

Dr inż. Marek Konrad Kieliszek

# **Autoreferat**

z opisem osiągnięć naukowych  
związanych z postępowaniem habilitacyjnym

Załącznik 2A

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Wydział Nauk o Żywności

Warszawa, 2019

## Spis treści

1. Dane personalne .....	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki.....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4.2. Publikacje wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej.....	4
4.3. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania .....	6
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	28
5.1. Charakterystyka enzymów wykorzystywanych w przemyśle spożywczym.....	30
5.2. Charakterystyka produktów pszczelich .....	34
5.3. Właściwości prozdrowotne owoców róży <i>Rosa rugosa</i> .....	36
5.4. Rola selenu w patofizjologicznym znaczeniu oddziaływań hydrofobowych białek.....	37
5.5. Identyfikacja wybranych gatunków ptaków na podstawie błon witelinowych jaj.....	39
5.6. Możliwości wykorzystania pullulanu jako substancji o właściwościach prebiotycznych ...	41
5.7. Identyfikacja mikroorganizmów oraz charakterystyka ich zdolności do biosyntezy różnych metabolitów.....	42
6. Podsumowanie pracy naukowo-badawczej .....	46

## 1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Marek Konrad Kieliszek  
Miejsce pracy: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie,  
Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii  
i Oceny Żywności  
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

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

12.06.2015 Doktor nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, praca doktorska, pt. „Bioakumulacja selenu w komórkach drożdży *Candida utilis* ATCC 9950” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Błażejaka

12.06.2009 Studia podyplomowe, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Biologia molekularna

13.06.2008 Magister inżynier, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, praca magisterska, pt. „Oczyszczanie i charakterystyka proteaz wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*” wykonana pod kierunkiem dr hab. Adama Waśko, prof. UP w Lublinie

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.01.2016 Adiunkt  
obecnie Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności,  
Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

01.01.2015 Asystent  
01.01.2016 Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności,  
Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

12.09.2014 Asystent  
31.12.2014 Zakład Mikrobiologii,  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego  
im. prof. Waclawa Dąbrowskiego w Warszawie

19.04.2012	Specjalista badawczo-techniczny
11.09.2014	Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waława Dąbrowskiego w Warszawie
20.03.2009	Mikrobiolog
18.04.2012	Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waława Dąbrowskiego w Warszawie

#### 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r., poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311) jest jednotematyczny cykl siedmiu publikacji naukowych z lat 2016–2019.

##### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Studia nad wiązaniem i metabolizmem selenu w komórkach drożdży uzyskanych w hodowli na podłożu komercyjnym oraz na odpadach rolno-spożywczych.

##### 4.2. Publikacje wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej

H1. **Kieliszek M.**, Kot A. M., Bzducha-Wróbel A., Błażej S, Gientka I., Kurcz A. (2017) Biotechnological use of *Candida* yeasts – a review. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 185–198.

*(Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: udział w opracowaniu koncepcji pracy, opis poszczególnych rozdziałów pracy, przygotowanie publikacji, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 40%)*

Impact Factor<sub>2017</sub>: 3,967, MNiSW<sub>2017</sub>: 40 pkt.

H2. **Kieliszek M.**, Błażej S., Płaczek M. (2016) Spectrophotometric evaluation of selenium binding by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 and *Candida utilis* ATCC 9950 yeast. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35, 90–96.

*(Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: udział w opracowaniu koncepcji pracy, prowadzenie badań, napisanie manuskryptu, przygotowanie publikacji, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 70%)*

Impact Factor<sub>2016</sub>: 3,225, MNiSW<sub>2016</sub>: 20 pkt.

- H3. **Kieliszek M.**, Błażej S., Kurek E. (2017) Binding and conversion of selenium in *Candida utilis* ATCC 9950 yeasts in bioreactor culture. *Molecules*, 22(3), 352.  
*(Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: udział w opracowaniu koncepcji pracy, prowadzenie badań, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu, przygotowanie publikacji, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 80%)*  
Impact Factor<sub>2017</sub>: 3,098, MNiSW<sub>2016/2017</sub>: 30 pkt.
- H4. **Kieliszek M.**, Błażej S., Piwowarek K., Brzezicka K. (2018) Equilibrium modeling of selenium binding from aqueous solutions by *Candida utilis* ATCC 9950 yeasts. *3 Biotech*, 8, 388.  
*(Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: udział w opracowaniu koncepcji pracy, prowadzenie badań, napisanie manuskryptu, przygotowanie publikacji, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 85%)*  
Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 1,497, MNiSW<sub>2017</sub>: 15 pkt.
- H5. **Kieliszek M.**, Błażej S. (2018) Speciation analysis of selenium in *Candida utilis* yeast cells using HPLC-ICP-MS and UHPLC-ESI-Orbitrap MS techniques. *Applied Sciences*, 8, 2050.  
*(Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: udział w opracowaniu koncepcji pracy, prowadzenie badań, napisanie manuskryptu, opis rezultatu badań, przygotowanie publikacji, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 90%)*  
Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 1,689, MNiSW<sub>2017</sub>: 25 pkt.
- H6. **Kieliszek M.**, Błażej S., Bzducha-Wróbel A., Kot A. M. (2019) Effect of selenium on lipid and amino acid metabolism in yeast cells. *Biological Trace Element Research*, 187, 316–327.  
Korekta: Kieliszek M., Błażej S., Bzducha-Wróbel A., Kot A. M. (2019) Correction: Effect of selenium on lipid and amino acid metabolism in yeast cells. *Biological Trace Element Research*, 187, 328–328.  
*(Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: udział w opracowaniu koncepcji pracy, prowadzenie badań, napisanie manuskryptu, opis rezultatu badań, przygotowanie publikacji, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 80%)*  
Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 2,361, MNiSW<sub>2017</sub>: 15 pkt.
- H7. **Kieliszek M.**, Błażej S., Bzducha-Wróbel A., Kot A. M. (2019) Effect of selenium on growth and antioxidative system of yeast cells. *Molecular Biology Reports*, <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04630-z>.  
*(Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: udział w opracowaniu koncepcji pracy, prowadzenie badań, napisanie manuskryptu, opis rezultatu badań, przygotowanie publikacji, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 85%)*  
Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 1,889, MNiSW<sub>2017</sub>: 20 pkt.

Oświadczenia współautorów odnośnie ich udziału we wspólnych publikacjach stanowiących jednotematyczny cykl zostały zamieszczone w załączniku 5.

Osiągnięcie będące podstawą ubiegania się o uzyskanie stopnia naukowego doktora habilitowanego zostało przedstawione w publikacjach o łącznej wartości współczynnika IF = **17,726**. Suma punktów według punktacji MNiSW, obliczonej zgodnie z rokiem publikacji wynosi **165**.

Wartość Indexu Hirscha wg bazy Web of Science wynosi **9**, zaś liczba cytowań **424** (bez autocytowań **347**). Wartość Indexu Hirscha wg bazy Elsevier Scopus wynosi **10**, zaś liczba cytowań **486** (bez autocytowań **404**).

#### **4.3. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

##### **Wprowadzenie**

W początkowym okresie mojej działalności naukowej podjąłem badania związane z procesem bioakumulacji selenu przez biomasę komórkową drożdży *C. utilis* ATCC 9950. Wyniki tych prac zostały przedstawione międzynarodowemu środowisku naukowemu poprzez opublikowanie po obronie pracy doktorskiej czterech artykułów naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) (zał. 3, punkt II, A-20, A-22, A-23, A-24). Należy podkreślić, że przeprowadzone badania cieszą się dużym zainteresowaniem w środowisku naukowym o czym świadczą liczne cytowania w bazie Web of Science oraz Elsevier Scopus. Rezultaty badań uzyskane w pracy doktorskiej stanowiły impuls do pogłębienia wiedzy z tego tematu i wykorzystania w dalszej pracy doświadczalnej nowych metod analitycznych. Uznałem, że produkty odpadowe pochodzące z różnych gałęzi branży rolno-spożywczej (ziemniaczana woda sokowa, glicerol) można wykorzystać jako składniki podłoża hodowlanego do wzrostu drożdży. Tak uzyskana i dobrze odżywiona biomasa komórkowa po hodowli powinna zawierać substancje zapasowe, które będą sprzyjały procesowi wiązania selenu z roztworów wodnych. Przyjęte założenie wyznaczyło dalszy kierunek moich badań mających na celu porównanie wiązania selenu przez drożdże z podłoża komercyjnego YPD suplementowanego selenem z biomasą komórkową drożdży otrzymaną po hodowli w podłożach przygotowanych z odpadów rolno-spożywczych, która wykazuje

zdolności wiązania tego pierwiastka z roztworów wodnych. Uzyskane wyniki badań pozwoliły pogłębić wiedzę na temat zdolności bioakumulacji selenu przez drożdże hodowane w różnych warunkach. Jednocześnie uzyskano wiele nowych informacji naukowych dotyczących wpływu tego pierwiastka na szlaki metaboliczne w komórkach drożdży oraz wyjaśniono działanie systemów detoksykacyjnych umożliwiających przetrwanie komórkom w środowisku zawierającym ten pierwiastek. Z punktu widzenia technologii żywności i żywienia drożdże wzbogacone w pierwiastki śladowe m.in. selen mogą stanowić jeden ze sposobów zwalczania niedoborów składników mineralnych w codziennej diecie. Otrzymanie wyników badań dało możliwość wyprowadzenia wartościowych wniosków, które zbliżają do poznania możliwości wpływu selenu na funkcjonowanie komórek eukariotycznych (drożdży).

Selen jako ważny biopierwiastek jest niezbędny do funkcjonowania wszystkich organizmów. Pełni rolę przeciwutleniacza, chroniącego przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. Najistotniejsze znaczenie biologiczne selenu związane jest z jego występowaniem w białkach i enzymach, m.in. selenoproteinach (peroksydaza glutationowa, dejodynaza, reduktaza glutationowa). Pierwiastek ten najczęściej występuje w formach organicznych, czego przykładem są aminokwasy selenometionina i selenocysteina (Kieliszek i Błażej 2013). Dostępność biologiczna selenu determinowana jest przede wszystkim jego formą chemiczną, a w mniejszym stopniu całkowitym stężeniem. Biodostępność tego pierwiastka dla organizmów żywych oraz jego korzystne efekty w dużym stopniu zależą od zawartości w żywności. Organiczne formy selenu charakteryzują się większą biodostępnością i mniejszą toksycznością niż nieorganiczne formy tego pierwiastka (Kubachka i wsp. 2017; Tie i wsp. 2017). Asymilowane są one przez organizmy w około 85-95% w porównaniu z formami nieorganicznymi tego pierwiastka (40-50%) (Niedzielski i wsp. 2016). Należy podkreślić, że zakres stężenia selenu między dawką niezbędną i toksyczną dla organizmów jest bardzo wąski. Jego toksyczna dawka zaczyna się już od 400 µg/dobę. Nadmiar lub niedobór tego pierwiastka w diecie może prowadzić do wystąpienia zaburzeń w organizmie (selenoza, choroba Kashin-Beck). Z kolei odpowiednia dawka selenu (od 55 do 70 µg/dobę) korzystnie wpływa na zdrowie ludzi, zmniejsza ryzyko wystąpienia chorób nowotworowych, układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy.

W dzisiejszych czasach obserwuje się rosnące zainteresowanie suplementami diety oraz dynamiczny rozwój rynku preparatów wzbogaconych w selen. Niektóre z tych dodatków zawierają nieorganiczne sole tego pierwiastka. Pozostałe preparaty oparte są na drożdżach wzbogaconych selenem organicznym. Produkcja biomasy drożdży z produktów odpadowych pochodzących z różnych gałęzi przemysłu jako składników podłoża hodowlanego jest procesem opłacalnym i korzystnym pod względem ekonomicznym. Coraz większym zainteresowaniem cieszą się technologie hodowli drożdży z wykorzystaniem substratów odpadowych pochodzących z przemysłu rolno-spożywczego, m.in. ziemniaczana woda sokowa, gliceryna odpadowa po produkcji biodiesla, które mogą być przekształcone w produkty bardziej wartościowe.

W trakcie prowadzonych badań udało się potwierdzić możliwość wykorzystania biomasy drożdży w procesie bioakumulacji selenu. W związku z powyższym celem podjętych badań była analiza obejmująca szereg aspektów związanych z wiązaniem i metabolizmem tego pierwiastka przez biomasę komórkową drożdży. W efekcie tej działalności naukowej powstało 7 publikacji, które wchodzi w skład osiągnięcia habilitacyjnego (**H1-H7**). Cykl artykułów naukowych, przedłożonych jako podstawa mojego postępowania habilitacyjnego tworzy pięć szczegółowych celów badawczych, które obejmowały:

- Uzupełnienie aktualnego stanu wiedzy z zakresu biotechnologicznego wykorzystania drożdży *Candida utilis* w różnych gałęziach przemysłu (**H1**).
- Ocenę wzrostu i zdolności wiązania selenu przez drożdże w różnych skalach hodowli laboratoryjnych. Opracowanie nowej metody spektrofotometrycznej oznaczania selenu, która z powodzeniem może być wykorzystana do oznaczania tego pierwiastka w różnych matrycach biologicznych (**H2, H3**).
- Określenie skuteczności wiązania i akumulacji selenu z roztworów wodnych przez biomasę drożdży otrzymaną z hodowli w podłożach złożonych z produktów odpadowych (**H4**).
- Przeprowadzenie analizy specjacyjnej nowych związków selenowych występujących w biomasie komórkowej drożdży (**H5**).
- Kompleksową ocenę wpływu selenu na zmiany morfologiczne, metaboliczne lipidów i aminokwasów w biomasie drożdży. Omówiono także wpływ tego



pierwiastka na funkcjonowanie systemu antyoksydacyjnego w komórkach drożdży (H6, H7).

### **Omówienie wyników**

Właściwości biotechnologiczne drożdży wykorzystywane są w różnych gałęziach przemysłu. Ze względu na swoje cechy oraz znaczenie aplikacyjne biomasa tych mikroorganizmów znajduje coraz większe zainteresowanie w środowisku naukowym. Wielką zaletą jest również możliwość wykorzystania ich pełnego potencjału w branży spożywczej. Wyrazem moich dążeń do przedstawienia charakterystyki i wykorzystania drożdży była praca przeglądowa opublikowana w czasopiśmie *Fungal Biology Reviews* (H1).

W artykule przedstawiono perspektywy biotechnologicznego zastosowania niekonwencjonalnych drożdży z rodzaju *Candida* w przemyśle spożywczym. Z punktu widzenia technologii żywności na szczególną uwagę zasługuje możliwość wytwarzania przez drożdże biopleksów, a więc połączeń białkowych z pierwiastkami. Ponadto zwrócono uwagę na potencjał tych drobnoustrojów jako źródła białka mikrobiologicznego i polisacharydów w żywieniu ludzi i zwierząt. Przedstawiono również możliwości biosyntezy przez drożdże innych metabolitów (m.in. ksylitol, erytrytol, kwas cytrynowy).

Drożdże z rodzaju *Candida* stanowią grupę drobnoustrojów o szerokich możliwościach aplikacyjnych we współczesnej biotechnologii. Mikroorganizmy te nie mają wysokich wymagań pokarmowych oraz wykazują szybkie tempo wzrostu. Są one szeroko wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłowych. Z powodzeniem znalazły zastosowanie w technologii żywności, medycynie, czy farmacji. Produkcja biomasy drożdży bogatej w poszczególne metabolity na dużą skalę charakteryzuje się wieloma zaletami: może być otrzymywana z wykorzystaniem nieskomplikowanych technik hodowlanych oraz można ją uzyskać z różnych surowców odpadowych pochodzących z wielu gałęzi przemysłu. Ze względu na wyjątkowe zdolności metaboliczne drożdże z rodzaju *Candida* są zdolne do asymilacji wielu substancji stanowiących źródło węgla i azotu, w tym różnorodnych surowców odpadowych. Dzięki temu wykorzystanie tych mikroorganizmów we współczesnym przemyśle stwarza możliwość biodegradacji

odpadów przemysłowych i otrzymanie w ten sposób metabolitów znajdujących zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Wzrost zapotrzebowania konsumentów na produkty ekologicznie bogate w łatwo przyswajalne składniki mineralne oraz witaminy stanowią dowód na celowość prowadzenia badań w tym kierunku. W świadomości konsumentów tkwi bowiem przekonanie o konieczności spożywania naturalnej, niezagrażającej zdrowiu żywności. Z tego względu na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wybrane gatunki drożdży posiadają status GRAS (Generally Recognized as Safe), a więc w świetle obecnej wiedzy są bezpieczne dla ludzi i zwierząt. Jednym z zastosowań komórek drożdży jest ich wykorzystanie w procesie produkcji preparatów stosowanych w celach terapeutycznych, żywieniowych, czy profilaktycznych. Przykładem takich produktów mogą być biopleksy. Atrakcyjność komórek drożdży w tym zakresie polega na ich zdolności do wiązania deficytowych mikroelementów (m.in. selenu) i ich włączaniu do struktur komórkowych.

Dieta europejska charakteryzuje się niską zawartością selenu ze względu na różnice w występowaniu tego pierwiastka w środowisku. Głównym odbiorcą selenu z gleby są rośliny, a te z kolei są głównym jego źródłem w diecie ludzi i zwierząt. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy należy zalecać racjonalny sposób żywienia, zapewniający pokrycie zapotrzebowania na wszystkie potrzebne składniki pokarmowe, które nie zawsze są dostarczane z produktami spożywczymi. Dlatego wraz z rosnącym zainteresowaniem suplementacją farmaceutyczną różnych kluczowych mikroelementów, wiele uwagi poświęca się suplementacji żywieniowej selenu i projektowaniu żywności funkcjonalnej. Drożdże hodowane w podłożach wzbogaconych selenem są wykorzystywane jako podstawa dodatków do żywności i pasz bogatych w ten pierwiastek (Bierla i wsp. 2018). Z punktu widzenia współczesnych trendów w technologii żywności niższa efektywność żywieniowa selenowych form nieorganicznych skłoniła do poszukiwania nowych, bardziej skutecznych metod suplementacji. Drożdże selenowe to obecnie uznany suplement diety uzupełniający ewentualne braki selenu u ludzi na całym świecie. Prowadzone badania naukowe potwierdzają wykorzystanie biomasy drożdży, jako bardzo dobrego nośnika dla różnych biologicznie czynnych substancji (pierwiastków). Według dostępnej literatury wzbogacona w mikroelementy biomasa drożdży wywiera szczególnie korzystny wpływ na zdrowie człowieka (Jach i wsp. 2015).

Podsumowując należy zaznaczyć, że w przedstawionej publikacji przeglądowej wskazano na możliwe przyszłe trendy w prowadzeniu innowacyjnych badań w obszarze biotechnologii spożywczej. Treści przedstawione w artykule są cennym źródłem wiedzy na temat wykorzystania drożdży *C. utilis* w przemyśle spożywczym. Taki zbiór informacji może wskazywać nową drogę dla prowadzenia w przyszłości badań na komórkach drożdży w celu intensyfikacji produkcji ważnych metabolitów.

Wyjaśnienie mechanizmów zachodzących podczas wiązania selenu przez komórki drożdży nadal pozostaje tematem, który w dużym stopniu nie został do końca zbadany. W trakcie prowadzonych przeze mnie badań do rozprawy doktorskiej udało się potwierdzić możliwość wykorzystania drożdży *C. utilis* ATCC 9950 w procesach wiązania selenu. W tym oznaczenia zawartości tego pierwiastka w biomacie drożdży wykorzystywano dość kosztowną metodę spektrometrii mas sprzężoną z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS). Próby zmniejszenia kosztów analizy zawartości selenu skutkowało podjęciem opracowania metody umożliwiającej szybkie oznaczenie tego pierwiastka.

W drugiej pracy **H2** wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego porównano zdolności wzrostu i akumulacji selenu z podłoża hodowlanego zawierającego różne stężenia selenu (10-60 mg Se<sup>4+</sup>/L) przez dwa szczepy drożdży: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 oraz *Candida utilis* ATCC 9950. Zasadniczym celem prowadzonych badań było opracowanie szybkiej metody oznaczania zawartości selenu.

Na tym etapie badań wykorzystano komercyjne podłoże YPD oraz zastosowano nową metodę spektrofotometryczną z wykorzystaniem barwnego odczynnika Variamine Blue (VB) do przeprowadzenia analizy zawartości selenu. Jego maksimum absorpcji odpowiadało fali o długości 546 nm. Różnica pomiędzy początkową zawartością selenu w podłożu, a końcową (po procesie hodowli) oznaczała selen związany z biomasą komórkową drożdży. Reakcja ta opierała się na uwolnieniu jodu z roztworu jodku potasu pod wpływem anionów seleninowych. Metoda została udoskonalona (wymagała kwaśnego środowiska w zakresie 1-1.5 pH), co w konsekwencji umożliwiło zmniejszenie kosztów analiz, a ze względu na jej prostotę wykonania jest obecnie wykorzystywana w ocenie wykrywania selenu w różnych próbkach biologicznych.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że w badanym zakresie stężeń selenu (10-60 mg Se<sup>4+</sup>/L) odnotowano znaczne ograniczenie plonu biomasy obu szczepów drożdży wobec hodowli kontrolnej bez dodatku tego pierwiastka. Niewielka dawka jonów selenu ograniczała wzrost i namnażanie komórek, a dalsze jej zwiększanie potęgowało zahamowanie wzrostu drożdży. Porównując testowane szczepy wykazano, że silniejszym wzrostem charakteryzowały się drożdże *C. utilis*, które po 24-godzinnej hodowli w obecności 10 mg Se<sup>4+</sup>/L osiągnęły najwyższy plon biomasy wynoszący 15 g/L. W przypadku drożdży *S. cerevisiae* hodowanych w tym samym podłożu doświadczalnym plon biomasy wyniósł tylko 6,7 g/L. Różnice wrażliwości na selen badanych szczepów mogą wynikać z mechanizmu jego toksyczności na badane drożdże. Zgodnie z danymi literaturowymi zbyt duża zawartość selenu we wnętrzu komórki drożdżowej może generować stres oksydacyjny, który uszkadza takie struktury jak DNA i białka. Analizując procentowe wykorzystanie selenu z podłoża hodowlanego przez drożdże wykazano, że zastosowanie tego pierwiastka w dawce >40 mg/L było nieekonomiczne. Głównie ze względu na pozostawianie dużych ilości w podłożu doświadczalnym niewykorzystanego selenu (ok. 87%). Zaobserwowane po hodowli czerwone zabarwienie biomasy mikroorganizmów świadczyło o powstawaniu w cytozolu komórkowym dużej ilości selenu występującego w formie elementarnej. Otrzymane rezultaty badań świadczyły, że w biomacie wzrósł udział nieorganicznych form tego pierwiastka, które charakteryzuje niska biodostępność dla organizmów. Z punktu widzenia żywieniowego takie formy chemiczne selenu są bezużyteczne.

Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono, że najwydajniejszym wariantem wiązania selenu przez drożdże było wykorzystanie podłoża suplementowanego dawką ok. 10-30 mg Se<sup>4+</sup>/L. Zawartość selenu w drożdżach *S. cerevisiae* wynosiła od 1,4 do 2,2 mg Se<sup>4+</sup>/g. W przypadku drożdży *C. utilis* zawartość selenu wahała się w zakresie od 0,7 do 1,5 mg Se<sup>4+</sup>/g przy prawie 100% wykorzystaniu tego pierwiastka z podłoża hodowlanego. Na uwagę zasługuje fakt, że w miarę przedłużania czasu hodowli zawartość tego pierwiastka w drożdżach ulegała zwiększeniu. Należy podkreślić, że tolerancja drożdży na ten pierwiastek może zwiększać się wraz ze wzrostem jego stężenia w podłożu hodowlanym.

Podsumowując ten etap pracy należy zaznaczyć, że najefektywniejsze z punktu widzenia akumulacji selenu przez drożdże wydaje się być krótki czas hodowli

i niskie stężenie w podłożu hodowlanym tego pierwiastka (10-30 mg Se<sup>4+</sup>/L). Wykorzystana metoda z odczynnikiem Variamine Blue okazała się bardzo czuła i skuteczna. Zastosowana metoda dzięki swoim zaletom może być z powodzeniem wykorzystywana do monitorowania poziomu selenu w różnych matrycach biologicznych. Jednocześnie może zastąpić powszechnie stosowane metody (ICP-MS) do identyfikacji poziomu tego pierwiastka. Na podstawie wyników plonu biomasy i wykorzystania selenu z podłoża można ocenić, że drożdże z rodzaju *Candida* mogą być wykorzystane jako biosorbent w procesach wiązania tego pierwiastka, co może znaleźć praktyczne zastosowanie w produkcji drożdży wzbogaconych selenem.

Trzecia opublikowana praca (H3) dotyczyła sprawdzenia wiązania selenu z podłoża YPD przez drożdże *C. utilis* w większej skali hodowlanej wykorzystując bioreaktor. Uzyskane wyniki wykazały, że pod wpływem selenu i wraz z przedłużeniem czasu hodowli *C. utilis* biomasa drożdży była mniejsza w stosunku do plonu uzyskanego z hodowli kontrolnej. Wskazuje to na niewielką wrażliwość drożdży wobec tego pierwiastka. Uzyskane wyniki badań potwierdzają rezultaty otrzymane w hodowli prowadzonej w mniejszej skali laboratoryjnej (w kolbach płaskodennych) przedstawione w poprzedniej publikacji (H2). Po wprowadzeniu inokulum do kontrolnego podłoża YPD w bioreaktorze, plon biomasy komórkowej wynosił 2,1 g/L, natomiast w 24 godzinie hodowli osiągnął wartość 15,3 g/L. W podłożach suplementowanych selenem największy plon biomasy *C. utilis* wynoszący 13,6 g/L uzyskano przy stężeniu 20 mg Se<sup>4+</sup>/L i po upływie 24 godzin. W hodowli suplementowanej 30 mg Se<sup>4+</sup>/L, zwłaszcza po trzeciej dobie hodowli zaobserwowano czerwone zabarwienie biomasy komórkowej. Takie rezultaty mogły być wynikiem wystąpienia silnych procesów detoksykacyjnych w komórkach drożdży. Przedłużenie czasu hodowli do trzeciej doby wpływało na wystąpienie procesów autolizy komórek drożdży, co w konsekwencji powodowało zmniejszenie uzyskanego plonu biomasy. Ustalono ponadto, że mogło być to spowodowane przemianami metabolicznymi selenu w drożdżach prowadzącymi do powstania jego amorficznej czerwonej formy.

W trakcie prowadzenia 24-godzinnej hodowli doświadczalnej w podłożach suplementowanych selenem w dawkach 20 i 30 mg/L zawartość tego pierwiastka trwale związanego z biomasą komórkową drożdży *C. utilis* wyniosła odpowiednio

427,5 i 442  $\mu\text{g/g}$ . W kolejnej dobie hodowli (po 48 godzinach) poziom selenu był większy i wynosił 869 i 1711  $\mu\text{g/g}$ . Wydłużenie czasu hodowli do trzeciej doby powodowało dalszy wzrost akumulacji tego pierwiastka w biomacie komórkowej drożdży *C. utilis*. Proces wiązania jonów selenu ze środowiska hodowlanego może wzmacniać biosyntezę oraz wydzielanie przez komórki drożdży związków chelatujących i jonoforów, które w konsekwencji prowadzą do rozpadu kwasów tłuszczowych i zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych. Konsekwencją tych procesów jest zniszczenie struktur komórkowych i możliwy wyciek cytozolu komórkowego do środowiska hodowlanego.

W pracy wykonano również analizę zawartości aminokwasu selenometioniny metodą HPLC ICP-MS. Największą jej zawartość w komórkach drożdży *C. utilis* (238,8  $\mu\text{g/g}$ ) stwierdzono po drugiej dobie hodowli w biomacie uzyskanej z podłoża wzbogaconego selenem w ilości 20 mg/L. Na otrzymanych profilach chromatograficznych stwierdzono ponadto występowanie dodatkowych sygnałów świadczących o powstawaniu innych związków selenowych, których możliwą identyfikację przedstawiono w następnych publikacjach. Na uwagę zasługuje fakt, że selenometionina jest efektywnie magazynowana w tkankach, wykazuje właściwości antyoksydacyjne, wpływa na poprawę odporności organizmu ludzi (Rayman 2008; Tapiero i wsp. 2003; Laffon i wsp. 2010).

Uzyskane wyniki ze względu na nowatorski charakter prowadzonych badań dostarczają nowych informacji na temat wpływu selenu na wzrost drożdży *C. utilis* ATCC 9950 podczas hodowli prowadzonej w bioreaktorze. Otrzymane wyniki wskazały, że drożdże *C. utilis* mają możliwość przeprowadzania biotransformacji nieorganicznych związków selenu (IV) w ich pochodne organiczne, np. selenometioninę. Najefektywniejsze warunki z punktu widzenia produkcji drożdży selenowych są krótki czas hodowli drożdży do 48 godzin i niskie stężenie selenu na poziomie 20-30 mg/L.

Omawiając wszystkie aspekty wpływu selenu na drożdże w kolejnym etapie pracy podjęto kwestię wyjaśnienia zdolności akumulacji tego pierwiastka. Mechanizm wiązania selenu ze środowiska przez mikroorganizmy może zachodzić w dwóch etapach. Z danych literaturowych wynika, iż w przypadku drożdży może być wynikiem adhezji tego pierwiastka do struktur zespołu ścianowo-błonowego. Drożdże wiążą pierwiastki na drodze procesów chemisorpcji oraz bioakumulacji.

Chemisorpcja wykorzystuje zdolność mikroorganizmów do gromadzenia pierwiastków drogą absorpcji metabolizowanej lub fizykochemicznej (Gupta i Rastogi 2008). Drożdże charakteryzują się wysokim stopniem oddziaływania ze środowiskiem zewnętrznym. Konsekwencją takich procesów jest wydajne gromadzenie ze środowiska hodowlanego i przekształcanie wielu pierwiastków w strukturach komórkowych, co stanowi drugi etap bioakumulacji tego pierwiastka.

W pracy **H4** przedstawiono skuteczność wiązania i gromadzenia selenu z roztworów wodnych przez biomasę drożdży, którą otrzymano w podłożu hodowlanym składającym się z przemysłowych produktów odpadowych (ziemniaczana woda sokowa, glicerol). Ponadto uzyskano informację o występowaniu możliwych interakcji jonów selenu z powierzchniowymi grupami chemicznymi występującymi na komórkach drożdży wiążącymi ten pierwiastek.

W literaturze opisanych jest wiele przykładów przemawiających za ogromnym znaczeniem różnych ugrupowań występujących na powierzchni adsorbentu, które biorą udział w procesie adsorpcji, a następnie akumulacji selenu. Przedstawiona analiza spektroskopowa widma FT-IR biomasy drożdży wykazała obecność zjonizowanych grup funkcyjnych (tj. karboksylowych, aminowych, amidowych i hydroksylowych) na powierzchniach komórek drożdży *C. utilis*. Proces akumulacji selenu przez drożdże zachodzi w obecności występowania grup funkcyjnych, które wykazują ujemny ładunek na powierzchni ściany komórkowej. Przykładem mogą być mostki fosfodiesterowe, siarczkowe oraz ujemnie naładowane grupy karboksylowe i hydroksylowe. Obecność białek, węglowodanów i lipidów na powierzchni komórek drożdży wpływa na hydrofobowość ich ściany oraz wielkość procesu biosorpcji selenu (Kieliszek i wsp. 2015; Kordialik-Bogacka 2011). Podsumowując należy podkreślić, że przesunięcie różnych pasm absorpcji w kierunku wyższej lub niższej częstotliwości wskazywała, że interakcje chemiczne jonów selenu z atomami wodoru grup karboksylowych, hydroksylowych i aminowych były głównie związane z procesem biosorpcji tego pierwiastka przez ligandy zespołu ścianowo-błonowego biomasy komórkowej badanego szczepu drożdży.

Morfologia komórek drożdży *C. utilis* po procesie akumulacji selenu wykonana z zastosowaniem elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) wykazała, że ściana komórkowa drożdży była szorstka, z wieloma fałdami, zgięciami i porami.

Taki wygląd komórek zapewniał odsłonięcie dużej liczby centrów adsorpcji jonów selenu na powierzchni ściany komórkowej drożdży, zwiększając powierzchnię kontaktu, co w konsekwencji ułatwiało wiązanie tego pierwiastka podczas procesu adsorpcji.

W dalszej części pracy oceniono wpływ kwasowości czynnej na wiązanie selenu przez biomasę drożdży *C. utilis*. Uzyskane wyniki badań wykazały brak wpływu pH (od 4.0 do 6.0) na biosorpcję tego pierwiastka przez drożdże. Można przypuszczać, że interakcje selenu z ligandami zespołu ścianowo-błonowego mają charakter wiązań kowalencyjnych z pewnym udziałem wiązania jonowego (Holmes i Gu 2016). Zdolność akumulacji tego pierwiastka znacznie się zmniejszyła, gdy początkowe pH roztworu wzrosło z 6.0 do 10.0 jak również zmniejszyło się z 4.0 do 2.0. Największą zawartość selenu drożdże związały przy pH 5 (2,28 mg Se<sup>4+</sup>/g) w roztworze wodnym suplementowanym selenem w dawce 30 mg/L. Należy zaznaczyć, że szczególną rolę w biosorpcji tego pierwiastka spełnia warstwa mannoproteinowa, która stanowi zewnętrzną barierę ochronną, decydującą o przepuszczalności ściany komórkowej drożdży. Można przypuszczać, że pH 5.0 spowodowało odsłonięcie centrów adsorpcji: zwiększenie powierzchni warstwy białkowej, co wiązało się ze wzrostem liczby łańcuchów polipeptydowych, reszt aminokwasowych w zespole ścianowo-błonowym drożdży zaangażowanych w proces akumulacji selenu. Dlatego też pH 5.0 zostało uznane za optymalne przy dalszych eksperymentach. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano niekorzystny wpływ obecności w roztworach wodnych różnych jonów na akumulację selenu przez biomasę drożdży. Przy czym największe zmniejszenie wiązania tego pierwiastka odnotowano w obecności anionu siarki i fosforu, odpowiednio o 31 i 34%. W świetle danych literaturowych obserwowane zmniejszenie biosorpcji Se (IV) wśród wykorzystanych anionów siarki można przypisać ich podobnym właściwościom chemicznym do tego pierwiastka (Vriens i wsp. 2016). Podsumowując należy zaznaczyć, że otrzymane rezultaty badań wskazują na możliwości współzawodnictwa pomiędzy badanymi jonami, a selenem o miejsca wiążące na powierzchni komórek drożdży.

W przedstawionym artykule przeanalizowano kinetykę wiązania selenu przez biomasę komórkową drożdży. Ponadto monitorowano ilość zaadsorbowanego selenu w jednostce czasu. Przyjmując za podstawowe kryterium wartości



współczynnika korelacji uzyskane w przypadku zlinearyzowanych form równań pseudopierwszego i drugiego rzędu można stwierdzić, że adsorpcja selenu przez biomasę drożdży *C. utilis* zachodziła zgodnie z modelem pseudodrugiego rzędu. Model ten pasował w opisie adsorpcji selenu przez biomasę drożdży, ponieważ wyznaczone równania regresji liniowej charakteryzowały się większą wartością kwadratu współczynnika korelacji (zbliżoną do jedności) niż te otrzymane dla równania pseudopierwszego rzędu. Stwierdzono również, że związana z szybkością chemisorpcji stała  $k_2$  wzrastała wraz ze zwiększeniem początkowego stężenia selenu, co wskazuje na występowanie więcej niż jednego mechanizm wpływającego na proces wiązania selenu przez biomasę komórkową drożdży. Nieliczne doniesienia literaturowe wskazują (Rosen i Liu 2009; Kieliszek i wsp. 2015), że transport tego pierwiastka zachodzi z udziałem wyspecjalizowanych, integralnych białek na powierzchni zespołu ścianowo-błonowego lub istnienia niespecyficznego transportu jonów skompleksowanych z substratami cukrowymi.

Analiza opisu matematycznego równowagi sorpcji selenu przez drożdże *C. utilis* wykazała, że najlepiej je ilustruje równanie Langmuira niż modelu Freundlicha. Wartości współczynnika  $R^2$  dla izoterm sorpcji na biomacie drożdży *C. utilis* w temperaturze 22°C wskazywały znaczną różnicę między wartościami dla obu modeli (Langmuira i Freundlicha), odpowiednio 0,999 i 0,983. Wydajność biosorpcji selenu przez biomasę drożdży wzrastała wraz ze zwiększeniem stężenia tego pierwiastka w badanych roztworach wodnych. Metody adsorpcyjne dają możliwość oszacowania możliwości praktycznego wykorzystania biomasy drożdży *C. utilis* do usuwania selenu z roztworów wodnych. Dobierając odpowiednie proporcje biomasy drożdży w zależności od stężenia selenu w roztworach wodnych, możliwe byłoby sterowanie właściwościami takiego adsorbentu zwiększając jego pojemność adsorpcyjną lub zwiększanie szybkości usuwania adsorbentu z roztworu.

W konkluzji można stwierdzić, że biomasa drożdży *C. utilis* z powodu łatwego dostępu, a także niskiego kosztu jej otrzymania może być wykorzystana jako skuteczny adsorbent do wiązania selenu z roztworów wodnych. Uzyskane wyniki wskazują na znaczną pojemność sorpcyjną drożdży względem tego pierwiastka. Proces wiązania selenu był zależny od stężenia jonów wodorowych, a maksymalna sorpcja tego pierwiastka przebiegała w pH 5.0. Maksymalna zdolność biosorpcji Se (IV) w temperaturze 28°C wynosiła 2,53 mg Se<sup>4+</sup>/g przy dawce świeżych drożdży

10 g/L po 48 godzinach kontaktu w początkowym stężeniu selenu wynoszącym 40 mg/L. Otrzymane dane dobrze opisuje model izotermi Langmuira, a proces adsorpcji przebiega według reakcji chemicznej pseudodrugiego rzędu.

Mechanizmy wiązania selenu oraz transformacji tego pierwiastka w cytozolu komórkowym mogą prowadzić do powstania różnych związków selenowych w biomacie komórkowej drożdży. Biorąc pod uwagę metabolizm tego pierwiastka w drożdżach oraz zastosowanie wzbogaconej w ten pierwiastek biomasy fundamentalne znaczenie ma poznanie selenometabolu tych mikroorganizmów. Kolejne badania przedstawione w publikacji **H5** dotyczyły wykonania analizy specjacyjnej selenu w komórkach drożdży *Candida utilis* ATCC 9950 z wykorzystaniem techniki HPLC-ICP-MS i UHPLC-(ESI)-Orbitrap MS/MS.

Obecny stan wiedzy wskazuje, że prozdrowotne lub toksyczne działanie tego pierwiastka może być wynikiem działania różnych procesów, które są ze sobą skorelowane. Opracowania wielu norm oraz wytycznych dotyczących żywienia opiera się na wykonaniu całkowitych pomiarów stężenia selenu w określeniu bezpieczeństwa i wartości odżywczej poszczególnych produktów żywnościowych (Gong i wsp. 2012). Należy podkreślić, że sama elementarna kwantyfikacja nie dostarcza wystarczających informacji. Tak więc, kluczowe znaczenie ma przeprowadzenie analizy specjacyjnej selenu w komórkach drożdży oraz wyjaśnienie możliwych mechanizmów transformacji tego pierwiastka.

Komórki drożdży w zależności od czasu hodowli i stężenia selenu w podłożu doświadczalnym metabolizowały nieorganiczny selen występujący w postaci  $\text{SeO}_3^{2-}$  do jego formy organicznej lub elementarnej (Kieliszek i wsp. 2016; Suhajda i wsp. 2000). Otrzymane wyniki wykazały, że zawartość selenometioniny w tych drożdżach oscylowała w granicach od 270 do 440  $\mu\text{g/g}$ . Natomiast całkowita zawartość selenu po 24-godzinnej hodowli oznaczona w biomacie komórkowej drożdży *C. utilis* wynosiła 629  $\mu\text{g/g}$ . Otrzymane wyniki badań są zbliżone do opublikowanych w artykule **H3** gdzie wykazano, że drożdże *C. utilis* ATCC 9950 hodowane w bioreaktorze w podłożu YPD wzbogaconym selenem w dawce 20 mg/L są w stanie po 24 godzinnej hodowli gromadzić 427,5  $\mu\text{g Se}^{4+}/\text{g}$ . Zgodnie z przepisami UE (Rozporządzenie UE nr 1170/2009) w produkcji suplementów diety zawierających selen można tylko stosować suplementy diety w postaci

selenometioniny i drożdży wzbogaconych selenem. Przy czym drożdże w biomacie nie powinny zawierać powyżej 2,5 mg Se<sup>4+</sup>/g.

Przeprowadzone analizy chromatograficzne wykazały obecność wyraźnych pików i dobrą skuteczność separacji. Oprócz sygnałów odpowiadającym poszczególnym związkom selenowym potwierdzonych dzięki dostępności wzorców zaobserwowano również obecność niezidentyfikowanych form tego pierwiastka występujących w biomacie komórkowej drożdży. Dlatego też w dalszej części pracy wykorzystano układ UHPLC-ESI-Orbitrap MS/MS głównie w kierunku identyfikacji nieznanych związków. Identyfikacja związków selenowych została przedstawiona na przykładzie prekursorów selenometabolitów. Stwierdzono obecność związków, takich jak m.in.: selenometionina-NH<sub>3</sub>, metyloselenoglutation, 2,3-dihydroksypropionyl(DHP)-selenocysteina-cysteina.

Podsumowując należy zaznaczyć, że badania prowadzone nad procesami akumulacji pierwiastków przez komórki drożdży mają duże znaczenie w produkcji żywności wzbogaconej w deficytowe pierwiastki. Otrzymane wyniki zachęcają do prowadzenia dalszych analiz nad identyfikacją nowych związków selenowych występujących w biomacie różnych gatunków drożdży. Odpowiednie wykorzystanie warunków hodowli drożdży oraz metod analitycznych umożliwi poznanie różnic w procesach metabolicznych przekształcania selenu do jego form organicznych. Takie podejście związane z myślą o tworzeniu nowych produktów możliwe ułatwi w przyszłości zaprojektować suplement diety wzbogacony w organiczne formy tego pierwiastka.

W kolejnej publikacji **H6** stanowiącej element osiągnięcia habilitacyjnego podjęto próbę wskazania wpływu selenu na zmiany metaboliczne lipidów oraz aminokwasów w biomacie komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 oraz *Candida utilis* ATCC 9950.

Drożdże na szeroką skalę są wykorzystywane, jako dodatki paszowe dla zwierząt. Ich popularność, jako źródła białka, wzrosła na początku XXI wieku. Połączenie biomasy drożdżowej wzbogaconej w niezbędne mikroelementy (selen), aminokwasy oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe daje możliwość wytworzenia nowych suplementów diety, które mogą znaleźć zastosowanie jako dodatek do preparatów w żywieniu ludzi lub w postaci biomasy komórkowej, jako wysokoenergetyczny dodatek paszowy dla zwierząt. Podjęcie tej problematyki

otwiera możliwość wyjaśnienia wpływu selenu na profil lipidowy oraz aminokwasowy w komórkach drożdży. Jest to interesujące zagadnienie badawcze, które może stanowić podstawę do opracowania alternatywnej i innowacyjnej technologii produkcji takiej biomasy drożdży.

Biomasa komórkowa drożdży otrzymana po hodowli w podłożu zawierającym produkty odpadowe z przemysłu (ziemniaczana woda sokowa, glicerol) stanowiła naturalny adsorbent wykorzystywany w procesie wiązania selenu z roztworów wodnych. Zrealizowane badania wykazały, że biomasa drożdży *C. utilis* ATCC 9950 oraz *S. cerevisiae* ATCC MYA-2200 przetrzymywana w roztworach wodnych bez dodatku selenu charakteryzowała się dużą zawartością białka ogólnego wynoszącą odpowiednio 48,4 i 42,1%. W przypadku biomasy tych mikroorganizmów uzyskanych po procesie utrzymywania w roztworach wodnych suplementowanych selenem wykazała, że zawartość białka obu szczepów drożdży *C. utilis* oraz *S. cerevisiae* niewiele się zmniejszyła w stosunku do biomasy otrzymanej z roztworów pozbawionych tego pierwiastka i wynosiła odpowiednio 42,6% i 37%. Zmniejszenie zawartości białka w biomacie drożdży mogło być związane z wystąpieniem postępującego procesu peroksydacji lipidów i autolizy komórek. Ponadto obniżanie zawartości białka mogło być związane z przystosowaniem się komórek do niesprzyjających warunków środowiskowych oraz wydatkowaniem tego składnika odżywczego na procesy energetyczne i metaboliczne.

Zmianom zawartości białka w biomacie drożdży *C. utilis* i *S. cerevisiae* towarzyszyły zmiany składu aminokwasowego. Zawartość wszystkich aminokwasów w biomacie drożdży uzyskanej po procesie przetrzymywania w roztworach wodnych bez dodatku selenu wynosiła odpowiednio 280 i 472 mg/g. W biomacie drożdży po procesie wiązania selenu z roztworów wodnych ogólna zawartość aminokwasów zarówno dla szczepu *C. utilis*, jak i *S. cerevisiae* była większa i wzrosła odpowiednio o ok. 12 i 5%. Analiza składu aminokwasowego biomasy drożdży *C. utilis* wzbogaconej selenem wykazała, że zawartość najważniejszych aminokwasów egzogennych (lizyny) była na wyższym poziomie (8,3 mg/g.) w porównaniu do otrzymanej z biomasy pozbawionej dodatku tego pierwiastka (5,6 mg/g). W przypadku drożdży *S. cerevisiae* wzbogaconych selenem zawartość tego aminokwasu była o ok. 10 mg/g większa niż z próby kontrolnej (37,7 mg/g).

Niniejsze badania potwierdzają doniesienia innych autorów (Suhajda i wsp. 2000), że zawartość białka i poszczególnych aminokwasów w biomasie drożdży jest zależna od warunków oraz obecności selenu w środowisku hodowlanym. Brak składników odżywczych, jak i obecność tego pierwiastka może zwiększać intensywność procesu oddychania mitochondrialnego powodując wzmocnienie represji katabolicznej. W konsekwencji ma to wpływ na hamowanie syntezy białek cytozolowych, co wyraża się wystąpieniem zmian w budowie morfologicznej komórek drożdży.

W kontekście przedstawionych wyników dodatkowym celem badań było określenie wpływu selenu na morfologię komórek badanych szczepów drożdży. Frakcja komórek *C. utilis* oraz *S. cerevisiae* poddanych działaniu selenu wykazywała deformację ściany i błony cytoplazmatycznej. Obecność tego pierwiastka mogła powodować wystąpienie obrzęku błony komórkowej, który wpływał negatywnie na barierę energetyczną w warstwie lipidowej błony zmieniając przebieg zachodzących procesów biochemicznych w komórkach. Wewnątrz badanych komórek obserwowano występowanie gęstych ziarnistości. Przetrzywanie drożdży w środowisku bogatym w jony selenu prawdopodobnie skutkowało powstawaniem specjalnych komór przedzielonych membraną oraz zespołów wielocząsteczkowych w cytozolu komórkowym. Zgodnie z danymi literaturowymi (Rabouille i Alberti 2017) powstające struktury w komórkach stanowią kluczową rolę w ochronie organelli komórkowych. W cytoplazmie drożdży można było zaobserwować obecność wielu kropli lipidowych (LDS) powstałych po hodowli komórek w glicerolu i odpadowej ziemniaczanej wodzie sokowej. Glicerol transportowany jest przez błony cytoplazmatyczne komórek drożdży, a następnie w drodze metabolicznych reakcji może być przekształcany do wartościowych produktów czego przykładem są krople lipidowe (Mattanna i wsp. 2014). Podstawową ich funkcją jest udział w magazynowaniu i uwalnianiu nagromadzonych składników odżywczych jako źródła energii. Komórki drożdży aby przetrwać niekorzystne warunki hodowlane wykorzystywały zgromadzone wcześniej substancje. Niewielka część selenu, która została związana przez drożdże w wyniku procesów detoksykacyjnych może być usuwana na zewnątrz komórki do środowiska hodowlanego. Jednym z takich mechanizmów jest zjawisko uwypuklenia zewnętrznej błony, które powstaje w odpowiedzi na stres związany z obecnością

materiałów szkodliwych dla komórek. Takie substancje usuwane są na zewnątrz komórki przez lipidowe dwuwarstwowe pęcherzyki (Khoei i wsp. 2017; Kieliszek i wsp. 2016).

Na podstawie obserwacji mikroskopowych stwierdzono, że warunki stresowe wywołane obecnością selenu w roztworach wodnych wpływały na zakłócenie aktywności metabolicznej oraz stabilności strukturalnej badanych komórek drożdży. Przedstawione rezultaty jednak nie do końca wyczerpują zagadnienia, wskazują jedynie na nowe informacje, które są pomocne w prowadzeniu kolejnych badań nad rolą tego pierwiastka w metabolizmie komórek drożdży.

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono analizę zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w komórkach drożdży. Biomasa szczepu *C. utilis* bez dodatku selenu charakteryzowała się znaczną zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym kwasu oleinowego (C18:1) (62%), kwasu linolowego (C18:2) (11%) i kwasu linolenowego (18:3) (3%) w stosunku do ogólnej zawartości kwasów tłuszczowych. Zgodnie z danymi literaturowym (Arous i wsp. 2017; Čertík i wsp. 2013) głównym kwasem tłuszczowym występującym w lipidach drożdży jest kwas oleinowy (C18:1), a jego udział może wynosić nawet powyżej 70%. Suplementacja selenem biomasy *C. utilis* spowodowała zmniejszenie zawartości kwasu oleinowego o ok. 45% wobec całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych. W przypadku dwóch pozostałych kwasów stwierdzono ich wzrost o około: 42 i 57% ogólnej zawartości kwasów tłuszczowych.

W przypadku biomasy *S. cerevisiae* wzbogaconej w selen stwierdzono obecność kwasów linolowego, linolenowego, eikozanowego oraz dokozaheksaenowego. Za powstanie takich długołańcuchowych form mógł być odpowiedzialny proces metabolicznej interkonwersji na drodze przemian enzymatycznych kwasu stearynowego i linolowego. Dzięki takim procesom komórka drożdży może dokonywać starannej korekty tempa przemian metabolicznych i tym samym sprawniej utrzymywać równowagę pomiędzy zapotrzebowaniem na energię, a jej pozyskiwaniem. Lipidy drożdży *S. cerevisiae* charakteryzowały się większą zawartością kwasów tłuszczowych o średnim łańcuchu (C10-C14) w porównaniu z biomasą drożdży *C. utilis*. Uzyskane wyniki badań na tym etapie pracy oraz otrzymane w ocenie morfologicznej komórek wykazały, że zawartość kwasów tłuszczowych występujących w błonie

cytoplazmatycznej drożdży mogła być modyfikowana obecnością selenu w roztworach wodnych. Konsekwencją tych procesów było obniżenie płynności dwuwarstwy lipidowej wpływającej na żywotność drożdży oraz zmianę budowy morfologicznej komórek.

Otrzymane wyniki badań dostarczyły informacji na temat wpływu selenu na zawartość białka, aminokwasów i profil kwasów tłuszczowych w biomacie obu szczepów drożdży wzbogaconych tym pierwiastkiem. Zastosowany dodatek selenu powodował zwiększenie udziału nienasyconych kwasów, m.in.: linolowego, linolenowego w biomacie *C. utilis* i *S. cerevisiae*. Należy podkreślić, że biosynteza tych kwasów może być związana ze zwiększeniem aktywności desaturaz oraz wystąpieniem peroksydacji lipidów. W konsekwencji takie działania miały wpływ na zmianę morfologii komórek drożdży. Biomasa obu szczepów wzbogacona w selen zawierała większą zawartość aminokwasów egzogennych m.in. lizyny, leucyny, waliny w stosunku do biomasy kontrolnej. Otrzymane rezultaty badań mogą przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów wpływu selenu na procesy metabolizmu aminokwasów i lipidów w komórkach drożdży.

W ostatniej publikacji naukowej (H7) wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego podjęto tematykę wyjaśnienia wpływu selenu na mechanizm działania glutationu i systemu antyoksydacyjnego komórek drożdży *Candida utilis* ATCC 9950 oraz *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200. Zrozumienie takiego systemu działania w komórkach eukariotycznych może być pomocne w celu opracowanie wydajnej i alternatywnej metody otrzymania biomasy drożdży, która będzie dobrym źródłem przyswajalnych form selenu.

Wyrazem moich dążeń do wyjaśnienia tego zagadnienia było złożenie w 2017 roku projektu badawczego do Narodowego Centrum Nauki pt. „Wpływ selenu na ocenę aktywności systemu antyoksydacyjnego komórek drożdży”, nr 2017/01/X/NZ9/00339. Uzyskanie pozytywnej decyzji przedstawionego programu badawczego było jednocześnie potwierdzeniem, że wiedza istniejąca w tym obszarze badań jest nadal niewystarczająca. W trakcie realizacji projektu udało się uzyskać odpowiedź na wiele pytań przybliżających do rozwiązania zawartego w tytule problemu oraz praktycznego zrozumienia działalności systemu antyoksydacyjnego w komórkach drożdży.

W przedstawionych badaniach wykazano, że obecność selenu miała wpływ na zmianę aktywności enzymów antyoksydacyjnych w komórkach drożdży. Należy podkreślić, że biomasa obu szczepów uzyskano jak w przypadku poprzednich badań (publikacje **H4**, **H5**, **H6**) przy wykorzystaniu produktów odpadowych, a następnie umieszczano ją w roztworach wodnych suplementowanych selenem. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że niewielkie stężenie tego pierwiastka ( $\leq 10$  mg Se<sup>4+</sup>/L) w stosunku do kontroli nie wpływało istotnie na poziom peroksydacji lipidów u drożdży *C. utilis*. Jednak wraz ze wzrostem stężenia selenu  $>20$  mg Se<sup>4+</sup>/L stwierdzono zwiększony jej poziom. W biomacie obu szczepów drożdży nastąpił wzrost aktywności peroksydazy glutationowej (PGx). Największą jej aktywność (5,39 mU/mg) odnotowano w biomacie drożdży *C. utilis* przetrzymywanej w roztworze wodnym suplementowanym 60 mg Se<sup>4+</sup>/L. W przypadku drożdży *S. cerevisiae* jej wartość była o 81% większa niż w próbie kontrolnej. Nie odnotowano istotnych różnic w aktywności reduktazy glutationowej (GR) w obecności najmniejszych stężeń selenu 10 i 20 mg Se<sup>4+</sup>/L dla szczepu drożdży *C. utilis*. W przypadku *S. cerevisiae* w miarę zwiększania stężenia selenu stwierdzono wzrost aktywności enzymu reduktazy tioredoksyny (TrxR) i GR wobec biomasy przetrzymywanej w wodnych roztworach pozbawionych dodatku tego pierwiastka.

Zawartość glutationu całkowitego w biomacie drożdży *C. utilis* i *S. cerevisiae* wzrastała wraz ze zwiększeniem selenu w roztworach wodnych. Największą wartość (odpowiednio: 8,74 i 6,95  $\mu$ g/mg białka) uzyskano w podłożu z dodatkiem 60 mg Se<sup>4+</sup>/L. Nieznaczny wzrost stężenia glutationu zredukowanego (GSH) w porównaniu do próby kontrolnej uzyskano w biomacie drożdży otrzymanej z roztworów wodnych wzbogaconych selenem w dawce 10 mg/L. Stwierdzona duża zawartość glutationu utlenionego (GSSG) w biomacie drożdży *C. utilis* i *S. cerevisiae* otrzymanej z roztworów wodnych z dodatkiem selenu (40-60 mg/L) mogła być wynikiem wystąpienia ostrego stresu oksydacyjnego. Ponadto uzyskane wyniki sugerują, że stężenie GSSG jest kontrolowane przez skuteczne działanie reduktazy glutationowej, która wymaga elektronów z NADPH pochodzącego głównie ze szlaku pentozofosforanowego.

Można sformułować hipotezę, że w warunkach stresowych spowodowanych obecnością selenu w celu ochrony komórek duże stężenie glutationu bierze udział



w procesie S-tiolacji, a więc przyłączania grupy –SH białek do cząsteczki GSH. Takie połączenia biorą udział w stabilizacji niektórych białek, chroniąc je przed toksycznymi procesami utleniania wywołanymi niekorzystnymi warunkami środowiskowymi (selen, stres kwasowy). GSH jest ważnym przeciwutleniaczem, ponieważ szczepy drożdży pozbawione tego związku są wrażliwe na stres oksydacyjny indukowany przez nadtlenki, aniony ponadtlenkowy, a także toksyczne produkty peroksydacji lipidów (Grant 2001). Ponadto GSH bierze udział w wiązaniu selenu przyczyniając się do łagodzenia skutków stresu oksydacyjnego. Jest to przykład procesu detoksykacyjnego zachodzącego w komórkach drożdży. Należy podkreślić, że mechanizm toksyczności selenu na drożdże mógł być związany z procesem redukcji do jego czerwonej formy elementarnej. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w otrzymanych rezultatach badań w poprzednich publikacjach (**H2, H5**).

Tolerancja drożdży *C. utilis* oraz *S. cerevisiae* na wysokie stężenie selenu może wynikać ze wspólnego działania złożonego systemu antyoksydacyjnego. Zmniejszenie stężenia GSH w komórce prowadzi do wzrostu nadtlenków lipidów, co negatywnie wpływa na regulację procesów metabolicznych. Ten wieloetapowy proces może ostatecznie doprowadzić do zaburzenia struktury błony cytoplazmatycznej wpływającej na zmianę morfologii komórek.

Podsumowując można stwierdzić, że aktywność antyoksydacyjna badanych szczepów drożdży wykazała podobne zależności wobec wzrastającego stężenia selenu w roztworach wodnych. Przy czym większą aktywnością enzymów GPx, GR charakteryzował się szczep *C. utilis* niż *S. cerevisiae*. Otrzymane wyniki w ramach osiągnięcia habilitacyjnego nie wyczerpują do końca tematu badawczego. Otwierają możliwości prowadzenia kolejnych programów badawczych zmierzających do poznania wpływu selenu na funkcjonowanie komórek drożdży. Dalsze badania powinny zmierzać do poznania metabolizmu komórek drożdży, jak również przeprowadzenia identyfikacji i szczegółowej analizy molekularnej genów odpowiedzialnych za funkcjonowanie procesów biosyntezy poszczególnych białek w warunkach stresowych.

Głównym osiągnięciem naukowym wynikającym bezpośrednio z jednotematycznego cyklu 7 publikacji jest uzyskanie cennej wiedzy na temat wpływu selenu na wzrost i aktywność procesów metabolicznych w komórkach

drożdży. Ponadto można stwierdzić, że produkty odpadowe z przemysłu (odpadowa ziemniaczana woda sokowa, glicerol) mogą być zastosowane jako składniki podłoża hodowlanego zamiast kosztownych podłoży komercyjnych (YPD). Biomasa komórkowa drożdży otrzymana w podłożach hodowlanych przygotowanych z odpadów rolno-spożywczych (ziemniaczana woda sokowa i glicerol) może stać się biosorbentem selenu z roztworów wodnych tego pierwiastka.

### **Podsumowanie najważniejszych otrzymanych wyników:**

- Metoda z wykorzystaniem odczynnika Variamine Blue może być z powodzeniem wykorzystywana do ciągłego monitorowania poziomu selenu. Zaproponowana procedura odznacza się dużym potencjałem w interdyscyplinarnych badaniach zarówno dla biotechnologii, przemysłu spożywczego, czy ochrony środowiska.
- Produkty odpadowe (ziemniaczana woda sokowa, glicerol) mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako składniki podłoża hodowlanego do otrzymania biomasy komórkowej drożdży. Taka biomasa może być wykorzystywana do efektywnego wiązania selenu z roztworów wodnych.
- Duża pojemność sorpcyjna drożdży i łatwość prowadzenia procesu wiązania selenu stwarza możliwości wytworzenia nowego preparatu mineralnego, który może znaleźć zastosowanie w diecie.
- Obecność selenu powodowała zwiększenie udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych w biomacie drożdży oraz wystąpienie zmian morfologicznych w budowie komórek. Ponadto przeprowadzona analiza specjacyjna tego pierwiastka w drożdżach wykazała obecność nowych związków selenowych.
- Biomasa obu szczepów drożdży wzbogacona selenem zawierała większą zawartość aminokwasów egzogennych m.in. lizyny, leucyny, waliny w stosunku do biomasy kontrolnej pozbawionej tego pierwiastka. Drożdże wzbogacone odpowiednią dawką selenu charakteryzujące się korzystnym składem aminokwasowym mogą znaleźć zastosowanie jako potencjalne źródło preparatów białkowo-selenowych.

- Wysokie dawki selenu wpływały na wystąpienie stresu oksydacyjnego w drożdżach, co skutkowało zwiększeniem poziomu peroksydacji lipidów oraz wzrostem aktywności enzymów antyoksydacyjnych w biomacie drożdży.

### Cytowana literatura:

1. Arous F., Azabou S., Triantaphyllidou I. E., Aggelis G., Jaouani A., Nasri M., Mechichi T. (2017) Newly isolated yeasts from Tunisian microhabitats: lipid accumulation and fatty acid composition. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 226–236.
2. Bierla K., Lobinski R., Szpunar J. (2018) Determination of proteinaceous selenocysteine in selenized yeast. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 543.
3. Čertík M., Breierová E., Oláhová M., Šajbidor J., Márová I. (2013) Effect of selenium on lipid alternations in pigment-forming yeasts. *Food Science and Biotechnology*, 22(1), 45–51.
4. Gong L., Xu Q., Lee C., Zhang H. (2012) Selenium speciation analysis of *Misgurnus anguillicaudatus* selenoprotein by HPLC–ICP–MS and HPLC–ESI–MS/MS. *European Food Research and Technology*, 235, 169–176.
5. Grant C. M. (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, 39(3), 533–541.
6. Gupta V. K., Rastogi A. (2008) Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: kinetics and equilibrium studiem. *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 407–414.
7. Holmes B, Gu F. X. (2016) Emerging nanomaterials for the application of selenium removal for wastewater treatment. *Environmental Science: Nano*, 3(5), 982–996.
8. Jach M. E., Serefko A., Sajnaga E., Kozak E., Poleszak E., Malm A. (2015). Dietary supplements based on the yeast biomass. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 13(2), 83e88.
9. Khoei N. S., Lampis S., Zonaro E., Yrjälä K., Bernardi P., Vallini G. (2017) Insights into selenite reduction and biogenesis of elemental selenium nanoparticles by two environmental isolates of *Burkholderia fungorum*. *New Biotechnology*, 34, 1–11.
10. Kieliszek M, Błażej S, Gientka I, Bzducha-Wróbel A (2015) Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(13), 5373–5382.
11. Kieliszek M., Błażej S. (2013) Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition* 29, 713–718.
12. Kieliszek M., Błażej S. (2016) Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: A review. *Molecules*, 21, 609.
13. Kieliszek M., Błażej S., Bzducha-Wróbel A., Kurcz A. (2016) Effects of selenium on morphological changes in *Candida utilis* ATCC 9950 yeast cells. *Biological Trace Element Research*, 169(2), 387–393.
14. Kordialik-Bogacka E. (2011) Surface properties of yeast cells during heavy metal biosorption. *Central European Journal of Chemistry*, 9(2), 348–351.
15. Kubachka K. M., Hanley T., Mantha M., Wilson R. A., Falconer T. M., Kassa Z., Oliveria A., Landero, J., Caruso J. (2017) Evaluation of selenium in dietary supplements using elemental speciation. *Food Chemistry*, 218, 313–320.

16. Laffon B., Valdiglesias V., Pasaro E., Mendez J. (2010) The organic selenium compound selenomethionine modulates bleomycin-induced DNA damage and repair in human leukocytes. *Biological Trace Element Research*, 133, 12–19.
17. Mattanna P., Dallé da Rosa P., Gusso A. P., Richards N. S., Valente P. (2014) Enhancement of microbial oil production by alpha-linolenic acid producing *Yarrowia lipolytica* strains QU22 and QU137. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 1929–1934.
18. Niedzielski P., Rudnicka M., Wachelka M., Kozak L., Rzany M., Wozniak M., Kaskow Z. (2016) Selenium species in selenium fortified dietary supplements. *Food Chemistry*, 190, 454–459.
19. Rayman M. P. (2008) Food-chain selenium and human health: Emphasis on intake. *British Journal of Nutrition*, 100, 254–268.
20. Rosen R, Liu Z. J. (2009) Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environment International*, 35(3), 512–515.
21. Rozporządzenie Komisji UE (WE) nr 1170/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. zmieniające dyrektywę 2002/46/WE Parlamentu Europejskiego i Rady oraz rozporządzenie (WE) nr 1925/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do wykazów witamin i składników mineralnych oraz ich form chemicznych, które można dodawać do żywności, w tym do suplementów żywnościowych. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*, 38, 232–238.
22. Suhajda A., Hegoczki J., Janzso B, Pais I, Vereczkey G. (2000) Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 14, 43–47.
23. Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D. (2003) The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57(3-4), 134–144.
24. Tie M., Li B., Sun T., Guan W., Liang Y., Li H. (2017) HPLC-ICP-MS speciation of selenium in Se-cultivated *Flammulina velutipes*. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017, <http://doi.org/10.1016/j.arabje.2017.05.012>.
25. Vriens B., Behra R., Voegelin A., Zupanic A., Winkel L. H. E. (2016) Selenium uptake and methylation by the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology*, 50(2), 711–720.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Główny nurt prowadzonych przeze mnie badań dotyczy bioakumulacji selenu przez biomasę komórkową drożdży. Ważnym aspektem mojej pracy naukowej jest również tematyka związana z identyfikacją nowych mikroorganizmów metodami biologii molekularnej. Wykazuję również zainteresowanie możliwością otrzymania różnych metabolitów produkowanych przez drożdże i bakterie na drodze mikrobiologicznej, mogących znaleźć szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu spożywczego oraz farmaceutycznego (np. biopleksy, enzymy,  $\beta$ -glukan). Ponadto biorę aktywny udział w prowadzeniu prac badawczych realizowanych nie tylko na Wydziale Nauk o Żywności SGGW w Warszawie, ale również poza

macierzystą jednostką naukową. W niniejszej części omówiłem wybrane aspekty mojej pracy badawczej.

W początkowym okresie działalności naukowej przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora zajmowałem się badaniem aktywności metabolicznej i enzymatycznej różnych szczepów mikroorganizmów. Moje zainteresowania naukowe koncentrowały się również na poszukiwaniu oraz identyfikacji nowych mikroorganizmów wyizolowanych z produktów pszczelich (pyłek, pierzga pszczela). Ponadto brałem udział w badaniach zajmujących się produkcją enzymu transglutaminazy przy wykorzystaniu szczepu *Streptoverticillium mobaraense*. Pozostając w kręgu zainteresowań poszukiwaniem nowych szczepów mikroorganizmów charakteryzujących się wybitnymi zdolnościami biotechnologicznymi muszę podkreślić, że temat ten jest nadal kontynuowany. W ramach wykonywania pracy doktorskiej moje zainteresowania naukowe skierowały się w kierunku możliwości bioakumulacji selenu przez biomasę komórkową drożdży. Podjąłem się realizacji tego tematu by uzyskać odpowiedzi na pojawiające się pytania odnośnie wpływu selenu na zdolności akumulacyjne i funkcjonowanie komórek drożdży. Niewielka ilość pojawiających się publikacji z tego zakresu zachęciła mnie do zgłębienia tych zagadnień.

Po uzyskaniu stopnia doktora nadal kontynuowałem tematykę związaną z procesami wiązania selenu przez drożdże. W badaniach wykorzystywałem różne produkty odpadowe pochodzące z przemysłu rolno-spożywczego jako składników podłoża hodowlanego. Pragnę nadmienić, że badania zostały rozszerzone o nowe analizy chemiczne i są kontynuowane przy współpracy z różnymi zagranicznymi ośrodkami naukowymi. Prowadząc badania naukowe zwracam szczególną uwagę na możliwość nawiązywania współpracy z różnymi zespołami badaczy, którzy nie zawsze reprezentują taką samą specjalność naukową. Odpowiednie zaangażowanie poszczególnych grup naukowców można prowadzić do otrzymania bardzo ciekawych wyników badań, które znajdą zainteresowanie w Polsce oraz na świecie. Poza głównym nurtem prowadzonej pracy badawczej moje zainteresowania naukowe ostatnio ukierunkowały się również na identyfikacji różnych gatunków ptaków w oparciu o profil białkowy błony witelinowej jaj. Prace nadal są kontynuowane i dodatkowo zostały rozszerzone o analizę proteomiczną poszczególnych frakcji białkowych. Ponadto brałem udział w pracach obejmujących

analizę składu oraz profilu związków fenolowych występujących w płatkach róży *Rosa rugosa*, jak również rolę selenu (w postaci związku seleninu sodu) w oddziaływaniach hydrofobowych białek (m.in. fibrynogenu). W mojej pracy naukowo-badawczej zajmuję się charakterystyką i zdolnością mikroorganizmów do biosyntezy różnych metabolitów, które można wykorzystać w różnych gałęziach przemysłowych. Efektem tych prac są liczne publikacje naukowe opublikowane w prestiżowych czasopismach z listy JCR. Badania prowadzone w tym obszarze tematycznym są cały czas rozwijane o nowe analizy. Uczestnictwo w realizacji wielu rozległych tematów naukowo-badawczych, pozwoliło mi na nawiązaniu wielu inspirujących kontaktów naukowych. Dodatkowo umożliwiło mi doskonaleniu organizacji i warsztatu własnej pracy laboratoryjnej oraz podnoszeniu kwalifikacji w zakresie wykorzystania nowych metod chemicznych, analitycznych czy biotechnologicznych.

Pragnę nadmienić, że opisane poniżej tematy były realizowane przed i po uzyskaniu przeze mnie stopnia naukowego doktora. Poniżej przedstawiłem wybrany opis moich zainteresowań badawczych wraz z opublikowanymi artykułami naukowymi.

### **5.1. Charakterystyka enzymów wykorzystywanych w przemyśle spożywczym**

W trakcie mojego zatrudnienia w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego brałem udział w projekcie nr 6 ZR9 2009C/07327 pt. „Opracowanie technologii i wdrożenie do produkcji mikrobiologicznej transglutaminazy dla potrzeb przemysłu spożywczego” (zał. 3, punkt II, I-6). Praca miała na celu opracowanie komercyjnego preparatu enzymu transglutaminazy (TGase) dla przemysłu spożywczego. Transglutaminaza jest enzymem, który katalizuje tworzenie wiązań izopeptydowych między białkami. Zdolność tego enzymu do sieciowania różnych białek jest szeroko stosowana w wytwarzaniu różnych produktów spożywczych (serów, przetworów mięsnych, filmów spożywczych). Takie działania pozwalają dostosowywać, jak i kreować potrzeby rynku i gospodarki. Wielka skala zainteresowania TGase znajduje odzwierciedlenie w rosnącej liczbie wniosków patentowych oraz artykułów na temat biosyntezy i wykorzystywania tego enzymu w różnych gałęziach przemysłowych. W ramach projektu zostały wykonane analizy nad doborem

warunków biosyntezy transglutaminazy przez szczep *Streptoverticillium mobaraense* wykorzystując różne składniki podłoża hodowlanego. Ponadto przeprowadzono badania nad wpływem dodatku preparatu transglutaminazy na wybrane parametry jakościowe produktów mleczarskich i piekarskich. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że największą aktywność transglutaminazy (1,8 U/ml) uzyskano po czasie 48 godzin w hodowli z dodatkiem 2,5% płatków owsianych oraz 2% aminobaku jako źródła azotu. Ponadto przeprowadzono badania nad wpływem dodatku preparatu transglutaminazy na wybrane parametry jakościowe produktów mleczarskich i piekarskich. Podsumowując należy stwierdzić, że możliwości aplikacyjne TGase zachęcają do poszukiwań nowych źródeł tego biokatalizatora (mikroorganizmów), zdolnych do syntezy znacznych ilości tego enzymu z wykorzystaniem jak najtańszych substratów hodowlanych. Wyniki badań uzyskane w ramach niniejszego projektu były prezentowane na międzynarodowej konferencji FEMS (Federation of European Microbiological Societies) w Holandii (zał. 3, punkt III, B-15).

W roku 2014 powstała praca przeglądowa, którą opublikowano w czasopiśmie *Folia Microbiologica* (zał. 3, punkt II, A-1). W artykule przedstawiłem ogólną charakterystykę enzymu oraz jego wykorzystanie w różnych gałęziach przemysłowych. Zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi w pracy zaprezentowano mikrobiologiczny proces produkcji tego enzymu. Praca nadal cieszy się dużą poczytnością i szerokim zainteresowaniem naukowym, co przekłada się na liczbę cytowań. Według bazy Web of Science praca była cytowana 103 razy, natomiast w przypadku bazy Elsevier Scopus praca była cytowana aż 118 razy (stan z dn. 23.02.2019). Mając na uwadze moje zainteresowania w dziedzinie technologii enzymów na początku roku 2016 zostałem zaproszony do napisania rozdziału o wykorzystaniu właściwości transglutaminazy w przemyśle spożywczym w książce pt. „*Microbial Enzyme Technology in Food Applications*” pod redakcją Prof. Ramesh C. Ray oraz Prof. Cristina M Rosell (zał. 3, punkt II, D-7). Omawiana publikacja przedstawia charakterystykę biochemiczną enzymu transglutaminazy. Enzym ten posiada ogromny potencjał w zakresie poprawy jędrności, elastyczności oraz wiązania wody w produktach spożywczych. Dzięki udziałowi transglutaminazy w tworzeniu nowej mikrostruktury białek, możliwości jej zastosowania w przemyśle spożywczym są ogromne. W pracy przeanalizowałem dostępne

informacje literaturowe na temat możliwości aplikacyjnego wykorzystania tego enzymu w poszczególnych gałęziach przemysłu spożywczego, m.in. mięsnym, fermentacyjnym, piekarskim. Współczesna nauka daje szerokie spektrum możliwości w obszarze biotechnologii, technologii żywności i wykorzystania enzymów na skalę przemysłową dlatego tak ważne jest poszukiwanie nowych łatwo dostępnych źródeł tego enzymu. Prowadzone badania nad modyfikacjami drobnoustrojów oraz ciągły rozwój w kierunku opłacalnej produkcji tego enzymu może spowodować wytworzenie bardziej przystępnych produktów, które mogą mieć szerszy zakres zastosowań.

Realizację tematyki badawczej związanej z enzymologią kontynuowałem w ramach projektu statutowego 510-01-ZM-02 pt. „*Produkcja zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych przez wybrane szczepy bakterii Lactobacillus w zależności od źródła azotu w pożywce oraz wykorzystanie statystyki eksperymentalnej*” (zał. 3, punkt II, I-1), którego realizacja pod moim kierunkiem miała miejsce w roku 2014. W pracy wykazano, że największą aktywnością proteolityczną charakteryzował się szczep *Lactobacillus plantarum* KKP 815 hodowany w podłożu zawierającym serwatkę. Projekt prowadzono w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego w Warszawie. Otrzymane wyniki badań zostały przedstawione na konferencji krajowej w Wiśle (zał. 3, punkt III, B-6).

W roku 2012 ukazała się publikacja będąca częścią przeprowadzonych badań w mojej pracy magisterskiej przygotowanej pod kierunkiem dr hab. Adama Waśko na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie (Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii) opisująca oczyszczanie i charakterystykę wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych (zał. 3, punkt II, A-4). W pracy określono również właściwości biochemiczne i specyficzność substratową proteinaz wyizolowanych z bakterii probiotycznych *Lactobacillus rhamnosus* OXY. Bakterie fermentacji mlekowej, którymi się zajmowałem, stanowią źródło różnorodnych enzymów proteolitycznych biorących udział w przemianach degradacyjnych białek. Współcześnie jednak największe oczekiwania, związane z praktycznym zastosowaniem tych enzymów, dotyczą możliwości wykorzystania ich w przemyśle mleczarskim.



Przeprowadzone badania wykazały obecność genu *prtR2* odpowiadającego za biosyntezę proteinaz w badanym szczepie bakterii *Lb. rhamnosus* OXY. Największą aktywność enzymatyczną (59 U/ml) stwierdzono po 48-godzinnej hodowli bakterii w podłożu MRS przy pH w zakresie od 6.5 do 7.5 i temperaturze 40°C. Proces oczyszczania enzymów proteolitycznych przeprowadzono przy użyciu systemu chromatografii niskociśnieniowej (FPLC) oraz podłoży separacyjnych CM-Sepharose Fast Flow oraz Sephacryl S-300. Rozdział elektroforetyczny wykonany w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) wykazał, że enzym miał względnie niską masę cząsteczkową ok. 60 kD. Aktywność proteolityczna była hamowana przez obecność specyficznych inhibitorów (fluorek fenylometylosulfonylu i 3,4-dichloroizokumarina), co sugeruje, że enzym należał do grupy proteinaz serynowych. W pracy został również określony wpływ jonów metali na aktywność proteolityczną. Stwierdzono, że wzrost aktywności enzymatycznej następował w przypadku obecności jonów  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ . Aktywność badanego enzymu była silnie hamowana przy udziale jonów metali ciężkich m.in.  $Cd^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ . Otrzymane wyniki badań były prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

#### Publikacje:

**Kieliszek M.**, Błażej S. (2016) Microbial transglutaminase and applications in food industry. Chapter 10: Microbial Enzyme Technology in Food Applications (red. Ray R. C., Rosell C. M.), CRC Press Taylor and Francis Group, 180–198, ISBN 978-14-987498-3-1.

**Kieliszek M.**, Misiewicz A. (2014) Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, 59(3), 241–250. Impact Factor<sub>2014</sub>: 1,000, MNiSW<sub>2014</sub>: 15 pkt.

Waśko A., **Kieliszek M.**, Targoński Z. (2012) Purification and characterization of a proteinase from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* OXY. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(5), 476–488. Impact Factor<sub>2012</sub>: 0,4065, MNiSW<sub>2012</sub>: 15 pkt.

#### Konferencje:

Zdziennicki F., Słowik E., Misiewicz A., **Kieliszek M.**, Adamska P., Górniak W. (2015) Transglutaminase application in wheat bread production. The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015), Maastricht, Holandia, 07.06-11.06.2015 r., FEMS-2144.

**Kieliszek M.**, Błażej S., Chlebowska-Śmigiel A., Gientka I., Waśko A., Bugajewska A. (2015) Właściwości proteolityczne bakterii probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus*. IX Konferencja

naukowa „Jakość i Bezpieczeństwo Żywności”, Warszawa 17.11-18.11.2015 r., Materiały konferencyjne, 34.

**Kieliszek M.**, Misiewicz A. (2014) Produkcja zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych przez wybrane szczepy bakterii *Lactobacillus* w zależności od źródła azotu w pożywce. XXIII Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne „Bromatologia dla społeczeństwa XXI wieku”, Wisła, 10.09-12.09.2014 r., Materiały konferencyjne, 170.

**Kieliszek M.**, Waśko A., Błażej S. (2012) Study of proteinase activity of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* OXY. 7<sup>th</sup> Baltic Conference on Food Science and Technology, 17.05-18.05.2012 r., Kowno, Litwa, Materiały konferencyjne, 109.

## 5.2. Charakterystyka produktów pszczelich

W kolejnych latach przedmiotem moich zainteresowań naukowych były prozdrowotne właściwości produktów pochodzenia naturalnego (pierzga pszczoła). W roku 2014 byłem kierownikiem projektu 500-01-ZM-04 „Ocena przydatności szczepów bakterii fermentacji mlekowej i drożdży do wytwarzania prozdrowotnego produktu – pierzgi” (Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie) (zał. 3, punkt II, I-2). W ramach tego projektu zajmowałem się identyfikacją nowych szczepów bakterii i drożdży występujących jako naturalna mikroflora produktów pszczelich. Ponadto brałem udział w charakterystyce fizjologicznej i biochemicznej wyizolowanych szczepów mikroorganizmów oraz możliwości ich wykorzystania w procesie fermentacji pyłku kwiatowego. Jednocześnie brałem udział w projekcie naukowym UDA-POIG.01.03.02-00-014/10 („Ochrona patentowa wynalazku dotyczącego szczepów i sposobu otrzymywania prozdrowotnego produktu na bazie pyłku kwiatowego i miodu pszczelego”) (zał. 3, punkt II, I-5) współfinansowanym przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. W toku prowadzonych prac badawczych stwierdzono, że wyizolowany szczep bakterii *Lactobacillus delbrueckii* KKP 1645 potrafi rozwijać się w środowisku hodowlanym o wysokim ciśnieniu osmotycznym (brzeczka miodowa) z jednoczesną produkcją kwasu mlekowego. Wyniki przeprowadzonych badań były prezentowane w roku 2014 na konferencji międzynarodowej w Walencji (Hiszpania) (zał. 3, punkt III, B-1). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że zdolność wyizolowanych drobnoustrojów do przeprowadzenia fermentacji brzeczek miodowych oraz sposób wytwarzania pierzgi w laboratorium stały się przedmiotem

ochrony patentowej i stanowią część polskiego (PL. 226477) (zał. 3, punkt II, B-Pt3) i międzynarodowego zastrzeżenia patentowego (WO2015093997-A1) (zał. 3, punkt II, B-Pt2).

Produkty pochodzenia pszczelego znajdowały się w kręgu moich zainteresowań i stały się podstawą do napisania artykułu przeglądowego. Praca została opublikowana w roku 2018 w prestiżowym czasopiśmie *Trends in Food Science and Technology* (zał. 3, punkt II, A-9). We wspomnianym artykule przedstawiono charakterystykę pyłku oraz pierzgi pszczelej jako nowych produktów, które mogą znaleźć zastosowanie w wielu sektorach przemysłu spożywczego. Pierzga pszczela jest wyjątkowym produktem, niezwykle ważnym nie tylko dla ludzi, ale również dla pszczół. Powstaje w wyniku połączenia zlepionych nektarem, śliną pszczół i miodem różnych ziaren pyłku kwiatowego. W plastrach, w warunkach beztlenowych, spontanicznie następuje proces fermentacji mlekowej pyłku, wywoływanej przez bakterie *Lactobacillus*. Fermentacja do postaci pierzgi nie tylko zabezpiecza pyłek przed utratą właściwości, ale również powoduje uzyskanie nowych związków w wyniku przemian enzymatycznych. Ze względu na proporcje poszczególnych składników, pierzga jest doskonałym produktem mogącym uzupełniać niedobory witamin oraz składników odżywczych w organizmie człowieka.

Podsumowując należy zaznaczyć, że produkty pochodzenia pszczelego są znane i wykorzystywane od kilku tysięcy lat, jednak dopiero w ostatnim okresie czasu stały się przedmiotem nielicznych udokumentowanych badań naukowych. Poszerzenie wiedzy na temat produktów pochodzenia naturalnego stworzy możliwość kreowania nowych rozwiązań żywnościowych, które w przyszłości znajdą zainteresowanie konsumentów na rynku.

Publikacje:

**Kieliszek M.**, Piwowarek K., Kot A. M., Błażej S., Chlebowska-Śmigiel A., Wolska I. (2018) Pollen and bee bread as new health-oriented products: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 71, 170–180. Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 6,609, MNiSW<sub>2017</sub>: 50 pkt.

Patenty:

Misiewicz A., **Kieliszek M.**, Czarniak K. (2017) Nowy szczep bakterii *Lactobacillus delbrueckii* oraz jego zastosowanie do wytwarzania pierzgi, PL. 226477. Data uzyskania ochrony patentowej: 30.08.2017 r., MNiSW<sub>2017</sub>: 15 pkt.

Misiewicz A., **Kieliszek M.**, Czarniak K. (2017) Międzynarodowy patent. New strain *Lactobacillus delbrueckii* bacteria and its use of bee pollen. Pub. no. WO2015093997-A1; PL406622-A1; EP2914754, Int. appl. PCT/PL2014/050061. Data uzyskania ochrony patentowej: 31.07.2017 r., MNiSW<sub>2017</sub>: 15 pkt.

Konferencje:

Misiewicz A., **Kieliszek M.** (2014) The lactic acid bacteria used in the production of bee bread. ECCO XXXIII - Molecular Taxonomy from biodiversity to biotechnology. 33rd Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation. Fundación Universidad-Empresa de la Universitat de València - ADEIT, Walencja, Hiszpania, 11.06-13.06.2014 r.

### 5.3. Właściwości prozdrowotne owoców róży *Rosa rugosa*

W roku 2016 nawiązałem wewnątrzwydziałową współpracę z Dr inż. Andrzejem Cendrowskim (Zakład Technologii Owoców i Warzyw, Wydział Nauk o Żywności SGGW w Warszawie) obejmującą analizę składu oraz profilu związków fenolowych występujących w płatkach róży *Rosa rugosa*. Przeprowadzone badania wykazały, że płatki *Rosa rugosa* zawierały do 2175,43 mg polifenoli na 100 g świeżej masy. Jednocześnie udało się zidentyfikować dwadzieścia różnych polifenoli wykorzystując zaawansowany sprzęt laboratoryjny UPLC-ESI-MS. Główną frakcją polifenoli były elagitaniny, które stanowiły od 69 do 74% wszystkich polifenoli występujących w płatkach róży *Rosa rugosa*. W nieprzetworzonych płatkach róży zidentyfikowano cztery antocyjany: 3,5-di-O-glukozyd cyjanidyny, 3-O-soforozy peonidyny, 3,5-di-O-glukozyd peonidyny i 3-O-glukozyd peonidyny, z których dominujący 3,5-di-O-glukozyd peonidyny stanowił około 85% wszystkich oznaczonych związków antocyjanowych. W dalszych badaniach wykorzystując szybką oraz zwalidowaną metodę UPLC-PDA-Q/TOF-MS potwierdzono obecność w płatkach róży następujących związków: kwasów fenolowych, flawonoli, flawan-3-oli i hydrolizowalnych tanin (gallotannin i ellagotannin). Dodatkowo stwierdzono, że przeprowadzenie procesu ekstrakcji polifenoli z płatków *Rosa rugosa* zakwaszonym roztworem etanolu jako rozpuszczalnikiem jest bardziej skuteczne niż wykorzystanie wodnego roztwór etanolu w tym samym stężeniu. Uzyskane rezultaty badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Molecules* i *Journal of Food Quality* (zał. 3, punkt II, A-15, A-16). Ze względu na wysoką zawartość związków bioaktywnych, w szczególności

polifenolowych (antocyjanów, flawonoli, elagitaniny) płatków *Rosa rugosa* mogą być wartościowym surowcem do produkcji preparatów prozdrowotnych.

Dodatkowe badania dotyczyły sprawdzenia wpływu czasu zbioru płatków róży *Rosa rugosa* (podczas kolejnych po sobie trzech sezonów) na wystąpienie możliwych zmian w ich składzie chemicznym oraz aktywności przeciwutleniającej. Stwierdzono, że czas zbioru płatków róży nie wpływał na zmiany w całkowitej zawartości związków fenolowych, antocyjanów i aktywności przeciwutleniającej. Ponadto właściwości przeciwutleniające wykazały wysoką korelację z zawartością związków fenolowych w płatkach róży. W pracy szczególną uwagę zwrócono również na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych. Głównymi zidentyfikowanymi kwasami tłuszczowymi w płatkach róży były: kwas linolowy, palmitynowy, stearynowy i linolenowy. Otrzymane wyniki badań opublikowano w roku 2018 w czasopiśmie międzynarodowym *Agrochimica* (zał. 3, punkt II, A-7). Podsumowując można stwierdzić, że płatki róży *Rosa rugosa* są bogatym źródłem naturalnych przeciwutleniaczy i mogą być wykorzystywane jako promujący zdrowie składnik żywności funkcjonalnej lub jako naturalny przeciwutleniacz. Produkt ten może odgrywać ważną rolę w codziennej diecie wpływając pozytywnie na zdrowie ludzi.

Publikacje:

Cendrowski A., Ścibisz I., Mitek M., **Kieliszek M.** (2018) Influence of harvest seasons on the chemical composition and antioxidant activity in *Rosa rugosa* petals. *Agrochimica*, 62 (2), Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 0,694, MNiSW<sub>2017</sub>: 15 pkt.

Cendrowski A., Ścibisz I., **Kieliszek M.**, Kolniak-Ostek J., Mitek M. (2017) UPLC-PDA-Q/TOF-MS profile of polyphenolic compounds of liqueurs from *Rose* petals (*Rosa rugosa*). *Molecules*, 22, 1832, Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 3,098, MNiSW<sub>2017</sub>: 30 pkt.

Cendrowski A., Ścibisz I., Mitek M., **Kieliszek M.**, Kolniak-Ostek J. (2017): Profile of the phenolic compounds of *Rosa rugosa* petals. *Journal of Food Quality*, vol. 2017, Article ID 7941347, 10 pages, 2017. Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 0,841, MNiSW<sub>2017</sub>: 20 pkt.

#### **5.4. Rola selenu w patofizjologicznym znaczeniu oddziaływań hydrofobowych białek**

W pracy przedstawiono hipotezę badawczą dotyczącą wpływu seleninu sodowego na oddziaływanie hydrofobowe białek. Ponadto został zaproponowany mechanizm przeciwnowotworowego działania tego związku chemicznego.

Właściwości hydrofobowe białek określa się na podstawie występowania proporcji niepolarnych aminokwasów (z alifatycznymi lub aromatycznymi łańcuchami bocznymi) w stosunku do tych z polarnymi resztami. Siły hydrofobowe w natywnych białkach biorą udział w zachowaniu właściwej trójwymiarowej struktury ich łańcuchów polipeptydowych połączonych ze sobą wiązaniami dwusiarczkowymi. Jednak każde przerwanie takich wiązań jest związane z ekspozycją wewnątrzcząsteczkowych grup hydrofobowych i ich późniejszych interakcji między cząsteczkami. W artykule (zał. 3, punkt II, A-8) wykazano, że inkubacja albuminy ludzkiej (HSA) z silnymi reduktorami, czego przykładem jest ditiotreitol (DTT) lub homocysteina (HC) prowadzi do powstania nierozpuszczalnego polimeru (amyloidów-hydrofobowych agregatów białkowych w organizmach ludzi). Odkładanie takiego polimeru w układzie krążenia może powodować nieodwracalne zmiany prowadzące do powstania chorób wieńcowych, neurologicznych oraz innych zmian degeneracyjnych. Przedstawione polimery mogą pokrywać błony komórek i czynić je odpornymi na rozpoznawanie i niszczenie przez wrodzony układ odpornościowy. Ochronna bariera tych komórek zbudowana jest z białka krwi o własnościach fibryny, która jednak nie ulega normalnemu procesowi fibrynolitycznej degradacji. Na skutek tego pozostaje ona permanentnie na takiej błonie i nie pozwala na immunologiczne rozpoznanie jej jako ciała „obcego” przez układ odpornościowy.

W kolejnej pracy (przeglądowej) przedstawiono możliwy mechanizm przeciwnowotworowego działania seleninu sodu (zał. 3, punkt II, A-14). Fibrynogen, który jest istotnym czynnikiem krzepnięcia krwi reaguje z wolnymi rodnikami hydroksylowymi, które powodują modyfikację jego struktury trzeciorzędowej z utworzeniem polimeru podobnego do fibryny, określanego jako parafibryna. W konsekwencji parafibrina łatwo oddziałuje z hydrofobowymi epitopami składników ściany komórkowej i znacząco zaburza ich właściwości i funkcje. Takie epitopy reagują łatwo ze sobą, tworząc wiązania silniejsze niż wiązania kowalencyjne peptydów, co czyni je odpornymi na degradację proteolityczną, m.in. przez enzym chymotrypsynę. Powstawanie parafibrynowej powłoki na komórkach (np. nowotworowych) można zapobiec przez traktowanie ich aktywnym-redoks selenem, w szczególności seleninem sodu oraz środkami chelatującymi żelazo. Związki te hamują wywołane żelazem tworzenie wolnych

rodników hydroksylowych. Jednak po uformowaniu się powłoki ochronnej można ją usunąć przez traktowanie różnymi amfifilowymi substancjami naturalnymi (polifenole) występującymi szczególnie w produktach spożywczych pochodzących z diety śródziemnomorskiej. W związku z tym, aktywne-redoks związki selenu produkujące reaktywne formy tlenu mogą stanowić nową klasę środków terapeutycznych ukierunkowanych na wystąpienie niekontrolowanej homeostazy redoksowej komórek nowotworowych. Tak więc, selenin ma własności utleniające, szczególnie w reakcjach z grupami sulfhydryłowymi (-SH) białek. Jedynie selenin hamuje wymianę dwusiarczkową w ludzkim fibrynogenie i w ten sposób zapobiega powstawaniu hydrofobowego polimeru nazwanego parafibryną. Należy podkreślić, że zastosowanie dużych dawek seleninu sodu wykazuje obiecujące działania przeciwnowotworowe, jak opisano w wielu badaniach przedklinicznych.

Nie ulega więc wątpliwości, że prowadzenie badań nad hydrofobowymi interakcjami białkowymi wywołanymi różnymi czynnikami żywieniowymi lub środowiskowymi może dostarczyć racjonalnego wyjaśnienia wielu stanów patologicznych, w tym chorób sercowo-naczyniowych, neurologicznych i innych chorób zwyrodnieniowych, w tym raka w organizmach ludzi.

Publikacje:

**Kieliszek M.**, Lipinski B. (2018) Pathophysiological significance of protein hydrophobic interactions: an emerging hypothesis. *Medical Hypotheses*, 110, 15–22. Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 1,12, MNiSW<sub>2017</sub>: 15 pkt.

**Kieliszek M.**, Lipinski B., Błażej S. (2017) Application of sodium selenite in the prevention and treatment of cancers. *Cells*, 6(4), 39. Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 4,829, MNiSW<sub>2017</sub>: 0 pkt.

## 5.5. Identyfikacja wybranych gatunków ptaków na podstawie błon witelinowych jaj

W roku 2017 nawiązałem współpracę z Dr inż. Krzysztofem Damaziakiem (Wydział Nauk o Zwierzętach, SGGW w Warszawie), której wynikiem jest wspólna publikacja dotycząca analizy porównawczej struktury i wybranych właściwości fizycznych i chemicznych błony witelinowej żółtka jaj udomowionych ptaków strusia, emu i nandu (zał. 3, punkt II, A-10). Opublikowane badania dotyczące charakterystyki VM żółtek jaj innych gatunków ptaków są nieliczne i ograniczają się

tylko do kilku gatunków ptaków udomowionych (m.in. kura domowa). Ważnym odkryciem zaprezentowanym w tej publikacji jest możliwość przeprowadzenia identyfikacji ptaków w wyniku uzyskanych różnic w strukturze błony witelinowej (VM) oraz parametrów fizycznych żółtka jaj. Zgodnie z naszą wiedzą, ani struktura oraz inne parametry VM nie były do tej pory badane w żadnym z gatunków ptaków bezgrzebieniowych. Ponadto badania dotyczące cech morfologicznych i fizykochemicznych treści jaj tych ptaków również są nieliczne. Zarówno fizyczna, jak i chemiczna struktura VM różni się wśród poszczególnych gatunków ptaków nawet w obrębie jednego porządku taksonomicznego. Struktura VM ma duże znaczenie dla reprodukcji ptaków. Nadaje ona kulisty kształt żółtka, a łącząc się z chalazami utrzymuje je w centralnej części jaja. Stanowi barierę dyfuzyjną dla wewnętrznej treści żółtka, co chroni zarodek w okresie inkubacji jaja. W ramach badań prowadziłam rozdział i analizę frakcji białkowych błony witalinowej otrzymanej z jaj poszczególnych ptaków. W badaniach do oceny profilu białkowego wykorzystywałam metodę elektroforezy w żelu poliakrylamidowym.

W wyniku przeprowadzonych badań potwierdzono, że gatunki ptaków różniły się budową warstwy wewnętrznej VM, którą stanowiły włókna o różnej grubości. Najbardziej charakterystyczna była wewnętrzna warstwa membrany witelinowej emu, której włókna były najmniej zróżnicowane, ale tworzące najbardziej zwartą sieć. Ponadto przeprowadzony rozdział elektroforetyczny białek uzyskanych z błony VM potwierdził różnice w profilu białkowym pomiędzy poszczególnymi gatunkami ptaków. Efektem tych wspólnych badań oprócz publikacji w prestiżowym czasopiśmie naukowym *Poultry Science* było doniesienie konferencyjne (zał. 3, punkt III, B-13). Badania są nadal realizowane na poznaniu profili białkowych, parametrów fizycznych VM innych ptaków w tym gniazdowników i zagniazdowników.

Publikacje:

Damaziak K., Marzec A., **Kieliszek M.**, Buclaw M., Michalczuk M., Niemiec J. (2018) Comparative study on vitelline membrane structure and correlations with their strength and yolk content physical parameters of ostrich, emu and greater rhea eggs. *Poultry Science*, 97 (3), 1032–1040. Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 2,216, MNiSW<sub>2017</sub>: 40 pkt.



Konferencje:

Damaziak K., Marzec A., **Kieliszek M.**, Buclaw M., Michalczyk M., Niemiec J. (2017) Comparative analysis of the structure and strength of the vitelline membrane of selected ratite species. Science to Practice - Practice to Science. XXIX International Poultry Science Symposium of the WPSA Polish Branch. Polski Oddział Światowego Stowarzyszenia Wiedzy Drobiarskiej. Tarnowo Podgórze, 18.09-20.09.2017 r., Materiały konferencyjne, 172–173.

### **5.6. Możliwości wykorzystania pullulanu jako substancji o właściwościach prebiotycznych**

Uczestniczyłem w badaniach mających na celu określenie wpływu pullulanu na wzrost i aktywność fermentacyjną wybranych bakterii mlekowych wyizolowanych z układu pokarmowego człowieka. Pullulan jest mikrobiologicznym polisacharydem wytwarzanym przez grzyby *Aureobasidium pullulans*. Może być wykorzystywany jako składnik niskokalorycznej żywności oraz dietetycznych przekąsek przeznaczonych dla diabetyków.

W publikacji (zał. 3 punkt II, A-18) wykazano, że 2% dodatek pullulanu do podłoża hodowlanego wpływał na zwiększenie liczby bakterii *Bifidobacterium* w porównaniu do hodowli kontrolnej pozbawionej tego składnika odżywczego. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Current Pharmaceutical Biotechnology*. Dalsze badania (artykuł w recenzji) związane były z otrzymaniem jogurtów z dodatkiem pullulanu i określeniem jego wpływu na liczbę bakterii fermentacji mlekowej. W pracy wykazano, że dodatek pullulanu (1 i 2%) mógł wpływać na zachowanie wysokiej żywotności bakterii fermentacji mlekowej w jogurtach podczas ich przechowywania w 4°C przez 28 dni wobec próby kontrolnej pozbawionej tego polisacharydu. W jogurtach wzbogaconych pullulanem w miarę wydłużania czasu przechowania stwierdzono wzrost kwasowości. Otrzymane rezultaty badań mogły świadczyć o lepszym wykorzystaniu laktozy przez bakterie *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* do produkcji kwasu mlekowego. Ponadto jogurty wzbogacone 1% pullulanem wykazywały lepsze cechy sensoryczne niż te z 2% dodatkiem. Podsumowując należy zaznaczyć, że badania cały czas są kontynuowane i zostały rozszerzone o nowe analizy charakterystyki produktów hydrolizy cząsteczek pullulanu.

Publikacje:

Chlebowska-Śmigiel A., Gniewosz M., **Kieliszek M.**, Bzducha-Wróbel A. (2017) The effect of pullulan on the growth and activity of selected stool microflora of human. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(2), 121–126. Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 1,819, MNiSW<sub>2017</sub>: 30 pkt.

### **5.7. Identyfikacja mikroorganizmów oraz charakterystyka ich zdolności do biosyntezy różnych metabolitów**

Kolejnym obszarem moich zainteresowań naukowych była identyfikacja molekularna wybranych szczepów drożdży oraz grzybów *Aureobasidium pullulans*. Identyfikację mikroorganizmów przeprowadzono w oparciu o analizę łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). W pracy wykorzystywano uniwersalne startery ITS1 i ITS4, które biorą udział w amplifikacji polimorficznego regionu znajdującego się między genami kodującymi 18S rRNA. Dodatkowo wykonano sekwencjonowanie regionów ITS otrzymanego DNA w celu potwierdzenia tożsamości mikroorganizmów. Otrzymane sekwencje zostały zdeponowane w bazie GenBank (NCBI) (zał. 3, punkt III, Q). Wystąpienie niewielkich różnic w wielkości ampliconu DNA pomiędzy poszczególnymi gatunkami drożdży skłoniło do wykonania dodatkowej analizy identyfikacyjnej. Posłużono się techniką PCR-RFLP w celu zróżnicowania tych fragmentów genomu. Wykorzystywano dwa enzymy restrykcyjne *HaeIII* i *RsaI*, w wyniku czego otrzymano wzorce umożliwiające analizę gatunkową drożdży. Uzyskane wyniki przeprowadzonych prac eksperymentalnych doprowadziły do identyfikacji pięciu szczepów drożdży: *Candida inconspicua*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kazachstania unispora* i *Zygorulaspora florentina*. W pracy (zał. 3, punkt II, A-17) również zostały przeprowadzone badania nad hodowlą drożdży w podłożach składających się z przemysłowych produktów odpadowych: ziemniaczanej wody sokowej uzupełnionej różnymi źródłami węgla. Badane szczepy drożdży były w stanie akumulować do 20% substancji lipidowych w strukturach komórkowych. Należy podkreślić, że wszystkie drożdże hodowane w środowisku wzbogaconym glukozą wykazywały duży udział zawartości kwasów tłuszczowych C18, wśród których kwas oleinowy (C18:1 cis-9) był dominujący. Jego największy udział (ponad 60%) stwierdzono w lipidach pozyskanych z biomasy *D. hansenii* IG01.

W kolejnych badaniach z tego cyklu skoncentrowałem się nad identyfikacją szczepów drożdży metodami biologii molekularnej. Publikacja (zał. 3, punkt II, A-19) w powyższym obszarze tematycznym dotyczyła badań nad oceną zdolności biosyntezy lipidów przez szczepy z rodzajów *Rhodotorula* i *Sporobolomyces*. W celu potwierdzenia przynależności taksonomicznej drożdży wykorzystywano dwa enzymy restrykcyjne *Hinfl* i *HaeIII*. Fragmenty DNA otrzymane w wyniku reakcji PCR-RFLP, po rozdiale elektroforetycznym w 2% żelu agarozowym dały charakterystyczny dla danego rodzaju drożdży profil prążków. Ponadto w pracy wykazano, że badane szczepy drożdży *Rhodotorula* w porównaniu do *Sporobolomyces* są w stanie wykorzystywać glicerol jako źródło węgla. Wykorzystanie tego organicznego związku w hodowli drożdży powodowało intensyfikację biosyntezy wewnątrzkomórkowych lipidów. Drożdże *Rhodotorula glutinis* var. *rubescens* LOCKR<sub>13</sub> charakteryzowały się największą wydajnością objętościową biosyntezy wewnątrzkomórkowych lipidów w swoich strukturach komórkowych (4,73 g/L) wobec wszystkich badanych szczepów mikroorganizmów.

Kolejnym obiektem moich zainteresowań była możliwość prowadzenia badań na temat produkcji drożdżowych preparatów  $\beta$ -glukanowych. Publikacja (zał. 3, punkt II, A-3) stanowi doniesienie dotyczące określenia wpływu glicerolu jako źródła węgla na zawartość polimerów ściany komórkowej ( $\beta$ -glukany i mannoproteiny) drożdży probiotycznych *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* i piwowarskich *S. cerevisiae* R9. W pracy wykazano, że suplementacja podłoża hodowlanego glicerolem w dawce 3 i 5% intensyfikowała biosyntezę mannoprotein w ścianie komórkowej drożdży *S. cerevisiae* R9. W przypadku drożdży *S. cerevisiae* var. *boulardii* hodowanych w podłożu YPD o pH 5 mannoproteiny stanowiły ok. 27% ściany komórkowej. Podsumowując ten etap pracy należy podkreślić, że po hodowli w podłożach zawierających 2 i 3% glicerolu o pH 4 drożdże *S. cerevisiae* R9 były najlepszym źródłem  $\beta$ -glukanów. Ściany komórkowe zawierały ok. 36% polimerów  $\beta$ -1,3-/1,6-glukanu.

Dwie pozostałe publikacje (zał. 3, punkt II, A-5, A-6) powiązane ze sobą tematycznie dotyczyły hodowli drożdży w podłożach złożonych z produktów odpadowych pochodzących z przemysłu (glicerol, ziemniaczana woda sokowa) na produkcję  $\beta$ -1,3-/1,6-glukanu. Otrzymane wyniki badań wykazały, że największy plon biomasy komórkowej i  $\beta$ -glukanu szczepu *Candida utilis* ATCC 9950 osiągnięto

po 48-godzinnej inkubacji w bioreaktorze. Biomasa komórkowa drożdży *C. utilis* otrzymana po hodowli w kolbach charakteryzowała się większą zawartością białka (ok. 26,5%) w porównaniu do hodowli prowadzonej w bioreaktorze (19%). Dodatek 5 i 10% glicerolu do ziemniaczanej wody sokowej o pH 7.0 powodował wzrost zawartości  $\beta$ -glukanu u szczepów drożdży *S. cerevisiae*. Zestawienie uzyskanych wyników badań pozwoliło na sformułowanie zgłoszonego zastrzeżenia patentowego do Urzędu Patentowego RP (zał. 3, punkt II, Pt-4).

Warto podkreślić, że uzyskane wyniki badań były przedmiotem do sformułowania projektu badawczego pt. „Glu-Can-Technologia wytwarzania funkcjonalnych preparatów o wysokiej zawartości  $\beta$ -1,3-/1,6-glukanu *C. utilis* o właściwościach wiązania mykotoksyn”, którego jestem wykonawcą (zał. 3, punkt III, I-9). Uzyskane wyniki badań potwierdziły możliwość wykorzystania przemysłowych produktów odpadowych w biosyntezie funkcjonalnych polisacharydów ściany komórkowej. Pragnę nadmienić, że prace badawcze są cały czas kontynuowane.

#### Publikacje:

Gientka I., **Kieliszek M.**, Jermacz K., Błażej S. (2017) Identification and characterization of oleaginous yeast isolated from kefir and their ability to accumulate intracellular fats in deproteinated potato wastewater with different carbon sources. *BioMed Research International*, 2017, Article ID 6061042, Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 2,583, MNiSW<sub>2017</sub>: 25 pkt.

Gientka I., Gadaszewska M., Błażej S., **Kieliszek M.**, Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Różańska L., Kot A. M. (2017) Evaluation of lipid biosynthesis ability by *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* strains in medium with glycerol. *European Food Research and Technology*, 243, 275–286, Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 1,919, MNiSW<sub>2017</sub>: 30 pkt.

Bzducha-Wróbel A., Pobiega K., Błażej S., **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(21), 9131–9145. Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 3,340, MNiSW<sub>2017</sub>: 35 pkt.

Bzducha-Wróbel A., Błażej S., **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. Impact Factor<sub>2017/2018</sub>: 2,533, MNiSW<sub>2017</sub>: 30 pkt.

Bzducha-Wróbel A., **Kieliszek M.**, Błażej S. (2013) Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon

source. *European Food Research and Technology*, 237(4), 489–499. Impact Factor<sub>2013</sub>: 1,378, MNiSW<sub>2013</sub>: 30 pkt.

Patenty:

Bzducha-Wróbel A., Błażej S., Pobiega K., **Kieliszek M.** (2017) Sposób otrzymywania preparatu  $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanów drożdży *Candida utilis*. P.420212. data zgłoszenia w Urzędzie Patentowym RP: 16.01.2017 r., MNiSW<sub>2017</sub>: 0 pkt.

## 6. Podsumowanie pracy naukowo-badawczej

**Tabela 1.** Zestawienie publikacji naukowych znajdujących się w bazie Web of Science.

Lp.	Nazwa czasopisma	Liczba	Impact Factor*	Punkty wg MNiSW**
<b>Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Web of Science:</b>				
<i>Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</i>				
1.	Folia Microbiologica (2014)	1	1,000	15
2.	Nutrition (2013)	1	3,046	30
3.	European Food Research and Technology (2013)	1	1,387	30
4.	Preparative Biochemistry and Biotechnology (2012)	1	0,406	15
<b>Łącznie (1-4)</b>		<b>4</b>	<b>5,839</b>	<b>90</b>
<i>Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora wchodzące w skład Osiągnięcia</i>				
5.	Fungal Biology Reviews (2017)	1	3,967	40
6.	Journal of Trace Elements in Medicine and Biology (2016)	1	3,225	20
7.	Molecules (2017)	1	3,098	30
8.	3 Biotech (2018)	1	1,497	15
9.	Applied Sciences (2018)	1	1,689	25
10.	Biological Trace Element Research (2019)	1	2,361	15
11.	Molecular Biology Reports (2019)	1	1,889	20
<b>Łącznie (5-11)</b>		<b>7</b>	<b>17,726</b>	<b>165</b>
<i>Pozostałe po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</i>				
12.	Applied Microbiology and Biotechnology (2018, 2017, 2015)	4	2 x 3,340 1 x 3,420 1 x 3,376	4 x 35
13.	Journal of Biotechnology (2018)	1	2,533	30
14.	Agrochimica (2018)	1	0,694	15
15.	Medical Hypotheses (2018)	1	1,066	15
16.	Trends in Food Science and Technology (2018)	1	6,609	50
17.	Poultry Science (2018)	1	2,216	40
18.	Waste Biomass Valorization (2018)	1	1,874	20
19.	Microbial Cell Factories (2018)	1	3,831	40
20.	Cells (2017)	1	4,829	0
21.	Molecules (2017, 2016)	2	1 x 3,098 1 x 2,861	2 x 30
22.	Journal of Food Quality (2017)	1	0,841	20
23.	BioMed Research International (2017)	1	2,583	25
24.	Current Pharmaceutical Biotechnology (2017)	1	1,819	30
25.	European Food Research and Technology (2017)	1	1,919	30
26.	Biological Trace Element Research (2016)	1	2,399	15
27.	Oxidative Medicine and Cellular Longevity (2015)	1	4,492	25
<b>Łącznie (12-27)</b>		<b>20</b>	<b>57,140</b>	<b>555</b>
<b>RAZEM (1-27)</b>		<b>31</b>	<b>80,705</b>	<b>810</b>

**Tabela 2.** Zestawienie publikacji naukowych znajdujących się na liście B MNiSW.

Lp.	Nazwa czasopisma	Liczba	Impact Factor*	Punkty wg MNiSW**
<b>Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się na liście B MNiSW</b>				
<i>Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</i>				
1.	Bromatologia i Chemia Toksykologiczna (2012)	1		4
2.	Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego (2010)	1		2
<b>Łącznie (1-2)</b>		<b>2</b>		<b>6</b>
<i>Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</i>				
3.	Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych (2016)	2		2 x 13
<b>Łącznie (3)</b>		<b>2</b>		<b>26</b>
<b>RAZEM (1-3)</b>		<b>4</b>		<b>32</b>

**Tabela 3.** Zestawienie monografii naukowych.

Lp.	Nazwa monografii	Liczba	Impact Factor*	Punkty wg MNiSW**
<b>Monografie</b>				
<i>Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</i>				
1.	Zasady przyjmowania i przechowywania drobnoustrojów. Kolekcja Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych (2009) ISBN 9788392571179	2		2 x 4
<b>Łącznie (1)</b>		<b>2</b>		<b>8</b>
<i>Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</i>				
2.	Microbial Enzyme Technology in Food Applications (2016) ISBN 9781498749831	1		5
3.	Bezpieczeństwo Zdrowotne Żywności Aspekty Mikrobiologiczne, Chemiczne i Ocena Towaroznawcza (2015) ISBN 9788393542178	2		2 x 4
<b>Łącznie (2-3)</b>		<b>3</b>		<b>13</b>
<b>RAZEM (1-3)</b>		<b>5</b>		<b>21</b>

**Tabela 4.** Zestawienie patentów i zgłoszeń patentowych.

Lp.	Tytuł patentu	Liczba	Impact Factor*	Punkty wg MNiSW**
<b>Patenty i zgłoszenia patentowe</b>				
<i>Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</i>				
1.	Brak			
<b>Łącznie</b>				
<i>Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</i>				
2.	Międzynarodowy patent. Method for honey wort hight-sugar alcohol fermentation (2017) Pub. no. WO2015102500-A1; PL406718-A1; EP2914755-B1, Int. appl. PCT/PL2014/000111	1		15
3.	Nowy szczep bakterii <i>Lactobacillus delbrueckii</i> oraz jego zastosowanie do wytwarzania pierzgi (2017) PL. 226477 B1	1		15
4.	Zgłoszenie patentowe. Sposób otrzymywania preparatu $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanów drożdży <i>Candida utilis</i> (2017) PL.420212	1		0
5.	Międzynarodowy patent. New strain <i>Lactobacillus delbrueckii</i> bacteria and its use of bee pollen. (2017) Pub. no. WO2015093997-A1; PL406622-A1; EP2914754, Int. appl. PCT/PL2014/050061	1		15
<b>Łącznie (2-5)</b>		<b>4</b>		<b>45</b>
<b>RAZEM (1-5)</b>		<b>4</b>		<b>45</b>

**Tabela 5.** Zestawienie recenzowanych i punktowanych doniesień konferencyjnych.

Lp.	Nazwa czasopisma	Liczba	Impact Factor*	Punkty wg MNiSW**
<b>Referaty i doniesienia konferencyjne</b>				
<i>Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</i>				
1.	26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Frankfurt/Main, Niemcy (2013) Yeast 30(1), S176-S177, ISSN 0749-503X	2	2 x 1,742	0
<b>Łącznie (1)</b>		<b>2</b>		<b>0</b>
<i>Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</i>				
2.	Brak			
<b>Łącznie (2)</b>				
<b>RAZEM (1-2)</b>		<b>2</b>	<b>3,484</b>	<b>0</b>

\* Zgodnie z rokiem opublikowania. W przypadku publikacji z roku 2018 i 2019, dla których IF nie został obliczony podano ostatni aktualny IF.

\*\* Zgodnie z punktacją Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) obowiązującą w roku opublikowania.



**Publikacje (oryginalne prace twórcze)**\_\_\_\_\_ 40

Publikacje z Web of Science

eksperymentalne\_\_\_\_\_ 20

przeglądowe\_\_\_\_\_ 11

Inne publikacje

eksperymentalne\_\_\_\_\_ 3

przeglądowe\_\_\_\_\_ 1

Rozdziały w monografii\_\_\_\_\_ 5

**Cytowania**

według Web of Science\_\_\_\_\_ 424 (347 bez autoc.)

według Elsevier Scopus\_\_\_\_\_ 486 (404 bez autoc.)

**Index Hirsha**\_\_\_\_\_ 9**Sumaryczny Impact Factor**\_\_\_\_\_ 80,705**Suma punktów według listy MNiSW**\_\_\_\_\_ 908

Doniesienia konferencyjne\_\_\_\_\_ 27

Referaty\_\_\_\_\_ 9

Kierownictwo grantów NCN\_\_\_\_\_ 1

Patenty i zgłoszenia patentowe\_\_\_\_\_ 4

Sekwencje nukleotydowe opublikowane w GenBank\_\_\_\_\_ 15

Po wyłączeniu artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (IF = 17,726; MNiSW = 165) wartość mojego pozostałego dorobku publikacyjnego wynosi IF = 62,979; MNiSW = 743 pkt. Pełny wykaz moich osiągnięć w pracy naukowo-badawczej zawiera załącznik 3.

*Kieliszek Marek*