

Autoreferat
uwzględniający opis osiągnięć naukowych związanych
z postępowaniem habilitacyjnym

dr inż. Anna Maria Bzducha-Wróbel

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

Warszawa, 2019

Spis treści		Str.
1.	Dane personalne	3
2.	Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
3.	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych i innych	4
4.	Informacja o odbytych urloпах macierzyńskich i rodzicielskich	4
5.	Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789)	5
5.1.	Tytuł osiągnięcia naukowego	5
5.2.	Wykaz cyklu publikacji monotematycznych stanowiących osiągnięcie będące podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego wraz z określeniem wkładu własnego wnioskodawcy w powstanie tych prac oraz danymi bibliometrycznymi	5
5.3.	Podsumowanie danych bibliometrycznych cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie	7
5.4.	Omówienie celu naukowego wskazanego osiągnięcia, uzyskanych wyników oraz ich ewentualnego wykorzystania	8
5.4.1.	Wprowadzenie	8
5.4.2.	Cel badań i hipotezy badawcze	11
5.4.3.	Omówienie wyników przeprowadzonych badań	13
5.4.4.	Podsumowanie i możliwość wykorzystania uzyskanych wyników i dalsze perspektywy badawcze	31
5.4.5.	Wykaz cytowanej literatury	32
6.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	34
6.1.	Obszary zainteresowań naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora	34
6.2.	Obszary zainteresowań naukowych po uzyskaniu stopnia doktora	39
7.	Podsumowanie liczbowe dorobku naukowo-badawczego	47
7.1.	Podsumowanie danych bibliometrycznych całościowego punktowanego dorobku naukowego	47
7.2.	Zestawienie liczbowe całościowego dorobku naukowego niepuktowanego	49

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: **Dr inż. Anna Maria Bzducha-Wróbel**

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

Nr ORCID 0000-0002-5583-2432

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

19.06.2009 **Doktor nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia.**
Specjalność: Biotechnologia żywności
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ wybranych szczepów probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* na zawartość kwasu linolowego o wiązaniach skoniugowanych w tłuszczu modelowych serów dojrzewających”.
Promotor: prof. dr hab. Mieczysław W. Obiedziński

23.07.2004 **Magister inżynier**. Wydział Nauk o Żywności SGGW w Warszawie; *Kierunek:* Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka; *Specjalność:* Ocena Jakości Żywności;
Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ hydrolizy enzymatycznej kazeiny na jej synergizm z kwasem askorbinowym i β -karotenem w modelowych układach oksydacyjnych”.
Promotor: dr inż. Rafał Wołosiak

10.2014 - 06. 2015 **Studia Podyplomowe:** Ochrona Własności Intelektualnej (V Edycja), Uniwersytet Warszawski, Wydział Prawa i Administracji

10.2011 – 06.2012 **Studia Podyplomowe:** Biologia Molekularna, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

02.2009 – 06.2009 **Studia Podyplomowe** w zakresie Doskonalenia Pedagogicznego, SGGW w Warszawie, Wydział Nauk Humanistycznych

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych i innych

01.01.2010 - obecnie	Adiunkt , SGGW w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
01.07.2009 -31.12.2009	Asystent z doktoratem , SGGW w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
30.12.2008-30.06.2009	Asystent , SGGW w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
06.2007 – 08.2008 (część etatu)	Specjalista ds. legislacyjnych , Związek Prywatnych Przetwórców Mleka, Warszawa, Polska
10.2005 – 04.2006 (część etatu)	Specjalista , Krajowa Unia Producentów Soków, Warszawa, Polska

4. Informacja o odbytych urloпах macierzyńskich i rodzicielskich

29.07.2015 – 26.07.2016	Urlop macierzyński, dodatkowy urlop macierzyński i urlop rodzicielski
10.06.2012 – 24.11.2012	Urlop macierzyński i dodatkowy urlop macierzyński

5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789)

Osiągnięciem naukowym, wynikającym z art. z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki jest **monotematyczny cykl 6 oryginalnych publikacji naukowych.**

5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Sposób intensyfikacji biosyntezy $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży oparty na waloryzacji odpadowej ziemniaczanej wody sokowej i otrzymywanie funkcjonalnych preparatów tego polisacharydu w hodowli drożdży *C. utilis* ATCC 9950

5.2. Wykaz cyklu publikacji monotematycznych stanowiących osiągnięcie będące podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego wraz z określeniem wkładu własnego wnioskodawcy w powstanie tych prac oraz danymi bibliometrycznymi

I-B.1	Bzducha-Wróbel A., Błażej St., Kawarska A., Stasiak-Róžańska L., Gientka I., Majewska E. (2014) Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for β-glucan isolation. <i>Molecules</i> 19: 20941–20961 - Udział 65%		
	IF₂₀₁₄	Punkty MNiSW₂₀₁₄	Liczba cytowań
	2,416	30	18
I-B.2	Bzducha-Wróbel A., Błażej St., Kieliszek M., Pobiega K., Falana K., Janowicz M. (2018) Modification of the cell wall structure of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains during cultivation on waste potato juice water and glycerol towards biosynthesis of functional polysaccharides. <i>Journal of Biotechnology</i> 281: 1–10 - Udział 75%		
	IF₂₀₁₈	Punkty MNiSW₂₀₁₈	Liczba cytowań
	2,533	35	0

I-B.3	Bzducha-Wróbel A., Błażej St., Molenda M., Reczek L. (2015) Biosynthesis of $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucans of cell wall of the yeast <i>Candida utilis</i> ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol. European Food Research and Technology 240: 1023–1034		
	I-B.3.a. Bzducha-Wróbel A., Błażej St., Molenda M., Reczek L. (2015) Erratum to: Biosynthesis of $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucans of cell wall of the yeast <i>Candida utilis</i> ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol. European Food Research and Technology 240: 1281–1282 - Udział 85%		
	IF₂₀₁₅	Punkty MNiSW₂₀₁₅	Liczba cytowań
	1,433	25	13
I-B.4	Bzducha-Wróbel A., Pobiega K., Błażej St., Kieliszek M. (2018) The scale-up cultivation of <i>Candida utilis</i> in waste potato juice water with glycerol affects biomass and $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucan characteristic and yield. Applied Microbiology and Biotechnology 102: 9131–9145 - Udział 80%		
	IF₂₀₁₈	Punkty MNiSW₂₀₁₈	Liczba cytowań
	3,340	35	0
I-B.5	Bzducha-Wróbel A., Koczón P., Błażej St., Kozera J., Kieliszek M. (2019) Valorization of deproteinated potato juice water into β -glucan preparation of <i>C. utilis</i> origin - comparative study of preparations obtained by two isolation methods. Waste and Biomass Valorization DOI:10.1007/s12649-019-00641-w - Udział 70%		
	IF₂₀₁₉	Punkty MNiSW₂₀₁₉	Liczba cytowań
	1,874	20	0
I-B.6	Bzducha-Wróbel A., Bryła M., Gientka I., Błażej St., Janowicz M. (2019) <i>Candida utilis</i> ATCC 9950 cell walls and $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucan preparations produced using agro-waste as a mycotoxins trap. Toxins 2019, 11, 192; doi:10.3390/toxins11040192 - Udział 70%		
	IF₂₀₁₉	Punkty MNiSW₂₀₁₉	Liczba cytowań
	3,273	30	0

Mój wkład w powstanie tych prac polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i opracowaniu metodyki większości oznaczeń, zdobyciu finansowania na realizację badań, prowadzeniu prac doświadczalnych, interpretacji wyników, napisaniu manuskryptów, prowadzeniu korespondencji z redaktorami czasopism (autor korespondencyjny), dokonaniu korekty manuskryptów

z uwzględnieniem uwag recenzentów i udzieleniu odpowiedzi na recenzje. Szczegółowe omówienie mojego wkładu w powstanie każdej ze wskazanych w osiągnięciu publikacji zawarto w **Załączniku 4, punkt I-B**.

Oświadczenia współautorów w wyżej wymienionych publikacjach wraz z określeniem ich wkładu w powstanie prac zamieszczono w **Załączniku 3** do wniosku habilitacyjnego.

5.3. Podsumowanie danych bibliometrycznych cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie

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

Sumaryczny <i>Impact Factor</i> (IF) z roku opublikowania *	14,869
Liczba punktów zgodnie z wykazami czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego **	175
Liczba cytowań wg bazy Web of Science (Core Collection)***	31

* Sumaryczny IF obliczono wg danych zawartych w bazie Journal Citation Reports sumując współczynniki IF z roku publikacji dla czasopism, w których ukazały się prace **I-B.1 – I-B.6**. W przypadku publikacji z lat 2018 i 2019 uwzględniono IF z roku 2017 ze względu na brak danych za rok wydania.

** Uwzględniono punktację czasopism z roku publikacji artykułów wchodzących w skład osiągnięcia zgodnie z komunikatami Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW):

- Publikacje wydane w 2018 i 2019 roku – zgodnie z Komunikatem MNiSW z dnia 25 stycznia 2017 roku ze względu na brak danych za rok wydania.
- Publikacje z lat 2013-2016 – zgodnie z Komunikatem MNiSW z dnia 23 grudnia 2015r.
- Publikacja z roku 2011 – zgodnie z Komunikatem MNiSW z dnia 20 grudnia 2012r.

*** Liczba cytowań na dzień 25.03.2019r.

Efektom przeprowadzonych badań są także:

- **patent** o numerze prawa wyłącznego **PL. 226221 (Załącznik 4, II-B.2.1)** na „Sposób otrzymywania biomasy drożdży o zwiększonej zawartości $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanów i zastosowanie biomasy”,
- **zgłoszenie patentowe nr P.420212** na sposób otrzymywania preparatu $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży (**Załącznik 4, II-B.2.3**).

5.4. Omówienie celu naukowego wskazanego osiągnięcia, uzyskanych wyników oraz ich ewentualnego wykorzystania

5.4.1. Wprowadzenie

Główny obszar prowadzonych przeze mnie badań, które zaowocowały powstaniem publikacji naukowych wskazanych w ramach osiągnięcia obejmuje zagadnienie biosyntezy polimerów strukturalnych ściany komórkowej drożdży i ich właściwości funkcjonalnych.

Ściana komórkowa drożdży stanowi barierę fizyczną chroniącą komórkę przed wpływem różnych czynników występujących w środowisku wzrostu [21]. Pełnienie tej funkcji możliwe jest dzięki dynamicznemu charakterowi tego organellum, gwarantującemu przebudowę ściany pod wpływem zmieniających się warunków wzrostu drożdży [25]. Ten ważny mechanizm odpowiedzialny za przetrwanie drożdży realizowany jest w ramach tzw. ścieżki integralności ściany komórkowej i wiąże się ze zwiększeniem lub ograniczeniem syntezy poszczególnych składników budujących to organellum, takich jak $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukan, $\beta(1,6)/(1,3)$ -glukan, mannoпротеiny oraz chityna [21, 25, 32, 46].

Mimo postępu w badaniach nad biologią komórek drożdży niewiele jeszcze wiemy o ścieżkach regulujących architekturę omawianego organellum, kierunkach zmian w tej strukturze oraz budowie chemicznej polimerów budujących ścianę drożdży w zależności od gatunku tych grzybów i warunków hodowli [10, 26, 33, publikacje I-B.2, I-B.3, I-B.4]. Dostępne dane literaturowe są nieliczne. Było to dla mnie argumentem za zasadnością podjęcia badań z tego zakresu.

Moje zainteresowanie wskazanym problemem badawczym wynika zarówno z przesłanek poznawczych, jak również z atrakcyjnych właściwości funkcjonalnych składników ściany komórkowej drożdży. Zachęciły mnie one do prowadzenia badań nad opracowaniem procesu biotechnologicznego ukierunkowanego na produkcję $\beta(1,6)/(1,3)$ -glukanu. W literaturze opisywana jest zdolność $\beta(1,6)/(1,3)$ -glukanu drożdżowego do stymulacji układu immunologicznego, aktywność przeciwmutagenna, przeciwnowotworowa, przeciwutleniająca, właściwości hipocholesterolemiczne, stymulacja syntezy kolagenu i przyspieszanie procesu regeneracji ran, jak również zdolność wiązania mykotoksyn [1- 4, 8, 11, 12, 15, 45, 54, 57, publikacja I-B.6]. Omawiany polimer może znaleźć zastosowanie jako matryca do immobilizacji antygenów bakterii patogennych w produkcji szczepionek doustnych [4]. Podkreślane jest ponadto znaczenie tych polisacharydów dla właściwości terapeutycznych drożdży probiotycznych *S. cerevisiae* var. *boulardii* [35, 47]. Polimery

strukturalne ściany komórkowej drożdży mogą być stosowane w technologii żywności jako składnik żywności funkcjonalnej bądź dodatek pełniący funkcje technologiczne oraz składnik powłok jadalnych [9, 31, 37, 57]. Zgodnie z decyzją Komisji Europejskiej β -glukan izolowany drożdży *Saccharomyces cerevisiae* został wpisany na listę nowych składników żywności [13].

Analizy ekonomiczne światowego rynku β -glukanu pochodzenia drożdżowego wskazują, że wartość tego rynku znacząco wzrośnie w najbliższych latach – z ok. 158 mln USD w 2017 r. do ok. 222 mln USD w roku 2025 [18, 42, 43, 51]. Szybki rozwój omawianego segmentu produktów izolowanych z biomasy drożdży wynika przede wszystkim z rosnącego zainteresowania innowacyjnymi rozwiązaniami technologicznymi opierającymi się na wykorzystaniu preparatów tego polisacharydu w produkcji żywności, farmaceutyków, pasz i kosmetyków.

Na rozwój rynku β -glukanów pochodzenia drożdżowego niekorzystnie wpływa wzrost cen i ograniczenie dostępności melasy wykorzystywanej w konwencjonalnej hodowli drożdży spożywczych [51, publikacja I-B.4]. Otwiera to drogę do poszukiwania nowych, wydajnych rozwiązań biotechnologicznych, które mogłyby stać się atrakcyjną alternatywą dla rynkowych wytwórców β -glukanu drożdżowego. W związku z powyższym założyłam, że konkurencyjność przemysłową wytwarzania β -glukanu można poprawić przez zastąpienie podłoży tradycyjnie wykorzystywanych w hodowli drożdży tanimi i lokalnie dostępnymi źródłami substancji odżywczych. Uznałam, że istotne jest przy tym również poszukiwanie nowych, wydajnych gatunków drożdży jako systemu biosyntezy tego polisacharydu, daje to bowiem szansę wskazania polimerów o nowych właściwościach funkcjonalnych. Stopień polimeryzacji cząsteczki i rozgałęzienia łańcuchów $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdżowego mogą być determinowane genetycznie, a wpływają na funkcjonalność tych polisacharydów [11]. Wybór wydajnego producenta drożdżowego oraz zaprojektowanie warunków hodowli są warunkiem wstępnym uzyskania wysokiej wydajności produkcji β -glukanu, w dalszej kolejności istotny jest sposób izolacji tego polisacharydu z biomasy drożdży. Aktualnie preparaty β -glukanu drożdżowego otrzymywane są na skalę przemysłową wyłącznie z biomasy drożdży szlachetnych *S. cerevisiae* (drożdży piekarskich oraz pofermentacyjnej biomasy drożdży piwowarskich).

Produkcja preparatów $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdżowego opiera się na ich izolacji z biomasy. Z biotechnologicznego punktu widzenia wydajnością procesu można sterować stymulując biosyntezę tych polisacharydów i/ lub uzyskując wysoką produktywność biomasy drożdży. Odpowiednie dobranie składu podłoża hodowlanego i warunków hodowli jest z tego powodu najważniejszym aspektem biotechnologii przemysłowej. Drożdże są mikroorganizmami zdolnymi do wzrostu

w podłożach opartych na różnego rodzaju odpadach przemysłu rolno-spożywczego, co pozwala zmniejszyć koszty całego procesu determinowane w dużej mierze kosztami pożywki [6]. Prowadzone przeze mnie badania nad biosyntezą $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży stanowią innowacyjne rozwiązanie. Zastosowałam bowiem w tym celu niestandardowe źródło azotu w postaci odpadowej odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej (OZWS). Jest to uciążliwy produkt uboczny powstający przy produkcji skrobi ziemniaczanej po kwasowo-termicznej koagulacji białek z soku ziemniaczanego, bogaty w składniki o charakterze białkowym, sole mineralne, witaminy i w niewielkim stopniu w cukry [29, publikacje **I-B.3**, **I-B.5**]. Na podstawie prognozowanego rozwoju światowego rynku skrobi ziemniaczanej oszacowano, że ilość generowanej OZWS wzrośnie w ujęciu globalnym do ok. 12 milionów m³ w 2023 [20, 44]. Odpad ten nie znajduje obecnie praktycznego zastosowania przemysłowego. Po rozcieńczeniu wodami przemysłowymi stosowany jest jako zalew użyźniający glebę, co znacząco obciąża środowisko naturalne [28, 38]. Podjęte przeze mnie badania są jednymi z nielicznych w zakresie biotechnologicznego zagospodarowania OZWS i jako pierwsza ukierunkowałam je na pozyskanie funkcjonalnego polisacharydu mikrobiologicznego jakim jest $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukan drożdżowy.

Kompleks enzymatyczny syntazy $\beta(1,3)$ -glukanu jest w dużej mierze nieodkrytym narzędziem biotechnologicznym, nie opisano dokładnie regulacji aktywności tego enzymu, przez co mechanizm syntezy β -glukanu to przedmiot aktualnych badań na świecie [41]. Wiadomo, że synteza $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu regulowana jest na poziomie molekularnym stopniem ekspresji genów *FKS1*, *FKS2* i *RHO1*. Nadekspresja genów *RHO1* oraz *FKS2* przyczynia się do wzrostu zawartości β -glukanu w ścianie komórkowej drożdży [32, 46, 53]. Ekspresję tych genów w komórkach drożdży mogą stymulować niska zawartość lub wyczerpanie glukozy w pożywce, hodowla w obecności innych niż glukoza źródeł węgla, czy też podwyższona zawartość jonów Ca²⁺ [15, 32, 46]. Było to dla mnie wskazaniem do podjęcia próby określenia zmian w strukturze ścian komórkowych drożdży po ich hodowli w obecności niekonwencjonalnego źródła węgla jakim jest glicerol. Konieczność uzupełniania OZWS o dodatkowe źródło węgla, aby stworzyć warunki umożliwiające wydajne namnażanie biomasy komórkowej drożdży także uzasadniały ten wybór (publikacja **I-B.3**). Glicerol jest tanim źródłem węgla w hodowli drobnoustrojów. Jest produktem ubocznym powstającym przy produkcji biodiesla [14]. Wiele gatunków drożdży jest w stanie wykorzystać glicerol jako źródło węgla i energii. Należy zaznaczyć, że metabolizm glicerolu i transport tej substancji do komórek drożdży nie jest jeszcze dokładnie poznany [24].

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych badań zebrałam w cykl monotematycznych publikacji, a kolejność ich prezentacji w autoreferacie wynika z merytorycznej zawartości. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że opublikowane przeze mnie rezultaty badań należą do bardzo nielicznych opisujących wpływ warunków hodowli drożdży na biosyntezę $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu. Jednocześnie nikt wcześniej nie wskazał możliwości wykorzystania w tym procesie odpadów przemysłu rolno-spożywczego.

5.4.2. Cel badań i hipotezy badawcze

Przeprowadzone badania ukierunkowano na opracowanie sposobu hodowli drożdży indukującego zwiększoną syntezę $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w ścianie komórkowej tych mikroorganizmów. Założono możliwość wykorzystania w tym celu odpadowej ziemniaczanej wody sokowej oraz glicerolu, co mogłoby stanowić podstawę innowacyjnego procesu pozyskiwania preparatów $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży na skalę przemysłową. Podjęto również badania, których celem było wskazanie metody pozwalającej na wydajną izolację preparatów ścian komórkowych drożdży o możliwie najwyższej zawartości $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu oraz metody ekstrakcji tego polisacharydu ze ścian komórkowych gwarantującej wydajne wytwarzanie preparatu oczyszczonego. Podjęto próbę określenia właściwości detoksykacyjnych wytworzonego preparatu poprzez analizę zdolności wiązania wybranych mykotoksyn w układach *in vitro*.

Przedstawiony cel badań realizowano weryfikując eksperymentalnie następujące **hipotezy badawcze** kolejnych etapów doświadczeń:

- Hipoteza 1:** Sposób przygotowania preparatów ścian komórkowych drożdży istotnie wpływa na wydajność uwalniania składników wewnątrzkomórkowych, a przez to zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w tych preparatach.
- Hipoteza 2:** Kierunki modyfikacji struktury ściany komórkowej drożdży w odpowiedzi na warunki wzrostu oraz zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu są cechą zależną nie tylko od gatunku, ale również od szczepu drożdży.
- Hipoteza 3:** Możliwa jest indukcja zwiększonej syntezy $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w ścianach komórkowych drożdży po hodowli w podłożu z odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej (jako źródło azotu i składników mineralnych) z dodatkiem glicerolu (jako źródło węgla), i wskazanie drożdży najwydajniej syntetyzujących ten polisacharyd w wytypowanych warunkach hodowli.

- Hipoteza 4:** Sposób hodowli drożdży *C. utilis* ATCC 9950 w podłożu z odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej z dodatkiem glicerolu wpływa na skład biomasy oraz charakterystykę i produktywność $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu tych grzybów.
- Hipoteza 5:** Sposób oczyszczania preparatów ścian komórkowych drożdży *C. utilis* ATCC 9950 istotnie wpływa na charakterystykę preparatu i wydajność procesu otrzymywania $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu.
- Hipoteza 6:** Preparaty ścian komórkowych i oczyszczonego $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży *C. utilis* ATCC 9950 po hodowli w odbiałczanej ziemniaczanej wodzie sokowej z dodatkiem glicerolu wykazują zdolność wiązania mykotoksyn.

Weryfikacja wskazanych hipotez obejmowała cykl doświadczeń realizujących cele szczegółowe pięciu etapów badań:

- Etap 1.** Ocena wpływu wybranych metod destabilizacji i dezintegracji komórek drożdży w procesie wytwarzania preparatów ścian komórkowych na wydajność uwalniania składników wewnątrzkomórkowych i zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w tych preparatach – **weryfikacja hipotezy 1; publikacja I-B.1**
- Etap 2.** Określenie możliwości wykorzystania odpadowej ziemniaczanej wody sokowej i glicerolu w hodowli ukierunkowanej na indukcję zwiększonej syntezy $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w ścianach komórkowych – **weryfikacja hipotez 2 i 3; publikacje I-B.2, I-B.3, I-B.3a**
- Etap 3.** Określenie wpływu sposobu prowadzenia hodowli drożdży *C. utilis* ATCC 9950 w podłożu z odpadowej ziemniaczanej wody sokowej z dodatkiem glicerolu i czasu hodowli w biofermentorze na charakterystykę i produktywność biomasy oraz preparatów $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu – **weryfikacja hipotezy 4, publikacja I-B.4**
- Etap 4.** Określenie wpływu sposobu izolacji preparatu $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży *C. utilis* ATCC 9950 po hodowli w odbiałczonej ziemniaczanej wodzie sokowej z dodatkiem glicerolu na charakterystykę i wydajność otrzymywania preparatu – **weryfikacja hipotezy 5; publikacja I-B.5**
- Etap 5.** Wstępne określenie zdolności wiązania wybranych mykotoksyn przez preparaty ścian komórkowych i $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży *C. utilis*

ATCC 9950 uzyskanych po hodowli w odbiałczonej ziemniaczanej wodzie sokowej z dodatkiem glicerolu – **weryfikacja hipotezy 6; publikacja I-B.6**

5.4.3. Omówienie wyników przeprowadzonych badań

***Etap 1.** Ocena wpływu wybranych metod destabilizacji i dezintegracji komórek drożdży w procesie wytwarzania preparatów ścian komórkowych na wydajność uwalniania składników wewnątrzkomórkowych i zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w tych preparatach*

Publikacja:

I-B.1 Bzducha-Wróbel A., Błażej St., Kawarska A., Stasiak-Różańska L., Gientka I., Majewska E. (2014) Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for β -glucan isolation. **Molecules 19: 20941–20961**

Ściana komórkowa drożdży stanowi skomplikowaną strukturę, w którą wbudowane są włókna $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu. Oznaczenie zawartości tego polisacharydu w komórkach drożdży, jak również produkcja preparatów oczyszczonych β -glukanu wymaga wydzielenia ścian od składników cytozolu. Można wykorzystać w tym celu różne metody destabilizacji i dezintegracji komórek mikroorganizmów. Rozpoczynając swoje badania nad próbą uzyskania preparatu β -glukanu stwierdziłam, że dostępna literatura nie dostarcza informacji porównujących i oceniających przydatność różnych metod przygotowywania preparatów ścian komórkowych w procesie izolacji wspomnianego polisacharydu drożdżowego. Było to dla mnie uzasadnieniem konieczności przeprowadzenia pierwszego etapu badań, w którym skupiłam się na opracowaniu wydajnej procedury izolacji ścian komórkowych. Założyłam, że sposób przygotowania preparatów ścian istotnie wpływa na zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w tych preparatach i skuteczność wydzielenia składników cytozolu. **Celem tego etapu przeprowadzonych badań była ocena wpływu wybranych metod destabilizacji i dezintegracji komórek drożdży w procesie wytwarzania preparatów ścian komórkowych na czystość tych preparatów, zdefiniowaną możliwie najwyższą zawartością $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu.** Ewaluacji poddałam następujące procedury: autoliza indukowana termicznie, autoklawowanie, homogenizacja w młynku kulkowym, sonikacja oraz połączenie procesów autolizy i autoklawowania z wymienionymi metodami dezintegracji mechanicznej. Badania przeprowadzone były łącznie w 19 wariatach układów doświadczalnych (**Tabela 2, publikacja I-B.1**) z wykorzystaniem zawiesiny komórek drożdży w wodzie lub buforze. Ten etap badań został przeprowadzony z zastosowaniem biomasy drożdży piekarskich

S. cerevisiae dostępnych komercyjnie. Skuteczność badanych metod w procesie otrzymywania preparatów ścian komórkowych drożdży oceniałam analizując wydajność uwalniania składników wewnątrzkomórkowych oraz ubytek suchej masy drożdży po procesie dezintegracji lub destabilizacji komórek. Oznaczałam ponadto zawartość cukrów ogółem, $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu oraz białka w wytworzonych preparatach ścian komórkowych. Analiza widm spektroskopowych w podczerwieni (FT-IR) zarejestrowanych dla wytworzonych preparatów stanowiła dodatkową ocenę jakościową pod względem zanieczyszczenia białkami, lipidami i materiałem genetycznym. Skuteczność uwalniania składników wewnątrzkomórkowych oceniałam także obserwując preparaty mikroskopowe barwione błękitem metylenowym (**Rysunki 3 – 6, publikacja I-B.1**).

Zasadność podjęcia zaplanowanego zakresu badań potwierdziły uzyskane wyniki. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że wszystkie zastosowane metody przyczyniały się do uwalniania składników wewnątrzkomórkowych z biomasy badanych drożdży, jednak z różną wydajnością. Spośród wszystkich analizowanych metod, autoklawowanie komórek *S. cerevisiae*, wskazywane w literaturze jako metoda otrzymywania preparatów ścian komórkowych w procesie izolacji β -glukanu [55] okazało się najmniej skuteczne. Zawartość cukrów ogółem w preparatach uzyskanych tą metodą była podobna do stwierdzanej w biomacie nienaruszonych komórek, podczas gdy zawartość białka była wyższa. Mogło to wynikać z ekstrakcji składników komórki rozpuszczalnych w zadanych warunkach. Tylko nieliczne komórki traciły integralność ściany komórkowej. Połączenie autoklawowania z zastosowaniem metod dezintegracji mechanicznej (homogenizacji w młynie kulowym i sonikacji), nie przyczyniało się do wzrostu skuteczności uwalniania składników wewnątrzkomórkowych. **Skuteczność sił rozrywających, działających podczas dezintegracji martwych komórek poddanych wstępnemu autoklawowaniu, była mniejsza w porównaniu z procesem prowadzonym z żywym materiałem biologicznym.** Założono zatem, że siły ścinające działające podczas homogenizacji w młynie kulowym łatwiej uszkadzają te komórki, których ściany cechuje pewna sztywność. Wyniki tej części doświadczeń wskazały, że proces autoklawowania przyczyniał się do strat polimerów strukturalnych ściany komórkowej, na co wskazywały niższe zawartości β -glukanu w tych preparatach w porównaniu z biomasą nienaruszoną. Skutkiem tego mógł być wzrost elastyczności ścian komórkowych drożdży, co utrudniało mechaniczne uszkadzanie komórek, również przy zastosowaniu ultradźwięków.

Zaobserwowałam, że preparaty ścian komórkowych wytwarzane w wyniku ekspozycji komórek badanych drożdży na działanie ultradźwięków w wodzie zawierały mniej β -glukanu w porównaniu z nienaruszoną biomasą (**Tabela 1,**

publikacja I-B.1). Sonikacja mogła doprowadzać do depolimeryzacji i fragmentacji łańcuchów β -glukanu, a przez to strat podczas procesu dezintegracji [34]. W przypadku poddawania komórek badanych drożdży działaniu ultradźwięków w buforze TRIS-HCl o pH 8,0 nie obserwowano podobnej zależności. Wręcz przeciwnie, oznaczona zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu była ponad dwukrotnie wyższa od stwierdzonej w preparatach ścian uzyskanych na drodze sonikacji komórek prowadzonej w wodzie. Jednocześnie zawartość białka w tych preparatach uległa tylko nieznacznemu obniżeniu w porównaniu z biomasą nienaruszoną. Założyłam, że w środowisku alkalicznym dochodziło do rozerwania wiązań wodorowych i rozluźnienia struktury trójwymiarowej helisy, którą tworzą łańcuchy $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu [10, 56]. Mogło to skutkować mniejszą podatnością łańcuchów $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu na degradujące działanie ultradźwięków (mniejsza sztywność cząsteczek). Jednocześnie „poluzowanie” struktury polimeru pod wpływem środowiska alkalicznego mogło ułatwić hydrolizę enzymatyczną tego polisacharydu podczas jego oznaczania z zastosowaniem egzo- i endo- $\beta(1,3)$ -glukanaz.

Dezintegracja mechaniczna polegająca na homogenizacji komórek w młynku kulkowym pozwoliła uzyskać najwyższy stopień uwolnienia składników cytozolu (w granicach 61 - 66,5%, w zależności od rozmiaru kulek cyrkonowo szklanych) – **Tabela 1, publikacja I-B.1.** Dokumentacja fotograficzna preparatów mikroskopowych uzyskanych tą metodą potwierdza dużą skuteczność dezintegracji komórek (**Rysunek 5, publikacja I-B.1**). Skutkowało to otrzymaniem preparatów ścian komórkowych o wysokiej zawartości cukrów ogółem oraz $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu i istotnym obniżeniu zawartości białka w porównaniu z biomasą i pozostałymi preparatami. **Porównywalne wyniki uzyskano stosując proces autolizy połączonej z dezintegracją w młynku kulkowym lub z procesem sonikacji.** Czas tych procedur był jednak dłuższy niż 24 godziny.

Za osiągnięcie prac tego etapu uważam opracowanie skutecznej, szybkiej metody otrzymywania preparatów ścian komórkowych drożdży w oparciu o dezintegrację mechaniczną komórek w młynie kulkowym. Opracowana metoda pozwoliła uniezależnić efektywność procesu otrzymywania preparatów od zdolności autolitycznych drożdży oraz eliminuje ryzyko hydrolizy $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu pod wpływem działania enzymów wewnątrzkomórkowych aktywnych w czasie autolizy.

Etap 2. Określenie możliwości wykorzystania odpadowej ziemniaczanej wody sokowej i glicerolu w hodowli ukierunkowanej na indukcję zwiększonej syntezy $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w ścianach komórkowych wybranych drożdży

Publikacje:

I-B.2 Bzducha-Wróbel A., Błażej St., Kieliszek M., Pobiega K., Falana K., Janowicz M. (2018) Modification of the cell wall structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains during cultivation on waste potato juice water and glycerol towards biosynthesis of functional polysaccharides. **Journal of Biotechnology 281: 1–10**

I-B.3 Bzducha-Wróbel A., Błażej St., Molenda M., Reczek L. (2015) Biosynthesis of $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucans of cell wall of the yeast *Candida utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol. **European Food Research and Technology 240: 1023–1034**

I-B.3a Bzducha-Wróbel A., Błażej St., Molenda M., Reczek L. (2015) *Erratum to:* Biosynthesis of $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucans of cell wall of the yeast *Candida utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol. **European Food Research and Technology 240: 1281–1282**

Za istotną przesłankę w konstruowaniu podłoży modelowych opartych na odpadowej ziemniaczanej wodzie sokowej z dodatkiem glicerolu uznałam fakt, że $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukan odpowiedzialny jest za wytrzymałość ścian komórkowych drożdży w warunkach stresu osmotycznego [27]. Upośledzona synteza tego polisacharydu doprowadza do autolizy komórek drożdży pod wpływem niewielkich różnic ciśnień osmotycznych. Glicerol jest silniej osmoaktywnym źródłem węgla w porównaniu z glukozą [39]. Założyłam zatem możliwość zwiększonej syntezy $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu ściany komórkowej drożdży w podłożach z dodatkiem tego właśnie źródła węgla. Stres osmotyczny wzmacnia w komórkach drożdży ścieżki sygnałowe kaskady kinaz aktywowanych mitogenami – kinazy MAP Hog1 oraz Slt2 [7, 16, 25]. Szlak kinazy Slt2 odpowiada za wzmocnienie cytoszkieletu poprzez mobilizację białek regulujących aktywność enzymów odpowiedzialnych za syntezę polisacharydów ściany [16, 23].

Celem tego etapu badań było określenie zmian w strukturze ścian komórkowych wybranych szczepów drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* (probiotyczne, piwowarskie i piekarskie) oraz drożdży *Candida utilis* ATCC 9950 po hodowli w podłożu kontrolnym YPD oraz w podłożach z odbiałczoną ziemniaczaną wodą sokową (OZWS) o zróżnicowanym dodatku glicerolu (5, 10, 15, 20 i 25%) oraz pH (4,0; 5,0 oraz 7,0). Dodatek glicerolu do OZWS w zastosowanych stężeniach skutkowało wzrostem zawartości węgla organicznego ogółem w tych podłożach w granicach od ok. 36g/L (przy 5% dodatku glicerolu) do ok. 124g/L (przy

25% dodatku glicerolu). Odpowiadało to stosunkowi zawartości węgla ogółem do azotu ogółem (C:N) w granicach 14 – 49. **Założyłam, że możliwe będzie wskazanie warunków indukujących zwiększoną syntezę $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w takich układach.**

Ten etap badań został wsparty finansowo grantem uzyskanym w ramach wewnętrznego trybu konkursowego dla młodych pracowników nauki Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie w roku 2013 (**Załącznik 4, II-K.2.3**).

Badania przeprowadziłam z wykorzystaniem czterech szczepów drożdży z gatunku *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* var. *boulardii* PAN, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, drożdży piwowskich *S. cerevisiae* R9 i piekarskich *S. cerevisiae* 102 – **publikacja I-B.2**) oraz drożdży *Candida utilis* ATCC 9950 – **publikacja I-B.3**. Wszystkie szczepy dostępne są w Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii SGGW w Warszawie. Prace zawęziłam do wskazanych szczepów drożdży na podstawie wyników prac przeprowadzonych w ramach grantu wewnętrznego zrealizowanego w latach 2011 – 2012 (**Załącznik 4, II-K.2.4**), którego celem był skrining różnych gatunków drożdży pod względem zawartości funkcjonalnych polisacharydów w ścianie komórkowej. Wyniki tych badań były częściowo podstawą opracowania publikacji nie włączonych do cyklu monotematycznego oraz komunikatów konferencyjnych (**Załącznik 4, II-A.2.19, II-A.2.20, II-A.2.21, II.D.2.3, II-E.2.4, II-E.2.23, II-E.2.25, II-E.2.26**). Nie wykorzystywałam w nich odpadowej ziemniaczanej wody sokowej.

W pierwszej kolejności oceniłam wzrost badanych drożdży *S. cerevisiae* oraz *Candida utilis* ATCC 9950 w skonstruowanych podłożach doświadczalnych z OZWS wzbogaconych glicerolem. Wykorzystałam w tym celu zmiany gęstości optycznej mikrohodowli prowadzonych w aparacie Bioscreen C oraz zmiany plonu biomasy po 24 godzinach hodowli w kolbach wytrząsanych. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyznaczenie podstawowych parametrów wzrostu badanych drożdży jak współczynnik właściwej szybkości wzrostu oraz czas generacji komórek w badanych podłożach.

Badane szczepy wykazywały wzrost we wszystkich wariantach podłoży z odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej z glicerolem. **Najkorzystniejsze warunki dla wzrostu badanych grzybów panowały w pożywkach z dodatkiem 5 i 10% glicerolu, niezależnie od pH.** Jednocześnie osiągane w tych warunkach wartości współczynników właściwej prędkości wzrostu i plonu biomasy były zależne od szczepu. **Najszybszy wzrost i najwyższy plon biomasy w tych podłożach stwierdzono po hodowli drożdży *Candida utilis* ATCC 9950 (publikacja I-B.3, I-B.3a).** Produktywność biomasy tego szczepu była blisko dwukrotnie wyższa w porównaniu z drożdżami *S. cerevisiae* var. *boulardii* PAN, najlepiej rozwijającymi

się we wskazanych podłożach spośród badanych drożdży z rodzaju *Saccharomyces* (Tabela 3, publikacja I-B.2; Rysunek 1, publikacja I-B.3). Wszystkie badane przeze mnie drożdże z rodzaju *Saccharomyces* wykazywały nieco wolniejszy wzrost w pożywkach z dodatkiem glicerolu, w porównaniu z podłożem YPD. Nie wpłynęło to jednak istotnie na osiągnięty przez nie plon biomasy w podłożach zawierających 5 i 10% glicerolu. Fakt ten tłumaczyłam możliwością ukierunkowania metabolizmu drożdży na syntezę innych składników komórkowych w porównaniu z podłożem YPD. Na tym etapie badań nie zostało to jednak zweryfikowane. **W przypadku drożdży *Candida utilis* ATTC 9950 maksymalne szybkości wzrostu w podłożach z OZWS zawierających 5 i 10% glicerolu były porównywalne do odnotowanej w podłożu syntetycznym YPD. Jednocześnie, co ciekawe, czas generacji okazał się krótszy w podłożach z odpadowej ziemniaczanej wody sokowej z dodatkiem glicerolu.** Jest to interesujące z punktu widzenia możliwości skrócenia czasu namnażania biomasy drożdży. Przepuszczalność błon komórkowych drożdży z gatunku *C. utilis* jest ok. 10^5 razy wyższa w porównaniu z drożdżami *S. cerevisiae*, czym tłumaczony jest bardzo dobry wzrost tych pierwszych w obecności glicerolu [19].

Czynnikiem limitującym wzrost badanych drożdży w podłożach doświadczalnych było stężenie glicerolu w pożywce. **Dawki powyżej 15% istotnie hamowały namnażanie komórek badanych szczepów**, stanowiąc czynnik stresowy. Należy przypuszczać, że wynikało to ze wzrostu ciśnienia osmotycznego w podłożach zawierających to niskocząsteczkowe, hydrofilowe źródło węgla. **Warto podkreślić**, że najwyższe plony biomasy drożdży z rodzaju *Saccharomyces* w podłożach zawierających powyżej 15% glicerolu stwierdziłam w hodowlach **drożdży probiotycznych *Saccharomyces boulardii* CNCM 1-745** (publikacja I-B.2).

Stosując mikroskopię transmisji elektronów (TEM) obserwowałam budowę warstwową ściany komórkowej drożdży. Warstwa zewnętrzna, o wysokiej gęstości elektronowej, składa się przede wszystkim z mannoprotein, podczas gdy transparentna warstwa wewnętrzna z polimerów β -glukanu [40, publikacje I-B.2, I-B.3, I-B.3a]. **Hodowla badanych drożdży w podłożach z OZWS wzbogaconej glicerolem przyczyniła się do istotnych zmian w budowie ścian komórkowych badanych drożdży w porównaniu z podłożem YPD. Intensywność i charakter modyfikacji zależał od szczepu drożdży, dawki glicerolu w podłożu oraz pH pożywki.** Modyfikacja ta obejmowała zmiany grubości lub/ i udziału poszczególnych elementów struktury tego organellum. Na przykładowych zdjęciach preparatów komórkowych analizowanych z zastosowaniem TEM udokumentowałam zaobserwowane przeze mnie zmiany w strukturze ścian

badanych szczepów w zależności od podłoża hodowlanego (**Rysunek 1A-T w publikacji I-B.2 oraz Rysunek 2a-f w publikacji I-B.3a**).

Po hodowli badanych drożdży w podłożu kontrolnym YPD (przyjętym w tych pracach za kontrolne), **najgrubszymi ścianami oraz warstwą β -glukanową** charakteryzowały się drożdże *Candida utilis* ATCC 9950 oraz **szczep probiotyczny *Saccharomyces boulardii* CNCM 1-745**. Przypuszczalnie, naturalnie grubsze ściany komórkowe szczepu *Saccharomyces boulardii* CNCM 1-74 mogą być istotne dla oporności tych grzybów na działanie czynników środowiska zewnętrznego, np. podczas pasażu w układzie pokarmowym. Należy podkreślić, że **wyniki moich badań po raz pierwszy dokładnie opisują budowę ściany komórkowej drożdży probiotycznych oraz *Candida utilis* w zależności od warunków wzrostu**.

Stwierdziłam, że w przypadku trzech badanych szczepów drożdży (*Candida utilis* ATCC 9950, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* PAN oraz szczepu piwowarskiego *S. cerevisiae* R9) hodowla w podłożach z odbiałczanej ziemniaczanej wody sokowej z dodatkiem 5 i 10%, glicerolu intensyfikowała biosyntezę $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu, czego wyrazem były grubsze ściany komórkowe i warstwy β -glukanowe oraz wyższa zawartość cukrów ogółem i $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w preparatach ścian komórkowych tych grzybów. W przypadku wymienionych drożdży **synteza $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu zależała od pH pożywki**. Dwa szczepy drożdży - *Candida utilis* ATCC 9950 oraz *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* PAN wykazywały intensywniejszą syntezę β -glukanu, gdy pH podłoża wyjściowego wynosiło 5,0 oraz 7,0. Szczep drożdży piwowarskich *S. cerevisiae* R9 syntetyzował więcej tego polisacharydu tylko w pożywkach o pH 7,0.

Najwyższy wzrost zawartości $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w preparatach ścian komórkowych drożdży z rodzaju *Saccharomyces* (preparaty uzyskane na drodze dezintegracji mechanicznej komórek opracowanej w ramach etapu 1 badań) stwierdzono w przypadku szczepu *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* PAN. Po hodowli tych grzybów w pożywce z OZWS z dodatkiem 10% glicerolu i pH 5,0 oznaczono ok. **22,8g $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu/ 100g preparatu**, przy zawartości cukrów ogółem na poziomie 52,5g/ 100 g preparatu. Namnażanie tych drożdży w podłożu YPD skutkowało zawartością ok. 13,7g β -glukanu/ 100 g preparatu (przy 38,6g cukrów ogółem/ 100 g preparatu) – **Tabela 5, publikacja I-B.2**.

Najwyższą zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu stwierdziłam w preparatach ścian komórkowych drożdży *C. utilis* ATCC 9950 uzyskanych z OZWS o pH 5,0 z dodatkiem 10% glicerolu. Było to ok. **45g $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu/ 100 g preparatu** przy zawartości cukrów ogółem na poziomie ok. 80 g/ 100 g preparatu. Po hodowli tych drożdży w podłożu YPD zawartość cukrów ogółem kształtowała się na

poziomie ok. 55g/ 100 g preparatu ścian komórkowych, a zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu wyniosła ok. 31g/ 100 g preparatu (Tabela 4, publikacja I-B.3).

Najwyższa zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w preparatach ścian komórkowych oraz najwyższy plon biomasy stwierdzone po hodowli drożdży *C. utilis* ATCC 9950 w podłożu z OZWS o pH 5,0 z dodatkiem 10% glicerolu wskazały zasadność prowadzenia dalszych badań (Etap 3) nad próbą uzyskania oczyszczonego preparatu $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu z zastosowaniem właśnie tych drożdży.

Dodatek glicerolu do podłoża doświadczalnych z OZWS w dawkach powyżej 15% przyczyniał się do wyraźnego zmniejszenia grubości ścian komórkowych i warstwy β -glukanowej w komórkach szczepów *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* PAN oraz *C. utilis* ATCC 9950 w porównaniu z kontrolnym podłożem YPD i podłożami o niższej zawartości glicerolu. Zmiany te odpowiadały obniżonej zawartości cukrów ogółem oraz $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w preparatach ścian badanych drożdży. Jednakże udział warstwy β -glukanowej w strukturze ścian wskazanych szczepów był stale najwyższy spośród stwierdzonych po hodowli we wskazanych podłożach hodowlanych.

Zaobserwowałam, że przy wyższych dawkach glicerolu (15 – 25%) dochodziło do wzrostu gęstości elektronowej w obrębie warstwy mannoproteinowej drożdży probiotycznych *Sacharomyces boulardii* CNCM 1-745, piekarskich *S. cerevisiae* 102 oraz drożdży piwowskich *S. cerevisiae* R9, co uwidaczniało się zdecydowanie ciemniejszym wybarwieniem preparatów w obszarze tej warstwy. Prawdopodobnie wynikało to ze wzrostu zawartości frakcji białkowej w cząsteczkach mannoprotein. Obniżenie zawartości cukrów ogółem oraz $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w preparatach ścian omawianych drożdży po hodowli w podłożach zawierających powyżej 15% glicerolu korelowało ze zwiększonym udziałem mannoprotein. Stwierdziłam istotne różnicowanie w strukturze warstwy mannoproteinowej wskazanych szczepów drożdży. W przypadku drożdży piekarskich warstwa mannoproteinowa była „gąbczasta”, „rozpulchniona”, podczas gdy w komórkach drożdży piwowskich *S. cerevisiae* R9 „upakowana” i zwarta. Różnicowanie w stopniu polimeryzacji, rozgałęzienia i składzie oraz organizacji przestrzennej cząsteczek mannoprotein mogło być przyczyną obserwowanych zależności. Wytycza to kierunek moich badań w przyszłości, które powinny koncentrować się na dokładnej charakterystyce strukturalnej polisacharydów i mannoprotein budujących ściany komórkowe drożdży w zależności od warunków wzrostu i szczepu drożdży.

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na ochronną rolę zewnętrznej warstwy mannoproteinowej w ścianach komórkowych drożdży w warunkach

stresu osmotycznego wywołanego wysokimi stężeniami glicerolu (podłoża z dodatkiem 15 – 25% glicerolu) - publikacja I-B.2. Zaobserwowałam, że we wspomnianych pożywkach trzy spośród badanych szczepów (*S. cerevisiae* R9, *S. cerevisiae* 102, *S. boulardii* CNCM 1-745) zwiększały udział procentowy mannoprotein w strukturze ścian w porównaniu z komórkami hodowanymi w podłożach z OZWS zawierających 5 i 10% glicerolu oraz YPD. Wskazuje to na strategię przystosowywania się do wzrostu ciśnienia osmotycznego w pożywkach hodowlanych komórek tych grzybów polegającą na przebudowywaniu najbardziej zewnętrznej warstwy ściany komórkowej, kontaktującej się bezpośrednio ze środowiskiem i działającej jak sito molekularne. Wzrost grubości warstwy mannoproteinowej w komórkach namnażanych w podłożach z dodatkiem glicerolu mógł wynikać z syntezy glikoprotein niezbędnych w procesie metabolizmu glicerolu oraz regulacji zmian ciśnienia osmotycznego w pożywce wywołanego tym źródłem węgla.

Za najważniejsze osiągnięcia tej części badań uważam opracowanie podłoża z odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej i glicerolu intensyfikującego syntezę $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w ścianach komórkowych wytypowanych szczepów drożdży z gatunków *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Candida utilis*. Uzyskane wyniki tej części badań stały się podstawą zgłoszenia patentowego (rok 2014), na podstawie którego w roku 2016 **został przyznany patent o numerze prawa wyłącznego PL. 226221 (Załącznik 4, II-B.2.1)** na „Sposób otrzymywania biomasy drożdży o zwiększonej zawartości $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanów i zastosowanie biomasy”. Wskazanie szczepu drożdży *Candida utilis* ATCC 9950 jako najwydajniejszego spośród badanych źródła $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu także uznaję za kluczowe. Ponadto istotne jest potwierdzenie możliwości wykorzystania odpadowej ziemniaczanej wody sokowej (OZWS) z dodatkiem glicerolu w hodowli drożdży o wydajności plonu biomasy podobnej do stwierdzanych w podłożu syntetycznym YPD. Zaobserwowanie ochronnego działania mannoprotein ściany komórkowej drożdży w warunkach stresu osmotycznego wywołanego wysokimi dawkami glicerolu w podłożach hodowlanych z OZWS również traktuję jako istotne.

Badania nad indukcją zwiększonej syntezy $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w komórkach *C. utilis* ATCC 9950 będę aktualnie pogłębiała **realizując pojedyncze działanie naukowe zakwalifikowane do finansowania w ramach konkursu NCN – MINIATURA 2 (Załącznik 4, II-K.2.5).**

Etap 3. Określenie wpływu sposobu prowadzenia hodowli drożdży *C. utilis* ATCC 9950 w podłożu z odpadowej ziemniaczanej wody sokowej z dodatkiem glicerolu i czasu hodowli w biofermentorze na charakterystykę i produktywność biomasy oraz preparatów $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu

Publikacja:

I-B.4 Bzducha-Wróbel A., Pobiega K., Błazejak St., Kieliszek M. (2018) The scale-up cultivation of *Candida utilis* in waste potato juice water with glycerol affects biomass and $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucan characteristic and yield. **Applied Microbiology and Biotechnology** 102: 9131–9145

Celem tego etapu badań było określenie wpływu sposobu prowadzenia hodowli drożdży *C. utilis* ATCC 9950 (hodowla wytrząsana w kolbach oraz hodowla okresowa w 5-litrowym biofermentorze) oraz czasu propagacji tych drożdży w podłożu z odpadowej ziemniaczanej wody sokowej (pH 5.0) z dodatkiem 10% glicerolu w skali biofermentora na charakterystykę i produktywność biomasy oraz preparatów $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu.

Hodowla badanych drożdży *C. utilis* w biofermentorze pozwoliła uzyskać istotnie wyższe wydajności plonu biomasy już po 48 godzinach namnażania w porównaniu z 72-godzinnym w kolbach. Wyniki te korelowały ze stopniem wykorzystania glicerolu, wyższym po hodowli w biofermentorze. Potwierdziłam tym samym istnienie zależności między intensywnością przemian metabolicznych glicerolu w komórkach drożdży a dostępnością rozpuszczonego tlenu, bowiem w przypadku biofermentora hodowla była intensywnie napowietrzana. Rozwijające się komórki drożdży doprowadzały do alkalizacji środowiska hodowlanego we wszystkich układach doświadczalnych, w najwyższym stopniu podczas hodowli w biofermentorze. Założyłam, że taki efekt związany mógł być z zaangażowaniem transportu aktywnego glicerolu do wnętrza komórek drożdży poprzez symport z jonami H⁺. Należy zauważyć, że mały rozmiar cząsteczek glicerolu umożliwia ich przenikanie do komórek drożdży na drodze dyfuzji, jednakże drożdże mogą uruchamiać strategię transportu aktywnego glicerolu w środowisku o podwyższonym ciśnieniu osmotycznym, wysokiej sile jonowej lub w obecności glukoneogennych źródeł węgla, do których glicerol należy [30, 36, 39]. Kontynuowane przeze mnie prace badawcze będą weryfikować to założenie.

Wyniki omawianego etapu moich badań wskazały na istotny wpływ sposobu prowadzenia hodowli drożdży na stopień wykorzystania cukrów, dostępnych w OZWS w stężeniu poniżej 1%. Najwyższy stopień wykorzystania tych składników odnotowałam po hodowli badanych drożdży w kolbach, natomiast zdecydowanie

niższe ich zużycie obserwowałam podczas hodowli w biofermentorze, w których preferowana była asymilacja glicerolu. W przypadku asymilacji azotu tendencja była odwrotna, bowiem komórki namnażane w kolbach wykorzystywały go w większym stopniu. Jednocześnie stwierdziłam, że **biomasa badanych drożdży *C. utilis* po hodowli w biofermentorze charakteryzowała się zdecydowanie niższą zawartością białka w porównaniu z hodowlą prowadzoną w kolbach**. Wywarło to wpływ na wyższą zawartość białka w oczyszczonych preparatach β -glukanu wytworzonych z biomasy namnażanej w kolbach, co wskazuje na ich integralność z polisacharydami ścian komórkowych badanych drożdży. **Podłoże z OZWS z dodatkiem 10% glicerolu ukierunkowywało metabolizm badanego szczepu na syntezę składników cukrowych, intensywniejszą w skali biofermentora**. Biomasa uzyskana w takich warunkach zawierała aż ok. 60% cukrów ogółem, a preparaty ścian komórkowych wyższą zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu. Klein i wsp. [24] i Turcotte i wsp. [52] stwierdzili, że hodowla drożdży *S. cerevisiae* w obecności glicerolu doprowadzała do zwiększonej ekspresji genów kodujących białka związane z funkcjami mitochondrialnymi, enzymami odpowiedzialnymi za glukoneogenezę oraz magazynowanie węglowodanów. Produkty utleniania glicerolu mogą wchodzić w szlak glukoneogenezy w cytozolu [24, 52].

Stosując mikroskopię elektronową **udało mi się dokonać bardzo ciekawych, nietypowych obserwacji w badanych komórkach drożdży *C. utilis* ATCC 9950 namnożonych w OZWS z dodatkiem 10% glicerolu**. Na Rysunku 6b-e w pracy I-B.4. przedstawiłam przykładowe fotografie ścian komórkowych oraz całych komórek badanych drożdży po hodowli we wskazanym podłożu z OZWS oraz w podłożu YPD (**praca I-B.4, Rysunek 6a**). W cytoplazmie badanych drożdży po hodowli w opracowanym podłożu widoczne były nieregularne jasne skupiska materiału zlokalizowanego szczególnie w pobliżu ściany komórkowej i mitochondriów. Materiał ten wyglądał jakby podlegał włączaniu w strukturę ściany komórkowej. Tkacz [50] obserwował biosyntezę $\beta(1,3)$ -glukanu *in vitro* z zastosowaniem kompleksu syntazy $\beta(1,3)$ -glukanowej drożdży *S. cerevisiae* z zastosowaniem mikroskopii elektronowej, stwierdzając powstawanie nieregularnej, transparentnej masy mikrowłókien tego polisacharydu. **Skłoniło mnie to do postawienia odważnej hipotezy (zawartej w pracy I-B.4.), że obserwowane przeze mnie transparentne skupiska są depozytami nierozpuszczalnego $\beta(1,3)$ -glukanu (Rysunek 6b-e, oznaczone strzałkami, praca I-B.4)**. Założyłam, że synteza β -glukanu zachodziła z wykorzystaniem glukozy powstającej w cytoplazmie w procesie glukoneogenezy z produktów utlenienia glicerolu w mitochondriach. W warunkach podwyższonego ciśnienia osmotycznego komórki drożdży włączają szlak ścieżki kinazy Hog, aby zwiększać poziom pobrania glicerolu z otoczenia i/lub jego syntezę

de novo oraz ograniczać utratę tego osmoprotektanta z komórek [16]. Niekontrolowane wewnątrzkomórkowe nagromadzenie glicerolu może prowadzić do zaburzeń prawidłowej równowagi osmotycznej i śmierci komórek, dlatego potrzebny jest katabolizm tego związku [24, 49]. Beese i wsp. [5] stwierdzili, że zwiększone ciśnienie osmotyczne pobudzało komórki drożdży *S. cerevisiae* do wzmacniania ściany komórkowej poprzez indukcję syntezy $\beta(1,3)$ -glukanu. Uznałam zatem, że warunki panujące w skonstruowanej pożywce hodowlanej skłaniały badane przeze mnie drożdże do wykorzystywania dostępnego glicerolu w syntezie nierozpuszczalnego $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu i jego wbudowywanie w strukturę ściany komórkowej. Jako pierwsza opisuję ten proces w podłożu, w których glicerol stanowi zarówno źródło węgla jak i czynnik zwiększający ciśnienie osmotyczne w pożywce hodowlanej. Nikt wcześniej nie prowadził podobnych badań z zastosowaniem drożdży z gatunku *Candida utilis*, ale również innych gatunków. Jednocześnie aktywność kompleksu enzymatycznego syntazy $\beta(1,3)$ -glukanu nadal nie jest w pełni scharakteryzowana, szczególnie w odniesieniu do drożdży gatunków innych niż *S. cerevisiae* [41].

Stwierdziłam istotny wpływ sposobu prowadzenia hodowli badanych drożdży na zawartość $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w preparatach ścian komórkowych. Namnażanie w biofermentorze skutkowało wyższą zawartością tego polisacharydu w preparatach ścian w porównaniu z hodowlą w kolbach. Oczyszczenie ścian z białek, lipidów i rozpuszczalnych polisacharydów zwiększyło koncentrację $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu do ok. 85% w preparatach izolowanych z biomasy namnożonej w biofermentorze. W badanych preparatach zaobserwowałam istotne różnicowanie w zawartości frakcji β -glukanów nierozpuszczalnych w zasadach. **Hodowla w biofermentorze intensyfikowała zawartość $\beta(1,3)$ -glukanu nierozpuszczalnego w zasadach**, podczas gdy namnażanie w kolbach sprzyjało syntezie $\beta(1,6)$ -glukanu, również nierozpuszczalnego w alkaliach. **Nie opisano wcześniej podobnej zależności**, a tłumaczę ją wyższą zawartością białek w ścianie komórkowej drożdży namnażanych w kolbach. Białka podlegają włączeniu w strukturę ściany m.in. poprzez $\beta(1,6)$ -glukan. **Z kolei siły ścinające działające podczas intensywnego mieszania hodowli w biofermentorze mogą indukować syntezę $\beta(1,3)$ -glukanu determinującą wytrzymałość mechaniczną komórek drożdży.** Ponadto w warunkach biofermentora obserwowano wydajniejszą glukoneogenezę. Zaobserwowałam także, że **krótszy czas hodowli drożdży w biofermentorze skutkowało wyższą zawartością frakcji polisacharydów rozpuszczalnych w alkaliach** w badanych preparatach. Rozpuszczalny w zasadach β -glukan jest prekursorem β -glukanu nierozpuszczalnego w takich warunkach [22].

Uzyskane produktywności objętościowe oraz wydajności preparatów ścian komórkowych i oczyszczonego $\beta(1,3)(1,6)$ -glukanu (metodą opisaną jako najkorzystniejszą w etapie 4 badań) już po 48 godzinach hodowli drożdży *C. utilis* ATCC 9950 w opracowanych warunkach okazały się konkurencyjne, bo zdecydowanie wyższe od opisanych do tej pory w literaturze. Uznaję to za kluczowe osiągnięcie przeprowadzonych prac badawczych tego etapu. Jednocześnie jako pierwsza opisałam otrzymywanie preparatu $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w hodowli drożdży *C. utilis* i możliwość waloryzacji odpadu przemysłu skrobiowego w tym procesie. Widzę możliwość dalszej optymalizacji warunków hodowli badanych drożdży ukierunkowanej na syntezę $\beta(1,3)(1,6)$ -glukanu w skali biofermentora. Prace w tym kierunku kontynuuję.

Etap 4. Określenie wpływu sposobu izolacji $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży *C. utilis* ATCC 9950 po hodowli w odbiałczonej ziemniaczanej wodzie sokowej z dodatkiem glicerolu na charakterystykę i wydajność otrzymywania preparatu

Publikacja:

I-B.5 Bzducha-Wróbel A., Koczoń P., Błażej St., Kozera J., Kieliszek M. (2019) Valorization of deproteinated potato juice water into β -glucan preparation of *C. utilis* origin - comparative study of preparations obtained by two isolation methods. **Waste and Biomass Valorization DOI: 10.1007/s12649-019-00641-w**

Równoległe z próbą zwiększenia skali hodowli ukierunkowanej na uzyskanie preparatu $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży *C. utilis* prowadziłam badania nad doborem metody izolacji tego polisacharydu ze ścian komórkowych. Opisane w literaturze metody otrzymywania oczyszczonych preparatów β -glukanów drożdżowych opierają się przede wszystkim na ekstrakcji z zastosowaniem roztworów zasad i kwasów (najczęściej stosowane) lub są to bardziej łagodne procedury, wykorzystujące trawienie enzymatyczne białek i lipidów lub ekstrakcję tych ostatnich odczynnikami organicznymi. Budowa ściany komórkowej drożdży, zależna od uwarunkowań genetycznych oraz warunków hodowli drożdży, determinuje podatność tego organellum na działanie czynników destrukcyjnych. Uznałam zatem za celowe określenie wpływu metody izolacji $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży *C. utilis* ATCC 9950 na charakterystykę oraz wydajność otrzymywania preparatu tego polisacharydu. Materiałem wyjściowym badań były preparaty ścian komórkowych drożdży *C. utilis* ATCC 9950 po hodowli w podłożu wskazanym w ramach 2 etapu. Preparaty te uzyskiwano na drodze dezintegracji mechanicznej komórek w młynku kulkowym opracowanej w etapie 1, zoptymalizowanej pod względem liczby cykli dezintegracji na potrzeby wydzielenia ścian komórkowych

C. utilis z hodowli indukującej syntezę β -glukanu. **Wykorzystywałam dwie różne metody izolacji $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu z preparatów ścian komórkowych.** Była to ekstrakcja w warunkach alkaliczno-kwasowych połączona z usunięciem składników ściany komórkowej rozpuszczalnych podczas autoklawowania (**metoda 1**). Ekstrakcja z zastosowaniem roztworów alkalicznych powoduje zniszczenie przestrzennej organizacji ściany drożdży i uwalnianie jej składników strukturalnych. Zastosowanie w następnej kolejności łagodnej ekstrakcji roztworem kwasu octowego pozwala zmniejszyć zawartość nierozpuszczalnej w alkaliach frakcji $\beta(1, 6)$ -glukanu, który jest wrażliwy na acetolizę. Kolejny etap oczyszczania, oparty na autoklawowaniu próbek zawieszonych w buforze przyczynia się do dodatkowego usunięcia zanieczyszczeń rozpuszczalnych w tych warunkach. Druga zastosowana procedura oparta została na wstępnym usunięciu z preparatów ścian komórkowych składników rozpuszczalnych w warunkach autoklawowania. Zastosowanie tego etapu powoduje, że struktura ścian komórkowych drożdży staje się bardziej podatna na dalsze etapy oczyszczania, które polegały na ekstrakcji lipidów alkoholem izopropylowym oraz trawieniu enzymatycznym białek preparatem Pronase E (**metoda 2**). Uzyskane powyższymi metodami preparaty poddawano analizie na zawartość białka, lipidów i $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu, w tym frakcji β -glukanów nierozpuszczalnych w zasadach oraz analizie spektroskopowej w podczerwieni (FT-IR) w zakresie liczb falowych 4000 – 400 cm^{-1} . Zarejestrowane widma IR porównywano ze sobą (preparaty izolowane metodami 1 i 2) i z widmem wzorca $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży *S. cerevisiae* o wysokiej czystości. Porównanie to prowadzono w ramach trzech specyficznych regionów liczb falowych: 3200 - 2700 cm^{-1} , 2000 - 1450 cm^{-1} oraz w zakresie daktyloskopowym 1450 - 400 cm^{-1} .

W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono, że niezależnie od metody izolacji otrzymane preparaty zawierały ok. 82% $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu po skróconym czasie ekstrakcji w porównaniu z procedurami opisanymi w literaturze. Polisacharyd ten stanowił ok. 93 - 95% całkowitej zawartości cukrów w badanych preparatach (**Tabela 3, publikacja I-B.5**). Otrzymane preparaty zawierały przede wszystkim polisacharydy nierozpuszczalne w alkaliach, których udział był porównywalny niezależnie od zastosowanej metody izolacji. **Dominującym składnikiem tej frakcji był $\beta(1,3)$ -glukan.** Stwierdzono, że **metoda 2 skuteczniej oczyszczała preparaty z nierozpuszczalnego w alkaliach $\beta(1,6)$ -glukanu, co przekładało się na wyższy stosunek zawartości $\beta(1,3)$ - do $\beta(1,6)$ -glukanu.** Stosunek ten wynosił odpowiednio 1,23 i 1,04 dla metody 2 i 1 (**Tabela 5, publikacja I-B.5**). Prawdopodobnie enzymatyczna hydroliza białka ułatwiała jednoczesne uwalnianie $\beta(1,6)$ -glukanu, który odpowiada za przyłączanie protein oraz chityny do polimeru $\beta(1,3)$ -glukanu w strukturze ściany drożdży. **Obie metody pozwoliły wydajnie oczyścić preparat**

β -glukanu z lipidów i ponad dwukrotnie obniżyć w nich zawartość białka w porównaniu z zawartością tego składnika w preparatach ścian komórkowych. Skuteczniej białka były jednak usuwane z zastosowaniem hydrolizy enzymatycznej (metoda 2). **Obie metody znacząco różniły się wydajnością produkcji preparatów β -glukanu w odniesieniu do wyjściowej ilości ścian komórkowych pobranych do oczyszczania.** W przypadku metody 2 preparaty uzyskiwano z wydajnością 70%, podczas gdy metoda 1 charakteryzowała się wydajnością na poziomie ok. 49%. Świadczy to o znaczących stratach preparatu w warunkach alkaliczno-kwasowych. **W związku z powyższym metodę 2 uznano za korzystniejszą w otrzymywaniu preparatów o wysokiej zawartości $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu badanych drożdży.**

Widma w podczerwieni badanych preparatów wykazały wysoce podobny przebieg do zarejestrowanego dla standardu $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży *S. cerevisiae* (Rysunki 1 - 3, publikacja I-B-5). We wszystkich badanych próbkach przy liczbie falowej 3417 cm^{-1} obserwowano szerokie, intensywne pasmo bardzo charakterystyczne dla wibracji grup O-H, co należy wiązać z obecnością polisacharydów w tych preparatach. We wszystkich preparatach obserwowano sygnały absorpcji przy liczbach falowych 2958 , 2921 i 2777 cm^{-1} . Pasma przy 2984 cm^{-1} występowało wyłącznie w próbkach preparatów uzyskanych w ramach przeprowadzonych izolacji, czyniąc je podobnymi do siebie, a nieznacznie różnymi od standardu. Pasma te były intensywne w preparacie uzyskanym metodą alkaliczno-kwasową (metoda 1), a bardzo słabe w widmie preparatu uzyskanego metodą 2. W porównaniu ze standardem mogło to wynikać z obecności dodatkowych grup C-H lub innym otoczeniem chemicznym grupy wibracyjnej (np., wpływ zanieczyszczeń). Przy 2852 cm^{-1} sygnał występował tylko w widmie standardu oraz próbce oczyszczonej za pomocą metody 2, co wyróżniało preparat uzyskany metodą alkaliczno-kwasową. Obecność dwóch szerokich i intensywnych prążków przy 1659 cm^{-1} w preparatach uzyskanych metodą 1 i 2 oraz ich brak w standardzie glukanu sugerował, że sygnały te były generowane przez drgania rozciągające grup C=O, a powiązano je z obecnością białek zanieczyszczających wytworzone preparaty. W rejonie daktyloskopowym (region tzw. odcisku palca) pasma przy: $1379/1371$, 1315 , 1254 , 1204 , 1159 , 1110 , 1080 , 1043 and 893 cm^{-1} występowały we wszystkich badanych próbkach, aczkolwiek różniły się intensywnością. Zgodnie z literaturą [3, 34, 48] pasma charakterystyczne dla $\beta(1,3)$ -i/lub $\beta(1,6)$ -glukanów obecne są przy ok. 1160 , 1078 , 1041 i 889 cm^{-1} . Na podstawie literatury przyjęto, że stosunki intensywności pasm: $1379/1080$; $1659/893$; $1379/893$ i $1080/893$ można traktować jako wskaźniki czystości badanych preparatów [34, 48]. Stosunek $1659/893$ informuje o stopniu zanieczyszczenia białkami. Dla standardu wyniósł on 0, a dla preparatów uzyskanych metodami 2 i 1 odpowiednio 3,81 i 2,07.

Standard glukanu i preparaty wytworzone różniły się także stosunkiem natężenia pasma 1379/893. Sygnał w rejonie 1379 cm^{-1} wynika z obecności N-acetyloglukozaminy. Wyniki analizy FT-IR sugerowały, że preparat uzyskany metodą 2 był w mniejszym stopniu zanieczyszczony chityną w porównaniu z uzyskanym po ekstrakcji alkaliczno-kwasowej, natomiast w większym stopniu białkami. W strukturze ściany drożdży chityna jest silnie związana z $\beta(1,6)$ -glukanem. Przepuszczalnie niższą zawartość N-acetyloglukozaminy w preparatach oczyszczonych metodą 2 powiązałam zatem z niższym stopniem zanieczyszczenia tych preparatów $\beta(1,6)$ -glukanem, stwierdzonym w analizie chemicznej. Przyczyną rozbieżności między wynikami analizy spektralnej a wyznaczoną zawartością białka w badanych preparatach mogło być założenie, że oznaczony azot pochodzi tylko z białek, podczas gdy w preparatach ścian drożdży jest obecna w niewielkiej ilości wspomniana chityna jak i możliwe są zanieczyszczenia kwasami nukleinowymi.

W efekcie przeprowadzonych prac przygotowano zgłoszenie patentowe nr P.420212 na sposób otrzymywania preparatu $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży (Załącznik 4, II-B.2.3).

Etap 5. Wstępne określenie zdolności wiązania wybranych mykotoksyn przez preparaty ścian komórkowych i $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży *C. utilis* ATCC 9950 uzyskanych po hodowli w odbiatczonej ziemniaczanej wodzie sokowej z dodatkiem glicerolu

Publikacja:

I-B.6 Bzducha-Wróbel A., Bryła M., Gientka I., Błażej St., Janowicz M. (2019) *Candida utilis* ATCC 9950 cell walls and $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucan preparations produced using agro-waste as a mycotoxins trap. *Toxins* 2019, 11, 192; doi:10.3390/toxins11040192

Mykotoksyny są szkodliwymi metabolitami wtórnymi grzybów mikroskopowych. Stanowią częste zanieczyszczenie żywności i pasz, o czym świadczą statystyki zgłoszeń do Systemu Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach – RASFF w krajach Unii Europejskiej. Produkty rolne są głównie zanieczyszczone aflatoksynami, deoksyniwalenolem, zearalenonem, ochratoksyną A, fumonizynami (FB) i toksyną T-2, na ogół stabilnymi podczas rutynowych procesów stosowanych w produkcji żywności i pasz [17]. Mimo licznych wysiłków podejmowanych w celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia żywności mykotoksynami już na etapie produkcji pierwotnej, bardzo trudne jest całkowite wyeliminowanie występowania tych substancji w łańcuchu żywnościowym. Dodatki paszowe o zdolności wiązania mykotoksyn są uważane za substancje mogące ograniczać absorpcję toksyn w przewodzie pokarmowym zwierząt. Możliwość

minimalizacji lub łagodzenia skutków szkodliwego działania mykotoksyn w organizmie zwierząt poprzez stosowanie dodatków paszowych wytwarzanych z biomasy drożdży jest aktualnym tematem badawczym. Badania w tym zakresie prowadzone są przede wszystkim z zastosowaniem preparatów ścian komórkowych i składników strukturalnych ściany (mannoproteiny i β -glukany) izolowanych z drożdży *S. cerevisiae*.

Za cel etapu 5 badań wyznaczyłam wstępną ocenę zdolności wiązania wybranych mykotoksyn (aflatoksyna B1 - AFB1, zearalenon - ZEN, ochratoksyna A - OTA, deoksynivalenol - DON, niwalenol - NIV, toksyna T-2 i fumonizyna B1 - FB1) przez preparaty ścian komórkowych (CW) i preparaty $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu (β -G) uzyskane z biomasy drożdży *Candida utilis* ATCC 9950 i scharakteryzowane w ramach etapu 3 badań (hodowla 48h w biofermentorze). Adsorpcję wskazanych mykotoksyn określono w układach *in vitro* w buforze PBS (pH 3,0 i 6,0) z dodatkiem 1% adsorbenta (preparat ścian komórkowych lub preparat β -glukanu) i 500 ng/ ml toksyny (1000 ng w układzie doświadczalnym). Zastosowane pH odpowiadało warunkom przewodu pokarmowego zwierząt monogastrycznych. Stężenie badanych mykotoksyn przekraczało znacznie maksymalne dopuszczalne w Unii Europejskiej poziomy zanieczyszczeń materiału paszowego i pasz w odniesieniu do AFB1, ZEN, OTA i T-2. Przeprowadzone badania zrealizowano w ramach grantu finansowanego z programu Inkubator Innowacyjności + (**Załącznik 4, II-K.2.2**).

Oprócz charakterystyki chemicznej preparatów izolowanych z biomasy drożdży na wiązanie mykotoksyn może mieć wpływ mikrostruktura cząstek adsorbenta. Pierwszym etapem pracy była zatem charakterystyka cząstek preparatu ścian komórkowych (CW) i β -glukanu (β -G) z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Stwierdziłam, że cząstki CW składały się z aglomeratów ścian komórkowych drożdży (**Rysunek 1a,b praca I-B.6**). Preparat β -G składał się z cząstek o bardziej zróżnicowanej charakterystyce powierzchni, wykazujących znaczną aglomerację (**Rysunek 1c-d praca I-B.6**). Morfologia pojedynczych cząstek β -glukanu nie przypominała kształtu ścian komórkowych drożdży. Dodatkowo przeprowadzono analizę wielkości cząstek metodą dyfrakcji laserowej. **Analiza statystyczna tych wyników potwierdziła istotne różnice w wielkościach cząstek badanych preparatów CW i β -G**. Tylko 10% cząstek CW wykazywało wymiary do około 8 μm (podobne do wielkości komórek drożdży), podczas gdy 90% z nich należało do klasy o wymiarach ok. 200 μm . Badany preparat β -G składał się z cząstek o większych rozmiarach w porównaniu z CW. Około 10% cząstek preparatu β -G miało wymiary do 16 μm , 50% do 85 μm , podczas gdy 90% z nich wykazywało wymiary do 208 μm . **Oba preparaty składały się zatem głównie z cząstek o dużych rozmiarach, dlatego przyszłym kierunkiem badań powinna być**

próba rozwinięcia powierzchni aktywnej preparatu. Na podstawie uzyskanych wyników tej części badań założyłam, że preparat CW mógł charakteryzować się większą powierzchnią wiązania w porównaniu z oczyszczonym β -G.

W efekcie przeprowadzonych badań stwierdziłam, że badane preparaty ścian komórkowych i oczyszczonego β -glukanu drożdży *Candida utilis* ATCC 9950 wykazywały zdolność wiązania zwłaszcza niepolarnych mykotoksyn, takich jak ZEN, OTA i AFB1. W niewielkim stopniu wiązały DON, NIV, toksynę T-2 oraz FB1, co należy tłumaczyć bardziej hydrofilowym charakterem tych toksyn. Na efektywność adsorpcji badanych preparatów miały wpływ ich skład chemiczny, pH, rodzaj mykotoksyny i przypuszczalnie wielkość cząstek oraz ich struktura. Nie stwierdziłam prostej korelacji pomiędzy właściwościami preparatu, pH i zdolnością wiązania mykotoksyn. Dla każdej badanej toksyny obserwowałam bowiem inną zależność. Zarówno obecność polisacharydów jak i frakcje białkowe ścian komórkowych *C. utilis* były ważne w procesie wiązania ZEN, OTA, DON i T-2, natomiast zdolność adsorpcji AFB1 była związana z obecnością β -glukanu w badanych preparatach. **Ściany komórkowe wykazywały wyższą lub porównywalną skuteczność wiązania badanych mykotoksyn w porównaniu z oczyszczonym preparatem β -glukanu.** Jest to ważna obserwacja, ponieważ produkcja nieoczyszczonych preparatów jest korzystniejsza ekonomicznie. Wyższa zawartość białka w CW i mniejsze rozmiary cząstek preparatu mogły wpływać na bardziej wydajne wiązanie toksyn ZEN, OTA, DON i T-2 w odpowiednim pH w porównaniu z oczyszczonym preparatem glukanu.

Najwyższy procent adsorpcji (około 83%), który wyraził się pojemnością wiązania na poziomie około 41 μ g/g preparatu, stwierdziłam dla ścian komórkowych badanych drożdży, gdy wiązaną toksyną był zearalenon w środowisku kwaśnym (pH 3,0). Aby określić ilościowo powinowactwo badanych czynników adsorpcyjnych do wiązanych mykotoksyn wyznaczyłam współczynniki podziału (Kd). Współczynnik Kd definiuje się jako stosunek związanej toksyny (μ g/g) do wolnej toksyny (μ g/ml). **Najwyższy współczynnik Kd (459 ml/g) odnotowałam w przypadku wiązania ZEN przez preparaty ścian komórkowych badanych drożdży przy pH 3,0.** Preparat CW charakteryzował się wydajniejszym wiązaniem ZEN w porównaniu z preparatem β -G. W przypadku wiązania OTA przez preparat ścian komórkowych współczynnik podziału wyniósł ok. 81 (ml/g) w pH 3,0. Proces wiązania ochratoksyny A był znacznie niższy w warunkach pH 6,0. Wiązanie aflatoksyny B1 najwydajniej zachodziło w obecności oczyszczonego preparatu β -glukanu przy pH 6,0 (adsorpcja na poziomie ok. 30%) przy współczynniku podziału 41 ml/g. Najniższą wartość Kd stwierdziłam dla preparatu β -glukanu podczas wiązania fumonizyny B1 przy pH 6,0 (Kd tylko około 2 ml/g).

Biorąc pod uwagę wymagania dla adsorbentów mykotoksyn [17], zastosowane stężenie badanych preparatów CW i β -G było wystarczające do związania co najmniej 20% mikotoksyny tylko w przypadku ZEN, OTA, AFB1 i DON (ściany komórkowe).

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość waloryzacji odpadowej ziemniaczanej wody sokowej w produkcji preparatów o właściwościach adsorpcji szczególnie zearalenonu i ochratoksyny oraz aflatoksyny. Konieczne są dalsze badania, które warto ukierunkować na optymalizację formulacji preparatów celem zwiększenia powierzchni wiązania. Należy także określić, czy badane preparaty przyczynią się do obniżenia negatywnego oddziaływania wskazanych toksyn *in vivo*.

5.4.4. Podsumowanie i możliwość wykorzystania uzyskanych wyników oraz dalsze perspektywy badawcze

Ideą podjętych badań było wykorzystanie odpadu przemysłu rolno-spożywczego w biosyntezie $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu ściany komórkowej drożdży i próba uzyskania preparatu tego polisacharydu. Określono właściwości wiązania mykotoksyn przez wytworzone preparaty ścian komórkowych i $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdży *C. utilis* ATCC 9950, wytypowanych jako wydajny producent tego polisacharydu. Prowadzone przeze mnie badania mają charakter zarówno poznawczy jak i wykazują potencjał wdrożeniowy. **W osiągnięciu wskazałam nowy, konkurencyjny sposób wytwarzania preparatów $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdżowego w hodowli drożdży *C. utilis* oparty na waloryzacji odpadowej ziemniaczanej wody sokowej. W ramach realizacji przedstawionych etapów badań opracowałam podstawowe składowe procesu technologicznego uwzględniające warunki hodowli drożdży intensyfikujące syntezę β -glukanu w skali biofermentora laboratoryjnego, sposób otrzymywania preparatów ścian komórkowych oraz izolacji $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu. Wskazałam zdolność wiązania zearalenonu, ochratoksyny i aflatoksyny przez preparaty ścian komórkowych i β -glukanu drożdży *C. utilis* namnożone według zaproponowanego sposobu.** Uzyskane wyniki stanowią punkt wyjścia do opracowania innowacyjnej technologii produkcji preparatów $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu pochodzenia drożdżowego w skali przemysłowej. Wskazane rozwiązanie wpisuje się w rosnące zapotrzebowanie rynkowej produkcji β -glukanu drożdżowego na cele przemysłu spożywczego, paszowego, farmaceutycznego i kosmetycznego. Możliwe ścieżki wykorzystania uzyskanych przeze mnie wyników badań zostały zaprezentowane w artykule opublikowanym na łamach Dziennik Gazeta Prawna pt: „Co za gruboskórny typ”. Artykuł ten stanowił nagrodę redakcyjną w IV Edycji konkursu "Eureka! DGP - odkrywamy polskie wynalazki", którego celem jest wsparcie komercjalizacji wyników badań (Załącznik

4, II-L.2.4). Został on przygotowany na podstawie udzielonego wywiadu (**Załącznik 5, III-M.2**). Opracowane rozwiązanie produkcji $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu drożdżowego było także tematem audycji radiowej Agro-Fakty pt. „Niecodzienne wykorzystanie drożdży? To może być pomysł na biznes” w Programie I Polskiego Radia (**Załącznik 5, III-M.1**). Wywiad dla biura prasowego SGGW pt: „Odpady dla zdrowia i urody” zamieszczony na stronie internetowej Uczelni także wskazywał potencjalne wykorzystanie opracowanego rozwiązania (**Załącznik 5, III-M.3**). Podobnie wywiad dla magazynu branżowego - Gospodarka odpadami, pt.: „Innowacyjne rozwiązania w zagospodarowaniu odpadów rolno-spożywczych” (**Załącznik 5, III-M.4**). Ponadto, uzyskane wyniki zaprezentowałam na dwóch konferencjach biznesowo-naukowych (**Załącznik 4, II-M.2.1, II-M.2.2**), uczestnikami których byli przedstawiciele firm zagranicznych specjalizujących się w produkcji β -glukanu drożdżowego i preparatów drożdżowych.

Wyniki moich badań pogłębiły wiedzę dotyczącą wpływu warunków wzrostu drożdży na biosyntezę składników ściany komórkowej i strukturę tego organellum. Wyznaczają także kierunki moich dalszych badań, które będę koncentrowała na poznaniu zmian na poziomie budowy strukturalnej $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu w zależności od gatunku i warunków wzrostu drożdży w powiązaniu z potencjalną aktywnością biologiczną tych polisacharydów. Wpływ budowy chemicznej $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanu na właściwości funkcjonalne tego polisacharydu nie są dokładnie poznane. Krokiem, który podjęłam w celu realizacji tych planów jest uczestnictwo w akcji COST CA18103 INNOGLY Europejskiego Programu Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych (**Załącznik 4, II-K.2.1; Załącznik 5, III-A.1.3**).

5.4.5. Wykaz cytowanej literatury

1. Arena M.P., Spano J., Fiocco D. (2017) *Am J Immunol* 13(4), 34-44.
2. Auinger A., Riede L., Bothe G., Busch R., Gruenwald J. (2013) *Eur J Nutr* 52:1913-1918.
3. Bacha U., Nasir M., Iqbal S., Anjum A.A. (2017) *Biomed Res Int* volume 2017, Article ID 8972678, 14 pages. doi: 10.1155/2017/8972678.
4. Baert, K., De Geest, B.G., De Greve, H., Cox, E., Devriendt, B. (2016) *Int J Nanomed* 11, 2463-2469.
5. Beese S.E., Negishi T., Levin D.E. (2009) *Plos Genet* 5(11):e1000738. doi: 10.1371/journal.pgen.1000738.
6. Bekatorou A., Psarianos C., Koutinas A.A. (2006) *Food Technol Biotechnol* 44(3):407-415.
7. Bermejo C., Rodríguez R., García R., Rodríguez-Pena J.M. et al. (2008) *Mol Biol Cell* 19, 1113-1124.
8. Bohn J.A., BeMiller J.N. (1995) *Carbohydr Polym* 28, 3-14.
9. Borchani Ch., Fonteyn F., Jamin G., Destain J., Willems L., Paquot M., Blecker C., Thonart P. (2016) *Crit Rev Food Sci Nutr* 56(10): 1746-1752.
10. Bzducha-Wróbel A., Kieliszek M., Błażej S. (2013) *Eur Food Res Technol* 237: 489-499.
11. Camilli G., Tabouret G., Quintin J. (2018) *Front Immunol* DOI:10.3389/fimmu.2018.00673
12. Chen, J., Seviour, R. (2007) *Mycol Res* 111(6), 635-652.
13. Commission Implementing Decision of 24 November 2011 authorising the placing on the market of yeast beta-glucans as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the EP and of the Council.
14. Da Silva G.P., Mack M., Contiero J. (2009) *Biotechnol Adv* 27(1), 30-39.
15. Dalonso N., Goldman G.H., Gern R.M.M. (2015) *Appl Microbiol Biotechnol* 99(19), 7893-7906.
16. Duškova M., Borovikova D., Herynkova P., Rapoport A., Sychrova H. (2015) *FEMS Microbiol Lett* 362(3), 1-8.

17. EFSA. *Scientific report submitted to EFSA*. Call for proposal: CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01 (2009) <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/sp.efsa.2009.EN-22>
18. Future Market Insights: "Beta-glucanMarket: Global Industry Analysis and Opportunity Assessment 2015 - 2025". <https://globenewswire.com/news-release/2015/08/21/762539/10146822/en/Global-Beta-glucan-Market-to-Expand-at-7-CAGR-through-2025-says-Future-Market-Insights.html>
19. Gancedo C., Gancedo J.M., Sols A. (1968) *European J Biochem* 5:165-172.
20. Gientka I., Aleksandrak-Piekarczyk T., Bzducha-Wróbel A., Synowiec A., Błażej S. (2019) *Potato Res* DOI: 10.1007/s11540-018-9408-x
21. Gow N.A.R., Latge J.P., Munro C. (2017) *Microbiol Spectr* doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
22. Hartland R.P., Vermeulen C.A., Klis F.M., Sietsma J.H., Wessels J.G. (1994) *Yeast* 10(12):1591-1599.
23. Hohmann S. (2002) *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 300-372.
24. Klein M., Swinnen S., Thevelein J.M., Nevoigt E. (2017) *Environ Microbiol* 19(3):878-893.
25. Klis F.M., Mol P., Hellinngwerf K., Brul S. (2002) *FEMS Microbiol Rev* 26: 239-256.
26. Klis F.M., Boorsma A., De Groot P.W.J. (2006) *Yeast* 23:185-202.
27. Kopecká M., Gabriel M., Nečas O., Svoboda A., Venkov P.V. (1991) *J Gen Microbiol* 137:1263-1270.
28. Kosiek, E. (1993) *Zesz Nauk PŁ, Technol Chem Spoż* 648, 31-41.
29. Kowalczewski P., Celka K., Białas W., Lewandowicz G. (2012) *Acta Sci Pol Technol Aliment* 11(2), 175-181.
30. Lages F., Lucas C. (1997) *Biochim Biophys Acta* 1322:8-18
31. Laroche C., Michaud P. (2007) *Recent Pat Biotechnol* 1:59-73.
32. Lesage G., Bussey H. (2006) *Microbiol Mol Biol Rev* 70(2): 317-343.
33. Levin D.E. (2011) *Genetics* 189:1145-1175.
34. Magnani M., Calliari C.M., De Macedo J.F.C., Mori M.P., De Syllos Cólus I.M., Casto-Gomez R.J.H. (2009) *Carbohydr Polym* 78(4):658-665.
35. Moré, M., Swidsinski, A. (2015) *Clin Exp Gastroenterol* 8:237-255.
36. Neves L., Oliveira R., Lucas C. (2004) *FEMS Yeast Res* 5(1):51-62.
37. Novák M., Synytsya A., Gedeon O., Slepíčka P., Procházka V., Synytsya A., Blahovec J., Hejlová A., Čopíková J. (2012) *Carbohydr Polym* 87: 2496-2504.
38. Nowak J., Górna B., Nowak W. (2013) *Żywność Nauka Technologia Jakość* 6(91), 191-203.
39. Ochoa-Estopier A., Lesage J., Gorret N., Guillouet S.E. (2011) *Bioresour Technol* 102: 1521-1527.
40. Osumi M. (1998) *Micron* 29(2-3), 207-233.
41. Papaspyridi L-M., Zerva A., Topakas E. (2018) *Catalysts* 8, 274: 1-23.
42. Progressive Markets: "Global Yeast Extracts and Beta-Glucan Market – Size, Trend, Share, Opportunity Analysis, and Forecast, 2014-2025". <https://www.newsguards.com/2017/12/16/yeast-extracts-beta-glucan-industry-expected-grow-cagr-7-3-2018-2025-progressive-markets/>
43. Reserach and Markets: Global Beta Glucan Market Size, Market Share, Application Analysis, Regional Outlook, Growth Trends, Key Players, Competitive Strategies and Forecasts, 2017 to 2025. <https://www.researchandmarkets.com/reports/4431818/global-beta-glucan-market-size-market-share>
44. Research and Markets, Potato starch market: global industry trends, share, size, growth, opportunity and forecast 2018-2023. <https://www.researchandmarkets.com/reports/4535068/potato-starch-market-global-industry-trends> Accessed 30 January 2019
45. Shao Y., Wang Z., Tian X., Guo Y., Zhang H. (2016) *Int J Biol Macromol* 85: 573-584.
46. Smits G.J., van den Ende H., Klis F.M. (2001) *Microbiology* 147:781-794.
47. Stier H., Bischoff C. (2016) *Clin Exp Gastroenterol* 9:269-279.
48. Šandula J., Kogan G., Kačuráková M., Machová E. (1999) *Carbohydr Polym* 38:247-253
49. Tao W., Deschenes R.J., Fassler J.S. (1999) *J Biol Chem* 274(1):360-367
50. Tkacz J.S. (1992) In: Sutcliffe JA, Georgopapadakou NH (eds) *Emerging Targets in antibacterial and antifungal chemotherapy*, Springer, Boston, MA, pp.495-523
51. Transparency Market Research, Yeast Extract and Beta Glucan Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth and Forecast 2015 – 2021 <https://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/global-yeasts-products-market.htm>
52. Turcotte B., Liang X.B., Robert F., Soontorngun N. (2010) *FEMS Yeast Res* 10:2-13.
53. Xu S., Zhang G.Y., Zhang H., Kitajima T., Nakanishi H., Gao X.D. (2016) *Microb Cell Fact* 15(1):179.
54. Yiannikouris A., François J., Poughon L., Dussap C.G., Bertin G., Jeminet G., Jouany J.P. (2004) *J Agric Food Chem* 52(11), 3666-3673.
55. Yoshida Y., Yokoi W., Ohishi K., Ito M., Naito E., Sawada H. (2005) *Biosci Biotech Bioch* 69(4), 714-723.
56. Young S.H., Dong W.J., Jacobs R.R. (2000) *J Biol Chem* 275:111874-111879.
57. Zhu F., Du B., Xu B. (2016) *Food Hydrocoll* 52: 275-288.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

6.1. Obszary zainteresowań naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora

Główne obszary mojej działalności naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora dotyczyły:

- 1) **Kształtowania jakości i bezpieczeństwa żywności,**
- 2) **Zastosowania metod analizy instrumentalnej w ocenie jakości i bezpieczeństwa żywności.**

Ad. 1 Kształtowanie jakości i bezpieczeństwa żywności

Moje pierwsze badania naukowe podjęłam w 2003 roku w Zakładzie Analizy Żywności Wydziału Technologii Żywności (obecnie Wydział Nauk o Żywności) przygotowując **pracę magisterską** pt.: „Wpływ hydrolizy enzymatycznej kazeiny na jej synergizm z kwasem askorbinowym i β -karotenem w modelowych układach oksydacyjnych” pod kierunkiem naukowym dr inż. Rafała Wołosiaaka (obecnie dr hab. inż.). Podjęty przeze mnie wówczas problem badawczy jest stale aktualny. Oprócz działalności mikroorganizmów reakcje utleniania zachodzące w żywności są jedną z głównych przyczyn ograniczania jej trwałości i przydatności do spożycia. Inhibicja procesów utleniania osiągana jest m.in. poprzez stosowanie substancji przeciwutleniających, a mechanizmy reakcji synergistycznych między takimi substancjami nie są dokładnie poznane. **W efekcie przeprowadzonych badań wskazałam**, że ektywność antyoksydacyjna zastosowanych w pracy przeciwutleniaczy zależała od charakteru układu (emulsja lub roztwór kwasu linolowego) oraz mechanizmu reakcji utleniania (autooksydacja, reakcja utleniania enzymatycznego oraz fotosensybilizowanego). Najbardziej stabilny charakter przeciwutleniający we wszystkich stosowanych układach oksydacyjnych posiadała kazeina, nie wykazując właściwości prooksydacyjnych. Kwas askorbinowy i β -karoten stosowane oddzielnie wykazały zróżnicowane właściwości – od działania prooksydacyjnego do silnie przeciwutleniającego podczas autooksydacji (kwas askorbinowy) i utleniania fotosensybilizowanego (β -karoten) emulsji kwasu linolowego. W układach nieenzymatycznych najsilniejsze działanie przeciwutleniające wykazały połączenia kazeiny z kwasem askorbinowym, β -karotenem oraz obydwoma wskazanymi przeciwutleniaczami, zaś największe efekty synergistyczne uzyskano przy połączeniach hydrolizatu kazeiny z kwasem askorbinowym bądź β -karotenem. Najmniejszą efektywność hamowania utleniania

przez zastosowane przeciwutleniacze zaobserwowałam w reakcji katalizowanej lipooksygenazą. Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w pracy w *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* (Załącznik 4, II-D.1.4). Były również prezentowane na konferencji (Załącznik 4, II-E.1.16).

Celem naukowym badań podjętych przeze mnie w ramach pracy doktorskiej było określenie wpływu bakterii probiotycznych z rodzaju *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, *Lactobacillus casei* DN-11401 oraz *Lactobacillus acidophilus* La-5 na zawartość kwasu linolowego o wiązaniach skoniugowanych (CLA) w tłuszczu modelowych serów dojrzewających. Związek ten wykazuje działanie przeciwnowotworowe, przeciwutleniające, przeciwmiażdżycowe i immunostymulujące. Badania realizowałam w Zakładzie Analizy Żywności pod opieką Prof. dr hab. Mieczysława W. Obiedzińskiego we współpracy z dr hab. Małgorzatą Ziarno, prof. SGGW z Zakładu Biotechnologii Mleka. Prace były finansowane w ramach projektu promotorskiego wspartego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Załącznik 4, II-K.1.2). **W efekcie przeprowadzonych badań stwierdziłam**, że zawartość CLA zależała od warunków dojrzewania, sposobu wytwarzania modeli serów oraz kombinacji zastosowanych kultur starterowej i probiotycznych. Najwyższy wzrost zawartości CLA w odniesieniu do modeli kontrolnych (zawierających tylko monokulturę starterową) zaobserwowałam w układach zawierających bakterie *Lb. acidophilus* La-5 oraz dodatek kwasu linolowego jako substratu przemian. Stwierdziłam, że dodatek kwasu linolowego do modeli zawierających bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* indukował powstawanie hydroksykwasów, które wskazywane są jako produkty pośrednie w szlaku biosyntezy CLA przez bakterie mlekowe. Obserwowałam zależność między koncentracją izomerów *cis* i *trans* hydroksykwasów, składem mikroflory probiotycznej w układach eksperymentalnych oraz syntezą izomerów CLA (kwasów *cis*-9, *trans*-11 oraz *trans*-9, *cis*-11 linolowego). W modelach, do których dodawano pałeczki *Lactobacillus casei* (jako pojedynczy probiotyk bądź w zestawieniu z pozostałymi pałeczkami) dominował kwas 10-hydroksy-*cis*-12-oktadekenowy. W modelach zawierających pałeczki *Lactobacillus acidophilus* przeważał natomiast izomer 10-hydroksy-*trans*-12-oktadekenowy. W modelach z monokulturą *Bif. animalis* subsp. *lactis* oraz w zestawianiu *Bif. animalis* subsp. *lactis* z *Lb. acidophilus* zawartość omawianych związków była wyższa od stwierdzonej w układach kontrolnych, ale niższa od ilości analizowanych w modelach zawierających pałeczki *Lb. casei*. W serach modelowych, gdzie hydroksykwasy obecne były w wyższych stężeniach, wyższa była również zawartość CLA. Pracę obroniłam z wyróżnieniem (Załącznik 4, II-L.2.6). Została ona także wyróżniona w ramach II Edycji konkursu „Innowator Mazowska” w kategorii

Innowacyjny Młody Naukowiec (**Załącznik 4, II-L.2.5**). Uzyskane wyniki oraz dokonany przegląd literatury zostały opublikowane w *Polish Journal of Food and Nutrition Science, Nauka Przyroda Technologie, Żywność Nauka Technologia Jakość, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, Przegląd Mleczarski* oraz jako rozdział w monografii naukowej (**Załącznik 4, II-C.2.1, II-D.1.2, II-D.1.5, II-D.1.6, II-D.1.10, II-D.1.11, II-D.1.14, II-D.2.1**). Były także przedmiotem komunikatów konferencyjnych (**Załącznik 4, II-E.1, II-E.2, II-E.3, II-E.1.6, II-E.1.9, II-E.2.6, II-E.2.27, II-E.2.28, II-M.2.7**).

W 2004 roku **uczestniczyłam w projekcie badawczym w ramach 3-miesięcznego stypendium** finansowanego ze środków programu **Central European Exchange Programme for University Studies** (**Załącznik 4, II-G.1.1, II-K.1.1; Załącznik 5, III-N.1**). Stypendium to odbywałam na Uniwersytecie w Ljublanie (Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology, Chair of Biotechnology, Microbiology and Food Safety). **Celem badań było** określenie wpływu różnych czynników stresowych (szok temperaturowy, stres oksydacyjny oraz głodowy) na nabywanie oporności i tworzenie przez bakterie patogenne *Campylobacter jejuni* form aktywnych metabolicznie, ale nie dających wzrostu z zastosowaniem klasycznych metod hodowlanych (VBNC). **Efektom przeprowadzonych badań było wskazanie**, że bakterie *Campylobacter jejuni* są zdolne do przedłużania żywotności komórek poprzez wejście w stan fizjologiczny, w którym nie dochodzi do replikacji, przy zachowanej aktywności metabolicznej. Badane komórki osiągały ten stan po ekspozycji na 5-godzinny stres głodowy połączony z działaniem stresu oksydacyjnego (od 5 do 72 godzin). Komórki z fazy logarytmicznego wzrostu poddawane 5-godzinnemu stresowi głodowemu wykazywały wyższą przeżywalność i tworzyły mniej form kokoidalnych (VBNC) w porównaniu z fazą stacjonarną. Dodatek krwi do podłoża hodowlanych działał ochronnie na komórki poddawane działaniu atmosfery tlenowej. Przegląd literatury, którego dokonałam na potrzeby udziału w tych badaniach skłonił mnie do napisania artykułu przeglądowego dotyczącego szybkich metod identyfikacji mikroorganizmów w żywności i ich znaczenia w detekcji komórek w stanie VBNC opublikowane w czasopiśmie *Medycyna Weterynaryjna* (**Załącznik 4, II-D.1.9**).

Ad.2. Zastosowanie metod analizy instrumentalnej w ocenie jakości i bezpieczeństwa żywności

Już w czasie studiów magisterskich starałam się pogłębiać wiedzę i umiejętności praktyczne z zakresu analizy instrumentalnej żywności. Uczestniczyłam w stażach w instytutach badawczych zajmujących się oceną jakości i bezpieczeństwa żywności (**Załącznik 5, III-N.3, III-N.4**). Umiejętności analityczne

poszerzałam następnie na szkoleniach i kursach odbywanych podczas studiów doktoranckich, jak również po już uzyskaniu stopnia doktora (**Załącznik 5, III-N.5, III-T.4, III-T.5, III-T.8, III-T.10, III-T.16, III-T.26**). Poznane techniki analizy instrumentalnej wykorzystywałam m.in. **do monitorowania zmian w składzie związków lotnych** powstających w czasie dojrzewania fermentowanych produktów mlecznych w zależności od mikroflory zastosowanej w procesie produkcji. **W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono**, że ocena udziału acetoiny, kwasu masłowego lub kwasu propionowego we frakcji lotnej próbek analizowanej z zastosowaniem SPME-GC/MS może służyć do planowania i kontroli trwania procesu fermentacji oraz czasu przechowywania mlecznych produktów fermentowanych. Analiza frakcji związków lotnych okazała się przydatna w ustalaniu stopnia proteolizy i lipolizy serów dojrzewających oraz umożliwiała rozróżnianie takich produktów w zależności od pochodzenia. Uzyskane wyniki prac badawczych, a także dokonany przegląd literatury, były podstawą publikacji w *Polish Journal of Food and Nutrition Science, Żywność Nauka Technologia Jakość, Przegląd Spożywczy* (**Załącznik 4, II-D.1.3, II-D.1.7, II-D.1.12, II-D.1.13**) i komunikatów konferencyjnych (**Załącznik 4, II-E.1.5, II-E.1.7, II-E.1.8, II-E.1.10, II-E.1.13, II-E.1.15**).

Uczestniczyłam w badaniach nad oceną przydatności RP-HPLC z detektorem UV oraz GC/MS do oznaczania zawartości fenyloalaniny w zbożowych produktach niskobiałkowych przeznaczonych dla osób obciążonych genetycznie fenyloketonurią. Byłam odpowiedzialna za opracowanie metody oznaczania fenyloalaniny z zastosowaniem zestawu testowego EZ:faast oraz GC/MS. **W efekcie przeprowadzonych prac stwierdzono**, że technika HPLC jest bardziej przydatna do ilościowej analizy fenyloalaniny w produktach zbożowych niskobiałkowych (pszennych). Stwierdzone zawartości fenyloalaniny w badanych produktach niskobiałkowych były poniżej deklaracji producenta, przypuszczalnie opierających się na wyliczeniach teoretycznego udziału tego aminokwasu w białku pszennym. Uzyskane wyniki opublikowano w *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* (**Załącznik 4, II-D.1.1**) oraz zaprezentowano podczas konferencji (**Załącznik 4, II-E.1.4**). Brałam również udział w badaniach nad oceną jakości suplementów diety niezbędnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych obejmujących analizę składu kwasów tłuszczowych omega-3 w wybranych produktach w odniesieniu do deklaracji producenta. **W efekcie przeprowadzonych badań** stwierdzono, że część deklaracji przedstawianych przez producentów była niezrozumiała i wprowadzała konsumenta w błąd. Profil kwasów tłuszczowych ocenianych suplementów w dużej mierze był zgodny z charakterystyką surowców deklarowanych w produkcji. Oceniane preparaty charakteryzowały się w większości

wyższym udziałem kwasu EPA w porównaniu DHA. Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w artykule opublikowanym już po uzyskaniu przez mnie stopnia doktora w *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* (Załącznik 4, II-D.2.6). Uczestniczyłam także w badaniach nad oceną autentyczności czekolad dostępnych na rynku. **W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono**, że wśród badanych próbek występowały takie, w których producenci zastosowali zamienniki tłuszczu kakaowego lub tłuszczów roślinnych, nie deklarując tego faktu. Świadczyły o tym stwierdzone różnice w proporcjach poszczególnych kwasów tłuszczowych oraz wyniki analizy zawartości steroli (kampesterolu, beta-sitosterolu i cholesterolu). Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Żywność Nauka Technologia Jakość* (Załącznik 4, II-D.1.8). Zostały także zaprezentowane podczas konferencji (Załącznik 4, II-E.1.11) uzyskując wyróżnienie (Załącznik 4., II-L.1.1).

W okresie przed uzyskaniem stopnia doktora uczestniczyłam w pracach nad projektem Quali-Juice (COLL-CT-2005-012461) - „Zapewnianie jakości i rozwój systemu wczesnego ostrzegania mikrobiologicznego psucia się soków owocowych dla europejskiego przemysłu soków owocowych” współrealizowanego w ramach 6PR UE przez Krajową Unię Producentów Soków (Załącznik 4, II-G.1.3, II-G.1.4, II-K.1.3). Projekt ten dotyczył wdrażania biosensorów, jako instrumentalnych systemów szybkiej detekcji skażeń mikrobiologicznych w sokach owocowych, na podstawie zawartości kwasu mlekowego.

Zdobyte umiejętności analityczne wykorzystywałam prowadząc wykłady i warsztaty szkoleniowe z zakresu analizy instrumentalnej z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) oraz technik ekstrakcji SPE i SPME dla pracowników Inspekcji Handlowej zajmujących się monitorowaniem jakości żywności (Załącznik 5, III-P.10). Były szkolenia organizowane w ramach projektów finansowanych z funduszy Unii Europejskiej programu Środki Przejściowe 2005.

6.2. Obszary zainteresowań naukowych po uzyskaniu stopnia doktora

W roku 2008 zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta, a następnie adiunkta (rok 2009) w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności. Rozpoczęłam wówczas badania w zespole kierowanym przez Prof. dr hab. Stanisława Błażejaka, który zainspirował mnie do podjęcia badań nad ścianą komórkową drożdży i wykorzystania odpadów rolno-spożywczych w hodowli tych drobnoustrojów. Moje zainteresowania naukowo-badawcze koncentrują się od tego momentu na:

- 1) **Biotechnologicznym wykorzystaniu drożdży w procesach ukierunkowanych na otrzymywanie składników żywności i pasz,**
- 2) **Biotechnologicznym wykorzystaniu bakterii w procesach ukierunkowanych na produkcję składników żywności oraz w kształtowaniu jakości i bezpieczeństwa żywności.**

Pierwszym wskazanym obszarem badawczym, który zaznacza się w mojej działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora jest **biotechnologiczne wykorzystanie drożdży w procesach ukierunkowanych na otrzymywanie składników żywności i pasz.**

Badania z tego zakresu wiązały się z tematyką dwutygodniowego szkolenia, które odbyłam na Uniwersytecie w Ghent w Belgii jeszcze przed obroną doktoratu z zakresu możliwości wykorzystywania odpadów przemysłowych m.in. w procesach biotechnologicznych (Załącznik 5, III-N.2). **Oprócz biosyntezy β -glukanu, prace z zakresu biotechnologicznego wykorzystania drożdży, w których uczestniczyłam dotyczą tematyki otrzymywania biopleksów magnezu i selenu, biosyntezy białka, tłuszczu, karotenoidów i egzopolisacharydów drożdżowych.** Możliwości wykorzystania drożdży w produkcji tych składników zostały przedstawione przez nasz zespół w pracy przeglądowej w czasopiśmie *Fungal Biology Reviews* (Załącznik 4, II-A.2.8), na przykładzie gatunku *Candida utilis*, jednego z głównych obiektów moich badań. Jest to gatunek uznany za bezpieczny do spożycia i wpisany na amerykańską listę GRAS.

Komórki drożdży są zdolne do pobierania ze środowiska i akumulacji w biomase makro- i mikroelementów. Biomase drożdży można dzięki temu wzbogacić w składniki mineralne, takie jak magnez i selen, uzyskując biopleksy

o wysokiej przyswajalności. Wiązanie kationów przez komórki drożdży jest w pierwszym etapie niezależne od ich metabolizmu i polega na chemisorpcji jonów do składników ściany komórkowej. Jednym z etapów prac z obszaru **wykorzystania drożdży w procesie bioakumulacji magnezu, w których uczestniczyłam**, było poszukiwanie zależności między strukturą ściany komórkowej a wiązaniem jonów magnezu przez drożdże z gatunków *Candida utilis* oraz *Saccharomyces cerevisiae* podczas hodowli w podłożach modelowych suplementowanych tym pierwiastkiem. **W efekcie przeprowadzonych badań** stwierdzono, że budowa ściany komórkowej badanych drożdży, jak również zmiany w jej składzie chemicznym zachodzące pod wpływem zróżnicowania warunków inkubacji, były cechą indywidualną testowanych szczepów. Najwięcej mannoprotein zawierały drożdże piekarskie *S. cerevisiae* 102, natomiast β -glukanów drożdże *C. utilis* ATTC 9950. Odnotowałam zróżnicowanie w proporcjach $\beta(1,3)$ - i $\beta(1,6)$ -glukanów w ścianie komórkowej w zależności od szczepu i warunków hodowli. Wiązanie magnezu przez drożdże gorzelnicze *S. cerevisiae* Nr 1 i *C. utilis* ATTC 9950 okazało się zależne od zmian w składzie i zawartości β -glukanów, podczas gdy dla szczepu *S. cerevisiae* 102 było uzależnione od zmian we frakcji mannoproteinowej. Wprowadzenie dodatkowego źródła magnezu do podłoża doświadczalnych powodowało zwiększenie grubości ściany komórkowej, co jednak w przypadku żywych komórek drożdży nie wpływało na wzrost wydajności wiązania jonów magnezu. Jedynie w przypadku biomasy pasteryzowanej wzrost grubości ściany zwiększał zdolność wiązania magnezu. Uzyskane wyniki badań stały się podstawą przygotowania publikacji naukowej z listy JCR w czasopiśmie *European Food Research and Technology* (**Załącznik 4, II-A.2.20**).

Omówione prace ukierunkowały moje cele badawcze na poznanie zmian w strukturze ściany komórkowej drożdży w zależności od warunków wzrostu. **Rozpoczęłam w tym okresie wstępne badania nad doborem warunków wzrostu drożdży do biosyntezy składników ściany komórkowej** wykorzystując glicerol jako źródło węgla w podłożu z peptonem i ekstraktem drożdżowym (zmodyfikowane podłoże YPD) w hodowli drożdży z rodzajów *Saccharomyces*, *Candida* i *Kluyveromyces*. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń potwierdziły, że zastosowane podłoża hodowlane z glicerolem wpływały na zmianę zawartości $\beta(1,3)$ - oraz $\beta(1,6)$ -glukanu oraz mannoprotein w preparatach ścian komórkowych. W ścianie drożdży *Candida utilis* ATTC 9950, w zależności od warunków wzrostu, stwierdziłam ok. 2 - 4 razy wyższy udział sumarycznej zawartości $\beta(1,3)$ - i $\beta(1,6)$ -glukanu w porównaniu z preparatami ścian drożdży z rodzajów *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces*. Wyniki uzyskane w ramach tych prac opublikowałam w czasopismach *European Food Research and Technology*, *Yeast* (recenzowane materiały pokonferencyjne) oraz *Zeszyty*

Problemowe Postępów Nauk Rolniczych (Załącznik 4, II-A.2.19, II-A.2.21, II.D.2.4). Były także prezentowane na konferencjach (Załącznik 4, II-E.2.4, II-E.2.22, II-E.2.23, II-E.2.25, II-E.2.26). Dalsze prace z tego obszaru koncentrowałam na wykorzystaniu glicerolu oraz odpadowej ziemniaczanej wody sokowej jako taniego źródła azotu w biosyntezie funkcjonalnych polisacharydów ściany komórkowej drożdży. Jest to cykl badań, których wyniki wskazałam w osiągnięciu będącym podstawą wniosku habilitacyjnego.

Brałam udział w **pracach badawczych nad akumulacją selenu przez komórki drożdży i wpływem tego pierwiastka na przemiany zachodzące w komórkach wybranych drożdży**. Selen to pierwiastek ważny dla funkcjonowania organizmów żywych. Jest integralną częścią centrów aktywnych enzymów systemu przeciwutleniającego. Wzrasta zainteresowanie znaczeniem tego pierwiastka w diecie, podczas gdy biomasa drożdży wzbogacona w selen może stanowić źródło łatwo przyswajalnych form tego pierwiastka. **Jednym z etapów badań z tego zakresu było określenie wpływu selenu na metabolizm kwasów tłuszczowych i aminokwasów w komórkach drożdży *C. utilis* i *S. cerevisiae*** namnażanych w obecności tego pierwiastka. Byłam w tych badaniach odpowiedzialna za analizę zmian w składzie jakościowym i ilościowym kwasów tłuszczowych w biomacie badanych drożdży. **W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono** znaczące różnice w profilu kwasów tłuszczowych w tłuszczu badanych drożdży po namnażaniu w hodowlach wzbogaconych w selen. W tłuszczu drożdży *C. utilis* dochodziło do znaczącej redukcji udziału kwasu oleinowego (na poziomie ok. 45%) z jednoczesnym wzrostem udziału kwasów wielonienasyconych (linolowego i linolenowego). Biomasa drożdży namnażanych w obecności selenu charakteryzowała się wyższą zawartością lizyny, leucyny i waliny w porównaniu z uzyskaną z podłoża bez dodatku omawianego pierwiastka. Stwierdzono ponadto, że **wysokie dawki selenu wywoływały stres oksydacyjny w komórkach drożdży *C. utilis* ATCC 9950 oraz *S. cerevisiae* MYA-2200**, indukując wzrost aktywności peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej. Najwyższą aktywność peroksydazy glutationowej (ok. 5,4 mU/mg) zaobserwowano w biomacie drożdży *C. utilis* inkubowanej w roztworze wodnym suplementowanym 60 mg Se⁴⁺/L. Wraz ze zwiększeniem koncentracji selenu w doświadczalnych roztworach wodnych w biomacie badanych drożdży wzrastała zawartość glutationu całkowitego, w tym glutationu w formie utlenionej. **Obserwowano różnice** w profilu elektroforetycznym białek izolowanych z biomasy namnażanej w obecności selenu i w podłożu kontrolnym bez dodatku tego pierwiastka. W profilu białkowym drożdży inkubowanych w pożywkach z dodatkiem selenu (20–40 mg/L) stwierdzono obecność nowych frakcji o masach molekularnych 60, 22, 18 i 15 kDa.

Przypuszczalnie frakcje o masach 15 i 18 kDa odpowiadały selenoproteinom. Obecność selenu w hodowlach drożdży doprowadzała ponadto do zmian w morfologii komórek. Wyniki z tego obszaru badań ukazały się w czasopismach *Molecular Biology Reports*, *Biological Trace Element Research*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Załącznik 4, II-A.2.1, II-A.2.4, II-A.2.13, II-A.2.17) oraz *Applied Microbiology and Biotechnology* (artykuł przeglądowy, II-A.2.16). Wyniki tych badań były podstawą komunikatów konferencyjnych (Załącznik 4, II-E.2.12, II-E.2.17).

Kolejna tematyka badań, w których uczestniczyłam dotyczy **opracowywania procesów syntezy tłuszczu wewnątrzkomórkowego i karotenoidów drożdżowych**. Celem jednego z etapów tych prac było określenie możliwości wykorzystania odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej z dodatkiem glicerolu i innych źródeł węgla w biosyntezie tłuszczu jednokomórkowców oraz wydajnej produkcji biomasy drożdży olejogennych. Tłuszcz mikrobiologiczny może być źródłem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz karotenoidów. Zasadne jest zatem prowadzenie badań z zakresu biotechnologii tych składników biomasy drożdży. W ramach wskazanego obszaru uczestniczyłam w pracach nad syntezą tłuszczu przez drożdże *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* i *Trichosporon* oraz karotenoidów w hodowli drożdży *Rhodotorula glutinis*. W badaniach tych wykorzystywałam zdobytą wiedzę i umiejętności w zakresie analizy chromatograficznej lipidów. **Efekt prac nad biosyntezą tłuszczu w hodowli drożdży *Trichosporon domesticum* PCM 2960** było stwierdzenie, że suplementacja odpadowej ziemniaczanej wody sokowej glukozą stanowi rozwiązanie najefektywniej stymulujące biosyntezę tłuszczu wewnątrzkomórkowego (bogatego w kwas linolowy) przez te drożdże. W podłożu takim uzyskiwano wydajne namnażanie biomasy. Wydajna biosynteza tłuszczu przez drożdże *Rhodotorula glutinis* var. *rubescens* LOCKR13 okazała się możliwa jedynie podczas hodowli w pożywce z peptonem, ekstraktem drożdżowym i glukozą. Podłoże z odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej z dodatkiem glukozy nie indukowało lipogenezy w komórkach tych grzybów. Glicerol okazał się nieodpowiednim źródłem węgla w hodowli drożdży *Sporobolomyces salmonicolor*. Obserwowano wzrost udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych w tłuszczu drożdży *R. aurantiaca*, *R. glutinis* var. *rubescens* oraz *R. gracilis* po hodowli w pożywkach z dodatkiem glicerolu. **W efekcie badań przeprowadzonych z zastosowaniem drożdży *Rhodotorula glutinis*** stwierdzono, że początkowe pH pożywki hodowlanej z glicerolem i odbiałczoną ziemniaczaną wodą sokową wywierało istotny wpływ na wzrost tych drożdży, determinując uzyskiwany plon biomasy, nie indukując jednocześnie istotnych zmian w ilości syntetyzowanego tłuszczu i białka. Warunki pH wpływały natomiast znacząco na zawartość karotenoidów w biomacie tych drożdży oraz kwasu linolowego. Hodowla

w podłożach o początkowych pH w zakresie 4,0 - 7,0 umożliwiła uzyskanie wyższej wydajności biomasy komórkowej w porównaniu z pH 3,0 oraz dwukrotnie wyższej sumarycznej zawartości karotenoidów, w tym wyższej zawartości torularodiny. W zadanych warunkach hodowli badane drożdże nie wykazywały znaczącej syntezy lipidów w odniesieniu do definicji organizmów olejogennych. Wyniki badań omówionych prac ukazały się w czasopismach *European Food Research and Technology*, *Potato Research*, *Electronic Journal of Biotechnology*, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* (**Załącznik 4, II-A.2.2, II-A.2.3, II-A.2.9, II-A.2.11, II-D.2.4**). Były prezentowane w ramach komunikatów konferencyjnych (**Załącznik 4, II-E.2.1, II-E.2.7, II-E.2.9**).

Efektom prac w ramach omówionej tematyki badawczej jest patent przyznany w 2017 przez Urząd Patentowy RP na sposób otrzymywania biomasy drożdży olejogennych (**Załącznik 4, II-B.2.2**).

Uczestniczyłam także w pracach nad określeniem możliwości wykorzystania odbiałczanej ziemniaczanej wody sokowej z glicerolem w produkcji biomasy drożdży *C. utilis* jako źródła białka na cele paszowe. **W efekcie tych prac stwierdzono**, że namnażanie drożdży we wskazanym podłożu skutkowało obniżeniem zawartości białka w biomacie w porównaniu z podłożem kontrolnym YPD. Wyższe dawki glicerolu intensyfikowały ten efekt. Jednakże wysoka produktywność biomasy osiągana w podłożu z dodatkiem niższych dawek glicerolu pozwoliła uzyskać wydajność objętościową białka dwukrotnie wyższą w porównaniu z podłożem YPD. Ten zakres badań zaowocował publikacjami w *Waste and Biomass Valorization*, *Acta Scientiarum Polonorum Biotechnologia* oraz w *Postęпах Mikrobiologii* (**Załącznik 4, II-A.2.5, II-A.2.15, II-D.2.3**). Wyniki były prezentowane również na konferencyjach (**Załącznik 4, II-E.2.10, II-E.2.15**).

Brałam także udział w badaniach **nad biosyntezą zewnątrzkomórkowych polisacharydów** przez drożdże *C. famata* oraz *C. guilliermondii*. Egzopolisacharydy drożdżowe mogą być wykorzystywane w produkcji żywności jako dodatki o znaczeniu technologicznym, kształtujące właściwości reologiczne produktów. Z tego względu możliwe jest także ich wykorzystanie w produkcji kosmetyków. W ramach wskazanych prac oznaczałam węglowodany w preparatach egzopolisacharydów (EPS) uzyskanych w hodowlach wskazanych drożdży w podłożach o zróżnicowanym źródle węgla (sacharoza, maltoza, glicerol i sorbitol). **Efektom tych badań było wskazanie maltozy, jako najkorzystniejszego źródła węgla w syntezie egzopolisacharydów w hodowlach badanych drożdży.** Maltoza intensyfikowała zawartość polisacharydów w wydzielanym egzopolimerze. Gatunek *C. guilliermondii* okazał się wydajniejszym producentem EPS. Wyniki tych

badania ukazały się w *Electronic Journal of Biotechnology* (Załącznik 4, II-A.2.14). Były także prezentowane na konferencjach (Załącznik 4, II-E.2.16).

Brałam udział w badaniach nad **oceną możliwości wykorzystania odpadowej ziemniaczanej wody sokowej w produkcji pullulanu** wytwarzanego w hodowli **grzybów polimorficznych *Aureobasidium pullulans* B-1**. Pullulan jest polisacharydem zatwierdzonym w Unii Europejskiej jako dodatek do żywności. Jest wykorzystywany do wytwarzania kapsułek, powłok i filmów jadalnych. Może być stosowany w żywności przeznaczony dla diabetyków. Stwierdzono, że hodowla badanego szczepu w nierozcieńczonej wodzie sokowej skutkowałą bardzo niską wydajnością syntezy wskazanego polisacharydu mikrobiologicznego, co należy wiązać z wysoką zawartością związków azotu i niską zawartością węgla w tym odpadzie. Badany odpad może być wykorzystany jako źródło azotu w produkcji pullulanu po rozcieńczeniu i suplementacji dodatkowym źródłem węgla. Najlepsze rezultaty (ok. 1,12g pullulanu/ 100 ml) uzyskano w podłożu z 5-krotnie rozcieńczoną wodą sokową z dodatkiem sacharozy i soli. Uzyskane wyniki zaprezentowano w formie komunikatu konferencyjnego (Załącznik 4, II-E.2.3).

Zainicjowałam badania nad biosyntezą skwalenu w hodowli drożdży. W ramach tej tematyki zrealizowane zostały do tej pory pod moją opieką dwie prace dyplome. Badania w ramach tego obszaru kontynuuję.

Uczestniczyłam w pracach badawczych realizowanych dla przedsiębiorstwa Aldes Sp. z o.o. nad doborem szczepu drożdży o wysokiej aktywności fermentacyjnej (Załącznik 4, II-G.2.3; Załącznik 5, III-P.3).

Drugim obszarem badawczym, który zaznacza się w mojej działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora jest **biotechnologiczne wykorzystanie bakterii w procesach ukierunkowanych na produkcję składników żywności oraz w kształtowaniu jakości i bezpieczeństwa żywności**.

W ramach wskazanej tematyki **uczestniczyłam w badaniach nad przeciwplesniową aktywnością bakterii kwasu mlekowego**. Jest to bardzo istotny obszar badań z punktu widzenia możliwości zapewniania bezpieczeństwa żywności na drodze naturalnej biokonserwacji. Byłam odpowiedzialna za analizę chromatograficzną metabolitów badanych bakterii *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* oraz *Lactobacillus fermentum* po hodowli w podłożach z dodatkiem octanu magnezu. Aktywność przeciwplesniową określano w odniesieniu do gatunków *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium avenaceum* oraz *Rhizopus arrhizus*. **W efekcie przeprowadzonych prac stwierdzono,**

że dodatek octanu magnezu do podłoża hodowlanego badanych bakterii stymulował je do produkcji kwasu octowego w ciągu pierwszych 8h hodowli, a w niewielkim stopniu również syntezę kwasu mlekowego przez bakterie *L. plantarum* w czasie pierwszych 24h inkubacji. Stwierdzono, że inhibicja wzrostu badanych pleśni (za wyjątkiem gatunku *R. arrhizus*) była wyższa po hodowli bakterii w podłożu MRS z dodatkiem wskazanej soli w porównaniu z podłożem niemodyfikowanym. Efekt hamujący wzrastał w ciągu 48h hodowli bakterii. Wyniki tych badań ukazały się w *Journal of Food Protection* (**Załącznik 4, II-A.2.7**).

Brałam także udział w badaniach **nad określeniem wpływu pullulanu na wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* oraz *E. coli* wyizolowanych z próbek treści stolca niemowląt**. Pullulan jest rozpuszczalnym w wodzie polisacharydem wytwarzanym przez grzyby polimorficzne *Aureobasidium pullulans*. Jest oporny na hydrolizę pod wpływem enzymów trawiennych przewodu pokarmowego człowieka. Spełnia pod tym względem definicję prebiotyku. **W efekcie przeprowadzonych badań** nie stwierdzono istotnej stymulacji wzrostu badanych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w obecności badanego polisacharydu. Zaobserwowano jednak wzrost aktywności fermentacyjnej tych bakterii w obecności pullulanu. W tych warunkach inkubacji obserwowano redukcję liczby bakterii *E. coli*. Uzyskane wyniki opublikowano w *Current Pharmaceutical Biotechnology* (**Załącznik 4, II-A.2.10**). Były częściowo prezentowane na konferencji (**Załącznik 4, II-A.2.13**).

Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* są wykorzystywane w biosyntezie kwasu propionowego i kobalaminy. Kwas propionowy znajduje zastosowanie jako konserwant żywności, w produkcji farmaceutyków, pasz dla zwierząt, kosmetyków i herbicydów. Uczestniczyłam w badaniach **nad określeniem potencjału szczepu *P. freudenreichii* T82 do produkcji kwasu propionowego oraz witaminy B12** i optymalizacją warunków hodowli tych bakterii pod względem rodzaju i ilości źródła węgla (glukoza, fruktoza i sacharoza), ukierunkowanych na biosyntezę wspomnianych metabolitów. W pracach tych byłam odpowiedzialna za analizę chromatograficzną. **Wyniki przeprowadzonych badań** wskazały, że w podłożach w których glukoza stanowiła co najmniej 50% dostępnych źródeł węgla osiągnano najwyższą produkcję kwasu propionowego przez badany szczep bakteryjny. Najniższe wydajności stwierdzano natomiast w obecności sacharozy. Zaobserwowano odwrotną zależność między ilością kwasu wytwarzanego przez te bakterie i biosyntezą witaminy B12. Uzyskane wyniki opublikowano w czasopiśmie *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* (**Załącznik 4, II-A.2.6**).

Wykorzystanie immobilizowanego preparatu o aktywności dehydrogenazy glicerolowej w procesie oksydacji glicerolu odpadowego do dihydroksyacetonu były kolejnym obszarem badań, w których wykorzystywałam umiejętności w zakresie analizy instrumentalnej. Dihydroksyaceton (DHA) jest składnikiem stosowanym w produkcji farmaceutyków, kosmetyków i żywności. Jest także substratem w syntezie organicznej m.in. związków powierzchniowoczynnych. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że immobilizowany ekstrakt komórkowy wyizolowany z bakterii *G. oxydans* ATCC621 stanowił efektywniejszy system katalityczny transformacji glicerolu do DHA w porównaniu z komórkami badanego szczepu. Najwydajniejsza synteza DHA zachodziła w ciągu pierwszej doby prowadzenia procesu. Badano także wpływ zawartość pirochinolinochinonu (PQQ) w środowisku reakcji na ilość wytwarzanego DHA. Dehydrogenaza glicerolowa bakterii *G. oxydans* jest zależna od tego związku. W zastosowanych stężeniach nie zaobserwowano istotnego wpływu PQQ na biokonwersję glicerolu w obecności badanego preparatu enzymatycznego. Wyniki tych prac opublikowano w czasopiśmie *Electronic Journal of Biotechnology Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* (**Załącznik 4, II-A.2.12, II-D.2.2**). Badania z tego zakresu były również prezentowane na konferencjach (**Załącznik 4, II-E.2.11, II-E.2.19**).

Wiedzę i umiejętności badawcze oraz praktykę z zakresu mikrobiologii żywności zdobyłam m.in. w czasie kilkumiesięcznego stażu w laboratorium SGS Polska (**Załącznik 5, III-O.4**) wykorzystywałam nie tylko na potrzeby dydaktyki, ale również wykonując ekspertyzy dla podmiotów z przemysłu spożywczego, paszowego i kosmetycznego. Współpracę z przemysłem uznaję za bardzo ważny przejaw mojej aktywności naukowo-badawczej. Były to prace badawcze zlecone przez przedsiębiorstwo Multisorb Technologies (USA) z zakresu oceny jakości mikrobiologicznej produktów mięsnych pakowanych z zastosowaniem nowoczesnych rozwiązań obniżających dostępność tlenu w atmosferze produktu (**Załącznik 4, II-G.2.1, II-G.2.2; Załącznik 5, III-P.1, III-P.2**). Testy przechowalnicze obciążeniowe oceniające skuteczność zabezpieczenia kosmetyków przed rozwojem mikroorganizmów wykonywałam w ramach prac zleconych przez Laboratorium Kosmetyczne dr Irena Eris (**Załącznik 4, II-G.2.5 - II-G.2.7; Załącznik 5, III-P.6, III-P.7**). Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących przeciwdrobnoustrojowej aktywności preparatów przekazanych przez przedsiębiorstwo CID LINES Sp. z o.o. (**Załącznik 4, II-G.2.4; Załącznik 5, III-P.4**). Dla przedsiębiorstwa CHEMTECH zrealizowałam ekspertyzę nad doborem preparatu i dawki hamującej wzrost drobnoustrojów w biofilmie (**Załącznik 4, II-G.2.5; Załącznik 5, III-P.5**). Realizując te badania wyizolowałam nowy szczep pleśni z rodzaju *Acremonium* o nieznanym przynależności gatunkowej, którego informację genetyczną zdeponowałam

w międzynarodowej bazie GenBank pod nr zgłoszenia LC064992.1 (**Załącznik 4, II-F.2.1**). Aktualnie prowadzę badania nad potencjałem biotechnologicznym tych grzybów. Tematyka ta była też podstawą kilku prac dyplomowych zrealizowanych pod moją opieką merytoryczną. Artykuł z tego zakresu badań jest w przygotowaniu.

Po obronie pracy doktorskiej prowadziłam szkolenia w ramach kursu chromatograficznego oraz technik ekstrakcji w ramach współpracy z Centralnym Ośrodkiem Badawczo-Rozwojowym Aparatury Badawczej i Dydaktycznej (**Załącznik 5, III-P.9, III-P.11**).

Zdobyte przez lata pracy naukowej doświadczenie, ale także podczas stażu zawodowego na stanowisku specjalisty ds. legislacyjnych w Związku Prywatnych Przetwórców Mleka oraz odbytych praktyk (**Załącznik 5, III-O.1, III-O.3**) wykorzystałam w 2010 do przygotowania i wygłoszenia wykładu na Uniwersytecie w Pisie (Włochy), dotyczącego aspektów jakości i bezpieczeństwa produktów mleczarskich. Referat ten został przygotowany na potrzeby dwutygodniowego szkolenia w ramach Socrates Intensive Programme „Broadening of the skills in food sanitary safety” (**Załącznik 5, III-A.2.4**).

7. Podsumowanie liczbowe dorobku naukowo-badawczego

7.1 Podsumowanie danych bibliometrycznych całościowego punktowanego dorobku naukowego

Mój całkowity dorobek naukowy wg punktacji MNiSW wynosi **884 punkty**. (Tabela 1.), z czego **104 punkty** przypada na okres przed uzyskaniem stopnia doktora, a **780 punktów** po uzyskaniu stopnia doktora (w tym **175 punktów** przypada na osiągnięcie naukowe, które jest podstawą wniosku habilitacyjnego).

Sumaryczny Impact Factor (IF) opublikowanych prac wynosi **52,768** (zgodnie z rokiem publikacji) i dotyczy prac opublikowanych po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora. Na osiągnięcie, które jest podstawą wniosku habilitacyjnego przypada **sumaryczny IF = 14,869**.

Liczba cytowań moich prac wg bazy **Web of Science Core Collection** wynosi **140** (bez autocytowań **110**), a zgodnie z **Web of Science All Databases** są to **148 cytowania** (bez autocytowań **118**). Zgodnie z bazą **Scopus** są to **175 cytowania** (bez autocytowań **107**). Są to dane z dnia 25 marca 2019r.

Index Hirscha wg bazy **Web of Science** wynosi **6**, a zgodnie z bazą **Scopus** wskaźnik ten wynosi **7**.

Dotychczas opublikowałam 56 prac, z czego 42 po uzyskaniu stopnia doktora (Tabela 1). Na wskazany dorobek naukowy składa się:

- 26 publikacji w czasopiśmie z IF (wszystkie po uzyskaniu stopnia doktora), w tym 6 stanowiących wskazane osiągnięcie
- 20 publikacji z listy B MNiSW (13 przed i 7 po uzyskaniu stopnia doktora),
- 6 rozdziałów w monografiach naukowych (po uzyskaniu stopnia doktora),
- 1 artykuł w czasopiśmie branżowym niepuktowanym,
- 2 patenty i 1 zgłoszenie patentowe (po uzyskaniu stopnia doktora).

Szczegółowe zestawienie danych zawartych w Tabeli 1 przedstawiono w **Załączniku 4** do wniosku.

Tabela 1. Tabelaiczne zestawienie opublikowanego dorobku naukowego z uwzględnieniem współczynników IF oraz punktacji MNiSW czasopism

Kategoria	Przed doktoratem			Po doktoracie			Razem		
	Liczba	*IF	**Punkty MNiSW	Liczba	IF	Punkty MNiSW	Liczba	IF	Punkty MNiSW
Oryginalne prace twórcze z IF (lista A MNiSW) włączając stanowiące osiągnięcie	0	0	0	22	44,921	540	22	44,921	540
Oryginalne prace twórcze bez IF (lista B MNiSW)	11	0	90	6	0	50	17	0	140
Artykuły przeglądowe z IF (lista A MNiSW)	0	0	0	4	7,847	105	4	7,847	105
Artykuły przeglądowe bez IF (lista B MNiSW)	2	0	14	1	0	10	3	0	24
Artykuły przeglądowe niepuktowane	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Rozdziały w monografiach naukowych	0	0	0	6	0	25	6	0	25
Patenty i zgłoszenia patentowe	0	0	0	3	0	50	3	0	50
RAZEM publikacje i patenty	14	0	104	42	52,768	780	56	52,768	884

* Wartość współczynnika wpływu IF podana zgodnie z rokiem publikacji wg. listy Journal Citation Reports. W przypadku publikacji z lat 2018 i 2019 uwzględniono IF z roku 2017 ze względu na brak danych za rok wydania.

** Punkty MNiSW z roku publikacji zgodnie komunikatami MNiSW wskazanymi w Załączniku 4. W przypadku publikacji z 2018 i 2019 roku uwzględniono punktację czasopism zgodnie z Komunikatem MNiSW z dnia 25 stycznia 2017 roku ze względu na brak danych za rok wydania.

7.2. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego niepunktowanego

W **Tabeli 2** przedstawiłam liczbowy wykaz niepuktowanych osiągnięć dorobku naukowego, które uważam za najistotniejsze spośród wskazanych w **Załączniku 4** (wykaz osiągnięć związanych z działalnością naukowo-badawczą) oraz **Załączniku 5** (informacje o współpracy międzynarodowej, osiągnięciach dydaktycznych, odbytych stażach naukowych i zawodowych, popularyzacji nauki oraz działalności organizacyjnej).

Wyniki mojej działalności naukowo-badawczej były prezentowane podczas **3** konferencji zagranicznych, **6** konferencji krajowych międzynarodowych oraz **19** konferencji o zasięgu krajowym w formie (Tabela 2):

- **47 komunikatów naukowych** opublikowanych w materiałach konferencyjnych (30 po uzyskaniu stopnia doktora), w tym:
 - **7 wystąpień ustnych** wygłoszonych na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych (po uzyskaniu stopnia doktora),
 - **40 komunikatów posterowych** (17 przed oraz 23 po uzyskaniu stopnia doktora).

Tabela 2. Zestawienie liczbowe niepuktowanego dorobku naukowego (wybrane)

Kategoria	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
	<i>Liczba</i>		
Opublikowane abstrakty komunikatów konferencyjnych, w tym:	17	30	47
<i>Postery</i>	17	23	40
<i>Komunikaty ustne</i>	0	7	7
Sekwencje DNA zdeponowane w GenBank	0	1	1
Ekspertyzy	0	17	17
Inne specjalistyczne opracowania pisemne	2	0	2
Szkolenia podmiotów zewnętrznych	1	1	2
Kierowanie projektami i zadaniami badawczymi oraz udział w takich projektach	3	5	8
Sprawozdania z realizacji projektów i zadań badawczych	2	3	5
Uczestnictwo w programach europejskich (badawcze i dydaktyczne)	4	4	8
Udział w konsorcjach i sieciach badawczych	0	1	1
Recenzje artykułów naukowych	0	32	32
Nagrody i wyróżnienia za działalność naukową	1	6	7
Staż naukowe i zawodowe	7	3	10
Popularyzacja nauki	0	14	14
RAZEM	37	117	154

Po uzyskaniu stopnia doktora uzyskałam **2 nagrody i 1 wyróżnienie JM Rektora** Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia naukowe (**Załącznik 4, II-L.2.2, II-L.2.3, II-L.2.6**). Dwukrotnie zostałam wyróżniona przez Kapituły konkursów zewnętrznych (**Załącznik 4, II-L.2.4, II-L.2.5**). Zostałam także wyróżniona przez Edytorów czasopisma Innovative Food Science and Emerging Technologies za jakość przygotowywanych recenzji prac naukowych (**Załącznik 4, II-L.2.1**).

Warszawa, 10.04.2018.....

Anna Bzducha-Wróbel
.....
podpis