wydajność objętościowa wzrosła z 2,75 do 4,87 g·dm<sup>-3</sup>, co stanowi ponad 77% lepszy wynik [H-7]. Dla porównania *T. fermentans* CICC 1368 wykazał mniejszą akumulację lipidów w podłożach melasowych (Shen i wsp. 2015), zaś *T. cutaneum* w podłożach z inuliną ok. 4,8 g·L<sup>-1</sup> (Wang i wsp. 2015). Zatem **uzdolnienia wyizolowanego z kefirów szczepu *T. domesticum* PCVA 2960 do biosyntezy lipidów są zbliżone do innych olejogennych przedstawicieli rodzaju *Trichosporon*.**

Podobnie jak w syntezie EPS, istotnym parametrem w opracowaniu pożywki ukierunkowanej na biosyntezę SCO jest początkowy stosunek C:N. Wpływ tego parametru badano podczas hodowli drożdży czerwonych *Rhodotorula glutins* var. *rubescens* LOCKR13 a wyniki przedstawiono w publikacji [H-9]. Początkowe stężenie glukozy istotnie wpływało na plon biomasy oraz zawartość tłuszczów

wewnątrzkomórkowych a także innych podstawowych składników komórki. Udział białek, tłuszczów oraz cukrów wewnątrzkomórkowych zmieniał się w czasie hodowli, co uzasadniam przemianami biochemicznymi oraz szybkością utylizacji węgla i azotu z pożywki. W przypadku podłoża YP (C:N=16:1) całkowity stopień utylizacji glukozy wynosił 97,2%. Natomiast stopień wykorzystania tego cukru nie osiągnął 56% w podłożach z największym początkowym stężeniem (C:N=67:1). W pożywkach YP nie zaobserwowano szczególnego wpływu początkowego C:N na stopień utylizacji azotu. Widoczna natomiast była taka korelacja na zawartość tłuszczu. W wariacie YPGlu5% końcowy udział lipidów w s.s. wynosił 37%, a w wariacie YPGlu20% ponad 46%. W stacjonarnej fazie wzrostu, między trzecią a czwartą dobą hodowli, zwiększała się udział tłuszczów kosztem cukrów wewnątrzkomórkowych i białek. Maksymalna końcowa wydajność objętościowa tłuszczów w podłożach YP z 20 i 15% glukozy nie różniła się istotnie (średnio 9,145 g·dm<sup>-3</sup>). Wykazano, że **szczep drożdży *Rhodotorula glutinis* var. *rubescens* LOCKR13 jest szczepem olejogennym.**

Rezultatem zastąpienia peptonu i ekstraktu drożdżowego odbiałczoną ziemniaczaną wodą sokową było odmienne kształtowanie się udziału podstawowych składników komórki w czasie inkubacji. Przede wszystkim zaobserwowano bardzo pozytywny wpływ tak skonstruowanej pożywki na wzrost badanego szczepu *Rhodotorula glutinis* var. *rubescens* LOCKR13. Końcowe plony biomasy były bardzo duże, a istotnie (P=0,05) największe ponad 38 i ponad 39 g<sub>s.s.</sub>·dm<sup>-3</sup>, kiedy stężenie glukozy wynosiło 10 lub 15%. **Wykazano zatem, że odbiałczona woda sokowa suplementowana glukozą stanowi pożywkę skutkującą ogromnym plonem biomasy drożdży czerwonych.** Stanowi to pole do planowania przyszłych doświadczeń nad utylizacją taniego źródła glukozy jako suplementu DPW. Całkowity stopień utylizacji glukozy przekraczał 95% dla wariantu DPW5% natomiast dla wariantu DPW20% wynosił tylko 26%. Analiza krzywych wzrostu wykazała, że niezależnie od początkowego C:N drożdże nie osiągnęły fazy wzrostu stacjonarnego. Sugeruje to potrzebę wydłużenia czasu hodowli w przyszłych badaniach. W porównaniu do wariantów podłoża YP zaobserwowano wysoki stopień utylizacji azotu, tj. od 68% do 52%, co oznacza, że były one lepiej przyswajalne przez komórki. Obserwowano bardzo istotny przyrost cukrów wewnątrzkomórkowych po 72h hodowli, niezależnie od wariantu podłoża, a wydajność biosyntezy tych składników była ponad 6 razy większa od wydajności lipidów (DPW10%). Zawartość cukrów zależała od początkowego C:N. Największy udział, 73% oznaczano po hodowli w podłożu DPW charakteryzującym się C:N=33:1. Z 1 grama glukozy powstało prawie 0,47g cukrów wewnątrzkomórkowych, gdyż  $Y_{s/s} = 0,469 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Podczas gdy  $Y_{L/s}$  (tłuszcz) wynosił tylko 0,047g·g<sup>-1</sup>. Niemal identyczny stosunek C:N=32:1 ale w podłożu z peptonem skutkował istotnie (P=0,05) mniejszym udziałem cukrów (42%) w biomacie drożdży. Udział białka w s.s. drożdży był większy w trzeciej dobie, a później malał. Ogólnie stwierdzono większą końcową zawartość białka po hodowli z wodą sokową. Wywnioskowano, że źródło azotu determinuje przebieg biosyntezy poszczególnych składników biomasy a woda sokowa z

glukozą nie wspomaga lipogenezę *Rhodotorula glutinis* var. *rubescens* LOCKR13. Mimo tego, wysoki plon biomasy osiągany podczas hodowli DPW z glukozą kompensował małą zawartość tłuszczów (6,94÷18,49%<sub>s.s.</sub>) i w rezultacie wydajność objętościowa biosyntezy tych związków kształtowała się w zakresie 4,10÷ 6,14 g·dm<sup>-3</sup> [H-9]. Sitepu (2013) podaje, że na gromadzenie tłuszczów ma istotny wpływ biotyna, gdyż stanowi ona grupę prostetyczną karboksylazy acetylo-CoA, która katalizuje reakcję karboksylacji acetylo-CoA do malonylo-CoA, tj. kluczowego etapu biosyntezy kwasów tłuszczowych *de novo*. Należy założyć, że wielokrotna obróbka termiczna wody sokowej (koagulacja białek na linii technologicznej, sterylizacja celem zabezpieczenia odpadu i wreszcie sterylizacja przygotowanych podłoży) skutecznie zmniejszyła stężenie biotyny.

Optymalna wartość pH podłoża hodowlanego ukierunkowanego na syntezę tłuszczów przez drożdże mieści się w przedziale 4–8 i zależy od rodzaju mikroorganizmu oraz zastosowanego źródła węgla (Enshaeieh i wsp, 2013, Załącznik 4. II.A.8.]. Podczas hodowli izolatów kefirowych jak i drożdży czerwonych w wariantach DPW obserwowano alkalizację płynów hodowlanych, zarówno [H-6, H-7, H-9]. Największe wartości pH (8,01-8,63) oznaczano w płynach pochodzących z wodą sokową i glicerolem. Silną alkalizację odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej podczas hodowli grzybów strzępkowych zaobserwował Nowak (2013). Ziemniaczana woda sokowa oprócz przyswajalnych organicznych źródeł azotu zawiera również jego nieprzyswajalne formy takie jak aminy lub iminy. W wysokiej temperaturze, podczas otrzymywania skrobi a następnie separacji białek ziemniaczanych zachodzi reakcja kondensacji pomiędzy grupami karbonyłowymi zawartymi w cukrach a pierwszorzędowymi grupami aminowymi zawartymi w aminokwasach białek. Powstające iminy (tzw. zasady Schiffa), ulegają samorzutnemu przegrupowaniu do tzw. związków Amadoriego, które z kolei polimeryzują do brunatnych produktów, jak dotąd słabo scharakteryzowanych. Prawdopodobnie nieprzyswajalne organiczne formy azotu pozostają w podłożu podczas hodowli i tym samym stanowią przyczynę alkalizacji podłoża. Z drugiej strony należy pamiętać, że brak azotu indukuje syntezę lipidów (większy stopień utylizacji azotu w podłożach YP [H-9]) a wtedy dochodzi do rozkładu AMP do amoniaku i jonu amonowego, co także może być przyczyną alkalizacji. Wzrost drożdży jest wydajniejszy, gdy pH podłoża jest kwaśne dlatego nawet najmniejszy wzrost pH środowiska stanowi dla komórki duży stres. Alkalizacja środowiska zaburza przede wszystkim homeostazę składników odżywczych i wpływa na ekspresję genów pobierania i metabolizmu glukozy. Wysokie pH powoduje przejściowy spadek stężenia cAMP (cyclic adenosine monophosphate) i zahamowanie aktywatorów kinaz białkowych PKA (protein kinase A). W wyniku inhibicji PKA czynnik transkrypcyjny Msn2/4p ulegają szybkiej aktywacji w jądrze komórkowym i aktywuje gen odpowiedzi na stres związane m.in. z syntezą trehalozy (Casado i wsp. 2011). Podłoże DPW z glukozą silniej ulegało alkalizacji, a zatem zachodzenie wyżej opisanego mechanizm aktywacji genu związanego z syntezą trehalozy wyjaśniałoby mniejszą lipogenezę oraz duży udział cukrów wewnątrzkomórkowych [H-9].

**Ad. A.4. Określenie przydatności tłuszczów pozyskiwanych z wybranych drożdży niekonwencjonalnych do celów żywieniowych**

Stale rosnące skażenie wód śródlądowych oraz mórz i oceanów w toksyczne związki takie jak dioksyne, polichlorowane bifenyle (PCB) i metale ciężkie – ołów czy rtęć, czyni niestety morską faunę źródłami szkodliwych dla zdrowia związków. W efekcie część krajów zakazała używania tłuszczów pochodzenia rybiego w preparatach przeznaczonych dla niemowląt (Patnayak i Sree, 2005). Ponadto cechy organoleptyczne tłuszczów rybich nie spełniają wymagań konsumenckich, ze względu na niepożądany smak i zapach. Pozyskiwanie tłuszczów rybich uzależnione jest od pory roku, lokalizacji połowów, gatunku ryb i od typu oraz dobrostanu ich pożywienia m.in. planktonu i mikroalg (Coreia i wsp. 2012). Alternatywy dla olejów rybich upatruje się w SCO. Oleje mikrobiologiczne są coraz lepiej znane a obok kwasu dokozaheksaenowego (DHA), także kwas  $\gamma$ -linolenowy (GLA), arachidonowy (ARA), oraz eikozapentaenowy (EPA) zostały zaakceptowane jako biotechnologiczne produkty (Patnayak i Sree, 2005). Interesującym było określenie przydatności wytworzonych tłuszczów przez drożdże niekonwencjonalne do celów żywieniowych poprzez analizę udziału kwasów tłuszczowych techniką GC-FID.

Tłuszcz ekstrahowany z biomasy *T. domesticum* po hodowli z glukozą i DPW charakteryzowała wysoka zawartość kwasu linolowego ( $^{A9,12}C18:2$ ), kwasu oleinowego ( $^{A9}C18:1$ ), kwasu palmitynowego (C16:0) oraz kwasu  $\alpha$ -linolenowego ( $^{A9,12,15}C18:3$ ). Hodowla drożdży w większej skali, czyli w bioreaktorze skutkowałą zwiększeniem udziału kwasu linolowego z  $27,45 \pm 0,11\%$  (kolba) do  $35,80 \pm 0,10\%$ , oraz kwasu  $\alpha$ -linolenowego z  $3,18 \pm 0,06\%$  do  $4,99 \pm 0,02\%$  a także eikozatrienowego ( $^{\Delta 8,11,14}C20:3$  n6). Ogólnie można stwierdzić, że zastosowanie hodowli w bioreaktorze przyniosło rezultat polegający na zwiększeniu udziału kwasów wielonienasyconych, kosztem zmniejszenia nasyconych i jednonienasyconych [H-9]. Zgodnie zaleceniami specjalistów w zakresie żywienia człowieka należy zwiększyć ilość NNKT w diecie. Obok kwasu linolowego ( $^{A9,12}C18:2$ ) szczególnie ważną rolę odgrywają kwas  $\alpha$ -linolenowy (ALA,  $^{\Delta 9,12,15}C18:3$ ) i kwas  $\gamma$ -linolenowy (GLA,  $^{\Delta 6,9,12}C18:3$ ), które należą do dwóch rodzin: n-3 i n-6. W profilaktyce chorób układu krążenia szczególnie nacisk kładzie się na prozdrowotną rolę kwasów n-3. European Food Safety Authority (EFSA) podaje, że zalecane dzienne spożycie ALA w krajach europejskich wynosi 2g. Uznano, że niższe proporcje n-6:n-3 =2,5:1 oraz 5:1 są korzystne w olejach jadalnych (Simopoulos, 2008). Stosunek tych kwasów tłuszczowych w lipidach otrzymanych z biomasy komórek drożdży *Trichosporon domesticum* PCM 2960 po inkubacji w pożywce DPW z glukozą wynosi 7,4:1, co zbliża go do właściwości oliwy z oliwek [H-9].

Prowadzone doświadczenia wykazały, że tłuszcz *Kazachstania unispora* IG 16 charakteryzuje się dużym udziałem kwasu palmitooleinowego (C16:1) (maksymalny udział 39% oznaczono po hodowli z glicerolem) [H-6]. Ten kwas tłuszczowy zapobiega apoptozie komórek  $\beta$  (Morgan i Dhayal, 2010) oraz hamuje



wzrost bakterii gram-dodatnich (Wille i Kyodenijs, 2003) a dieta bogata w orzechy macadamia, główne źródło kwasu palmitooleinowego, skutkowała zmniejszeniem cholesterolu całkowitego LDL (Griel i wsp. 2008). Ponadto **tłuszcz *Kazachastania unispora* IG 16 charakteryzował się udziałem kwasu arachidonowego (ARA, C20:4, n-6) oraz dihomo- $\gamma$ -linolenowego (DGLA, C20:3, n-6) wynoszącym odpowiednio 8,14% oraz 5,47%**. ARA pojawił się także w olejach *Kluyveromyces marxianus* IGI oraz *Zygorulaspóra florentina* IG12 przy czym jego udział wynosił 6,28 oraz 2,11% i był istotnie mniejszy niż u *Kazachastania unispora* [H-6]. ARA odgrywa ważną rolę w organizmie, gdyż jest prekursorem ikozanoidów: prostaglandyn, tromboksanów i leukotrienów (Sikorski, 2014). To związki o dużej aktywności fizjologicznej i farmakologicznej. ARA powstaje z kwasu linolowego przy udziale desaturaz (odwodornienie) i elongaz (wydłużenie łańcucha). Istotnie, u tych szczepów zaobserwowano mniejszy udział kwasu linolowego, a w przypadku *Kazachastania unispora* nie oznaczano obecności kwasu linolowego, co może świadczyć o obecności aktywnych enzymów u wymienionych szczepów drożdży [H-6]. Ponadto ocenę aktywności desaturaz (Fakas i wsp. 2009) w czasie hodowli można szacować analizując zmienność udziału kwasów tłuszczowych poszczególnych rodzin, np. C18:1/C18:0. Wedle tej metodyki wysoką aktywność  $\Delta 9$  desaturaz stwierdzono u *Rhodotorula glutinis* var. *rubescens*, przy czym miały one większe powinowactwo do kwasów tłuszczowych zawierających 18 atomów niż 16 atomów [H-9]. Niewiele mniejszą aktywność desaturaz  $\Delta 9$  z powinowactwem do kwasów tłuszczowych o 18 atomach węgla oznaczano w wykładniczej fazie wzrostu drożdży *Trichosporon domesticum* [H-7]. Drożdże *Rhodotorula glutinis* var. *rubescens* LOCKR13 po hodowli w różnych wariantach podłoży z DPW i glukozą charakteryzowały się dużym udziałem kwasu oleinowego ( $^{13}\text{C}18:1$ ) od 41 do 51% oraz palmitynowego 15,3÷17,8%. Natomiast po hodowli w podłożach YP oprócz kwasu oleinowego 33,1÷43,6%, palmitynowego 19,3÷27% obserwowano istotnie większy udział kwasu stearynowego 9,1÷16% oraz kwasu dokozanowego C22:0 4,5÷14,7% [H-9]. W przypadku innych czerwonych drożdży: *R. aurantiaca*, *R. glutinis*, *R. gracilis* i *R. mucilaginosa* zaobserwowano, że zastosowanie glicerolu w zamian glukozy zwiększyło pulę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [H-8].

#### **Ad. A5.      Analiza przydatności tłuszczów badanych drożdży do produkcji paliwa typu biodiesel**

Tłuszcz pochodzenia mikrobiologicznego zalicza się do biodiesla III generacji (Schneider i wsp. 2013). Do niewątpliwych zalet wykorzystania drobnoustrojów jako źródła glicerydów należą szybki czas generacji komórek, brak konkurencji o powierzchnię uprawną i możliwość hodowli niezależnie od szerokości geograficznej co gwarantuje powtarzalną jakość produktu oraz daje możliwość dokładnej kontroli procesu produkcji. Podstawą opłacalnej produkcji biodiesla III generacji jest wydajny szczep zdolny do gromadzenia dużych ilości tłuszczu. Ponadto SCO powinien

charakteryzować się również odpowiednim składem kwasów tłuszczowych, a w szczególności powinny w nim dominować nasycone i jednonienasycone kwasy tłuszczowe. W chwili obecnej biodiesel III generacji nie jest produkowany przemysłowo z uwagi na wysokie koszty biosyntezy (Nguyen i wsp. 2017).

Określono teoretyczną przydatność tłuszczów pochodzących z badanych drożdży niekonwencjonalnych jako surowca do uzyskania biodiesla, a w szczególności estrów metylowych FAME. Na podstawie składu kwasów tłuszczowych oraz stosując odpowiednie wzory matematyczne (Ramos i wsp. 2009, Pinzi i wsp. 2011) obliczano stopień nienasycenia (UD), liczbę cetanową (CN), długość łańcucha (LC), wartość opałową (LCV), temperaturę zapłonu (FP) oraz lepkość ( $\mu$ ) [H-6, H-7, H-9]. Liczba cetanowa jest głównym wskaźnikiem jakości paliwa, który jest związany z czasem opóźnienia zapłonu. W przypadku oleju napędowego wyższe wartości CN korelują z redukcją emisji tlenków azotu (NOx) (Knothe 2005). Zgodnie z normą europejską EN 14214 liczba cetanowa biodiesla powinna być wyższa od 54 natomiast zgodnie z amerykańską ASTM D6751 powinna być wyższa od 47. Temperatury zapłonu biodiesla powinny być wyższe niż 93°C (zgodnie z ASTM D6751) a nawet wyższe niż 122°C (zgodnie z EN 14214), co stanowi o bezpieczeństwie ich przechowywania. Wysoka lepkość kinematyczna może wpływać na rozpylanie paliwa podczas wtrysku, jak również ma wpływ na spalanie (Knothe, 2005). Lepkość dobrych FAME powinna zawierać się w zakresie 1,9÷6 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> lub 3,5÷5 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> w zależności od normy. Innym ważnym parametrem paliwa jest wartość opałowa, która reprezentuje ilość ciepła przekazywanego do komory podczas spalania i wskazuje dostępną energię w paliwie (Demirbas, 2008). Dla przykładu wartość opałowa benzyny wynosi ok. 46 MJ kg<sup>-1</sup> a oleju napędowego 43 MJ kg<sup>-1</sup> (Oliveira i da Silva, 2013). W publikacji H-9 wykazano, że tłuszcze uzyskane z biomasy *Rhodotorula glutinis* var. *rubescens* po hodowli w wodzie sokowej niezależnie od początkowej zawartości glukozy, miałyby pożądaną temperaturę zapłonu i lepkość, natomiast na tyle niską liczbę cetanową, że spełniłyby wymogi norm amerykańskich. Teoretycznie estry metylowe wyekstrahowanego tłuszczu pochodzącego z drożdży kefirowych spełniłyby europejskie normy dotyczące temperatury zapłonu (niezależnie od rodzaju szczepu i warunków hodowli - zarówno w podłożach z DPW oraz YP). Charakteryzowałyby się lepkością od 4,59 do 6,02 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>, co oznacza, że wypełniłyby tylko normy amerykańskie. Warto podkreślić, że ważny parametr CN określony bardziej rygorystyczną normą europejską, spełniłyby tłuszcze uzyskane w wyniku hodowli w wariantach podłoży DPW wszystkich izolatów poza *K. unispora* IG16 [H-6]. Trudno natomiast jednoznacznie określić wpływ źródła węgla oraz azotu na prawdopodobną liczbę cetanową CN biodiesla uzyskanego z SCO badanych drożdży. Przykładowo zastosowanie DPW oraz glicerolu zwiększyło wartość liczby cetanowej tylko dla dwóch szczepów (*D. hansenii* IGII oraz *Z. florentina* IG12) w porównaniu gdyby zastosować podłoże YP. W przypadku gdy źródłem węgla była laktoza korzystny wpływ DPW skutkujący zwiększeniem wartości CN zaobserwowano olejach pochodzących ze szczepów: *D. hansenii* IGII oraz IG01, *K. marxianus*

i *Z. florentina* IG12. Średnia wartość opałowa biodiesla uzyskanego z drożdży kefirowych wynosiłaby 37,5 MJ kg<sup>-1</sup>, co stanowi wartość niższą od benzyny i oleju napędowego. Obliczone teoretyczne wskaźniki charakteryzujące metylowane estry lipidów ekstrahowanych z biomasy *Trichosporon domesticum* PCM 2960 hodowanych na DPW z glukozą wskazały, iż nie powinny być stosowane jako paliwo typu biodiesel w silnikach Diesla. W szczególności przemawia za tym zbyt mała wartość liczby cetanowej [H-7]. Podsumowując ten aspekt badań nad wykorzystaniem tłuszczów drożdżowych należy pamiętać, że teoretyczne parametry biodiesla mogą osiągać inne wartości w praktyce. Są one determinowane m.in. obecnością fosfolipidów, wolnych kwasów tłuszczowych, trwałością surowego oleju oraz przebiegiem estryfikacji [Lewandowski i Ryms, 2013]

#### 4.3.3. Podsumowanie

Drożdże niekonwencjonalne, zarówno wyizolowane z kefirów jak i drożdże czerwone, stanowią zróżnicowaną filogenetycznie grupę mikroorganizmów tak, że możliwe jest wykorzystanie poszczególnych gatunków do wydajnej biosyntezy egzopolisacharydów oraz tłuszczów.

Na tę konkluzję złożyły się osiągnięcia szczegółowe:

- Zasilono ogólnodostępną bazę danych sekwencjami kodującymi region ITS1&ITS2 szczepów drożdży wyizolowanych z kefirów.
- Poszerzono zasoby biologiczne Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów oraz Muzeum Czystych Kultur SGGW oddając w depozyt zidentyfikowane szczepy drożdży.
- Wykazano, że analiza PCR z wykorzystaniem starterów ITS1 i ITS4 może być wykorzystywana do rozróżnienia drożdży z rodzaju *Rhodotorula* i *Sporobolomyces* a zastosowanie enzymów restrykcyjnych *HinII* i *HaellI* do jednoznacznego zróżnicowania szczepów *R. rubra* i *R. mucilaginosa*.
- Rozszerzono wiedzę o źródłach izolacji gatunków *Zygorulaspora florentina* oraz *Trichosporon domesticum*.
- Udowodniono, że kefir może być źródłem szczepów drożdży tolerujących wysokie (20%) stężenia alkoholu etylowego oraz asymilujących i fermentujących laktozę.
- Wyselekcjonowano producentów egzopolisacharydów (*C. famata* i *C. guilliermondii*) spośród drożdży izolowanych z kefirów ustalając jednocześnie, że maltoza promuje biosyntezę EPS oraz zwiększa zawartość węglowodanów w ich preparatach.
- Udowodniono, że EPS wytworzone przez *C. famata* i *C. guilliermondii* pełnią funkcję substancji zapasowych.
- Spośród badanych izolatów wyselekcjonowano *Kl. marxianus* IG 1, *T. domesticum* PCM 2960, *D. hansenii* IG 01 jako te, które są zdolne do biosyntezy tłuszczu

wewnątrzkomórkowego podczas hodowli w podłożu skonstruowanym w oparciu o odbiałczoną ziemniaczaną wodę sokową i glukozę.

- Wykazano że odbiałczona woda sokowa suplementowana glukozą stanowi pożywkę skutkującą ogromnym plonem biomasy drożdży czerwonych *Rhodotorula glutinis* var. *rubescens* LOCKR13, przy czym takie warunki hodowli bardziej promują biosyntezę cukrów wewnątrzkomórkowych niż tłuszczów. Tłuszcz ekstrahowany z biomasy tego szczepu po hodowli w różnych wariantach podłoża z DPW i glukozą charakteryzuje się dużym udziałem kwasu oleinowego (41÷51%) oraz palmitynowego (15,3÷17,8%).
- Tłuszcz ekstrahowany z *Kazachstania unispora* IG16 wyróżnia się dużym udziałem kwasu palmitooleinowego oraz udziałem kwasu arachidonowego i dihomog- $\gamma$ -linolenowego.
- Wskazano, na większą przydatność tłuszczu *Trichosporon domesticum* PCM 2960 do celów żywieniowych niż do produkcji biodiesla.

### **Perspektywa na przyszłość**

Przedstawione w pracach stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego interesujące wyniki inspirują do kontynuowania rozpoczętych badań. W chwili obecnej prowadzone są doświadczenia optymalizujące biosyntezę egzopolisacharydów przez szczepy drożdży czerwonych oraz weryfikacja metod odbiałczania surowych preparatów celem określenia ich mas molekularnych oraz struktury chemicznej. Natomiast w zakresie biosyntezy tłuszczów rozwijane są badania nad środowiskowymi i genetycznymi uwarunkowaniami intensyfikacji produkcji SCO.

**Piśmiennictwo:**

1. Antolin G, Tinaut FV, Briceno Y, i wsp. 2002. *Bioresource Technology*, 83,111–4.
2. Arroyo-López FN, Durán-Quintana MC, Ruiz-Barba JL, i wsp. 2006. *Food Microbiology*, 23,791–796.
3. Assadi MM, Pourahmad R, Moazami N. 2000. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 16, no. 6, Article ID278340, pp. 541–543.
4. Badel S, Laroche C, Gardarin C, i wsp. 2011. *Enzyme and Microbial Technology*, 48,248–252.
5. Bai M, Qing M, Guo Z, i wsp. 2010. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(9),707–714.
6. Bártová V, Bárta J. 2008. *Research in Agricultural Engineering*, 54(4),170–175.
7. Breierova E, Hromadkova Z, Stratilova E, i wsp. 2005. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung*, Tubingen 60c, 444–450.
8. Bzducha-Wróbel A, Błażej S, Molenda M, i wsp. 2015. *European Food Research Technology*, 240:1023–1034.
9. Casado C, González A, Platara M, i wsp. 2011. *Biochemical Journal*, 438(3),523–533.
10. Chatzifragkou A, Papanikolaou S. 2012. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95,13–27.
11. Cho DH, Chae HJ, Kim EY. 2001. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 95,183–193.
12. Correia M, Michel V, Matos AA, i wsp. 2012. *PloS ONE* 7(4) DOI:10.1371/journal.pone.0035072
13. Cutzu R, Coi A, Rosso F, i wsp. 2013. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(6),1009–17.
14. De Oliveira FC, Coelho ST. 2017. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75,168–179.
15. Demirbas A. 2008. *Energy Conv Man*, 49,125–130.
16. Donot F, Fontana A, Baccou JC, i wsp. 2012. *Polymers*, 87,951–962.
17. Enshaeieh M, Abdoli A, Nahvi I. 2013. *Journal of Cell and Molecular Research*, 5,17–23.
18. Esteve-Zarzo B, Belloch C, Uruburu F, i wsp. 1999. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49,329–337.
19. Fakas S, Makri A, Mavromati M, i wsp. 2009. *Bioresource Technology*, 100,6118–6120.
20. Farnworth ER. 2005. *Food Science Technology Bulletin: Functional Foods*,2(1)1–17.
21. Fleet GH.1990. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(3),199–211
22. Fröhlich-Wyder MT, “Yeasts in dairy products,” in *Yeasts in food. Beneficial and Detrimental Aspects*, T. Boekhout and V. Robert, Eds., pp. 209–237, CRC Press, USA, 2003.
23. Furuno T, Nakanishi M. 2012. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(2),178–183.
24. Gaca J. 2006. *Czysta Energia*. 11,25–28.
25. Gamba RR, De Antoni GL, Peláez AL. 2016. *Journal of Dairy Research*, 83(2),249–255.
26. Garofalo C, Osimani A, V.Milanović V i wsp. 2015 *Food Microbiology*, 49(1),123–133.
27. Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. 2001. *Journal of Dairy Research*, 68(4),639–652.
28. Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. *Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink in Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Blackwell Publishing. 2010.
29. Golić N, Čadež N, Terzić-Vidojević A, i wsp. 2013. *International Journal of Food Microbiology*, 166,294–300.
30. Griel AE, Cao YM, Bagshaw DD, i wsp. 2008. *Journal of Nutrition*, 138,761–767.
31. Grigorova D, Pavlova K, Panchev I. 1999. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 81(3),181–191.
32. Guillamón JM, Sabate J, Barrio E, i wsp. 1998. *Archives of Microbiology*, 169,387–392.
33. Ibrahim GS, Mahmoud MG, Asker MMS, i wsp. 2012. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6,401–408.
34. Iturrieta-González IA, Padovan ACB, Bizerra FC, i wsp. 2014. *PLoS ONE* 9(10),e109553.
35. Johnson VW, Singh M, Saini VS, i wsp. 1995. *Journal of Industrial Microbiology*,14,1–4.
36. Khachigian LM, Parish CR. 2004. *Cardiovascular Drug Reviews*, 22(1),1–6.
37. Knothe G. 2005. *Fuel Processing Technology*, 86,1059–1070.
38. Kot AM, Błażej S, Kurcz A i wsp. 2015a. *Postępy Mikrobiologii*, 54(4),364–373.
39. Kot AM, Błażej S, Kurcz A i wsp. 2015b. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18,428–432.
40. Kuncheva M, Pavlova K, Panchev I i wsp. 2007. *International Journal of Cosmetic Science*, 29, 377–384.
41. Kurcz A, Błażej S, Kot AM i wsp. 2016. *Postępy Mikrobiologii*, 55(1),19–26.
42. Kurtzman CP, Fell JW (eds). *The yeast a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, 1998.
43. Kurtzman CP. 2003. *FEMS Yeast Research*, 4,233–245.

44. Labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. 2009. The EFSA Journal 1176,1-11.
45. Latorre-Garcia L, Del Castillo-Agudo L, Polaina J. 2007, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(6)785–791.
46. Laurenčík M, Sulo P, Sláviková E, i wsp. 2008. International Journal of Food Microbiology, 127,176–179.
47. Lencioni L, Romani C, Comitini F, i wsp. Ciani M, Domizio P. 2016. International Journal of Food Microbiology, 3(234),36-44.
48. Lewandowski WM, Ryms M. Biopaliwa. Proekologiczne odnawialne źródła energii. WNT, Warszawa 2013.
49. Li M, Liu G., Chi Z, Chi ZM. 2010. Biomass Bioenergy, 34,101–107.
50. Lim SL, Tay ST. 2011. Res Note Tropic Biomed, 28(2),438–443.
51. Londero A, Hamet MF, De Antoni GL, i wsp. 2012. Journal of Dairy Research ,79(3), 262-271.
52. Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, i wsp. 2006. Revista Iberoamericana de Micología, 23(2),67–74.
53. Matsuo K, Isogai E, Araki Y. 2000. Journal of Clinical Microbiology, 38(10),3750–3754.
54. Messier C, Epifano F, Genovese S, i wsp. 2011. Phytomedicine, 18,380–383.
55. Morgan NG, Dhayal S. 2010. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 82(4-6),231–236.
56. Munch G, Sestric R, Sparling R, i wsp. 2015. Bioresource Technology, 185,49–55.
57. Nguyen Q, Bowyer J, Howe J i wsp. 2017. Global production of second generation biofuels: trends and influences. Dovetial Partners INC. Report
58. Nishiura Y, Nakagawa-Yoshida K, Suga M, i wsp. 1997. Journal of Medical and veterinary Mycology, 35,45–52.
59. Nowak J, Górna B, Nowak W. 2013. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość., 6(91),191-203.
60. Oliveira LE, Da Silva MLCP. 2013. Renewable Energies and Power Quality Journal, 1(11),679–682.
61. Ongol MP, Asano K. 2009. International Journal of Food Microbiology, 133(3),286-91.
62. Otes S, Cagindi O. 2003. Pakistan Journal of Nutrition, 2(2), 54–59.
63. Padilla B, Manzanares P, Belloch C. 2014. Food Microbiology, 38,160-166.
64. Pangallo D, Šaková N, Koreňová J, i wsp. 2014. International Journal of Food Microbiology, 170,38–43.
65. Papanikolaou S, Aggelis G. 2011. European Journal of Lipids Science and Technology, 113,1052–1073.
66. Patnayak S, Sree A. 2005. Letters of Applied Microbiology, 40,358-363.
67. Pavlova K, Koleva L, Krachanova M, i wsp. 2004. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20(4),435–439.
68. Pavlova K, Panchev I, Krachanova M, i wsp. 2009. Folia Microbiologica, 54(4),343–548.
69. Pedersen LL, Owusu-Kwarteng J, Thorsen L, i wsp. 2012. International Journal of Food Microbiology, 159,144–151.
70. Pinzi S, Leiva D, Arzamendi G, i wsp. 2011. Bioresource Technology, 102,7280–7288.
71. Poli A, Anzelmo G, Tommonaro G i wsp. 2010. Folia Microbiologica, 55,576–81.
72. Potato starch market: global industry trends, share, size, growth, opportunity and forecast 2018-2023. Research and Markets. The world's largest market research store. <https://www.researchandmarkets.com/reports/4535068/potato-starch-market-global-industry-trends>. Accessed 5 November 2018
73. Quispe CAG, Coronado CJR, Carvalho JA. 2013. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 27,475–493.
74. Rai AK, Kumari R, Sanjukta S, i wsp. 2016. Bioresources Technology, 219,239–245.
75. Ramos MJ, Fernández CM, Casas A i wsp. 2009. Bioresource Technology, 100, 261–268.
76. Rusinova-Videva S, Pavlova K, Panchev I, i wsp. 2010. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 24, 507-511.
77. Rusinova-Videva S, Pavlova K, Georgieva K. 2011. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 25(4),80-84.
78. Schneider T, Graeff-Hönninger S, French WT, i wsp. 2012. Journal of Combustion. Article ID 153410, 9 pages
79. Shen Q, Lin H, Wang Q, i wsp. 2015. Bioresources Technology, 176,249–256.
80. Sikorski Z. Chemia żywności. Tom 2, WNT, Warszawa, 2014.
81. Simopoulos AP. 2008. Experimental Biology and Medicine, 233,674-688.
82. Simova E, Beshkova D, Angelov E, i wsp. 2002. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 28(1),1–6.

83. Simova ED, Frengova GI, Beshkova DM. 2004. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3),512–519.
84. Sitepu IR, Sestric R, Ignatia L, i wsp..2013. *Bioresource Technology*, 144,360-369.
85. Stringini M, Comitini F, Taccari M, i wsp. 2008. *International Journal of Food Microbiology* 127,184–189.
86. Sugita T, Makimura K, Nishikawa A, i wsp. 1997. *Microbiology and Immunology*, 41,571–573.
87. Turkiewicz M. 2006. *KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych*, 55(4),307–320.
88. Van Bogaert INA, De Maeseneire SL, Vandamme EJ. Extracellular polysaccharides produced by yeasts and yeast-like fungi (Chapter 29). W: Satyanarayana T., Kunze G.: *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Science + Business Media B.V. 2009.
89. Wang J, Zhang H, Bao J. 2015. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177,1083–1098.
90. Wasilewicz-Niedbalska W. Metanoliza w; Biopaliwo, pasza, gliceryna z rzepaku, Wydawnictwa Uczelniane Akademii Rolniczo-Technicznej w Bydgoszczy, Bydgoszcz,2004.
91. Wille JJ, Kydonieus A. 2003. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 16(3),176–187.
92. Witthuhn RC, Schoeman T, Britz TJ. 2005 *International Dairy Journal*, 15(4),383–389.
93. Wolfaardt GM. Lawrence JR, Korber DR. Function of EPS. w: *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1999.
94. Zajsek K, Gorsek A. 2010. *Food and Bioproduct Processing*, 88, 55–60.
95. Zhao L, Li Y, Jiang L, Deng F. 2016. *FEMS Microbiology Letters*, 363: fnw273.

**5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**Przed uzyskaniem stopnia doktora

Początek mojej pracy badawczej związany był z realizacją pracy magisterskiej pt.: "Oznaczanie struktury inhibitorów proteiny wirusa HIV" pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Grzegorza Bujacza na Wydziale Chemii Spożywczej i Biotechnologii Politechniki Łódzkiej. Przedmiotem badań były dwa związki - izostery hydroksyetylenowe - biologicznie czynne inhibitory proteazy wirusa HIV. Syntezę związków opracowano w narodowym Instytucie Badań nad Rakiem w USA. Opracowałam warunki krystalizacji tych związków a następnie określiłam podstawowe dane krystalograficzne w oparciu o analizę rentgenograficzną z użyciem dyfraktometru monokrystalicznego: macierz orientacji, parametry komórki elementarnej, maksymalne wskaźniki Millera  $h$ ,  $k$ ,  $l$ . Wstępną strukturę udokładniano szeregiem obliczeń metodą najmniejszych kwadratów i ustalono współrzędne atomów badanych związków, obliczono kąty drgań termicznych atomów, długości wiązań, wartości kątów torsyjnych oraz kątów między płaszczyznami przechodzącymi przez pierścienie aromatyczne cząsteczek.

Studia doktoranckie na Wydziale Technologii Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem dr hab. inż. Wandy Duszkiewicz-Reinhard, prof. SGGW rozpoczęłam w roku 2002. Prowadziłam badania nad optymalizacją biokonwersji kwasu *trans*-cynamonowego do L-feniloalaniny przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula mucilaginosa*. To jednoetapowy proces z wykorzystaniem komórek drożdżowych charakteryzujących się aktywnym enzymem amoniakolizy feniloalaninowej [EC4.3.1.5] dla której substratami są kwas *trans*-cynamonowy oraz amoniak. Określiłam, że wartość pH istotnie wpływa na wydajność biokonwersji a najbardziej optymalne wynosi 11 [Załącznik 4: II.J.1]. Natomiast optymalne początkowe stężenie kwasu *trans*-cynamonowego wynosiło 50mM, i skutkowało wytworzeniem 4.68mM L-Phe [Załącznik 4: II.J.2]. Uzupełnieniem części badań jest praca przeglądowa opisująca aktualny stan wiedzy dt. tego zagadnienia, tj: charakterystykę i zastosowanie L-Phe, strukturę i właściwości amoniakolizy feniloalaninowej, charakterystykę drożdży z rodzaju *Rhodotorula*, omówiono poszczególne etapy otrzymywania L-Phe, w tym parametry indukcji enzymu, parametry biokonwersji oraz metody oczyszczania feniloalaniny [Załącznik 4: II.C.2.1]

W roku 2004 zostałam stypendystką Marie Curie Training Site [Załącznik 5: II.G.1]. Pod kierunkiem Prof. Barbel Hähn-Hägerdal oraz Prof. Marie-Francoise Gorwa-Grauslund w Department of Applied Microbiology, Lund Institute of Technology, Lund University (Szwecja) realizowałam projekt dotyczący biosyntezy kwasu szikimowego przez drożdże. Kwas szikimowy stanowi substancję do syntezy inhibitora neuraminidazy (GS4104) oraz środków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej a szlak jego biosyntezy stanowi dobre źródło projektowania środków przeciwdrobnoustrojowych, gdyż nie występuje w organizmach zwierzęcych. W porównaniu z funkcjonowaniem szlaku szikimowego w innych organizmach



w komórkach drożdży występuje białko AROM (produkt genu ARO1) [Załącznik 4: **II.C.2.2** - opublikowany po doktoracie]. Stosując narzędzia planowania statystycznego dokonałam optymalizacji podłoża skutkującego biosyntezą kwasu szikimowego (glifosatu i różnych dodatków L-Phe, L-Tyr oraz L-Trp). Podłoże zawierające glifosat (5 $\mu$ M) oraz L-Trp (1  $\mu$ M) skutkowało największą zawartością kwasu szikimowego w podłożu. Wykazałam, że biosynteza kwasu szikimowego zachodzi podczas logarytmicznej fazy wzrostu. Potwierdziłam, że aminokwasy aromatyczne regulują syntezę enzymów szlaku szikimowego na zasadzie regulacji produktem. Wyniki przedstawiałam w formie referatu [Załącznik 4: **II.I.1.**]. Po pierwszej 6 miesięcznej wizycie w roku 2004, zaproszono mnie na kolejne 3 miesiące w roku 2005. Podczas drugiego stypendium [Załącznik 5: **II.G.2.**] podjęłam próbę opracowania metody oznaczania aktywności kinazy szikimianowej w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Uzyskane wyniki przedstawiłam w formie referatu podczas Internal seminars in Applied Microbiology [Załącznik 4: **II.I.2.**]. Pragnę nadmienić, że w okresie bliskim mojego stażu (2007r.) Lund University w kategorii *LIFE* zajmował 50 miejsce wg. Academic Ranking of World Universities (tzw. listy szanghajskiej).

Doświadczenia, które nabyłam podczas stażu naukowego skłoniły mnie do zmiany zagadnień realizowanych pracą doktorską. Na realizację badań uzyskałam grant promotorski 2 P06T 058 29 [Załącznik 5: **II.G.3**]. Celem projektu było określenie zmian w metabolizmie komórkowym drożdży wywołanych różną zawartością kwasu *p*-aminobenzoesowego (PABA). Jednoznacznie wskazałam, że kwas *p*-aminobenzoesowy zmienia metabolizm drożdży w taki sposób, że możliwa jest nadprodukcja kwasu szikimowego. W dawce 200  $\mu$ g PABA /dm<sup>3</sup> promuje biosyntezę kwasu szikimowego niezależnie od stosowanego szczepu drożdży [Załącznik 4: **II.J.3** - opublikowany po doktoracie], co pozwoliło stwierdzić, iż kwas *p*-aminobenzoesowy jest inhibitorem szlaku szikimowego. Wykazałam, że dawki PABA w zakresie od 0,02 do 100  $\mu$ g PABA cm<sup>-3</sup> wywołują istotny wzrost zawartości azotu w biomacie komórkowej drożdży [Załącznik 4: **II.C.2.3** - opublikowany po doktoracie]. Kwas *p*-aminobenzoesowy obok 2-amino-4-hydroksy-6-metylopterydiny oraz kwasu glutaminowy stanowi zasadniczy element cząsteczki kwasu foliowego zatem wysunęłam hipotezę, że zmiana jego zawartości w podłożu może regulować zawartość folianów w biomacie drożdży. Nawiązałam współpracę z prof. dr hab. Elżbietą Gujską z Katedry Towaroznawstwa i Badań Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, która umożliwiła mi oznaczenie folianów ogółem w biomacie badanych drożdży metodą HPLC. Zastosowana metoda pozwalała również na określenie ich składu. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że PABA wpływa na zdolność gromadzenia folianów przez badane szczepy drożdży. Suplementacja podłoża mineralnego PABA w stężeniu od 1 do 25  $\mu$ g PABA w 1 cm<sup>3</sup> promowała biosyntezę folianów przez szczep *S. cerevisiae* 2200. Większa zawartość PABA (od 50  $\mu$ g cm<sup>-3</sup>) hamowała biosyntezę folianów. Odmianą zależność stwierdzono dla haploidalnego szczepu *S. cerevisiae* CEN.PK 7D-113, który nie reagował zmianą wydajności biosyntezy folianów mimo suplementacji podłoża

mineralnego PABA. Kwas *p*-aminobenzoowy dodawany do podłoża mineralnego i jak również melasowego nie wpływał na rodzaj wytwarzanych form folianów, wśród których dominowały dwie: 5-CH<sub>3</sub>-THF (5-metylotetrahydrofolian) i THF (tetrahydrofolian). Szczep *S. cerevisiae* CEN.PK charakteryzował się istotnie większą zawartością wolnych folianów (oznaczana metodą mikrobiologiczną z użyciem szczepu referencyjnego *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469) w podłożu mineralnym, zaś szczep *S. cerevisiae* 2200 w podłożu melasowym [Załącznik 4: II.C.2.4-opublikowany po doktoracie].

Podsumowując, moje pozostałe osiągnięcia przed uzyskaniem stopnia doktora, zrealizowałam w obrębie następujących zainteresowań badawczych:

1. oznaczanie struktury inhibitorów proteiny HIV
2. optymalizacja biokonwersji kwasu *trans*-cynamonowego do L-fenylalaniny przez drożdże *Rhodotorula mucilaginosa*
3. badania nad biosyntezą kwasu szikimowego przez drożdże wraz opracowaniem metody oznaczania aktywności kinazy szikimianowej *Saccharomyces cerevisiae*
4. badania na wpływie kwasu *p*-aminobenzoowego na metabolizm drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

#### Po uzyskaniu stopnia doktora

#### **Badanie biosyntezy folianów przez drożdże**

W 2007r. zostałam zatrudniona na stanowisko asystenta w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności SGGW.

Początkowo wykorzystywałam nabyte podczas realizacji pracy doktorskiej umiejętności oznaczania zawartości folianów metodą mikrobiologiczną, m.in. w biomacie szczepów drożdży piekarski [Załącznik 4: II.J.4.] oraz w mąkach [Załącznik 4: II.J.5.]. Następnie uzyskałam dofinansowanie na realizację zadania badawczego w ramach wewnętrznego trybu konkursowego dla młodych pracowników [Załącznik 5: II.G.4.]. Zakres badań obejmował izolację, namnażanie oraz oznaczanie zawartości folianów metodą mikrobiologiczną w biomacie drożdży po ich ekstrakcji enzymatycznej z użyciem koniugazy (samodzielnie ekstrahowanej ze sproszkowanych nerek świńskich), proteiny i amylazy. Zawartość folianów w szczepach wahała się od 161 do 2711µg/100g mokrej biomasy i była zależna od szczepu. Do szczepów których biomasa zawierała najmniej folianów należą *Candida nanaspora* i *Pichia fermentas*. Największą ilość folianów oznaczono w biomacie drożdży *Candida famata*, *Candida inconspicua* oraz *Cryptococcus humicolus*. Otrzymane wyniki przestawiłam podczas Seminarium Wydziału Nauk o Żywności (2012r.). W pracy [Załącznik 4: II.C.2.5.] dokonano przeglądu produktów spożywczych wzbogaconych w kwas foliowy dostępnych na rynku polskim.

Wykazano, że największy udział produktów wzbogaconych to płatki śniadaniowe (31%), soki napoje i nektary (23%) oraz żywność dla niemowląt (16%).

### **Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej żywności fermentowanej**

Piśmiennictwo naukowe wielokrotnie donosiło, że bakterie *Lactobacillus rhamnosus*, m.in. *L. rhamnosus* ST461BZ oraz ST462BZ wytwarzają bakteriocynę rhamnozynę A. Celem badań była ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej płynów pochodzących z *L. rhamnosus* ATCC 7469 (szczep referencyjny w mikrobiologicznej metodzie oznaczania folianów) oraz weryfikacja zdolności szczepu do biosyntezy bakteriocyn. Aktywność przeciwdrobnoustrojową oznaczano metodą słupkowo-dyfuzyjną, krążkowo-dyfuzyjną oraz w podłożach płynnych w warunkach Bioscreen C wobec *E. coli*, *S. Enteritidis*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* oraz *B. cereus*. Badania pozwoliły na ustalenie, że szczep *L. rhamnosus* ATCC 7469 nie wytwarza bakteriocyn [Załącznik 4: II.C.2.14].

Tempeh to tradycyjny indonezyjski produkt otrzymywany z soi w wyniku naturalnej fermentacji przy udziale bakterii mlekowych, drożdży i szczepów pleśni z rodzaju *Rhizopus*. Spożywanie tempehu hamuje biegunki a za prawdopodobny czynnik antybakteryjny uznaje się peptyd o masie cząsteczkowej 5500 Da wytwarzany przez *Rhizopus oligosporus*. Podjęto próbę zbadania ewentualnych właściwości przeciwdrobnoustrojowych tempehu produkowanego w Polsce. Wykazano, że produkty wykazywały istotną aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do bakterii: *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923 i *S. Enteritidis* ATCC13076. Stopień zahamowania wzrostu bakterii był różny w zależności od rodzaju produktu (tempeh naturalny i wędzony), jak również badanego szczepu bakterii i wynosił od 1,6% do 24,22%. Największą wrażliwość na składniki aktywne obecne w obu badanych rodzajach tempeh wykazywały bakterie *S. aureus* ATCC 25923 i *S. Enteritidis* ATCC 13076 [Załącznik 4: II.C.2.8].

### **Badanie jakości mikrobiologicznej żywności minimalnie przetworzonej, ziół i kosmetyków**

Propagowanie zdrowego trybu życia, zmiany nawyków żywieniowych konsumentów wyzwolił w ostatnich latach popyt na świeżą a jednocześnie wygodną żywność. Tendencje przyczyniły się do zwiększonej podaży żywności minimalnie przetworzonej, która jest szczególnie narażona na rozwój niepożądaną mikroflory a przez to może stanowić zagrożenie dla bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów.

W związku z tym realizowałam badania określające jakość mikrobiologiczną żywności minimalnie przetworzonej. Dostępne w handlu niepasteryzowane soki warzywne ze względu na duże rozdrobnienie surowca, skład chemiczny oraz wysokie pH stanowią one doskonałe środowisko do rozwoju mikroflory. Badane soki warzywne były wolne od bakterii chorobotwórczych *Salmonella* oraz *Staphylococcus aureus* jak również od bakterii psychrofilnych, co stanowi warunek bezpiecznego przechowywania

produktów w temperaturze chłodniczej. W porównaniu z innymi produktami warzywnymi mało przetworzonymi soki jednodniowe charakteryzowały się mniejszą liczbą mezofilnych bakterii tlenowych a także bakterii fermentacji mlekowej i drożdży. Obserwowano natomiast niepokojące wyniki w zakresie wskaźników sanitarnych, t.j. wysoką liczbę bakterii z grupy coli oraz enterokoków (średnio  $10^5$  jtk/cm<sup>3</sup>) [Załącznik 4: **II.C.2.6.**] Przechowywanie soków w warunkach chłodniczych zwiększyło liczbę niektórych parametrów mikrobiologicznych, w tym ogólną liczbę drobnoustrojów, liczbę grzybów oraz wskaźników sanitarnych nie zwiększyło natomiast liczby bakterii fermentacji mlekowej [Załącznik 4: **II.C.2.7.**]. Badałam jakość mikrobiologiczną powietrza w bufetach uniwersyteckich metodą sedymentacyjną. Określono, że dominującą mikroflorę stanowiły bakterie mezofilne tlenowe należące do rodzaju *Micrococcus*, *Tetracoccus*, *Sarcina* i *Bacillus*, przy czym ich liczba w 1m<sup>3</sup> wynosiła od  $10^1$  do  $10^3$  jtk. Wyizolowano szczep bakterii patogennych *Staphylococcus caprae*. Stwierdziłam niski poziom zanieczyszczeń, niezależnie od miejsca badawczego co świadczyło o prawidłowej konserwacji systemów wentylacyjno-klimatyzacyjnych w obiektach poddanych badaniu. [Załącznik 4: **I.J.11.**]

W latach 2008-2011 wykonywałam ekspertyzy kosmetyków dla Laboratorium Kosmetyczne dr Irena Eris. Prowadziłam testy obciążeniowe surowców, półproduktów i produktów kosmetycznych zakażonych pleśniami, co miało celu sprawdzanie skuteczności układów konserwujących kosmetyków [Załącznik 4: **II.K.1.**]. W latach 2011-2016 wielokrotnie współpracowałam z Wydziałem Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu SGGW, późniejszym Wydziałem Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, przygotowując wspólnie z prof. dr hab. Małgorzatą Gniewosz ekspertyzy z zakresu analizy mikrobiologicznej dostarczanych próbek suszu różnych części roślin: liści, kwiatów, kłaczy i kory pozyskiwanych z upraw doświadczalnych w otwartym terenie i w systemie szklarniowym [Załącznik 4: **II.K.2.**]. Zakres prowadzonych przeze mnie analiz obejmował oznaczanie liczby bakterii mezofilnych tlenowych, liczby bakterii mezofilnych tlenowych przetrwalnikujących, liczbę drożdży i grzybów pleśniowych, miano coli, obecności *Escherichia coli* w 1g, pałeczek *Salmonella* w 25 g, gronkowców koagulazododatnich w 0,1 g jak również bakterii przetrwalnikujących beztlenowych redukujących siarczyny w 1g.

### **Pozyskiwanie fagów do zastosowań w utrwalaniu żywności**

Do grupy żywności minimalnie przetworzonej typu „ready to eat” zalicza się m.in. mieszanki sałat oraz kiełki. Przypadki poważnych zatruc, w tym zgonów, po spożyciu kiełków (Niemcy, 2011r.) oraz ich duże obciążenie mikroflorą bakteryjną wymusza opracowanie technologii produkcji zapewniającej ich bezpieczeństwa oraz jakość. W tym miejscu zainteresowałam się koncepcją stosowania fagów do polepszania jakości mikrobiologicznej żywności minimalnie przetworzonej. W związku z tym realizowano badania, których celem było pozyskiwanie fagów, ich charakterystyka oraz próba aplikacji do kiełków celem wydłużenia trwałości. Prace te realizowane były we

współpracy ze studentami Koła Naukowego Technologów Żywności SGGW oraz z merytorycznym wsparciem prof. dr hab. Stanisława Błażejaka. W pierwszym etapie prac izolowano fagi i określano ich aktywność lityczną wobec bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* metodą kropelkową oraz określano miana faga [Załącznik 5: **I.8.a.**] Materiał do izolacji fagów stanowiły próbki wody różnego pochodzenia, m.in. woda ściekowa, ze zbiorników naturalnych oraz przydomowej studni. Najlepszym źródłem bakteriofagów była woda ściekowa, z tego względu, iż jest to najbardziej zanieczyszczone środowisko, obciążone substancjami odżywczymi co stwarza dobre warunki do rozwoju bakterii a zatem do mnożenia cząstek fagowych. Następnie wpadłam na pomysł wykorzystania automatycznego analizatora wzrostu Bioscreen C do pomiaru szybkości lizy komórek bakteryjnych przez bakteriofagi. Otrzymane wyniki przedstawiono podczas Sesji Studenckich Kół Naukowych w Szczecinie, gdzie zostały nagrodzone wyróżnieniem w bloku przyrodniczym [Załącznik 5: **I.8.b.**]. Opracowana technika wykorzystania Bioscreen C do pomiaru szybkości lizy została wykorzystana podczas realizacji kolejnych doświadczeń. Kolejno analizowano jakość mikrobiologiczną kiełków, mieszanek sałat, soków jednodniowych w terminie przydatności do spożycia oraz 48h po jego zakończeniu. Badane produkty spełniały wymagania obowiązujących norm, jednak wykazano wysokie zanieczyszczenie produktów drobnoustrojami saprofitycznymi, np. OLD mezofilnych przekraczała  $8 \times 10^8$  jtk/g kiełków,  $7 \times 10^7$  jtk/g liści szpinaku oraz  $4 \times 10^6$  jtk/cm<sup>3</sup> soku marchwiowo-selerowego. Podczas przechowywania liczba bakterii psychrofilnych i pschrotrofowych zwiększała się o 1-2 rzędy logarytmiczne w kiełkach a w przypadku soków nawet o 3 rzędy. Soki warzywne były obciążone beztlenowcami redukującymi siarczynę co prawdopodobnie było związane ze środowiskiem uprawy warzyw przeznaczonych na soki [Załącznik 5: **I.8.d.**, Załącznik 4: **II.C.1.7.**]. Wynikiem doświadczeń było utworzenie biblioteki czystych kultur bakterii dominujących w badanych produktach minimalnie przetworzonych. Następnie ze ścieków komunalnych wyizolowano 29 wirusów infekujących bakterie dominujące w kiełkach. Przygotowano koktajle fagowe, które stosowano jako oprysk na produkt, który pakowano w atmosferze ochronnej (kiełki i liście) lub w postaci płynnej do soków, i po okresie inkubacji porównywano ogólną liczbę drobnoustrojów wobec prób kontrolnych. Obserwowano istotne zmniejszenie OLD a tym samym wykazano możliwość przedłużenia trwałości mikrobiologicznej z użyciem koktajlów fagowych [Załącznik 5: **I.8.e.**]. Badania morfologiczne z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) ujawniły, iż większość wyizolowanych fagów należy do rzędu *Siphoviridae* oraz *Myoviridae*. Określono wpływ temperatury (od -20°C do 70°C) oraz pH (od 3 do 12) na aktywność lityczną fagów wobec szczepów bakterii pochodzących z kiełków *Klebsiella ornithinolytica* oraz *Escherichia coli*. Jednoznacznie wykazano, że spośród badanych czynników kwasowość czynna środowiska silniej osłabia zdolność fagów do infekcji komórek gospodarzy [Załącznik 4: **II.C.1.8.**]. Wartościowym efektem prowadzonych doświadczeń jest opracowana kolekcja kilkudziesięciu szczepów bakterii dominujących w żywności „ready-to-eat” oraz infekujących je fagów. Kolekcja stanowi

źródło materiału biologicznego do realizacji dalszych prac naukowych z tego zakresu a równocześnie może być wykorzystana do opracowania nowatorskich zajęć dydaktycznych.

### **Pozyskiwanie cennych metabolitów mikroorganizmów hodowanych na tanich i odpadowych podłożach**

Równolegle kontynuowałam swoje zainteresowania naukowe związane z biotechnologicznym pozyskiwaniem cennych metabolitów w szczególności w oparciu o tanie i odpadowe podłoża. Uczestniczyłam w wielu pracach prowadzonych w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności skoncentrowanych wokół wielowątkowego projektu dt. zagospodarowania glicerolu odpadowego.

Biotransformacja glicerolu do DHA jest katalizowana przez enzym dehydrogenazę glicerolową (GlyDH, EC 1.1.99.22) związaną z błoną cytoplazmatyczną komórek *Gluconobacter oxydans*. Możliwość zagospodarowania glicerolu odpadowego tą metodą jest opracowywana przez dr inż. Lidię Stasiak-Różańską. Dihydroksyaceton (DHA) to ketotrioza stosowana jako składnik aktywny środków kosmetycznych przeznaczonych do samoopalania. Stwierdzono, że dla uzyskania produktywnych komórek *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 pożywka hodowlana powinna zawierać glicerol w stężeniu 30 g L<sup>-1</sup> oraz istotne jest jednoczesne zapewnienie prawidłowej kwasowości pożywki (pH 8,0) stabilizującej aktywność GlyDH [Załącznik4: II.A.1.]. Wykorzystanie unieruchomionych komórek bakterii octowych umożliwiło otrzymanie 9 g DHA L<sup>-1</sup> przy utylizacji 50% glicerolu, a kolejne użycie unieruchomionego biokatalizatora skutkowało otrzymaniem 8,7 g DHA L<sup>-1</sup> w dwukrotnie krótszym czasie [Załącznik 4: II.A.9.]. W zakresie tych badań służyłam swoją doświadczeniem dt. procesów biotransformacji podczas analizy i interpretacji wyników.

W ramach współpracy z dr inż. Anną Bzduchą-Wróbel, która koncentruje się na pozyskiwaniu β-glukanu pochodzenia drożdżowego, przeprowadziłam część doświadczeń oceniających wpływ zastosowanych metod dezintegracji na wydajność wydzielania materiału genetycznego z komórek badanych drożdży [Załącznik 4: II.A.2.]. Obecnie biorę udział jako wykonawca w projekcie GluCan – technologia wytwarzania funkcjonalnych preparatów o wysokiej zawartości β(1,3)/(1,6)-glukanu drożdży *Candida utilis* o właściwości wiązania mykotoksyn w konkursie Inkubator Innowacyjności i komercjalizacja wyników prac B+R w jednostkach naukowych i przedsiębiorstwach” w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 (Działanie 4.4.), którego kierownikiem jest dr inż. Anna Bzducha-Wróbel [Załącznik 4: II.G.5.]. W tym projekcie jestem odpowiedzialna za prowadzenie hodowli drożdży w warunkach bioreaktora. Wykazano, że drożdże *C. utilis* hodowane w podłożu z ziemniaczaną wodą sokową oraz glicerolem są bogatym źródłem β(1,3)/(1,6)-glukanu.

Byłam promotorem pomocniczym pracy doktorskiej pt. Biosynteza tłuszczu oraz karotenoidów przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* w podłożach z ziemniaczaną wodą sokową i glicerolem autorstwa dr inż. Anny M. Kot (obrona pracy z wyróżnieniem:

7.12.2018r.). Ustalono, że badane szczepy drożdży wykazały zarówno zdolność do utylizacji glicerolu (nawet powyżej 99%) jak również związków azotowych obecnych w wodzie sokowej (do 67,5%). Biomasa (s.s.) drożdży *Rhodotorula gracilis* ATCC 10877 uzyskana po hodowli z ziemniaczaną wodą sokową oraz glicerolem odpadowym w stężeniu 3% zawierała od 10,5 do 15,2% tłuszczów, przy czym tłuszcz taki charakteryzował się największym udziałem kwasu linolowego (28%) jeśli ekstrahowany był po hodowli w warunkach bioreaktora. Ustalono, że zawartość karotenoidów ogółem w biomacie szczepów drożdży *Rhodotorula* mieściła się w zakresie od 40 do 360  $\mu\text{g/g}_{\text{s.s}}$ , a obniżona temperatura najefektywniej indukowała proces ich biosyntezy. Ponadto możliwe było regulowanie udziałem  $\beta$ -karotenu, torularodyny oraz torulenu poprzez sterowanie składem podłoża oraz warunkami hodowli. Zastosowanie naświetlania (w zakresie widzialnym) zwiększyło udział torularodyny, zastosowanie nadtlenu wodoru zwiększyło udział torulenu a obniżenie temperatury hodowli wraz z dodatkiem chlorku sodu ukierunkowało syntezę na  $\beta$ -karoten.

Za istotny aspekt mojego rozwoju naukowego postrzegam wykonywanie ekspertyz naukowych dla podmiotów zewnętrznych w zakresie analizy jakości mikrobiologicznej kosmetyków i ziół [Załącznik 4: **II.K.1.**, **II.K.2.**]. Ponadto przygotowywałam czyste kultur drożdży winiarskich dla podmiotów zewnętrznych [Załącznik 4: **II.K.3.**] oraz klientów indywidualnych, a także ekspertyzę dt. doboru szczepu drożdży do prowadzenia fermentacji alkoholowej nastawów gorzelniczych z sacharozą wraz z opracowaniem sposobu ich namnażania [Załącznik 4: **II.K.5.**]. Jestem przekonana, że udział w ekspertyzach przyczynia się do budowania i rozwijania relacji z otoczeniem społeczno-gospodarczym uczelni w której pracuję.

### **Przechowywanie szczepów referencyjnych**

Za ogromnie istotny elementem mojego rozwoju naukowego uważam doświadczenie, które zdobyłam będąc współkuratorem Muzeum Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności (od 2009 do 2018). W chwili obecnej Muzeum dysponuje ponad 120 szczepami bakterii, w tym kilkudziesięcioma z II grupy ryzyka, 130 szczepami drożdży (winiarskie, gorzelnicze, piekarskie, piwowarskie i inne) oraz ponad 30 szczepami pleśni. Do moich obowiązków należało gromadzenie i przechowywanie szczepów drobnoustrojów w należyтым dobrostanie (w stanie zapewniającym stabilność fizjologiczną, biotechnologiczną i genetyczną), tak aby mogły służyć celom naukowym oraz dydaktycznym. Praca ta wymagała ode mnie wiedzy z zakresu fizjologii, uzdolnień biochemicznych oraz wymagań pokarmowych i środowiskowych zarówno drożdży i pleśni jak również bakterii. Wymagała także umiejętności odpowiedniego doboru metod przechowywania gwarantujących wysoką przeżywalność oraz stabilność genetyczną. Natomiast w przypadku wprowadzania do kolekcji szczepów izolowanych ze środowiska umiejętności identyfikacji mikroorganizmów metodami klasycznymi z zastosowaniem odpowiednich pożywek namnażających i selektywnych.

Podsumowując, moje pozostałe osiągnięcia naukowe **po uzyskaniu stopnia doktora** dotyczą następujących obszarów badawczych:

1. badania nad biosyntezą folianów przez drożdże
2. badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej żywności fermentowanej
3. badania jakości mikrobiologicznej żywności minimalnie przetworzonej, ziół i kosmetyków
4. pozyskiwania fagów do zastosowania w utrwalaniu żywności
5. pozyskiwania cennych metabolitów mikroorganizmów hodowanych na tanich i odpadowych (m.in. dihydroksyaceton,  $\beta$ -glukan)
6. przechowywanie szczepów referencyjnych.



## **6. Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego**

Do moich zainteresowań naukowych zaliczyłabym aktywność **w zakresie biotechnologii i mikrobiologii żywności** stanowiących **integralną część dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia**.

Wśród zainteresowań wymieniałabym najważniejsze:

1. Pozyskiwanie składników odżywczych metodami biotechnologicznymi poprzez regulację warunków hodowli drożdży, w szczególności niekonwencjonalnych (badań nad metabolizmem drożdży – biosynteza kwasu szikimowego, folianów, egzopolisacharydów i tłuszczów).
2. Badania nad możliwością utylizacji surowców odpadowych (ziemniaczana woda sokowa, glicerol odpadowy) przez drobnoustroje, zarówno drożdże i bakterie.
3. Badania nad jakością żywności (monitorowanie jakości mikrobiologicznej żywności, bioróżnorodność mikrobiologiczna żywności, poszukiwanie czynników przeciwdrobnoustrojowych, wykorzystanie fagów w kształtowaniu jakości żywności).

**Podsumowując, na mój dorobek naukowy składa się:**

- 15 artykułów w czasopismach wymienionych w bazie Journal Citation Reports (*Applied Microbiology and Biotechnology, BioMed Research International, Electronic Journal of Biotechnology, European Food Research and Technology, Fungal Biology Review, Microbial Cell Factories, Molecules, Postępy Mikrobiologii, Potato Research*)
- 20 artykułów w czasopismach wymienionych w części B wykazu MNiSW
- 7 rozdziałów w monografii naukowej
- 1 redakcja monografii naukowej
- 2 patenty krajowe
- 5 referatów wygłoszonych na międzynarodowych konferencjach tematycznych
- 5 referatów wygłoszonych na krajowych konferencjach tematycznych
- 29 komunikatów naukowych (postery)
- 2 wielomiesięczne (3 i 9 miesięczne) naukowe staże zagraniczne w prestiżowym ośrodku naukowym
- 8 sekwencji DNA zdeponowanych w GenBank®
- 1 szczep zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM)
- 12 ekspertyz
- 2 sprawozdania z grantów
- 10 recenzji artykułów naukowych w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym
- Udział w 2 projektach badawczych w roli wykonawcy
- Udział w 2 projektach badawczym w roli kierownika
- 1 pomocnicze promotorstwo pracy doktorskiej

**Podsumowanie scjentometryczne moich publikacji wygląda następująco:**

- Punkty MNiSW= **640<sup>a</sup>**
- Sumaryczny IF = **30,927<sup>b</sup>**
- Liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Sciences = **118**  
(w tym bez autocytowań = **104**)
- Index Hirsha wg bazy Web of Sciences = **5** [w dniu 25.03.2019r.]

<sup>a</sup> Liczba punktów zgodnie z wykazem czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach wg. Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 12 grudnia 2016 r. (Dz. U. 2016 r. poz. 2154) oraz wg Komunikatu MNiSW z dnia 26.01.2017

<sup>b</sup> Sumaryczny Impact Factor (IF)\* z roku publikacji (w przypadku publikacji z roku 2019 podano IF dla roku 2018)