

**Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Instytut Nauk o Żywności**

**Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania w sprawie  
nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych  
w dyscyplinie technologia żywności i żywienia**

**dr inż. Agata Fabiszewska  
Autoreferat**

**Synteza oleju mikrobiologicznego przez drożdże *Yarrowia lipolytica*  
z wykorzystaniem odpadów przemysłu rybnego  
- dobór warunków procesu i badania nad szlakami metabolicznymi  
biosyntezy lipidów zapasowych**

**Warszawa, 2022**

## Spis treści

1. Imiona i nazwisko .....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych .....	4
4. Informacja o osiągnięciach naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny .....	5
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....	5
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.....	5
4.3. Omówienie celu naukowego publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania .....	8
4.3.1. Wstęp.....	8
4.3.2. Cel naukowy osiągnięcia .....	11
4.3.3. Materiały i metody.....	12
4.3.3.1. Materiał badawczy .....	12
4.3.3.2. Podłoża i techniki hodowli drożdży .....	12
4.3.3.3. Metody preparatywne i analityczne .....	14
4.3.3.4. Metody statystyczne .....	15
4.3.4. Omówienie wyników badań .....	16
4.3.4.1. Zastosowanie odpadowego oleju po procesie wędzenia ryb w hodowli drożdży olejogennych z gatunku <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	16
4.3.4.2. Zastosowanie posmażalniczego oleju rzepakowego oraz odpadowej solanki w hodowli drożdży olejogennych z gatunku <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	21
4.3.4.3. Badania nad szlakami metabolicznymi biosyntezy lipidów zapasowych w podłożach zawierających lipidowe źródło węgla .....	23
4.3.5. Podsumowanie .....	29
4.3.6. Spis literatury.....	31
4.4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych.....	33
4.4.1. Charakterystyka oraz zastosowanie kultur bakterii fermentacji mlekowej do poprawy jakości żywności i pasz.....	34
4.4.2. Drożdże <i>Y. lipolytica</i> jako źródło enzymów lipolitycznych .....	38
4.4.3. Enzymatyczna synteza potencjalnych dodatków do żywności z udziałem lipaz ....	41
4.4.4. Pozyskiwanie cennych biotechnologicznie metabolitów w hodowli drożdży z gatunku <i>Y. lipolytica</i> ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania surowców odpadowych w podłożach hodowlanych .....	44

---

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	46
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	49
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne .....	49
6.2. Osiągnięcia organizacyjne .....	51
6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę .....	52
7. Inne ważne informacje dotyczące kariery zawodowej .....	53
7.1. Dorobek publikacyjny .....	53
7.2. Udział i rola w projektach badawczych.....	56
7.3. Udział w konferencjach .....	57
7.4. Działalność w towarzystwach naukowych i zespołach eksperckich oraz konsorcjach i sieciach badawczych, recenzje grantów .....	57
7.5. Współpraca międzynarodowa, współpraca z przemysłem, recenzje publikacji.....	57
7.6. Otrzymane nagrody i wyróżnienia .....	58
7.7. Odbyte szkolenia i kursy .....	61

**1. Imiona i nazwisko**

Agata Urszula Fabiszewska

Nazwisko panięskie: Kapturowska

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

- 2013**      **Doktor inżynier nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia człowieka**, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
praca doktorska pt. „Badania nad właściwościami katalitycznymi drożdży *Yarrowia lipolytica* w reakcjach biotransformacji” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Białeckiej-Florjańczyk.  
*Praca została wyróżniona uchwałą Rady Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie*
- 2010**      **Studia Podyplomowe Doskonalenia Pedagogicznego** (jedno-semestralne), Wydział Nauk Humanistycznych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, świadectwo ukończenia studiów podyplomowych nr SDP-701/2010
- 2009**      **Magister inżynier biotechnologii w zakresie biotechnologii w przemyśle spożywczym**, Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
praca magisterska pt. „Ocena zdolności szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości ochratoksyny A w środowisku” wykonana pod kierunkiem dr hab. Krystyny Steckiej, prof. IBPRS  
*Praca została wyróżniona w konkursie organizowanym przez firmę Bayer - The Bayer Young Environmental Envoy Program*

### 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- 2015 - obecnie**      **adiunkt badawczo-dydaktyczny**  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Wydział Nauk o Żywności (obecnie Instytut Nauk o Żywności)  
Katedra Chemii
- 2014**                **asystent**  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Wydział Nauk o Żywności (obecnie Instytut Nauk o Żywności)  
Katedra Chemii
- 2011 - 2013**        **asystent**  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie  
Zakład Technologii Fermentacji
- 08 - 12.2010**      **technolog**  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie  
Zakład Technologii Fermentacji
- 05 – 07.2010**      **stażysta**  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie  
Zakład Technologii Fermentacji

W okresach od 11.06.2014 do 9.06.2014 r. (12 m-cy) oraz od 30.03.2018 do 28.03.2019 r. (12 m-cy) przebywałam na urloпах: macierzyńskim, dodatkowym urlopie macierzyńskim i urlopie rodzicielskim.

#### **4. Informacja o osiągnięciach naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny**

Osiągnięciem naukowym będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest monotematyczny cykl składający się z 6 publikacji naukowych.

##### **4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

“Synteza oleju mikrobiologicznego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* z wykorzystaniem odpadów przemysłu rybnego - dobór warunków procesu i badania nad szlakami metabolicznymi biosyntezy lipidów zapasowych”

##### **4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego**

---

P1 - Agata Fabiszewska, Agnieszka Pielińska, Patrycja Mazurczak, Bartłomiej Zieniuk, Małgorzata Wołoszynowska (2017): Wpływ wybranych czynników na wydajność ekstrakcji i skład kwasów tłuszczowych otrzymanego oleju mikrobiologicznego w komórkach drożdży *Yarrowia lipolytica*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 24 (1) (110), 59 – 69;  
DOI:10.15193/zntj/2017/110/173

**MEiN 2017 = 13 pkt**

Mój wkład: Opracowanie koncepcji badań, opracowanie metodyki badań poza oznaczeniem składu kwasów tłuszczowych, wykonanie części doświadczeń, wiodący udział w opracowaniu, analizie i interpretacji wyników, sformułowanie wniosków, wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu artykułu jako autor korespondencyjny, przygotowanie odpowiedzi na recenzje artykułu. Mój udział oceniam na 70%.

---

P2 – Agata Fabiszewska, Bartłomiej Zieniuk, Patrycja Mazurczak-Zieniuk, Małgorzata Wołoszynowska, Dorota Nowak (2019): Waste fish oil as an alternative carbon source in microbial oil production by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 599, 3-13; DOI:10.22630/ZPPNR.2019.599.18

**MEiN 2019 = 20 pkt**

Mój wkład: Opracowanie koncepcji badań, opracowanie metodyki badań poza oznaczeniem składu kwasów tłuszczowych, wykonanie części doświadczeń, wiodący udział w opracowaniu, analizie i interpretacji wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu artykułu jako autor korespondencyjny, przygotowanie odpowiedzi na recenzje artykułu. Mój udział oceniam na 60%.

---

---

**P3** – Agata Fabiszewska, Paulina Misiukiewicz-Stępień, Magdalena Paplińska-Goryca, Bartłomiej Zieniuk, Ewa Białecka-Florjańczyk (2019): An insight into storage lipids synthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast relating to lipid and sugar substrates metabolism. *Biomolecules* 9(11), 1-13, nr artykułu 685; DOI:10.3390/biom9110685

**MEiN** 2019 = **100 pkt**

**IF** 2019 = **4,082**

**IF** 5-letni (2020) = **5,362**

Mój wkład: Opracowanie koncepcji badań, sformułowanie hipotezy badawczej, opracowanie metodyki badań poza analizami genetycznymi, wykonanie części doświadczeń obejmującej hodowlę drożdży, wiodący udział w opracowaniu, analizie i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowanie manuskryptu artykułu jako autor korespondencyjny, przygotowanie odpowiedzi na recenzje artykułu. Mój udział oceniam na 60%.

---

**P4** – Agata Fabiszewska, Bartłomiej Zieniuk, Mariola Kozłowska, Patrycja Mazurczak-Zieniuk, Małgorzata Wołoszynowska, Paulina Misiukiewicz-Stępień, Dorota Nowak (2021): Studies on upgradation of waste fish oil to lipid-rich yeast biomass in *Yarrowia lipolytica* batch cultures, *Foods* 10(2), 1-16, nr artykułu 436; DOI:10.3390/foods10020436

**MEiN** 2021 = **100 pkt**

**IF** 2021 = **5,561**

**IF** 5-letni (2021) = **5,940**

Mój wkład: Opracowanie koncepcji oraz metodyki badań, udział w realizacji prac eksperymentalnych, wiodący udział w opracowaniu, analizie i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowanie manuskryptu artykułu jako autor korespondencyjny, przygotowanie odpowiedzi na recenzje artykułu. Mój udział oceniam na 65%.

---

**P5** – Agata Fabiszewska, Magdalena Paplińska-Goryca, Paulina Misiukiewicz-Stępień, Małgorzata Wołoszynowska, Dorota Nowak, Bartłomiej Zieniuk (2022): Expression profile of selected genes involved in storage lipids synthesis in a model oleaginous yeast species *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Molecular Sciences* 23(3), nr artykułu 1041; DOI:10.3390/ijms23031041

**MEiN** 2021 = **140 pkt**

**IF** 2021 = **6,208**

**IF** 5-letni (2021) = **6,628**

Mój wkład: Opracowanie koncepcji oraz części metodyki badań, udział w realizacji prac eksperymentalnych, wiodący udział w opracowaniu, analizie i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowanie manuskryptu artykułu jako autor korespondencyjny, przygotowanie odpowiedzi na recenzje artykułu. Mój udział oceniam na 70%.

---

---

**P6** – Agata Fabiszewska, Katarzyna Wierzychowska, Małgorzata Wołoszynowska, Dorota Nowak, Bartłomiej Zieniuk (2022): Brine and post-frying oil management in the fish processing industry – a concept based on oleaginous yeast culture. *Processes*, 10, 1-12, nr artykułu 294; DOI:10.3390/pr10020294

**MEiN** 2021 = **70 pkt**

**IF** 2021 = **3,352**

**IF** 5-letni (2021) = **3,338**

Mój wkład: Opracowanie koncepcji oraz metodyki badań, wykonanie części doświadczeń, wiodący udział w opracowaniu, analizie i interpretacji wyników oraz przygotowanie manuskryptu artykułu jako autor korespondencyjny i odpowiedzi na recenzje artykułu.

Mój udział oceniam na 75%.

---

<b>Podsumowanie</b>
---------------------

<b>MEiN = 443 pkt</b>
-----------------------

<b>*IF</b> 1-roczny = <b>19,203</b>
-------------------------------------

<b>*IF</b> 5-letni = <b>21,268</b>
------------------------------------

*\*W podsumowaniu zsumowano parametry, jakie osiągnęło czasopismo w roku publikacji lub w przypadku publikacji z 2022 roku podano parametry z roku 2021*

*Efektom badań opisanych w Osiągnięciu był patent autorstwa Agaty Fabiszewskiej, Bartłomieja Zieniuka, Patrycji Mazurczak, Doroty Nowak, Ewy Białeckiej-Florjańczyk pt.: „Sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego o wysokiej zawartości kwasów omega-3. Wynalazek chroniony”, Numer zgłoszenia: P.426836, Numer patentu/prawa: P.426836, Data zgłoszenia: 29-08-2018, Data udzielenia prawa: 23-08-2021 [WIPO ST 10/C PL426836]*

*Oświadczenia Współautorów prac wchodzących w cykl będący osiągnięciem naukowym, potwierdzające mój udział oraz określające ich udział w powstaniu tych prac stanowi załącznik 5. Symbole przyporządkowane poszczególnym publikacjom będą stanowiły odnośniki w dalszej części pracy.*



### **4.3. Omówienie celu naukowego publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### **4.3.1. Wstęp**

Ludzkość wykorzystywała drożdże w procesie fermentacji na długo zanim zostały one odkryte. Już w starożytnym Egipcie około 5000 lat temu stosowano procesy fermentacji w produkcji chleba i piwa. Antonie van Leeuwenhoek po raz pierwszy zidentyfikował komórki drożdży w 1680 roku, wykonując preparat mikroskopowy z biomasy komórkowej w piwie, zaś chemik Antoine Lavoisier w 1789 roku opisał fermentację alkoholową. Jednak dopiero w 1857 roku Louis Pasteur przypisał tym komórkom zdolność do prowadzenia fermentacji alkoholowej [Barnett 2003; Geertman i in., 2006]. Obecnie rozpoznanych jest około 1500 gatunków drożdży. Wiele z nich jest nadal charakteryzowana, a ich potencjał stale nieodkryty.

Oprócz najbardziej znanych gatunków drożdży jak *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Schizosaccharomyces pombe* stosowanych od tysiącleci przez człowieka, w literaturze naukowej wyodrębnia się tzw. drożdże niekonwencjonalne. Drożdże niekonwencjonalne stanowią różnorodną grupę gatunków charakteryzujących się unikalnymi cechami i możliwościami wykorzystania w biotechnologii [de Souza Varize i in., 2019].

*Yarrowia lipolytica* to jeden z najczęściej badanych gatunków drożdży niekonwencjonalnych, powszechnie występujący w przyrodzie i posiadający cenny potencjał przemysłowy. Gatunek ten posiada status GRAS (ang. *generally recognized as safe*) przyznany przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków i uznaje się go za mikroorganizm niepatogenny [Barth i Gaillardin 1997; Groenewald i in., 2014]. W ostatnich latach biomasa drożdży *Y. lipolytica*, w tym biomasa zawierająca selen oraz chrom, zostały włączone do wykazu nowej żywności na mocy odpowiednich rozporządzeń Komisji Europejskiej.

Nazwa rodzajowa tych drożdży odnosi się do nazwiska Davida Yarrowsa, badacza Delft Microbiology Laboratory w Holandii, który reklasyfikował i ponownie opisał ten mikroorganizm zaliczany pierwotnie do rodzaju *Candida*. Nazwa gatunkowa "*lipolytica*" opisuje zdolność komórek do lipolizy czyli hydrolizy cząsteczek tłuszczów [Nicaud, 2012]. Kompletna sekwencja genomu drożdży *Y. lipolytica* dla szczepu E150 (CLIB99) została opublikowana po raz pierwszy w 2004 roku przez zespół naukowców skupionych w konsorcjum Génolevures. Genom dzikich szczepów *Y. lipolytica* ma rozmiar od 12,7 Mbp do 22,1 Mbp. Koduje ponad 6400 genów i jest zorganizowany w 4 do 6 chromosomach [Dujon i in., 2004].

Drożdże *Y. lipolytica* zaliczane są do gatunków dimorficznych, a ich komórki mogą

przybierać formę od typowych komórek o sferycznym kształcie, przez pseudogrzybnię (*pseudohyphae*), aż po septowaną grzybnię (*hyphae*). To drobnoustroje tlenowe o optymalnej temperaturze wzrostu 28 °C, zaliczane do gatunków heterotallicznych. Tworzą zarodniki o różnym typie koniugacyjnym, determinowanym przez dwa allele *MATA* i *MATB*. Wśród szczepów izolowanych naturalnie ze środowiska spotyka się najczęściej komórki haploidalne [Barth i Gaillardin 1997; Groenewald i in., 2014].

Zainteresowanie przemysłowe gatunkiem *Y. lipolytica* rośnie nieustająco. Obecnie znana jest jego wysoka aktywność sekrecyjna, a do najistotniejszych metabolitów tego gatunku należą: kwas cytrynowy i izocytrynowy [Rywińska i Rymowicz, 2010], 2-fenyletanol [Celińska i in. 2013], kwas  $\alpha$ -ketoglutarynowy, pirogronowy,  $\gamma$ -laktony, erytrytol oraz enzymy: proteazy, RNazy, fosfatazy, esterazy i lipazy. Co ważne, drożdże z rodzaju *Yarrowia* posiadają zdolność do wykorzystywania szerokiej gamy substratów jako źródła węgla, w tym hydrofobowych cząsteczek węglowodorów, kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli oraz cząsteczek niektórych cukrów prostych, alkoholi, polioli i kwasów organicznych. Cecha ta może być wykorzystana w bioremediacji środowiska oraz zagospodarowaniu zróżnicowanych odpadów [Groenewald i in., 2014]. Gatunek ten stanowi również atrakcyjny przedmiot badań nad ekspresją heterologiczną białek ze względu na wysoką wydajność ich sekrecji [Madzak, 2021] oraz może być wykorzystywany jako źródło białka (SCP, ang. *single cell protein*) i tłuszczów (SCO, ang. *single cell oil*) [Groenewald i in., 2014].

Wszystkie mikroorganizmy są zdolne do syntezy tłuszczów, ale tylko część z nich potrafi kumulować cząsteczki lipidów w ilości powyżej 20% suchej masy. Wśród mikroorganizmów olejogennych znajduje się wiele gatunków bakterii, drożdży, grzybów strzępkowych oraz alg. Za główne źródło tłuszczów pochodzenia mikrobiologicznego uznawana jest biomasa pleśni *Mortierella alpina* i *Mucor circinelloides* oraz alg z rodzajów *Chlorella* i *Schizochytrium*. Do drożdży olejogennych zaliczane są m.in. takie gatunki jak *Rhodotorula gracilis*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* oraz *Yarrowia lipolytica* uznana za gatunek modelowy [Papanikolaou i Aggelis, 2011a].

Biosynteza tłuszczu mikrobiologicznego może przebiegać na drodze jednego z dwóch szlaków biochemicznych. Synteza oleju "de novo" (synteza prekursorów kwasów tłuszczowych i ich włączenie w szlak syntezy tłuszczów zapasowych) zachodzi w podłożach zawierających nielipidowe źródła węgla (m.in. cukry, glicerol). Kwasy tłuszczowe syntetyzowane są z prekursorów acetylo-CoA oraz malonylo-CoA, przy udziale ATP i NADPH z jednoczesną produkcją kwasu cytrynowego w warunkach zahamowania cyklu Krebsa. Synteza *ex novo* odbywa się w warunkach obecności substratów o charakterze lipidowym. Polega na pobieraniu

kwasów tłuszczowych ze środowiska, ich częściowym lub całkowitym metabolizmie na drodze  $\beta$ -oksydacji i kumulacji w ciałkach lipidowych (ang. *lipid bodies*) w postaci triacylogliceroli oraz estrów steroli. Warto podkreślić, że produkcja SCO drogą *de novo* jest lepiej poznana oraz uznawana za wydajniejszą w stosunku do syntezy *ex novo* [Papanikolaou i Aggelis, 2011a].

W ostatnich latach świadomość ekologiczna krajów rozwiniętych znacząco wzrasta, a alternatywne źródła energii oraz nowe źródła żywności są intensywnie eksplorowane. Cenne właściwości olejów mikrobiologicznych wynikają m.in. z obecności wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Możliwe wydaje się również przemysłowe zastosowanie tych produktów jako alternatywy dla paliwa typu biodiesel produkowanego z surowców roślinnych. Choć obecnie tłuszcze pochodzenia mikrobiologicznego nie są szeroko wykorzystywane komercyjnie, to w nieodległej przyszłości łatwość zwiększania skali produkcji, a także krótki cykl życiowy mikroorganizmów produkujących tłuszcz wewnątrzkomórkowy oraz niezależność ich wzrostu od warunków klimatu i pór roku może zadecydować o jego powszechnym wykorzystaniu. Ekonomicznie bardziej uzasadnione wydaje się też dzisiaj wykorzystywanie całej biomasy komórkowej zamiast wyekstrahowanego oleju. Ponadto skład oleju wytwarzanego metodami mikrobiologicznymi można różnorodnie modyfikować metodami inżynierii metabolicznej lub na drodze odpowiedniego doboru gatunku i warunków jego hodowli, w tym interesującym trendem badawczym jest wzbogacanie oleju mikrobiologicznego w określone kwasy tłuszczowe (Bankar i in., 2009; Wierzchowska i in., 2022).

Istotnym czynnikiem, który może obniżyć wysokie koszty hodowli mikroorganizmów jest stosowanie surowców odpadowych jako składników podłoża hodowlanego. Takie podejście wpisuje się w cele zrównoważonego rozwoju oraz nadaje odpadom przemysłowym wartość dodaną (ang. *upcycling*). Zastosowano je również w Osiągnięciu będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego. Odpady, które aplikowano w podłożach do hodowli drożdży olejogennych z gatunku *Y. lipolytica*, pochodziły z zakładu produkcyjnego przetwórstwa ryb.

Popularność ryb i owoców morza rośnie ze względu na niezaprzeczalne korzyści dla zdrowia ludzkiego wynikające z ich spożywania. W związku z tym przewiduje się, że ilość odpadów rybnych będzie stale rosła, stanowiąc wyzwanie dla obszaru gospodarowania odpadami. W 2015 roku całkowita globalna produkcja ryb i produktów rybnych wynosiła 169,2 miliony ton, z czego 6,4 mln należało do krajów Unii Europejskiej. W 2018 roku ta produkcja wzrosła do 178 mln ton (Pauly i Zeller, 2017; Raport FAO 2020). Warto wiedzieć, że 25% masy poławianych zasobów rybnych stanowią odpady. Obecnie podlegają one częściowemu

zagospodarowaniu w formie paszy dla zwierząt lub do produkcji nawozów (Rebah i Miled, 2013). Na etapie badań laboratoryjnych i koncepcyjnych znajdują się rozwiązania opierające się na bioremediacji i biotechnologii (Wierzchowska i in., 2022).

#### 4.3.2. Cel naukowy osiągnięcia

Głównym celem naukowym Osiągnięcia będącego podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego była ocena możliwości produkcji oleju mikrobiologicznego w hodowli dzikich drożdży z gatunku *Y. lipolytica* w podłożach zawierających surowce odpadowe przemysłu rybnego oraz analiza przebiegu szlaków metabolicznych prowadzących do syntezy tłuszczów zapasowych w podłożach zawierających lipidowe źródło węgla.

Uważa się, że w podłożach z lipidowymi źródłami węgla zachodzi wyłącznie synteza oleju mikrobiologicznego drogą *ex novo*, a dokładny przebieg tego szlaku nie jest do końca poznany. Bazując na wynikach wstępnych badań własnych postawiono hipotezę badawczą, iż w podłożach zawierających lipidowe źródła węgla synteza tłuszczów mogłaby zachodzić w równoległe przebiegających dwóch szlakach metabolicznych *de novo* i *ex novo*. Postawiono także dodatkową hipotezę, że możliwe jest nowatorskie rozwiązanie spełniające zasady ekonomii o obiegu zamkniętym, polegające na utylizacji surowców odpadowych przemysłu rybnego z jednoczesną syntezą metabolitów (głównie tłuszczów) na drodze biotechnologicznej, które mogą być wykorzystane jako cenny składnik dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego.

Zakres prac badawczych mających na celu weryfikację postawionych hipotez obejmował następujące etapy:

- przygotowanie metodologii oceny zawartości tłuszczu w komórkach drożdży (praca **P1**);
- ocenę możliwości syntezy enzymów lipolitycznych oraz tłuszczów zapasowych przez drożdże *Y. lipolytica* w podłożach zawierających odpadowy olej po procesie wędzenia ryb jako źródło węgla (praca **P2** i **P4**);
- ocenę możliwości syntezy oleju mikrobiologicznego przez drożdże *Y. lipolytica* w podłożach zawierających olej rzepakowy po smażeniu filetów rybnych (praca **P6**);
- próbę zastosowania solanki odpadowej pochodzącej z zakładu przetwórstwa ryb jako składnika podłoża hodowlanego przeznaczonego do hodowli drożdży olejogennych *Y. lipolytica* (praca **P6**);
- analizę przebiegu szlaków biosyntezy lipidów zapasowych w komórkach drożdży *Y. lipolytica* w podłożach modelowych zawierających wyłącznie lipidowe źródło węgla

(oliwę z oliwek) oraz w podłożu kontrolnym zawierającym cukier prosty (glukozę) (praca **P3 i P5**).

*Badania, których wyniki przedstawiono w Osiągnięciu zostały częściowo sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu badawczego MINIATURA 3 2019/03/X/NZ9/00096 “Analiza przebiegu szlaków biosyntezy tłuszczów w komórkach drożdży modelowych *Yarrowia lipolytica* w podłożach zawierających lipidowe źródło węgla” (realizacja 2019-2020).*

### **4.3.3. Materiały i metody**

#### **4.3.3.1. Materiał badawczy**

We wszystkich pracach składających się na Osiągnięcie naukowe wykorzystano szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379, pochodzący z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie. Szczep przechowywano na skosach z podłożem agarowym YPG w temperaturze 4 °C oraz w 20% roztworze glicerolu w temperaturze -20 °C.

W doświadczeniach stosowano odpady pochodzące z Zakładu Produkcyjnego Rekin Sp. J. znajdującego się w Grajewie w województwie podlaskim:

- odpadowy olej po procesie wędzenia ryb, pochodzący z wędzenia ryb należących głównie do rodziny łososiowatych (*Salmonidae*) i makrelowatych (*Scombridae*),
- odpadowy olej rzepakowy po smażeniu filetów rybnych przeznaczonych na dania gotowe,
- odpadową solankę.

#### **4.3.3.2. Podłoża i techniki hodowli drożdży**

Hodowle wytrząsane prowadzono na wytrząsarce posuwisto – zwrotnej IKA KS 4000 ic control w temperaturze 28°C w objętości roboczej 100 cm<sup>3</sup> przy 140 rpm (IKA-Werke, Niemcy). Pozostałe hodowle drożdży prowadzono w bioreaktorze laboratoryjnym BIOFLO 3000 (New Brunswick Scientific Edison, USA) o objętości roboczej 4 dm<sup>3</sup> w temperaturze 28°C, w którym mieszanie następowało za pomocą mieszadła typu turbina Rushtona przy modyfikowanej, w zależności od potrzeb, szybkości mieszania. Przeprowadzono hodowle bez i z regulacją natlenienia, okresowe (bez wymiany podłoża hodowlanego i uzupełnienia składników odżywczych) oraz okresowe z zasilaniem, tzn. z okresowym dozowaniem sterylnego źródła węgla do fermentora. Hodowle były natleniane sprężonym powietrzem przy stałych obrotach lub wykorzystując regulację kaskadową w zakresie od 200 do 600 rpm

w zależności od wariantu doświadczenia. Do zaszczepienia podłoży eksperymentalnych wykorzystano 24-godzinną hodowlę inokulacyjną drożdży w podłożu YPG (glukoza 20 g/dm<sup>3</sup>, pepton 20 g/dm<sup>3</sup> i ekstrakt drożdżowy 10 g/dm<sup>3</sup>, pH = 5,0 ± 0,1) w ilości od 0,0075% do 0,0375% v/v. Do regulacji pH stosowano 25% wodny roztwór amoniaku.

W pracy wykorzystano dwa rodzaje podłoży eksperymentalnych: mineralne z limitowaną zawartością źródła azotu (M) oraz bogate (YP) (tabela 1). Podłoża mineralne zostały opracowane na podstawie pracy Biały i in. (2011) i zawierały w swoim składzie m.in. źródło azotu w postaci siarczanu (VI) amonu oraz źródło węgla: glukozę (modelowe źródło węgla będące cukrem prostym), oliwę z oliwek (modelowe lipidowe źródło węgla), rzepakowy olej posmażalniczy lub odpadowy olej rybny po procesie wędzenia. Podłoża YP zawierały w swoim składzie: pepton i ekstrakt drożdżowy oraz źródło węgla (tabela 1).

Tabela 1. Skład podłoży hodowlanych

Symbol podłoża	Źródło węgla [g/dm <sup>3</sup> ]	Źródło azotu (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [g/dm <sup>3</sup> ]	Pozostałe składniki [g/dm <sup>3</sup> ]
<b>Podłoża mineralne z limitowaną zawartością źródła azotu (M)</b>			
MO3	Oliwa z oliwek, 30,0	2,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 7,0; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,5; FeSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 0,16; CaCl <sub>2</sub> , 0,15; MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O, 0,08; ZnSO <sub>4</sub> , 0,02; ekstrakt drożdżowy*, 2,0; pepton*, 1,0; Tween 80**, 1,0
MO5	Oliwa z oliwek, 50,0	2,5	
MO5-2xN		5,0	
MG7	Glukoza, 70,0	2,5	
MG8	Glukoza, 80,0	2,5	
MF5	Odpadowy olej po wędzeniu ryb, 50,0	2,5	
pfWO-N-0.25	Odpadowy olej posmażalniczy, 50,0	2,5	
pfWO-N-0.50		5,0	
<b>Podłoża bogate (YP)</b>			
Symbol podłoża	Źródło węgla [g/dm <sup>3</sup> ]	Pozostałe składniki [g/dm <sup>3</sup> ]	
YPG	Glukoza, 20,0	ekstrakt drożdżowy, 10,0; pepton, 20,0	
YPO	Oliwa z oliwek, 30,0		
YPF, YPR	Odpadowy olej po wędzeniu ryb, 20,0		
YPOR	Oliwa z oliwek, 10,0; Odpadowy olej po wędzeniu ryb, 10,0		
YPpfWO	Olej posmażalniczy, 20,0		

\*oprócz podłoży z odpadowym olejem posmażalniczym

\*\*tylko dla podłoży z oliwą z oliwek

#### 4.3.3.3. Metody preparatywne i analityczne

pH podłoża w czasie hodowli w bioreaktorze laboratoryjnym oznaczano metodą potencjometryczną za pomocą elektrody. Względną zawartość rozpuszczonego tlenu w podłożu hodowlanym oznaczano elektrodą tlenową, przyjmując za 100% maksymalne natlenienie danego podłoża w momencie rozpoczęcia hodowli. Suchą masę drożdży oznaczano metodą termogravimetryczną. Fazy wzrostu drożdży oceniano na podstawie stopnia zużycia tlenu rozpuszczonego i uzyskanego plonu biomasy. Parametry kinetyczne hodowli obliczano na podstawie definicji i wzorów podanych przez Papanikolaou i Aggelis (2011b).

Do oznaczenia aktywności lipolitycznej w płynie pohodowlanym została wykorzystana zmodyfikowana metoda opracowana przez Krzyczkowską i in. (2009). Metoda polegała na spektrofotometrycznym pomiarze postępu hydrolizy laurynianu *p*-nitrofenylu - estru kwasu tłuszczowego przy długości fali 410 nm. Jednostkę aktywności enzymów definiowano jako ilość katalizatora, która uwalnia 1  $\mu$ mol *p*-nitrofenolu w czasie 1 minuty w temperaturze 37°C w warunkach oznaczenia. Stężenie glukozy w płynie pohodowlanym oznaczano metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) przy długości fali 540 nm. DNS ulegał redukcji w środowisku alkalicznym w obecności cukrów redukujących. Stężenie kwasu cytrynowego oznaczano w płynie po hodowli drożdży za pomocą testu enzymatycznego firmy Boehringer (Niemcy).

Ekstrakcję tłuszczów z komórek drożdży wykonywano metodą ługowania *n*-heksanem w aparacie Soxhleta zgodnie z metodyką opisaną przez Fabiszewską i in. (2017; **P1**). Tłuszcz zawarty w podłożu hodowlanym wydzielano metodą dwukrotnej ekstrakcji prostej *n*-heksanem. Skład kwasów tłuszczowych w oleju mikrobiologicznym i olejach odpadowych oznaczono metodą chromatografii gazowej z zastosowaniem detektora płomieniowo-jonizacyjnego w większości publikacji (poza **P1**) z użyciem aparatu Agilent Technologies 68790 N GC (Santa Clara, CA, USA). Kwasy tłuszczowe po hydrolizie poddano derywatażacji przy użyciu 1 M metanolanu sodu i 10% (lub 14%) BF<sub>3</sub>. Heptadekanian metylu stosowano jako standard wewnętrzny. Jako gaz nośny używano hel.

Olej mikrobiologiczny poddawano analizom za pomocą ciśnieniowej różnicowej kalorymetrii skaningowej (pDSC) w aparacie Q20P (TA Instruments, USA). Zawartość związków fenolowych ogółem w olejach mikrobiologicznych wyekstrahowanych według metodyki opisanej przez Krzyczkowską i Kozłowską (2017) oznaczono zmodyfikowaną metodą opisaną przez Singleton i Rossi (1965) przy użyciu odczynnika Folina–Ciocalteu'a.

Komórki drożdży do izolacji RNA zamrażano w temperaturze -80°C do czasu izolacji RNA w odczynniku RNAlater (Thermo Fisher, USA). Ekstrakcję RNA prowadzono według

metodyki opisanej przez Chomczyńskiego i Sacchi (1987). Komórki drożdży z hodowli w podłożach z glukozą lizowano w Trizolu (Thermo Fisher, USA), zaś komórki pochodzące z hodowli z oliwą z oliwek lizowano z udziałem QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Niemcy). Do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) użyto odczynnika Maxima First Strand cDNA Reakcję PCR w czasie rzeczywistym – (real time - qPCR) wykonywano przy użyciu TaqMan master Mix, a reakcje prowadzono w aparacie Prism 7500 (Applied Biosystems, USA). Do oceny zmian w ekspresji mRNA dla badanych genów użyta została metoda  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , wymagająca użycia genu referencyjnego dla badanego organizmu. Przeanalizowano cztery geny: podjednostki 18S rRNA,  $\beta$ -aktyny,  $\beta$ -tubuliny oraz czynnika elongacyjnego 1 alpha, Jako kontrolę wewnętrzną dla znormalizowania poziomu ekspresji badanych genów stosowano gen konstytutywny małej podjednostki rybosomu eukariotycznego – 18s rRNA ze względu na fakt, że badany gen odznaczał się najwcześniejszą aktywnością i najbardziej porównywalną wartością CT we wszystkich próbkach (**P5**). Sekwencje nukleotydowe starterów i sond z sekwencją badanych genów sprawdzano za pomocą narzędzia BLAST na platformie NCBI. Wyniki wyrażano jako względną ekspresję genu badanego w stosunku do genu konstytutywnego według metodyki Livak i Schmittgen (2001).

#### 4.3.3.4. Metody statystyczne

Średnią arytmetyczną wraz z odchyleniem standardowym przyjęto za miarę tendencji centralnej. Analizy statystyczne wyników wykonano przy pomocy oprogramowania STATISTICA 13.0 oraz 13.1 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Normalność rozkładu sprawdzano za pomocą testu Shapiro-Wilka, zaś jednorodność wariancji testem Levene'a i/lub Browna-Forsythe'a. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji oraz test post-hoc Tukey'a w celu wyodrębnienia grup jednorodnych. W przypadku analiz genetycznych w celu porównania grup zmiennych wykorzystano nieparametryczny test U Manna – Whitney'a. Zaufanie do uzyskanych wyników wynosiło 95%. Ponadto w publikacji **P1** przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem metod statystycznego planowania doświadczeń (DoE – ang. *design of experiment*) - planu kwadratów łacińskich 4 x 4 oraz 2 x 2.



#### 4.3.4. Omówienie wyników badań

##### 4.3.4.1. Zastosowanie odpadowego oleju po procesie wędzenia ryb w hodowli drożdży olejogennych z gatunku *Yarrowia lipolytica*

**P1** - Agata Fabiszewska, Agnieszka Pielnińska, Patrycja Mazurczak, Bartłomiej Zieniuk, Małgorzata Wołoszynowska (2017): Wpływ wybranych czynników na wydajność ekstrakcji i skład kwasów tłuszczowych otrzymanego oleju mikrobiologicznego w komórkach drożdży *Yarrowia lipolytica*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 24 (1) (110), 59 – 69.

**P2** – Agata Fabiszewska, Bartłomiej Zieniuk, Patrycja Mazurczak-Zieniuk, Małgorzata Wołoszynowska, Dorota Nowak (2019): Waste fish oil as an alternative carbon source in microbial oil production by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 599, 3-13.

**P4** – Agata Fabiszewska, Bartłomiej Zieniuk, Mariola Kozłowska, Patrycja Mazurczak-Zieniuk, Małgorzata Wołoszynowska, Paulina Misiukiewicz-Stępień, Dorota Nowak (2021): Studies on upgradation of waste fish oil to lipid-rich yeast biomass in *Yarrowia lipolytica* batch cultures, *Foods* 10(2), 1-16.

Zdolność do biosyntezy triacylogliceroli przez drożdże z gatunku *Y. lipolytica*, ich niepatogenność oraz doświadczenie w prowadzeniu prac badawczych z udziałem tych mikroorganizmów w Katedrze Chemii SGGW w Warszawie były decydującymi czynnikami, dla których drożdże te zostały wybrane jako obiekt badań nad zagospodarowaniem surowców odpadowych przemysłu rybnego, z jednoczesną produkcją oleju mikrobiologicznego. Ze względu na fakt, że istotnym zagadnieniem produkcji tłuszczów zapasowych w komórkach organizmów olejogennych jest dobór metod i warunków ich ekstrakcji, w pierwszych działaniach oceniono wpływ wybranych czynników na wydajność ekstrakcji tłuszczów wewnątrzkomórkowych syntezowanych w komórkach drożdży *Y. lipolytica* metodą Soxhleta (publikacja **P1**).

Istnieje szereg metod mających na celu przełamanie bariery ściany i błony komórkowej i uwolnienie składników lipidowych komórek jak metody ekstrakcji za pomocą mieszaniny chloroformu i metanolu – najbardziej znane to metody Bligha i Dyera oraz Folcha (Zainuddin i in., 2021). Standardową metodą AOAC (ang. *Association of Official Agricultural Chemists*) ekstrakcji ciągłej z próbek stałych jest ługowanie w aparacie Soxhleta (Carrasco-Panccorbo i in., 2009). Tę metodę wybrano jako technikę oznaczania zawartości lipidów wewnątrzkomórkowych w doświadczeniach opisanych w Osiągnięciu. Dobrano warunki ekstrakcji takie jak: rodzaj stosowanego rozpuszczalnika, sposób przygotowania biomasy drożdży olejogennych oraz liczba przelewów zastosowana w aparacie. Czynnikiem zakłócającym obserwację różnic w wartościach wyodrębnionego z biomasy tłuszczu, mimo

zróźnicowania poziomów czynników badanych, była niska zawartość tłuszczu w namnożonej biomacie. Zastosowanie metody kwadratów łacińskich pozwoliło na “odmaskowanie” efektu wpływu sposobu przygotowania biomasy na wydajność ekstrakcji lipidów. Rodzaj użytego rozpuszczalnika (heksanu i eteru naftowego) i czas ekstrakcji liczony liczbą przelewów (w zakresie od 6 do 18) nie miały istotnego wpływu na wydajność procesu. Z kolei taki wpływ wykazano dla sposobu przygotowania biomasy drożdży do ekstrakcji. Najwydajniejszą metodą dezintegracji komórki okazała się ta z zastosowaniem preparatu litycznego Y-PER (Thermo Fisher Scientific, USA). Z uwagi na wysoki koszt metody w dalszych eksperymentach ostatecznie zdecydowano się na stosowanie tradycyjnej maceracji suchej biomasy z piaskiem, która dawała satysfakcjonujące wyniki ekstrakcji tłuszczów wewnątrzkomórkowych.

W publikacji **P2** opisano próbę wykorzystania odpadowego oleju po procesie wędzenia ryb w podłożach stymulujących kumulację lipidów zapasowych w komórkach drożdży z gatunku *Y. lipolytica*. Odpady o charakterze hydrofobowym jak glicerol odpadowy, tłuszcze posmażalnicze czy odpady ropopochodne są jednymi z najbardziej uciążliwych w utylizacji ścieków, które obciążają oczyszczalnię. Tworzą one trudno przepuszczalne warstwy, cechują je wysokie wskaźniki BZT (biochemiczne zapotrzebowanie na tlen), a ponadto mogą być źródłem patogennej mikroflory (Yahyaee i in., 2013). Z drugiej strony stanowią źródło białka, azotu, mikro- i makroelementów, a więc istnieje potencjał wykorzystania ich w hodowli mikroorganizmów.

W pierwszym etapie doświadczenia przeprowadzono hodowlę wytrząsane drożdży w podłożach syntetycznych YP zawierających modelowe źródło węgla – glukozę (YPG) lub oliwę z oliwek (YPO) oraz odpadowy olej po procesie wędzenia ryb (YPF). Wysoka aktywność lipaz zewnątrzkomórkowych obecnych w płynie pohodowlanym w wariacie doświadczenia z podłożem YPF (ponad 3-krotnie wyższa od tej oznaczonej dla podłoża YPG oraz zaledwie 2-krotnie niższa niż dla podłoża YPO) potwierdziła zdolność badanego szczepu do hydrolizy triacylogliceroli zawartych w surowcu odpadowym. Ponadto uzyskano porównywalny plon biomasy hodowanej w podłożach zawierających lipidowe źródła węgla - YPO i YPF.

W drugim etapie eksperymentu przeprowadzono pięć hodowli okresowych drożdży *Y. lipolytica* w bioreaktorze laboratoryjnym w dwóch podłożach kontrolnych, różniących się charakterem obecnego źródła węgla - YPG (z glukozą) oraz YPO (z oliwą z oliwek) oraz w trzech eksperymentalnych podłożach mineralnych, w których ograniczono zawartość źródła azotu w postaci siarczanu (VI) amonu - MO3 i MO5 (z oliwą z oliwek) oraz MF5 (z odpadowym olejem po procesie wędzenia ryb). Obserwowano istotnie dłuższy czas trwania fazy adaptacyjnej dla komórek hodowanych w podłożu MF5 w porównaniu z podłożem

zawierającym oliwę z oliwek (MO3 i MO5). Przyczynę tego zjawiska upatrywano w składzie kwasów tłuszczowych triacylogliceroli wchodzących w skład substratów. Oliwa z oliwek zawierała około 80% kwasu oleinowego, który aktywuje promotor genu kodującego główną zewnątrzkomórkową lipazę Lip2p drożdży z gatunku *Y. lipolytica* (Fickers i in., 2011). Odpadowy olej pochodzący z zakładu przetwórstwa ryb wykazywał dużo większe zróżnicowanie pod kątem składu kwasów tłuszczowych i dodatkowo mógł zawierać substancje hamujące wzrost drożdży.

Najwyższą zawartość syntezowanych lipidów wewnątrzkomórkowych otrzymano w hodowli w podłożu MO5 (0,356 g/g s.m.). W podłożu z odpadowym źródłem węgla zawartość lipidów w komórce była prawie dwukrotnie niższa (0,187 g/g s.m.) i porównywalna z tą uzyskaną w podłożu z modelowym źródłem węgla (oliwą z oliwek) w dawce 30g/dm<sup>3</sup> (MO3). Stwierdzono, że wybrany gatunek drożdży był zdolny do biosyntezy lipidów w podłożu z limitowanym stężeniem źródła azotu i z odpadowym olejem po procesie wędzenia ryb jako źródłem węgla.

Publikacje **P1** i **P2** prezentują wstępne doświadczenia, a ich rezultaty wykorzystano do właściwych prac przedstawionych m. in. w publikacji **P4**.

W pracy **P4** opisano wyniki badań mających na celu modyfikację parametrów hodowli, która pozwoliłaby na uzyskanie biomasy zasobnej w olej mikrobiologiczny w ilości powyżej 20% suchej masy. Przeprowadzono hodowlę drożdży *Y. lipolytica* w podłożu zawierającym odpadowy olej po procesie wędzenia ryb (MF5). Wyekstrahowany olej mikrobiologiczny zawierał wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT) z szeregu omega-3, w tym kwas eikozapentaenowy (EPA) oraz dokozaheksaenowy (DHA) w ilości odpowiednio 7,26% oraz 9,97% w sumie kwasów tłuszczowych obecnych w oleju. Dla porównania w surowcu odpadowym znajdowało się odpowiednio 8,0% i 10,60% tych kwasów. Uzyskane wyniki wskazują, że komórki drożdży pobierały WNKT z surowca odpadowego i kumulowały w postaci tłuszczów zapasowych.

Analizując skład oleju mikrobiologicznego pochodzącego z hodowli drożdży w podłożu zawierającym odpadowe źródło węgla oraz w podłożu zawierającym modelowe źródła węgla w postaci glukozy i oliwy z oliwek, nieoczekiwanie zaobserwowano, że w lipidach wewnątrzkomórkowych pozyskanych z podłoża MF5 i MO5 znajdowały się kwasy tłuszczowe zawierające więcej niż 20 atomów węgla (kwas behenowy, erukowy i lignocerynowy). Drożdże z gatunku *Y. lipolytica* opisywane są jako mikroorganizmy niezdolne do biosyntezy kwasów tłuszczowych o długości powyżej 18 atomów węgla ze względu na brak odpowiednich elongaz i desaturaz (Sahin i in., 2018). Obserwacje własne sugerują jednak, że pewne modyfikacje

kwasów tłuszczowych prowadzące do syntezy kwasów tłuszczowych o bardzo długim łańcuchu są możliwe, a hipotezę tę potwierdzają wyniki Gajdosa i in. (2020), którzy zidentyfikowali w komórkach tego gatunku kwas arachidonowy, eikozanowy, behenowy i lignocerynowy.

W pracy **P4** oceniono także wpływ natlenienia, regulacji pH oraz ilości inokulum na wydajność biosyntezy oleju mikrobiologicznego w podłożu z odpadowym olejem rybnym powstałym przez jego wytopienie z wędzonych tuszek ryb (tabela 2). Zmniejszenie objętości inokulum z 0,0075 %v/v do 0,0025% v/v skutkowało 4-krotnym wzrostem ilości tłuszczów zawartych w komórkach drożdży w podłożu kontrolnym MO5 oraz 6-krotnym w podłożu MF5. Zmiana strategii natleniania hodowli, polegająca na utrzymaniu w czasie trwania hodowli minimum 20% początkowego stężenia tlenu rozpuszczonego w podłożu za pomocą regulacji kaskadowej, spowodowała wzrost plonu biomasy (z 15,16 g s.m./dm<sup>3</sup> do 20,43 g s.m./dm<sup>3</sup>) oraz ponad dwukrotny wzrost zawartości lipidów wewnątrzkomórkowych z 0,094 g/g s.m. do 0,227 g/g s.m. (tabela 2). Takiego efektu nie obserwowano w wariantcie doświadczenia z regulacją pH, który charakteryzował się najniższą wydajnością plonu suchej biomasy i niskimi parametrami kumulacji tłuszczów. Najwyższą zawartością tłuszczów (0,340 g/g s.m.) charakteryzowały się komórki namnażane w hodowli prowadzonej w podłożu z modelowym lipidowym źródłem węgla (oliwą z oliwek).

Tabela 2. Parametry opisujące biosyntezę oleju mikrobiologicznego w hodowlach okresowych drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 w podłożach z glukozą (MG7), oliwą z oliwek (MO5) oraz odpadowym olejem rybnym (MF5). Zastosowano wariant eksperymentu z intensywnym natlenianiem hodowli (MF5-O<sub>2</sub>) oraz z regulacją pH (MF5-pH).

Symbol	Jednostka	Parametr	MG7	MO5	MF5	MF5-O <sub>2</sub>	MF5-pH
t	[h]	czas hodowli	40	38	70	94	119
t <sub>lag</sub>	[h]	czas trwania fazy adaptacyjnej	17	13	37	47	49
S	[g dm <sup>-3</sup> ]	początkowe stężenie substratu	70	50	50	50	50
X	[g dm <sup>-3</sup> ]	plon suchej biomasy drożdży	13,79	23,10	15,16	20,43	8,09
Y <sub>LX</sub>	[g g <sup>-1</sup> ]	wydajność kumulacji lipidów w odniesieniu do plonu suchej biomasy	0,080	0,340	0,094	0,227	0,234
L	[g dm <sup>-3</sup> ]	objętościowa produktywność	1,15	7,88	1,43	4,64	1,90

W hodowli w podłożach MO5 i MG7 obserwowano średnio nawet 3-krotnie krótszy czas trwania fazy adaptacyjnej w porównaniu do hodowli w podłożu MF5, co sugerowało, że choć

odpadowy olej po procesie wędzenia ryb był źródłem węgla wykorzystywanym przez badany gatunek drożdży, to jego przyswajalność była słabsza w porównaniu z oliwą z oliwek i glukozą.

Niezależnie od wariantu hodowli w każdej z badanych próbek oleju mikrobiologicznego oznaczano kwasy tłuszczowe o długości łańcucha węglowego powyżej 20 atomów oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Najprawdopodobniej wielonienasycone kwasy tłuszczowe jak EPA i DHA były wolniej przyswajane przez komórki i włączane w cząsteczki acylogliceroli w ciałkach tłuszczowych, o czym świadczy wzrost ich zawartości w sumie kwasów tłuszczowych w późnej fazie hodowli.

Oceniona została także stabilność oksydacyjna oraz zawartość polifenoli w olejach mikrobiologicznych pozyskanych z komórek drożdży namnażanych w podłożach MO5 i MF5. Tłuszcz wyekstrahowany z drożdży pochodzących z hodowli w podłożu z odpadowym olejem rybnym cechował się wyższą stabilnością oksydacyjną, niższą podatnością na utlenianie i powstawanie nadtlenków w porównaniu z tłuszczem ekstrahowanym z drożdży namnażanych w podłożu z oliwą z oliwek. Zbadano całkowitą zawartość związków polifenolowych w tych olejach, które odpowiednio wynosiły 1,22 i 0,035 mg ekwiwalentów kwasu galusowego/g. Prawdopodobnie wysoka zawartość polifenoli wpływała na mniejszą podatność na utlenianie oleju mikrobiologicznego uzyskanego w podłożu z odpadowym źródłem węgla.

Opracowane rozwiązanie pozwoliło na uzyskanie wydajności biosyntezy tłuszczów wewnątrzkomórkowych na poziomie nie wyższym niż dwadzieścia kilka procent i charakteryzował je długi czas trwania fazy adaptacyjnej. Wydajność syntezy tłuszczów można zwiększyć, poszukując szczepu zdolnego do kumulacji wyższych ilości lipidów (dzikiego lub modyfikowanego). Długi czas lag fazy mógł wynikać z obecności substancji hamujących wzrost komórek, które wymagają identyfikacji lub z nieodpowiedniego składu kwasów tłuszczowych w odpadzie przemysłowym.

Bioupcykling jest trendem przetwarzania materiałów pozornie już nieprzydatnych i nadawania im nowego życia na drodze biotechnologicznej. W cyklu publikacji **P1**, **P2** i **P4** przedstawiono warunki hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożach zawierających odpadowy olej po procesie wędzenia ryb oraz opisano kinetykę syntezy lipidów zapasowych produkowanych w tych warunkach środowiska. Innowacyjność podjętej tematyki badawczej odzwierciedla uzyskany patent chroniący rozwiązanie dotyczące zastosowania odpadowego oleju po procesie wędzenia ryb jako źródło węgla w podłożach do hodowli drożdży olejogennych w celu otrzymania oleju mikrobiologicznego o wysokiej zawartości kwasów EPA i DHA (patent III.3.9 w wykazie zał. 4).

Kwasy EPA i DHA należą do grupy kwasów tłuszczowych omega-3, wywierających

pozytywny wpływ m.in. na rozwój układu nerwowego i narządu wzroku. Źródłem tych składników w diecie człowieka są ryby i bezkręgowce morskie. Z uwagi na zanieczyszczenie wód morskich i słodkich metalami ciężkimi i węglowodorami poszukuje się nowych źródeł kwasów omega-3. Alternatywnym źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych może być olej mikrobiologiczny. Obecnie na rynku dostępne są preparaty przeznaczone do suplementacji tej grupy związków pochodzące z mikroalg (Patel i in., 2020). Opisany w patencie przykładowy sposób produkcji biomasy drożdży bogatej w olej mikrobiologiczny pozwolił na uzyskanie komórek drożdży w 67-godzinnej hodowli w podłożu mineralnym zawierającym odpadowy olej po procesie wędzenia ryb w ilości 50 g/dm<sup>3</sup>, dla których wydajność kumulacji oleju wyniosła 0,187 g/g s.m. Tak uzyskany olej mikrobiologiczny zawierał 7,3% kwasu EPA i 10,0% kwasu DHA.

#### **4.3.4.2. Zastosowanie posmażalniczego oleju rzepakowego oraz odpadowej solanki w hodowli drożdży olejogennych z gatunku *Yarrowia lipolytica***

**P6** – Agata Fabiszewska, Katarzyna Wierzchowska, Małgorzata Wołoszynowska, Dorota Nowak, Bartłomiej Zieniuk (2022): Brine and post-frying oil management in the fish processing industry – a concept based on oleaginous yeast culture. *Processes*, 10, 1-12, nr artykułu 294.

Brak skutecznych metod utylizacji odpadów przemysłowych może stanowić poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego oraz skutkować wzrostem kosztów produkcji dla zakładu. Odpady pochodzące z zakładów przetwórstwa ryb należą do najbardziej uciążliwych z uwagi na dużą zawartość wody, soli, białek, tłuszczów i dużą podatność na utlenianie (Rebah i Miled, 2013). Wśród nich znajdują się nie tylko resztki ryb, ale także m.in. posmażalnicze oleje roślinne, które pochodzą z procesów smażenia oraz solanki stosowane w procesie technologicznym produkcji przetworów rybnych. Te dwa ostatnie odpady stanowiły przedmiot badań opisanych w pracy **P6**. Celem tej części Osiągnięcia było opracowanie koncepcji hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożu z posmażalniczym olejem rzepakowym pochodzącym z zakładu przetwórstwa ryb jako źródłem węgla, w którym woda została zastąpiona solanką odpadową jako rozcieńczalnikiem dla składników podłoża.

W pracy zaobserwowano, że zastosowanie odpadowego oleju rzepakowego o składzie kwasów tłuszczowych zbliżonym do oliwy z oliwek (pfWO-N-0.25) powodowało krótki czas trwania fazy adaptacyjnej w porównaniu z doświadczeniem z innym lipidowym surowcem odpadowym, jakim był olej rybny po procesie wędzenia. Olej posmażalniczy okazał się łatwo przyswajalnym źródłem węgla dla drożdży z gatunku *Y. lipolytica*. Ponadto wykorzystanie

strategii intensywnego napowietrzania opisanej w pracy **P4**, a polegającej na utrzymaniu natlenienia podłoża hodowlanego na poziomie minimum 20% początkowego stężenia tlenu, wpłynęło pozytywnie na wydajność plonu biomasy ( $19,93 \text{ g/dm}^3$ ) oraz wydajność syntezy lipidów wewnątrzkomórkowych ( $0,43 \text{ g/g s.m.}$ ). W czasie 67-godzinnej hodowli okresowej substrat odpadowy został wykorzystany w 96%, zaś wartość pH poniżej 3,0 obserwowano już w drugiej dobie hodowli.

Z uwagi na fakt, że kwas cytrynowy jest metabolitem syntezowanym przez komórki drożdży olejogennych w warunkach limitacji źródła azotu, które sprzyjają biosyntezie tłuszczów drogą *de novo*, oznaczono jego zawartość w płynach po hodowlach w podłożach z odpadowym olejem posmażalniczym. Najwyższe jego stężenie zaobserwowano w fazie wzrostu logarytmicznego w intensywnie natlenianej hodowli w wariancie podłoża, w którym surowiec odpadowy hydrolizowano. W tej hodowli panowało stosunkowo wysokie pH w porównaniu do pozostałych wariantów, co prawdopodobnie sprzyjało biosyntezie tego metabolitu (Tomaszewska i in., 2014).

W kolejnym etapie badań do podłoża hodowlanego wprowadzono odpadową solankę. Określono graniczne stężenie solanki (20%), przy którym nie obserwowano istotnego jej wpływu na obniżenie plonu biomasy drożdży w hodowlach wytrząsanych na skutek zbyt wysokiego stężenia chlorku sodu. Z kolei całkowite zastąpienie wody destylowanej solanką w podłożu istotnie hamowało wzrost komórek drożdży do poziomu  $4,88 \log \text{ j.t.k./cm}^3$  (plon biomasy  $1,0 \text{ g/dm}^3$ ). W 64-godzinnej hodowli okresowej przeprowadzonej w bioreaktorze laboratoryjnym użyto 20% solanki i 80% wody destylowanej, uzyskując o około 25% niższy plon biomasy i dwukrotnie niższą zawartość tłuszczów w komórkach, choć wciąż nieznacznie przekraczającą  $0,2 \text{ g/g s.m.}$  Uzyskany olej mikrobiologiczny cechował się wysoką zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych (62,42% kwasu oleinowego, 13,22% kwasu linolowego i 4,23% kwasu linolenowego).

Wykorzystując wyniki pracy **P6** opracowano sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego z hodowli mikroorganizmów olejogennych z jednoczesną utylizacją solanki pochodzącej z zakładów rybnych, co było przedmiotem zgłoszenia patentowego z dnia 27 maja 2021 roku (Fabiszewska A., Zieniuk B., Ukleja M., Wierzchowska K., Nowak D. Sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego z hodowli mikroorganizmów olejogennych. Zgłoszenie patentowe. Kraj zgłoszenia: Polska, Numer zgłoszenia: P.437980 [WIPO ST 10/C PL437980]). W przykładzie opisanym w zgłoszeniu patentowym uzyskano biomasę komórek drożdży, która zawierała 34% tłuszczów w suchej masie. W podłożu 30% wody destylowanej zastąpiono solanką odpadową. Mój udział w tym wynalazku został ustalony na poziomie 55%.

#### 4.3.4.3. Badania nad szlakami metabolicznymi biosyntezy lipidów zapasowych w podłożach zawierających lipidowe źródło węgla

**P3** – Agata Fabiszewska, Paulina Misiukiewicz-Stępień, Magdalena Paplińska-Goryca, Bartłomiej Zieniuk, Ewa Białecka-Florjańczyk (2019): An insight into storage lipids synthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast relating to lipid and sugar substrates metabolism. *Biomolecules* 9(11), 1-13, nr artykułu 685.

**P5** – Agata Fabiszewska, Magdalena Paplińska-Goryca, Paulina Misiukiewicz-Stępień, Małgorzata Wołoszynowska, Dorota Nowak, Bartłomiej Zieniuk (2022): Expression profile of selected genes involved in storage lipids synthesis in a model oleaginous yeast species *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Molecular Sciences* 23(3), nr artykułu 1041.

Drożdże *Y. lipolytica* są modelowym gatunkiem grupy drożdży olejogennych, czyli mikroorganizmów zdolnych do kumulacji tłuszczów w ilości powyżej 20% suchej masy komórki. Ich biosynteza może przebiegać na drodze jednego z dwóch szlaków biochemicznych (Ageitos 2011, Groenewald 2014). Synteza oleju "de novo" (synteza prekursorów kwasów tłuszczowych i ich włączenie w szlak syntezy tłuszczów zapasowych) zachodzi w podłożach zawierających nielipidowe źródła węgla (m.in. cukry, glicerol) lub "ex novo" (pobieranie kwasów tłuszczowych ze środowiska, ich częściowy lub całkowity metabolizm na drodze  $\beta$ -oksydacji i kumulacja w ciałkach lipidowych) (Ratledge i Wynn, 2002, Papanikolaou i Aggelis, 2011a). Pierwszy etap metabolizmu lipidów polegający na hydrolizie cząsteczek triacylogliceroli przez lipazy, pobieraniu kwasów tłuszczowych do wnętrza komórki oraz ich degradacji w reakcjach  $\beta$ -oksydacji, został dobrze i szczegółowo opisany na poziomie molekularnym na przykładzie niekonwencjonalnych drożdży z gatunku *Y. lipolytica*. Dobrze opisane są najważniejsze produkty genów z rodziny *LIP* kodujące białka lipaz oraz *POX* kodujące oksydazy acylo-CoA. Tymczasem kolejne etapy biosyntezy tłuszczów zapasowych w podłożach z lipidowym źródłem węgla są znacznie słabiej poznane, a większość doniesień naukowych pochodzi z późnych lat 90-tych ubiegłego wieku oraz z początku XXI wieku. Biochemia biosyntezy tłuszczów w komórkach mikroorganizmów olejogennych była opisywana na podstawie obserwacji metabolizmu takich gatunków jak *Candida curvata*, *Cryptococcus curvatus*, *C. albidus*, *Cunninghamella echinulata*, *Mortierella isabellina*, *M. alpina*, *Mucor circinelloides*, *Lipomyces starkeyi* i *Rhodosporidium toruloides* (Tang i in., 2009, Papanikolaou i Aggelis, 2011a, b). Ogólnie uważa się, że kwasy tłuszczowe są inhibitorami kluczowego enzymu szlaku de novo - ATP-zależnej liazy cytrynianowej, a zatem w podłożach z lipidowymi źródłami węgla zachodzi wyłącznie synteza oleju mikrobiologicznego drogą ex novo (Ratledge i Wynn, 2002, Papanikolaou i Aggelis, 2011a).



Mając na uwadze dotychczasowy stan wiedzy oraz doświadczenie w zakresie wykorzystania surowców lipidowych w podłożach do hodowli drożdży z gatunku *Y. lipolytica*, oceniono wpływ modelowego źródła węgla (glukozy i oliwy z oliwek) w podłożu hodowlanym na wybór drogi syntezy tłuszczów zapasowych w komórkach (publikacja **P3**). W tym celu zbadano poziom ekspresji mRNA dwóch genów w trzech podłożach - kontrolnym bogatym podłożu YPG oraz dwóch podłożach mineralnych doświadczalnych z ograniczoną zawartością źródła azotu oraz wysoką zawartością źródła węgla w postaci glukozy (MG7) oraz oliwy z oliwek (MO5). Podłoże kontrolne zawierało niski stosunek molowy źródła węgla do azotu, który był nieodpowiedni dla syntezy tłuszczów drogą *de novo*. Skład podłoży hodowlanych bazował na dostępnej wiedzy o kumulacji tłuszczów zapasowych, która odbywa się w warunkach dużej dostępności źródła węgla w podłożu i limitacji innego czynnika determinującego wzrost komórki (Ochsenrether i in., 2016). W przypadku opisywanych doświadczeń własnych tym czynnikiem było stężenie źródła azotu w pożywce (stosunek molowy C:N dla podłoża MG7 60:1, MO5 85:1).

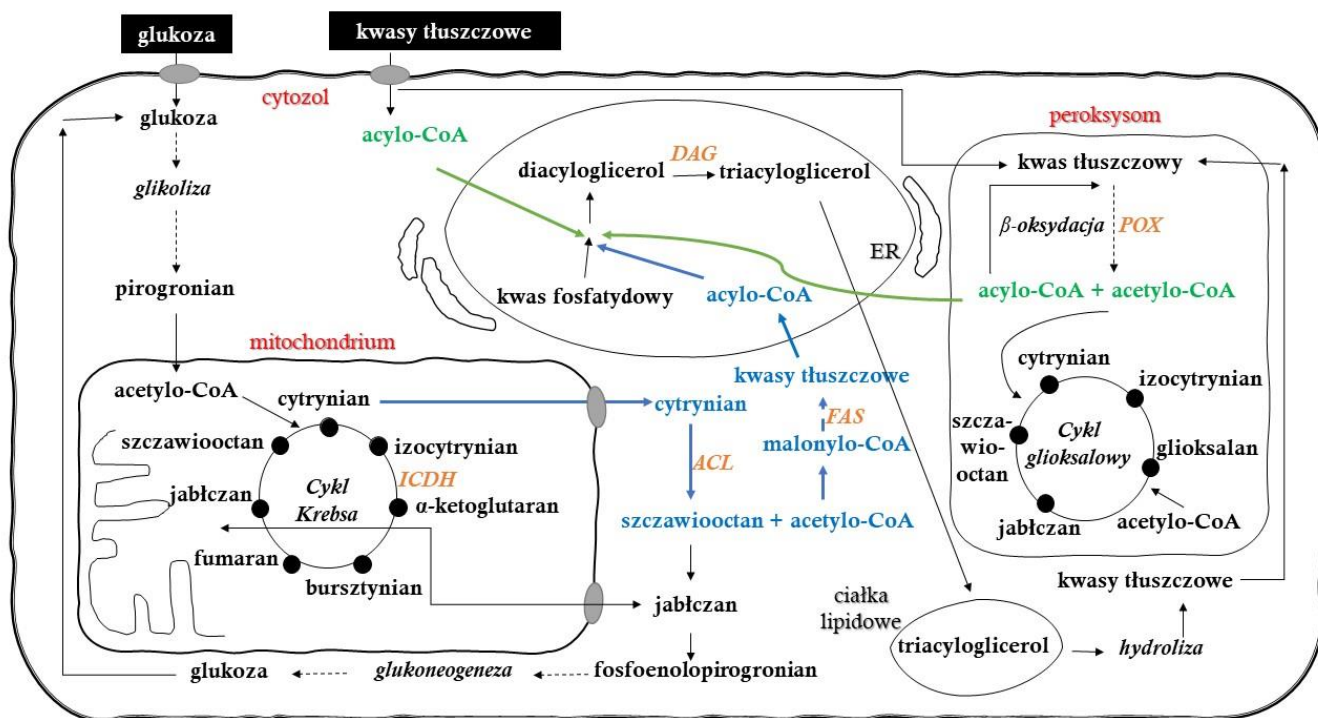
Pierwszym obiektem badań był gen *POX2* kodujący oksydazę acylo-CoA, która wykazuje specyficzną substratową wobec długołańcuchowych cząsteczek acylo-CoA, powstających poprzez biotransformację kwasów tłuszczowych pobranych do wnętrza komórki w procesie  $\beta$ -oksydacji, poprzedzającym syntezę lipidów wewnątrzkomórkowych drogą *ex novo*. Drugim był transkrypt genu *ACL* kodujący ATP-zależną liazę cytrynianową, kluczowy enzym w szlaku *de novo* biosyntezy tłuszczów zapasowych (Luo i in., 2002), który występuje wyłącznie u mikroorganizmów olejogennych (Ledesma-Amaro i Nicaud, 2016; Dulermo i in., 2015).

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na sformułowanie wniosku, że skład oleju mikrobiologicznego ekstrahowanego z komórek drożdży *Y. lipolytica* jest zależny w stopniu istotnym od zastosowanego rodzaju źródła węgla w podłożu hodowlanym. Rodzaj źródła węgla istotnie wpływał także na kinetykę kumulacji tłuszczów w komórkach drożdży oraz ekspresję badanych genów *POX2* i *ACL*. Niezależnie od źródła węgla zastosowanego w podłożu hodowlanym triacyloglicerole wyekstrahowane z biomasy drożdży zawierały w dominującej ilości kwas oleinowy (C18:1). Najwyższą zawartość kwasu oleinowego (92,72% sumy wszystkich kwasów tłuszczowych) zawierał olej mikrobiologiczny pochodzący z komórek namnażanych w podłożu mineralnym z oliwą z oliwek. Porównując hodowle w podłożu MG7 i MO5 oceniono, że synteza lipidów na drodze *ex novo* powinna być prowadzona w krótszym czasie w odniesieniu do drogi *de novo*.

W podłożu MO5 zawierającym lipidowe źródło węgla (oliwę z oliwek), zgodnie

z przewidywaniami, obserwowano wzrost ekspresji genu *POX2*, ale nieoczekiwanie nie zauważono hamowania transkrypcji genu *ACL*, które według wyników innych badaczy powinno nastąpić w tych warunkach eksperymentu. Tymczasem poziom ekspresji genu ATP-zależnej liazy cytrynianowej nie różnił się dla komórek drożdży pochodzących z hodowli z glukozą i z oliwą z oliwek. Biorąc pod uwagę wyniki badań opisanych w publikacji **P3** sformułowano hipotezę dotyczącą możliwości jednoczesnej biosyntezy lipidów zapasowych w komórkach drożdży *Y. lipolytica* szlakami *de novo* i *ex novo* w podłożach zawierających wyłącznie lipidowe źródło węgla.

W ramach weryfikacji hipotezy sformułowanej w publikacji **P3** przeprowadzone zostały hodowle okresowe dzikiego szczepu drożdży *Y. lipolytica* KKP379 w bioreaktorze laboratoryjnym w podłożach kontrolnych (bogatych w źródło węgla i azotu, YPG oraz YPO) oraz w podłożach doświadczalnych stymulujących syntezę lipidów zapasowych o limitowanej zawartości źródła azotu zawierające glukozę (MG8) lub oliwę z oliwek (MO5, MO5-2xN), jako źródło węgla. Wyniki tych doświadczeń opisano w publikacji **P5**. W trakcie hodowli okresowych oznaczano wiele parametrów takich jak plon biomasy drożdży, aktywność enzymów lipolitycznych syntezowanych przez komórki, zawartość i skład lipidów niewykorzystanych do wzrostu przez drożdże i pozostałych w podłożu hodowlanym oraz skład tłuszczów syntezowanych przez mikroorganizmy, które pozwoliły na szczegółowy opis kolejnych faz wzrostu drożdży w zróżnicowanych podłożach hodowlanych. Oceniono poziom ekspresji wybranych genów techniką ilościowego real time PCR (RT-qPCR) w kolejnych fazach wzrostu. Wśród transkryptów analizowano ekspresję mRNA dla następujących kluczowych enzymów szlaków biosyntezy tłuszczów wewnątrzkomórkowych (rys. 1): NAD-zależnej dehydrogenazy izocytrynianowej (ICDH, hamowanej w szlaku *de novo*), ATP-zależnej liazy cytrynianowej (*Acl*, o wysokiej aktywności w szlaku *de novo*), oksydazy II acylo-CoA (*Aox2*, o wysokiej aktywności w szlaku *ex novo* w obecności kwasów tłuszczowych), kompleksu syntazy kwasów tłuszczowych (FAS, o wysokiej aktywności w szlaku *de novo*), acylotransferazy diacyloglicerolu (DAG, aktywnej w obu szlakach).



Rys. 1. Szlaki biochemiczne biosyntezy tłuszczów zapasowych *de novo* (kolor niebieski) oraz *ex novo* (kolor zielony) i ich związek z cyklem Krebsa oraz cyklem glioksalowym w komórkach drożdży olejogennych. Linie przerywane reprezentują procesy składające się z więcej niż jednego etapu. Pomarańczowe skróty literowe odnoszą się do genów kodujących istotne enzymy w procesie biosyntezy lipidów, badanych w ramach omawianego Osiągnięcia: *ICDH* - NAD-zależnej dehydrogenazy izocytrynianowej, *ACL* - ATP-zależnej liazy cytrynianowej, *POX2* - oksydazy II acylo-CoA, *FAS* - kompleksu syntazy kwasów tłuszczowych, *DAG* - acylotransferazy diacyloglicerolu (opracowanie własne na podstawie publikacji P5).

Skład oleju mikrobiologicznego ekstrahowanego z komórek drożdży *Y. lipolytica* zależał ściśle od zastosowanego lipidowego źródła węgla, choć dominującym kwasem tłuszczowym niezależnie od warunków hodowli był kwas oleinowy (C18:1), co obserwowano w wielu innych wcześniej opisanych badaniach własnych. Obecne w podłożu triacyloglicerole były dość szybko hydrolizowane do wolnych kwasów tłuszczowych przez badany szczep drożdży i wykorzystywane do wzrostu, a w podłożu hodowlanym obserwowano wysoką aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych (aktywność w 24 h hodowli w podłożu MO5 wynosiła 1,12 U/cm<sup>3</sup> i w podłożu YPO 0,86 U/cm<sup>3</sup>). Charakterystyczną obserwacją dla wszystkich hodowli prowadzonych w podłożach z ograniczonym źródłem azotu było nagłe obniżenie wartości pH hodowli we wczesnej fazie wzrostu logarytmicznego, które w fazie stacjonarnej osiągało poziom od 1,91 dla podłoża MO5-2xN do 2,40 dla podłoża MO5).

Najistotniejsze rezultaty badań uzyskane w tych eksperymentach dotyczyły roli wybranych enzymów w szlakach biosyntezy tłuszczów zapasowych na podstawie oceny zmian w ekspresji mRNA dla badanych genów białek enzymatycznych. Transkrypcję genu *POX2* skorelowano z zewnątrzkomórkową aktywnością lipolityczną w podłożach z lipidowym źródłem węgla, co znajduje potwierdzenie także w pracach innych autorów (Fickers i in., 2011; Gue i in., 2012).

Poziom mRNA dla genu *ACL* okazał się nieoczekiwanie niski w porównaniu z wynikami uzyskanymi w publikacji **P3** i wbrew wynikom badań wstępnych gen nie okazał się dobrym markerem szlaku *de novo*. Z kolei zgodnie z przewidywaniami zdecydowany wzrost ekspresji genu *ACL* nastąpił w podłożu z glukozą z limitowaną zawartością źródła azotu MG8 prawdopodobnie na skutek wyczerpania się tego składnika, czego nie zauważono w podłożach z lipidowym źródłem węgla.

Najwięcej informacji o przebiegu procesów komórkowych uzyskano analizując hodowlę prowadzoną w podłożu MO5-2xN, który zawierał dwukrotnie wyższą dawkę nieorganicznego źródła azotu w stosunku do podłoża MO5, co potwierdziło zasadność wprowadzenia tego wariantu do całego układu doświadczalnego. W eksperymencie ciekawą obserwacją był wysoki poziom mRNA genu *ACL* w 3 i 4 dobie, a następnie jego nagły wzrost w 84 h hodowli, który nie mógł mieć już związku ze zmniejszeniem zawartości źródła azotu w podłożu hodowlanym w wyniku jego zużycia przez rosnące komórki drożdży.

Zaobserwowano, że poziom transkrypcji genów kodujących białka NAD-zależnej dehydrogenazy izocytrynianowej (*ICDH*) oraz ATP-zależnej liazy cytrynianowej *ACL* był istotnie najwyższy w podłożu MO5-2xN choć w przypadku genu *ICDH* poziom ten był porównywalny dla podłoża MG8. Warto przypomnieć, że wyczerpywanie się źródła azotu w środowisku hodowlanym, pociąga za sobą konsekwencję konieczności pozyskiwania azotu z AMP, co z kolei powoduje hamowanie cyklu Krebsa w komórce, w tym enzymu *ICDH* w szlaku *de novo*. Wzrasta stężenie cytrynianu i izocytrynianu w cytozolu i aktywacji ulega gen *ACL* (Papanikolaou i Aggelis, 2011a). Tymczasem pewien bazowy poziom mRNA ATP-zależnej liazy cytrynianowej (enzymu kluczowego w szlaku *de novo*) oznaczono w każdym z wariantów hodowlanych.

Aktywność genu syntazy kwasów tłuszczowych (*FAS*) była istotnie najwyższa dla komórek namnażanych w podłożach YPG oraz MG8, co potwierdza tezę, że syntaza była hamowana przez obecne w podłożu wolne kwasy tłuszczowe. W podłożu MO5 oraz YPO poziom transkrypcji genu *FAS* był niemal zerowy, ale już w podłożu MO5-2xN był istotnie wyższy, co z kolei daje dowód na możliwość częściowego hamowania ekspresji tego enzymu w podłożach z lipidowym źródłem węgla, choć powód tego zjawiska nie jest jasny.

Niezwykłe ciekawa okazała się dodatnia korelacja pomiędzy poziomem transkrypcji genu *DAG* a zawartością tłuszczów w komórce. W obserwowanych wariantach doświadczalnych, w których zastosowano glukozę jako źródło węgla w podłożu, wzrost mRNA dla tego genu w komórce następował wraz z okresem intensywnej biosyntezy tłuszczów zapasowych, a w podłożach z oliwą z oliwek nie zauważono podobnej prawidłowości. Uznano, że acylotransferaza diacyloglicerolu może być dobrym markerem procesu syntezy tłuszczów zapasowych.

Potwierdziły się wyniki badań wstępnych w kontekście genu *POX2*, którego najwyższą ekspresję obserwowano w podłożu MO5 i MO5-2xN, przy czym istotnie wyższy poziom mRNA wykazano w podłożu zawierającym dwukrotnie wyższy stosunek zawartości źródła węgla do azotu (MO5). Ponadto w pracy wykazano, że procesy syntezy i hydrolizy tłuszczów w komórkach drożdży olejogennych są ściśle związane z wysokim zapotrzebowaniem na tlen. Mitochondrialny enzym dehydrogenaza izocytrynianowa do swojej aktywności wymaga kofaktora w postaci NAD i katalizuje reakcję utleniania izocytrynianu do  $\alpha$ -ketoglutaranu. Enzym ten jest hamowany przez ATP i NADH. Kiedy poziom energii w komórce jest niski (niskie stężenie ATP i NADH), zwiększa się intensywność przemian w cyklu Krebsa (Borkowska i in., 2020). W podłożach MG8 i MO5-2xN zaobserwowano istotnie wyższy poziom mRNA genu *ICDH*. Niestety tej kwestii nie udało się w pełni wyjaśnić. Co ważne, z acetylo-CoA do cyklu Krebsa wprowadzane są dwa atomy węgla w reakcji katalizowanej m.in. przez dehydrogenazę izocytrynianową i  $\alpha$ -ketoglutaranową. Stąd, w podłożu MG8, wysoką aktywność genu kodującego enzym ICDH porównano z niskim poziomem obserwowanym w podłożu MO5, w którym do syntezy szczawiooctanu w cyklu glioksalowym wykorzystywany jest acetylo-CoA (rys. 1). Hipotetycznie transkrypcja genu *ICDH* może być hamowana przez bursztynian, co w przyszłości może być przedmiotem pogłębionych badań metabolicznych.

Warto podkreślić, że istniała istotna różnica pomiędzy stężeniem mRNA genu *ICDH* w komórkach drożdży namnażanych w podłożu MO5 i MO5-2xN. Przepuszczalnie, ze względu na dwukrotnie niższy stosunek molowy C/N i wyższą dawkę azotu zastosowaną w pożywce MO5-2xN, komórki charakteryzowały się większym zapotrzebowaniem na energię, a ponadto cykl Krebsa był hamowany w znacznie mniejszym stopniu niż w pożywce MO5. Wyjaśnienie tego może być związane z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, którzy postulowali, że dehydrogenaza izocytrynianowa wykazuje niewielką aktywność w warunkach kumulacji lipidów (Ratledge i Cohen, 2008; Papanikolaou i Aggelis, 2011a)

Podsumowując, wyniki opisane w publikacji **P5** należy podkreślić, że badane enzymy

szlaku *de novo* nie były całkowicie hamowane na etapie transkrypcji przez obecne w podłożu i pobierane do wnętrza komórki kwasy tłuszczowe. Ponadto należało stwierdzić, że zawartość lipidów wewnątrzkomórkowych syntezowanych w szlaku *ex novo* jest w pewnym stopniu zależna od limitacji źródła azotu. Mimo iż w podłożach z lipidowymi źródłami węgla synteza tłuszczów przebiegała głównie szlakiem *ex novo*, to aktywność genów kodujących enzymy szlaku *de novo* w tych podłożach może sugerować niewielki wpływ tego procesu na końcową wydajność produkcji oleju mikrobiologicznego w komórce. Badania opisane w Osiągnięciu wskazują, że należy mówić raczej o przewadze jednego szlaku biosyntezy tłuszczów zapasowych nad drugim, a nie o wyłącznej syntezie drogą *de novo* lub *ex novo* w zależności od warunków środowiska. Zaproponowano schemat łączący obydwie szlaki biochemiczne (rys. 1), w którym kluczowa jest propozycja udziału acetylo-CoA, pochodzącego z  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych w podłożach z lipidowym źródłem węgla, w reakcji katalizowanej przez syntazę kwasów tłuszczowych, uznawaną za enzym szlaku *de novo*. Są podstawy, aby sądzić, że komórki tych mikroorganizmów potrafią dość sprawnie przełączać szlaki biochemiczne i wykazywać istotną zdolność do szybkiej zmiany swojego metabolizmu w dynamicznie zmieniających się warunkach hodowli.

#### 4.3.5. Podsumowanie

Przedstawiony w Osiągnięciu cykl publikacji pozwolił na pogłębienie wiedzy z zakresu biochemii szlaków biosyntezy tłuszczów zapasowych w komórkach mikroorganizmów olejogennych oraz umożliwił poszerzenie wachlarza surowców odpadowych, które z powodzeniem można zagospodarować metodami biotechnologicznymi z udziałem gatunku drożdży niekonwencjonalnych *Y. lipolytica*. W sposób szczególny poszerzona i uzupełniona została wiedza dotycząca szlaku *ex novo* w podłożach zawierających lipidowe źródło węgla. Za największe osiągnięcie naukowe uważam badania dotyczące szlaków biochemicznych syntezy lipidów zapasowych na poziomie molekularnym, realizowanych do tej pory dla modelowego gatunku *Y. lipolytica* wyłącznie na poziomie fenotypowym.

Potwierdzono postawioną hipotezę badawczą, iż w podłożach zawierających lipidowe źródła węgla synteza tłuszczów może zachodzić w równoległe przebiegających dwóch szlakach metabolicznych *de novo* i *ex novo*. Dodatkowo stwierdzono, że możliwe jest nowatorskie rozwiązanie spełniające zasady ekonomii o obiegu zamkniętym, a polegające na utylizacji surowców odpadowych przemysłu rybnego z jednoczesną syntezą tłuszczów na drodze biotechnologicznej.

Na podstawie wyników przedstawionych w ramach Osiągnięcia można sformułować następujące wnioski szczegółowe:

1. Drożdże niekonwencjonalne z gatunku *Y. lipolytica* potrafią wykorzystać jako źródło węgla odpadowe surowce pochodzące z zakładu przetwórstwa ryb – odpadowy olej powstały z wytopienia tłuszczu w procesie wędzenia ryb oraz odpadowy olej rzepakowy po smażeniu filetów rybnych. W szczególności komórki drożdży *Y. lipolytica* są zdolne do zagospodarowania wymienionych odpadowych surowców w mikrobiologicznej syntezie tłuszczów zapasowych.
2. Możliwe jest zagospodarowanie strumienia ścieków poprodukcyjnych w postaci odpadowej solanki pochodzącej z zakładów rybnych, a tym samym zmniejszenia ilości zużywanej wody, w biotechnologicznej metodzie produkcji oleju mikrobiologicznego w komórkach drożdży *Y. lipolytica*.
3. Proces biosyntezy tłuszczów wewnątrzkomórkowych wymaga intensywnego natlenienia hodowli w celu uzyskania wysokiej wydajności kumulacji lipidów zapasowych.
4. Olej mikrobiologiczny uzyskany w hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożu z odpadowym olejem po procesie wędzenia ryb zawierał wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3: kwas dokozaheksaenowy oraz eikozapentaenowy, które są składnikami żywności niezbędnymi dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.
5. Synteza tłuszczów wewnątrzkomórkowych w szlaku *ex novo* była w pewnym stopniu zależna od limitacji źródła azotu w podłożu, a badane enzymy szlaku *de novo* nie były całkowicie hamowane na etapie transkrypcji przez obecne w podłożu i pobierane do wnętrza komórki kwasy tłuszczowe. Można zatem stwierdzić, że w podłożach z lipidowymi źródłami węgla synteza tłuszczów zapasowych może zachodzić równolegle z uruchomieniem dwóch szlaków biochemicznych *ex novo* i *de novo*.

Bioupcykling jest trendem przetwarzania materiałów pozornie już nieprzydatnych i nadawania im nowego życia na drodze biotechnologicznej. Wykorzystanie substratów odpadowych w hodowli mikroorganizmów może okazać się zrównoważoną technologią mającą na celu zagospodarowanie uciążliwych odpadów. Uzyskane w Osiągnięciu wyniki badań są podstawą do prowadzenia dalszych prac nad mikrobiologiczną utylizacją odpadów przemysłu spożywczego. Otrzymany olej mikrobiologiczny kumulowany w komórkach drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 może być zastosowany komercyjnie jako źródło tłuszczów bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, w tym kwasy tłuszczowe z szeregu omega-3.

Innowacyjność i użyteczność podjętej tematyki badawczej potwierdza uzyskany patent chroniący rozwiązanie zastosowania odpadowego oleju po procesie wędzenia ryb jako źródła węgla w podłożach do hodowli drożdży olejogennych oraz zgłoszenie patentowe opisujące sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego z hodowli mikroorganizmów olejogennych z jednoczesną utylizacją solanki pochodzącej z zakładów rybnych.

#### 4.3.6. Spis literatury

- Ageitos J.M., Vallejo J.A., Veiga-Crespo P., Villa T.G. (2011) Oily yeast as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 1219-1227.
- Bankar, A.V., Kumar A.R., Zinjarde S.S. (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 84(5): 847–865.
- Barnett J.A. (2003) Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research, *Microbiology* 149(3), 557-567.
- Barth G., Gaillardin C. (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* 19(4): 219-237.
- Borkowska M., Białas W., Celińska E. (2020) A new set of reference genes for comparative gene expression analyses in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 20, foaa059.
- Carrasco-Pancorbo A., Navas-Iglesias N., Cuadros-Rodriguez L. (2009) From lipid analysis towards lip-idomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *TrAC*, 28(3): 263-278.
- Celińska E., Kubiak P., Białas W., Dziadas M., Grajek W. (2013) *Yarrowia lipolytica*: the novel and promising 2-phenylethanol producer. *J Ind Microbiol Biotechnol* 40: 389-392.
- Chomczyński P., Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., De Montigny J., Marck C., Neuveglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J.M., Beyne E., Bleykasten C., Boisrame A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., Daruvar A., de Despons L., Fabre E., Fairhead C., Ferry-Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin C., Jauniaux N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire M., Lesur I., Ma L., Muller H., Nicaud J.-M., Nikolski M., Oztas S., Ozier-Kalogeropoulos O., Pellenz S., Potier S., Richard G.F., Straub M.L., Suleau A., Swennen D., Tekaia F., Wesolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Bouchier C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C., Weissenbach J., Wincker P., Souciet J.L. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44.
- Dulermo, R.; Gamboa-Melendez, H.; Ledesma-Amaro, R.; Thevenieau, F.; Nicaud, J.-M. (2015) Unraveling fatty acid transport and activation mechanisms in *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta*, 1851: 1202–1217.
- Fickers P., Marty A., Nicaud J.-M. (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 29: 632–644.
- Gajdoš P., Hambalko J., Slaný O., Certík M. (2020) Conversion of waste materials into very long chain fatty acids by the recombinant yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Lett.*, fnaa042.



- Geertman J.-M.A., van Maris A.J.A., van Dijken J.P., Pronk J.T. (2006) Physiological and genetic engineering of cytosolic redox metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved glycerol production. *Metabolic Engineering* 8(6): 532-542.
- Groenewald M., Boekhout T., Neuveglise C., Gaillardin C., van Dijck P.W.M., Wyss M. (2014) *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit Rev Microbiol* 40(3): 187-206.
- Guo Y., Song H., Wang Z., Ding Y. (2012) Expression of *POX2* gene and disruption of *POX3* genes in the industrial *Yarrowia lipolytica* on the  $\gamma$ -decalactone production. *Microbiol Res* 167: 246–225.
- Krzyczkowska J., Stolarzewicz I., Białecka-Florjańczyk E. (2009) Spektrofotometryczna metoda pomiaru aktywności lipaz w reakcji hydrolizy laurynianu *p*-nitrofenyłu, Monografia: Wielokierunkowość Badań w Rolnictwie i Leśnictwie t. 2, 665-671.
- Krzyczkowska J., Kozłowska M. (2017) Effect of oils extracted from plant seeds on the growth and lipolytic activity of *Yarrowia lipolytica* yeast. *J Am Oil Chem. Soc* 94: 661–667.
- Ledesma-Amaro R., Nicaud J.-M. (2016) *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Progr Lipid Res*, 61: 40–50.
- Livak K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . *Method* 25: 402-408.
- Luo Y.S., Nicaud J.M., Van Veldhoven P., Chardot T. (2002) The acyl-CoA oxidases from the yeast *Yarrowia lipolytica*: Characterization of Aox2p. *Arch Biochem Biophys* 407: 32–38.
- Madzak C. *Yarrowia lipolytica* Strains and Their Biotechnological Applications: How Natural Biodiversity and Metabolic Engineering Could Contribute to Cell Factories Improvement. *J. Fungi* 2021, 7(7), 1-67, nr artykułu 548.
- Nicaud J.M. (2012) *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29: 409-418.
- Ochsenrether K., Gluck C., Stressler T., Fischer L., Syldatk C. (2016) Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Front Microbiol* 7: 1539–1565.
- Papanikolaou S., Aggelis G. (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113: 1031-1051.
- Papanikolaou S., Aggelis G. (2011b) Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications. *Eur J Lipid Sci Technol* 113: 1052–1073.
- Patel A., Karageorgou D., Rova E., Katapodis P., Rova U., Christakopoulos P., Matsakas L., (2020) An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. *Microorganisms*, 8(3), nr artykułu 434.
- Pauly D., Zeller D. (2017) Comments on FAOs State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA 2016). *Mar. Policy* 77: 176–218.
- Ratledge C., Wynn J. (2002) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Lipid Technol* 51: 1-51.
- Ratledge C., Cohen Z. (2008) Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol* 20: 155–160.
- Rebah F.B., Miled N. (2013) Fish processing wastes for microbial enzyme production: A review. *3 Biotech* 3: 255–265.

- Rywińska A., Rymowicz W. (2010) High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37(5):431-435.
- Sahin D., Tas E., Altindag U.H. (2018) Enhancement of docosahexaenoic acid (DHA) production from *Schizochytrium* sp. S31 using different growth medium conditions. *AMB Expr* 8: 7.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1956) Colorimetry of total phenolics with posphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144–158.
- De Souza Varize, C., Christofoleti-Furlan, R. M., de Souza Miranda Muynarsk, E., de Melo Pereira, G. V., Lopes, L. D., Basso, L. C. Biotechnological Applications of Nonconventional Yeasts. In: Basso, T. P., editor. *Yeasts in Biotechnology* [Internet]. London: IntechOpen; 2019 [dostęp 17.05.2022].
- Tang W., Zhang S., Wang Q., Tan H., Zhao Z.B. (2009) The isocitrate dehydrogenase gene of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is linked to lipid accumulation. *Can J Microbiol* 55: 1062–1069.
- Yahyaee R., Ghobadian B., Najafi G. (2013) Waste fish oil biodiesel as a source of renewable fuel in Iran. *Ren Sust En Rev* 17: 312-319.
- Tomaszewska L., Rakicka M., Rymowicz W., Rywińska, A.A. (2014) comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. *FEMS Yeast Res* 14: 966–976.
- Wierzchowska K., Zieniuk B., Fabiszewska A. (2022) Use of non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* in treatment or upgradation of hydrophobic industry wastes. *Waste and Biomass Valorization* 13(2): 757–779.
- Zainuddin M.F., Fai C.K., Ariff A.B., Rios-Solis L., Halim M. (2021) Current pretreatment/cell disruption and extraction methods used to improve intracellular lipid recovery from oleaginous yeasts. *Microorganisms* 9, nr artykułu 251.

Źródła internetowe:

The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA 2020), Food and Agriculture Organization of the United Nations 2020. Available online: <https://www.fao.org/publications/sofia/en> [dostęp 27.12.2021].

#### 4.4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

W obszarze moich zainteresowań naukowych można wyróżnić kilka kierunków badawczych z zakresu zielonej chemii, biotechnologii spożywczej oraz mikrobiologii i biotechnologii w przemyśle i ochronie środowiska. Moje badania skupiają się na wykorzystaniu dwóch grup mikroorganizmów - drożdży niekonwencjonalnych z gatunku *Yarrowia lipolytica* oraz bakterii fermentacji mlekowej. W swojej pracy badawczej mogę wyróżnić następujące zagadnienia:

1. Charakterystyka oraz zastosowanie kultur bakterii fermentacji mlekowej do poprawy jakości żywności i pasz
2. Drożdże *Y. lipolytica* jako źródło enzymów lipolitycznych
3. Enzymatyczna synteza potencjalnych dodatków do żywności z udziałem lipaz
4. Pozyskiwanie cennych biotechnologicznie metabolitów w hodowli drożdży z gatunku *Y. lipolytica* ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania surowców odpadowych w podłożach hodowlanych

#### **4.4.1. Charakterystyka oraz zastosowanie kultur bakterii fermentacji mlekowej do poprawy jakości żywności i pasz**

Utrwalanie produktów spożywczych oraz pasz przez bakterie fermentacji mlekowej (LAB – ang. *lactic acid bacteria*) uważane jest za skuteczną alternatywę dla chemicznych technik stosowanych m.in. w przemyśle mleczarskim czy paszowym. Bakterie fermentacji mlekowej to mikroorganizmy bezpieczne o długiej historii stosowania, posiadają status GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*) oraz status QPS (ang. *Qualified Presumption of Safety*) nadane im przez właściwe agendy w Stanach Zjednoczonych oraz w Unii Europejskiej. Ponadto w ostatnich latach rośnie zainteresowanie konsumentów produktami spożywczymi o tzw. „czystej etykiecie”, które są naturalne, mniej przetworzone i pozbawione chemicznych konserwantów, a jednocześnie cechującymi się dłuższym okresem przydatności do spożycia w celu zminimalizowania ilości żywności marnotrawionej. Wspomniane trendy wpływają na nieustające zainteresowanie badaczy oraz przedstawicieli przemysłu wykorzystaniem bakterii fermentacji mlekowej (LAB) lub ich metabolitów jako biokonserwantów [Shi i Maktabdar, 2022]. Moje badania naukowe z udziałem pałeczek kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* (obecnie sklasyfikowane w nowych rodzajach *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*) prowadzę od kilkunastu lat, a dotyczą one wykorzystania zdolności wybranych gatunków i szczepów LAB do poprawy jakości produktów spożywczych oraz kiszonych pasz.

Grzyby strzępkowe są mikroorganizmami bardzo często powodującymi psucie się produktów żywnościowych oraz pasz objętościowych [Magnusson i Schnürer, 2005]. Wiele gatunków pleśni jest zdolnych do produkcji toksycznych dla człowieka i zwierząt metabolitów drugorzędowych zwanych mikotoksynami. Obok szkodliwego wpływu na zdrowie zwierząt i ludzi skażenie pasz i żywności toksynami grzybów strzępkowych prowadzi do poważnych strat ekonomicznych, stąd tak wiele wysiłku wkłada się w poszukiwanie nowych metod mających na celu odkażenie zanieczyszczonych produktów. Poza metodami fizycznymi i chemicznymi w kręgu zainteresowania znalazły się metody biologiczne, w tym w sposób szczególny skupia się uwagę na możliwości dekontaminacji skażonych pasz i żywności przez bakterie fermentacji mlekowej.

W ramach prac prowadzonych we współpracy z naukowcami z Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie im. prof. Wacława Dąbrowskiego przeprowadziłam selekcję szczepów wybranych gatunków pałeczek kwasu mlekowego należących do Kolekcji Kultur Przemysłowych IBPRS w Warszawie oraz kolekcji kultur Zakładu Technologii Fermentacji do obniżania zawartości ochratoksyny A (OTA)

w środowisku. OTA jest kancerogenną mikotoksyną produkowaną przez pleśnie z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* o właściwościach nefrotoksycznych, na skażenie którą często narażona jest żywność i pasza klimatu umiarkowanego. Część spośród badanych szczepów wykazywała zdolność do obniżania w środowisku zawartości zarówno ochratoksyny A jak i hepatotoksycznej aflatoksyny B<sub>1</sub> (mikotoksyny produkowanej m.in. przez pleśnię *A. flavus*) oraz w badaniach modelowych odznaczała się cechami decydującymi o ich przydatności do produkcji antymikotoksynowego preparatu do kiszenia surowców roślinnych, choć sam proces eliminacji mikotoksyn okazał się częściowo odwracalny.

Ważnym problemem badawczym realizowanym przeze mnie były prace nad oceną wrażliwości na obecność ochratoksyny A szczepów bakterii, wchodzących w skład kultur starterowych o zdolności do obniżania poziomu OTA. Tylko szczepy charakteryzujące się niską wrażliwością na obecność mikotoksyny oraz jednoczesną zdolnością do obniżania jej poziomu w środowisku mogły znaleźć zastosowanie w biologicznej dekontaminacji fermentowanych produktów pochodzenia roślinnego. Wśród badanych szczepów kilka z nich (*L. buchneri* KKP 907 p, *L. fermentum* N KKP 2020 p, *L. plantarum* K KKP 593 p, *L. plantarum* C KKP 788 p, *L. plantarum* S KKP 2021 p) spełniało kryteria małej wrażliwości na obecność OTA i faktycznie zostały one wykorzystane do produkcji kultur starterowych do badań w gospodarstwach doświadczalnych, w tym szczep *L. plantarum* S KKP 2021p uzyskał ochronę patentową w Europie oraz w Stanach Zjednoczonych.

Badanie skażenia płodów rolnych, pasz i żywności mikotoksynami zaowocowało pracami nad określeniem poziomu zawartości aflatoksyn (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>) i ochratoksyny A w surowcach kiszonkarskich w gospodarstwach konwencjonalnych oraz ekologicznych. Obecność mikotoksyn w paszach objętościowych dla przeżuwaczy jest wciąż aktualnym problemem, a badania pozwoliły na stwierdzenie istnienia dodatniej korelacji między stopniem porażenia grzybami pleśniowymi a zawartością badanych mikotoksyn w zielonkach. Ponadto we wszystkich latach badań średnia zawartość aflatoksyn i ochratoksyny A w runi łąkowej w gospodarstwach ekologicznych była istotnie wyższa od ich zawartości w runi łąkowej w gospodarstwach konwencjonalnych.

Liczba bakterii fermentacji mlekowej obecnych w surowcu roślinnym jest często wystarczająca do zapoczątkowania fermentacji. Dodatek kultury starterowej przyspiesza ten proces, a odpowiednia selekcja umożliwi dobór szczepów bakterii o specjalnych właściwościach cennych z punktu widzenia otrzymywania określonych produktów. Tradycyjnie kultury starterowe LAB stosowano się w celu obniżenia pH na drodze produkcji kwasu mlekowego i zahamowania wzrostu niepożądanych mikroorganizmów epifitycznych

w wyniku konkurencji o składniki odżywcze. W dzisiejszych czasach preparaty LAB stały się skutecznym narzędziem do zapewnienia dobrej jakości kiszonek poprzez selekcję gatunków o wyjątkowych cechach. Na rynku dostępna jest szeroka gama preparatów mikrobiologicznych zawierających żywe kultury bakterii, ale z uwagi na wciąż niewykorzystane możliwości tej grupy drobnoustrojów, trwają prace nad ich biotechnologicznym wykorzystaniem. Ważnym aspektem prowadzonej przeze mnie działalności naukowej było praktyczne przełożenie badań prowadzonych w skali laboratoryjnej na działania związane z zakiszaniem materiału roślinnego w skali produkcyjnej z wykorzystaniem wyselekcjonowanych kultur pałeczek kwasu mlekowego w postaci preparatów bakteryjnych i bakteryjno-mineralno-witaminowych. Każdorazowo stosowanie kultury starterowej bakterii fermentacji mlekowej do kiszenia runi łąkowej, ziarna kukurydzy, całych roślin kukurydzy czy lucerny wpływało na poprawę jakości mikrobiologicznej i/lub toksykologicznej kiszonek, a także stabilność tlenową oraz poprawę parametrów fizykochemicznych (pH, zawartość kwasu mlekowego, octowego, brak obecności kwasu masłowego). Ponadto wykazany został związek między jakością kiszonek, stosowaną jako podstawowa pasza w żywieniu krów a jakością mikrobiologiczną mleka surowego oraz zawartością aflatoksyny M1. Obecność aflatoksyn w paszach jest związana z rozwojem pleśni w czasie zbioru oraz podczas przechowywania płodów rolnych, które wykorzystuje się w żywieniu zwierząt. Dodatkowym zagrożeniem jest możliwość biotransformacji aflatoksyny B1 u bydła mlecznego i kumulacja produktów tej reakcji – aflatoksyny M1 w mleku.

Ze względu na aplikacyjny charakter moich prac badawczych ważną cechą szczepów bakterii fermentacji mlekowej o potencjalnym zastosowaniu przemysłowym jest ich oporność na antybiotyki, która również była przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań.

Oprócz pleśni częstym zagrożeniem dla bezpieczeństwa żywności i pasz są bakterie patogenne. Skutki skarmiania pasz pochodzących z użytków zielonych skażonych bakteriami patogennymi są groźne dla zdrowia zwierząt, a w następstwie dla zdrowia ludzi, spożywających produkty pochodzenia zwierzęcego. W celu poprawy jakości mikrobiologicznej kiszonek produkowanych ze skażonej bakteriami fekalnymi runi łąkowej brałam udział w opracowaniu i wdrażaniu w wybranych gospodarstwach ekologicznych metod obniżania ilości drobnoustrojów patogennych. Kiszonki doświadczalne z dodatkiem preparatów zawierających szczepy LAB charakteryzowały się wysoką czystością mikrobiologiczną, nie stwierdzono w nich obecności bakterii z rodzaju *Salmonella*, natomiast liczba bakterii z grupy coli i *Escherichia coli* oraz bakterii z gatunku *Clostridium perfringens* i rodzaju *Listeria* była niższa lub ponownie nie wykrywano ich w stosunku do kiszonek kontrolnych.

Ważnym trendem w badaniach nad preparatami bakteryjnymi jest poprawa stabilności

tlenowej oraz wzrost zawartości takich metabolitów jak kwas propionowy i 1,2-PD (1,2-propanodiol) w surowcach odnawialnych poddawanych procesom kiszenia, aby zapewnić wysoką wydajność produkcji metanu z tych surowców. Preparaty bakteryjne dodawane do kiszenia surowców roślinnych przeznaczonych do żywienia zwierząt powinny charakteryzować się zatem nieco odmiennym działaniem od tych przeznaczonych do produkcji biogazu. W konsekwencji nowy kierunek badań nad pałeczkami kwasu mlekowego podjęty w mojej działalności naukowej obejmuje badanie szlaków metabolicznych syntezy i/lub metabolizmu 1,2-PD. W pracach własnych skupiałam się na charakterystyce szczepów LAB, a następnie próbie syntezy kwasu propionowego z 1,2-PD na drodze kofermentacji. Stwierdziłam, że istnieje możliwość stymulowania przez szczepy bakterii z gatunków *L. buchneri*, *L. reuteri* i *L. diolivorans* (obecnie odpowiednio *Lentilactobacillus buchneri*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lentilactobacillus diolivorans*) syntezy pożądaných metabolitów kwasu octowego, 1,2-propanodiolu i kwasu propionowego, których obecność w kiszonkach z surowców odnawialnych wpływa na poprawę ich stabilności tlenowej i zwiększenie biogazodochodowości. Co ważne, wyizolowany z kiszonego ziarna kukurydzy nowy szczep *L. buchneri* A KKP 2047p charakteryzował się niezwykłą dla tego gatunku zdolnością do metabolizowania 1,2-PD i został objęty ochroną patentową. Badałam także szczepy bakterii z gatunków *L. reuteri* i *L. diolivorans*. Co ciekawe, wszystkie przebadane izolaty wykazały zdolność do efektywnego metabolizowania 1,2-PD w obecności kobalaminy i jego konwersji do kwasu propionowego. Na bazie wyizolowanych ze środowiska naturalnego, scharakteryzowanych genetycznie i biochemicznie szczepów tych gatunków opracowano skład kilku bakteryjnych preparatów z serii Lactosil Biogaz, przeznaczonych do kiszenia roślinnych surowców odnawialnych jak całe rośliny kukurydzy, trawy oraz ruń łąkowa.

W ostatnim czasie moje zainteresowania syntezą kwasu propionowego przez bakterie fermentacji mlekowej pozwoliły na zaangażowanie w roli wykonawcy w realizację grantu w ramach konkursu OPUS pt.: „Charakterystyka determinantów genetycznych biosyntezy kwasu propionowego oraz analiza ich funkcjonalności w wybranych bakteriach fermentacji mlekowej” (2018/29/B/NZ9/02278), którego liderem jest Instytut Biochemii i Biofizyki PAN. W ramach realizacji tego projektu prowadzone są prace nad poznaniem szczegółów mechanizmu syntezy kwasu propionowego u bakterii mlekowych, czyli identyfikacja i charakterystyka konkretnych genów i szlaków metabolicznych, których białkowe produkty są zaangażowane w przemiany, które w efekcie doprowadzają do powstania kwasu propionowego.

Wyniki prac związanych z charakterystyką oraz zastosowaniem kultur bakterii fermentacji mlekowej do poprawy jakości żywności i pasz przedstawiono w rozdziale

w monografii: II.2.1 oraz w publikacjach: II.4.1, II.4.5. - II.4.7, II.4.11, II.4.12, II.4.14, II.4.15- II.4.19, II.4.23 - II.4.25, II.4.30 - II.4.35, II.4.37, II.4.38, II.4.42, II.4.44, II.4.47, II.4.58 oraz patentach III.3.1 - III.3.8 (wymienionych w zał. nr 4 do wniosku).

#### **4.4.2. Drożdże *Y. lipolytica* jako źródło enzymów lipolitycznych**

Enzymy pochodzenia mikrobiologicznego są cennymi biokatalizatorami, które zostały szeroko przebadane ze względu na ich zalety stosowania w porównaniu z katalizatorami chemicznymi. Te pierwsze charakteryzują się lepszą selektywnością i mogą być stosowane w łagodnych warunkach reakcji. Enzymy produkowane często zewnątrzkomórkowo mogą być pozyskiwane z hodowli drobnoustrojów, które cechuje krótki czas generacji i wzrost niezależny od warunków środowiska. Przemysłowo szeroko produkowane i wykorzystywane są przede wszystkim enzymy z klasy hydrolaz (proteazy, amylazy, pektynazy czy lipazy), które są zdolne do hydrolizy naturalnych polimerów oraz biocząsteczek jak białka, skrobia, pektyny czy tłuszcze. Rynek enzymów przemysłowych stale rośnie, głównie dzięki lepszej wydajności produkcji oraz rozwijającym się możliwościom inżynierii białek oraz biologii molekularnej, co skutkuje niższą ceną preparatów enzymatycznych, nowymi obszarami zastosowań, nowymi enzymami oraz cząsteczkami o ulepszonych właściwościach. Dostosowywanie enzymów do konkretnych zastosowań będzie przyszłym trendem, dzięki ciągłemu ulepszaniu narzędzi badawczych, lepszemu zrozumieniu zależności pomiędzy strukturą i funkcją cząsteczki oraz intensywnym poszukiwaniom enzymów mikroorganizmów zamieszkujących ekstremalne środowiska.

W zakresie mojej aktywności naukowej ważne miejsce zajmują badania nad pozyskiwaniem i zastosowaniem lipaz, czyli hydrolaz triacyloglicerolu (EC 3.1.1.3). Lipazy są biokatalizatorami o wszechstronnej aktywności katalitycznej, zarówno hydrolitycznej jak i syntetycznej. Fizjologicznie w środowisku wodnym katalizują one reakcje hydrolizy estrów glicerolu i średnio- oraz długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. W środowiskach niewodnych, w tym w rozpuszczalnikach organicznych, białka te potrafią katalizować reakcje estryfikacji i transestryfikacji, a substratami dla tych enzymów mogą być nie tylko związki o charakterze lipidowym.

Znaczna część moich badań skupiała się nad badaniem wpływu warunków hodowli, w tym składu pożywki hodowlanej (źródła azotu, węgla, obecności substancji indukujących) i czasu jej trwania na aktywność enzymów lipolitycznych pochodzenia mikrobiologicznego. Do wyznaczenia aktywności lipolitycznej otrzymanych preparatów wykorzystywano spektrofotometryczną metodę pomiaru postępu reakcji hydrolizy laurynianu *p*-nitrofenylu.

Glukoza stanowi źródło węgla standardowo wykorzystywane w podłożach do hodowli mikroorganizmów, ale znany jest jej represyjny wpływ na aktywność drożdży lipolitycznych takich jak drożdże z gatunku *Y. lipolytica*. Glicerol, jako uboczny produkt w przemyśle tłuszczowym, alkoholowym i paliwowym, mógłby stanowić alternatywę dla wykorzystania glukozy w podłożach stymulujących produkcję lipaz, jednak jego obecność również hamowała produkcję lipaz przez drożdże *Y. lipolytica*, najprawdopodobniej wskutek zwiększonej produkcji kwasów organicznych. Według danych literaturowych modelowym źródłem węgla stymulującym syntezę tej grupy enzymów jest oliwa z oliwek. Zastosowanie statystycznych metod planowania eksperymentu (planów dla mieszanin) umożliwiło stworzenie modelu matematycznego pozwalającego na optymalny dobór trzech źródeł węgla w podłożu do hodowli tych mikroorganizmów. Zastosowanie opracowanego składu źródła węgla przy maksymalnej ilości glicerolu 30 g i 19,2 cm<sup>3</sup> oliwy z oliwek w 1 dm<sup>3</sup> podłoża pozwoliło uzyskać biokatalizator całokomórkowy o wysokiej aktywności lipaz zewnątrzkomórkowych oraz lipaz związanych ze ścianą komórkową, który mógłby znaleźć zastosowanie w syntezie organicznej.

Ważnym etapem prowadzonych doświadczeń były próby zastąpienia oliwy z oliwek innymi olejami roślinnymi o zbliżonym lub odmiennym od oliwy składzie kwasów tłuszczowych, a były to olej arachidowy, olej z ryżu, z sezamu, olej lniany, z pestek winogron, słonecznikowy i rzepakowy oraz olej z rzepaku canola i owoców czerwonej palmy, a także olej kukurydziany. Doświadczenia prowadzone w hodowli wytrząsanej szczepu drożdży *Y. lipolytica* KKP 379, w podłożach zawierających jako jedyne źródło węgla oleje roślinne, pozwoliły na sformułowanie wniosku, że zawartość kwasu oleinowego w oleju oraz jego pozycja w cząsteczce triacylogliceroli nie są jedynymi czynnikami warunkującymi różnice w aktywności lipolitycznej drożdży tego gatunku. Czynniki wpływające na ekspresję genów enzymów lipolitycznych i ich wysoką aktywność w podłożach hodowlanych pozostają nadal nierozwiązanym problemem badawczym. Jedną z nowych hipotez wartą weryfikacji jest istnienie progowego poziomu stężenia kwasów tłuszczowych niezbędnych do zapoczątkowania ekspresji genów lipaz oraz obecność inhibitorów tej grupy enzymów w stosowanych olejach. Znane są obecnie dwie kategorie inhibitorów ludzkich, zwierzęcych i mikrobiologicznych lipaz: syntetyczne inhibitory lipaz (w tym fosfoniany, kwas borowy i analogi tłuszczów) oraz związki naturalne (w tym  $\beta$ -laktony, ekstrakty roślinne i metabolity roślinne, głównie polifenole i saponiny oraz peptydy i niektóre rodzaje błonnika pokarmowego).

Względy ekonomiczne i ekologiczne zdecydowały o konieczności poszukiwania alternatywnych źródeł tłuszczów, które mogłyby zostać wykorzystane w mikrobiologicznej syntezie lipaz. Pozytywnie oceniono możliwość stosowania odpadów pochodzących



z zakładów przemysłowych oraz gospodarstw domowych: oleju powstałego w wyniku wytopienia tłuszczu z rybich tusz w procesie wędzenia, zjełczanego masła klarowanego, tłuszczu powstałego w wyniku wytopienia tkanki tłuszczowej w procesie wędzenia wędlin wieprzowych oraz tłuszczu po procesie pieczenia kaczki, do indukcji aktywności lipolitycznej drożdży z gatunku *Y. lipolytica*.

Zdecydowana większość bioprocessów prowadzona jest w bioreaktorach. Mając na uwadze konieczność zwiększenia skali optymalizowano hodowle okresowe w bioreaktorze laboratoryjnym, w których analizowano wpływ szybkości mieszania (200-600 obr/min) i natężenia przepływu powietrza ( $0,0375 - 2,0 \text{ dm}^3/(\text{dm}^3 \times \text{min})$ ) na plon biomasy i aktywność lipaz zewnątrzkomórkowych drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 w podłożach zawierających odpadowy olej rybny. Wzrost intensywności napowietrzania ograniczał okresy niedoboru tlenu w podłożu, choć zastosowanie maksymalnej założonej szybkości skutkowało zmniejszeniem aktywności lipolitycznej, prawdopodobnie w związku ze stresem oksydacyjnym lub zbyt dużymi naprężeniami ścinającymi. Ponadto w hodowlach potwierdzono, że synteza lipaz jest związana ze zwiększonym zapotrzebowaniem komórki na tlen oraz jest zależna od pH i fazy wzrostu drożdży.

W procesach biotransformacji biokatalizator może występować w różnych postaciach, jako biomasa całych komórek mikroorganizmów (tzw. biokatalizator całokomórkowy, ang. *whole-cell biocatalyst*), zagęszczony lub liofilizowany płyn po ich hodowli oraz jako oczyszczony preparat enzymatyczny. Wymienione biokatalizatory posiadają swoje wady i zalety, a odpowiedni dobór formy biokatalizatora zależy od wielu czynników. Najczęściej stosowaną w przemyśle i szeroko badaną formą katalizatorów są oczyszczone enzymy, które pozwalają na osiągnięcie wysokich wydajności procesu i zastosowanie wyższych stężeń reagentów. Czynnikiem ograniczającym ich wykorzystanie jest z kolei wysoka cena, związana z pracołłonnym i kosztownym procesem oczyszczania białka enzymatycznego. Jedną z metod poprawienia wydajności tych etapów jest immobilizacja biokatalizatorów m.in. poprzez unieruchamianie na nośnikach.

W swojej działalności naukowej pracowałam nad różnymi formami preparatów lipaz pochodzenia mikrobiologicznego. Wśród nich znalazły się preparaty lipaz zewnątrzkomórkowych oraz biomasa drożdży unieruchamiane na drodze adsorpcji fizycznej z wykorzystaniem takich nośników jak alginian, żelatyna oraz alkohol poliwinylowy. Prowadziłam badania nad oceną wpływu wybranych parametrów procesu liofilizacji na aktywność hydrolityczną lipaz zawartych w liofilizowanym surowym preparacie lipaz zewnątrzkomórkowych drożdży *Y. lipolytica* KKP 379. Liofilizacja poza istotnym obniżeniem

aktywności wody w preparacie, wpływała na stabilność białek enzymatycznych w czasie przechowywania. Oceniono, że podwyższenie temperatury dosuszania z 10°C do 50°C nie wpływało istotnie na aktywności enzymów zawartych w liofilizacie. Z kolei dodatek 1% siarczanu (VI) amonu spełnił rolę ochronną wobec cząsteczek białka enzymatycznego.

Drożdże z gatunku *Y. lipolytica* syntezują lipazy wewnątrzkomórkowe (znajdujące się w cytozolu oraz związane ze strukturami błony i ściany komórkowej) oraz zewnątrzkomórkowe (wydzielane do medium hodowlanego). Celem części moich prac była ocena możliwości zastosowania ultradźwięków w procesie permeabilizacji komórek, wykorzystując przede wszystkim zdolność fal ultradźwiękowych o dużej mocy i częstotliwości rzędu 20 - 100 kHz do wywoływania efektu kawitacji. Siły mechaniczne, tworzące się wówczas w miejscu zderzenia pęcherzyków kawitacyjnych oraz fala generowana po ich implozji są głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za uszkodzenie komórek. W zakresie badań nad katalitycznymi właściwościami szczepu drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 oceniono działanie ultradźwięków generowanych w homogenizatorze typu głowicowego pod kątem skuteczności uwalniania lipaz z wnętrza komórek drożdży. Badano zarówno aktywność lipolityczną białek wewnątrzkomórkowych uwolnionych do środowiska (tzw. ekstrakt surowy) oraz tych nadal związanych z nienaruszoną biomasą i pozostałościami struktur komórkowych. Analiza zdjęć wykonanych techniką skaningowej mikroskopii elektronowej pozwoliła na obserwację, że bardziej wrażliwe na zniszczenie były strzępki i pseudostrzępki drożdży od owalnych komórek. Parametry procesu pozwalające na pozyskanie wysokiej ilości białek wewnątrzkomórkowych wpływały negatywnie na aktywność lipolityczną obu frakcji enzymów, a za optymalne pod kątem wydajności uwalniania lipaz wewnątrzkomórkowych o wysokiej aktywności lipolitycznej uznano zastosowanie ultradźwięków przez okres 5 min przy mocy akustycznej 30 W, gdy komórki drożdży zawieszano w buforze TRIS lub roztworze jonów wapnia i magnezu.

Wyniki prac związanych z pozyskiwaniem biokatalizatorów w hodowli drożdży przedstawiono w następujących rozdziałach w monografiach: II.2.3, II.2.6 oraz publikacjach: II.4.3, II.4.4, II.4.8, II.4.10, II.4.13, II.4.20, II.4.22, II.4.26 - II.4.28, II.4.36, II.4.39, II.4.40, II.4.59 (wymienionych w zał. nr 4 do wniosku).

#### **4.4.3. Enzymatyczna synteza potencjalnych dodatków do żywności z udziałem lipaz**

Enzymy lipolityczne wykazują aktywność syntetyczną w środowisku o niskiej aktywności wody, katalizując reakcje estryfikacji, transestryfikacji, alkoholizy, acydolizy, aminolizy triacylogliceroli oraz innych estrów. Badałam możliwości zastosowania lipaz

syntezowanych przez drożdże *Y. lipolytica* w syntezie organicznej. W ramach prac zespołu w Katedrze Chemii SGGW uczestniczyłam w pomyślnych próbach aplikacji biomasy szczepu *Y. lipolytica* KKP 379 w syntezie estrów zapachowych, w tym octanu 2-feniloetylu o zapachu różanym oraz hydrocynamonianu etylu o zapachu kwiatowo-miodowym.

Obecnie realizuję cele badawcze związane z wykorzystaniem lipaz syntezowanych przez drożdże z gatunków *Y. lipolytica* oraz *C. antarctica* do syntezy estrów związków fenolowych oraz terpenowych. Duże zainteresowanie związkami fenolowymi wiąże się z ich wysokim potencjałem do konserwowania żywności (działanie przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe) oraz, co nie mniej ważne, z wysokim potencjałem terapeutycznym.

Z uwagi na istotny wpływ rozpuszczalnika, w którym prowadzona jest biokataliza, oceniono wpływ 20 polarnych (protonowych i aprotycznych) oraz niepolarnych rozpuszczalników na aktywność lipazy B z drożdży *C. antarctica* (CALB) w reakcji hydrolizy laurynianu *p*-nitrofenylu. Immobilizowana CALB to jedna z najczęściej stosowanych i badanych komercyjnych lipaz o wysokiej aktywności katalitycznej. Wskazano istotne znaczenie rozpuszczalności substratów (w tym związków fenolowych) na ostateczny wybór rozpuszczalnika do reakcji. Co więcej, aktywność hydrolityczna CALB okazała się być wysoko skorelowana ze współczynnikiem podziału rozpuszczalnika (logP). Jednocześnie zarówno rozpuszczalniki hydrofobowe jak izooktan oraz rozpuszczalniki polarne (aceton, eter *tert*-butylowo-metylowy, *tert*-butanol czy acetonitryl) korzystnie wpływały na wydajność hydrolizy estrów. Uważa się, że w obecności rozpuszczalników hydrofobowych poprawia się dostęp substratu do powierzchni cząsteczki enzymu. Z drugiej strony, rozpuszczalniki polarne polepszają rozpuszczalność substratu. Wyniki badań wskazały, że dobrym podejściem w kontekście wysokiej wydajności reakcji może okazać się stosowanie mieszaniny rozpuszczalników. W kolejnych pracach wykorzystywano układy zawierające izooktan, eter *tert*-butylowo-metylowy oraz mieszaninę tych dwóch rozpuszczalników w stosunku 7:3 (v/v).

Do najważniejszych osiągnięć w obrębie omawianej tematyki badań należy uzyskanie i scharakteryzowanie pod kątem właściwości przeciwutleniających oraz przeciwdrobnoustrojowych związków pochodnych kwasów fenolowych oraz alkoholi aromatycznych (w których funkcja fenolowa znajdowała się we fragmencie alkoholu zastosowanego w reakcji). W reakcjach syntezy wykorzystano komercyjny preparat lipazy B z drożdży *C. antarctica* oraz różne formy własnego preparatu lipaz drożdży *Y. lipolytica* (biomasy oraz płynu pochodzącego w postaci uwodnionej lub liofilizowanej) w reakcjach lipofilizacji związków fenolowych. Otrzymane estry charakteryzowały się niższą hydrofilowością, a co za tym idzie poprawiono możliwości ich rozpuszczania w matrycach

o charakterze lipidowym w porównaniu do wyjściowych kwasów lub alkoholi, co jest kluczowe z punktu widzenia ich potencjalnego zastosowania jako dodatków do żywności. Opisano właściwości m. in. 4-hydroksyfenylopropionianu geranylu, estrów butylowych następujących kwasów: fenylooctowego, 4-hydroksyfenylooctowego, 3-fenylopropanowego, 3-(4-hydroksy)fenylopropanowego i 3-(4-metoksy)fenylopropanowego; heksanianów: 4-hydroksybenzylu, 2-hydroksybenzylu, 4-metoksybenzylu oraz wanililu; octanów następujących alkoholi: 2-fenyletanolu, tyrozolu (2-(4-hydroksyfenylo)etanolu) i 3-fenylopropanolu. Spośród otrzymanych związków zwrócono uwagę na 3-(4-hydroksy)fenylopropionian bytulu oraz heksanian wanililu wykazujące wysoką aktywność przeciwutleniającą oznaczaną metodami *in vitro* m. in. w metodzie CUPRAC i w metodzie z rodnikiem DPPH. Heksanian wanililu pozytywnie wpłynął na stabilność oksydacyjną oleju rzepakowego i słonecznikowego w przyspieszonym teście Rancimat, zastosowany w stężeniu 0,1% wykazywał podobne działanie co popularny syntetyczny przeciwutleniacz BHT (butylohydroksytoluen). Z kolei 3-(4-hydroksy)fenylopropionian oktylu wykazywał działanie przeciwbakteryjne w stosunku do szczepu *L. monocytogenes* PCM 2191.

Warto zwrócić uwagę, że w trakcie badań zaobserwowano kilka ciekawych prawidłowości dotyczących zależności między strukturą otrzymywanych związków i/lub stosowanych w reakcji substratów a wydajnością reakcji oraz właściwościami jej produktów. Po pierwsze wydajność reakcji estryfikacji kwasu cynamonowego i jego pochodnych katalizowana przez CALB była niska w porównaniu z wydajnością reakcji kwasu hydrocynamonowego (niezawierającego podwójnego wiązania w części alifatycznej cząsteczki). Ponadto obniżenie wydajności reakcji estryfikacji obserwowano w obecności grup elektronodonorowych przy pierścieniu aromatycznym. Wykazano także różną specyficzność substratową lipazy B z *C. antarctica* oraz lipaz drożdży *Y. lipolytica*. W reakcji estryfikacji 1-butanolu z wybranymi kwasami fenolowymi najwyższy stopień konwersji do estrów butylowych uzyskano dla kwasu 3-fenylopropanowego w obecności biomasy drożdży *Y. lipolytica*, zaś w estryfikacji kwasu fenylooctowego oraz 4-hydroksyfenylooctowego uzyskano śladowe ilości produktu. Odwrotne zależności obserwowano dla CALB, dla której w reakcji z kwasem fenylooctowym uzyskano niemal całkowite przereagowanie po 24 h. Obecnie uczestniczę w badaniach modelowania dynamiki enzymów oraz dokowania molekularnego ligandów do cząsteczek białek w celu wyjaśnienia tego fenomenu.

Stwierdzono również, że estry, które zostały otrzymane z alkoholi zawierających grupę hydroksylową w pozycji *ortho*-, wykazywały wyższą aktywność przeciwutleniającą w stosunku do estrów z grupą hydroksylową w pozycji *para*. Z kolei grupa metoksylova przy

pierścieniu aromatycznym wpływała pozytywnie na efektywność fenolowej grupy hydroksylowej w alkoholu wanililowym.

Wyniki prac związanych z enzymatyczną syntezą pochodnych związków fenolowych oraz estrów zapachowych jako potencjalnych dodatków do żywności przedstawiono w następujących publikacjach: II.4.9, II.4.21, II.4.45, II.4.48, II.4.51, II.4.53 - II.4.55, II.4.57, II.4.60, II.4.64 - II.4.66 (wymienionych w zał. nr 4 do wniosku).

#### **4.4.4 Pozyskiwanie cennych biotechnologicznie metabolitów w hodowli drożdży z gatunku *Y. lipolytica* ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania surowców odpadowych w podłożach hodowlanych**

W zakresie mojej pracy naukowej wymienić należy badania nad kilkoma metabolitami niekonwencjonalnych drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica*. W sposób szczególny moje prace skupiają się na zagadnieniach związanych z biosyntezą oleju mikrobiologicznego oraz możliwością jego komercyjnego zastosowania. Część z nich omówiłam w ramach Osiągnięcia. Inne prace przeglądowe dotyczące aktualnych trendów w zastosowaniu SCO (ang. *single cell oil*) zostały przedstawione w następujących rozdziałach w monografiach II.2.5, II.2.8, II.2.9 oraz publikacjach: II.4.61 - II.4.63. Wskazano w nich dwa główne obszary zastosowań lipidów pochodzenia mikrobiologicznego w produkcji paliwa typu biodiesel II generacji oraz przemyśle farmaceutycznym, paszowym i spożywczym w suplementacji diety zwierząt oraz ludzi. Oceniono, że obecnie na polskim rynku występują wyłącznie suplementy diety człowieka wykorzystujące olej mikrobiologiczny głównie z alg z rodzaju *Schizochytrium*. Szeroki wybór tych produktów świadczy o wysokim zapotrzebowaniu konsumentów. Biomasa drożdży olejogennych jest stosowana wyłącznie jako preparaty paszowe dla zwierząt gospodarskich. Wciąż istnieje potrzeba wzrostu wydajności i obniżenia kosztów produkcji SCO pochodzenia drożdżowego, aby możliwa była jego komercjalizacja. W przygotowanej w moim zespole pracy przeglądowej (II.4.62) zebrano najnowszą wiedzę z zakresu utylizacji i bioupcyklingu odpadów przemysłowych w hodowli drożdży niekonwencjonalnych z gatunku *Y. lipolytica*. Szczególny nacisk położono na mikrobiologiczną utylizację odpadów przemysłu spożywczego, w tym odpadów rybnych i zwierzęcych, roślinnych olejów posmażalniczych oraz odpadów po tłoczeniu oliwy z oliwek i oleju palmowego. Omówiono najnowsze trendy w biosyntezie cennych metabolitów (np. lipaz czy oleju mikrobiologicznego) przy jednoczesnym wykorzystaniu odpadów przemysłowych oraz możliwości zastosowania tego gatunku drożdży w bioremediacji oraz detoksykacji uciążliwych odpadów z takich klas związków jak węglowodory alifatyczne i aromatyczne oraz związków nitrowych i fluorowcopochodnych.

Nadal kontynuuję prace związane z badaniem właściwości oleju mikrobiologicznego produkowanego przez komórki drożdży, w tym jego podatność na utlenianie. Uzyskany w moich pracach eksperymentalnych olej mikrobiologiczny pochodzący z hodowli w podłożu z odpadowym olejem po procesie wędzenia ryb cechował się wysoką zdolnością wygaszania rodników DPPH w stosunku do oleju uzyskanego w podłożu z posmażalniczym olejem rzepakowym. Podjęłam także prace nad czynnikami indukującymi produkcję tłuszczów zapasowych w komórkach drożdży olejogennych, limitując nie tylko źródło azotu w podłożu, ale również źródło fosforu. Warto podkreślić, że limitacja fosforu w podłożach do hodowli drożdży olejogennych jest słabo opisaną strategią. Ważną obserwacją okazał się niekorzystny wpływ na plon biomasy jednoczesnego ograniczenia zawartości źródła fosforu i azotu w podłożu i zaskakująco pozytywny wpływ na wydajność biosyntezy lipidów zapasowych.

Wśród cennych biotechnologicznie związków syntezowanych przez komórki tego gatunku znajduje się także gamma-dekalakton, związek zapachowy o przyjemnym kremowo-brzoskwiniowym aromacie stosowany jako dodatek do żywności. Biotechnologiczne metody jego syntezy oparte są o procesy utylizacji kwasów tłuszczowych, głównie kwasu rycynolowego zawartego w oleju rycynowym. W Katedrze Chemii od kilkunastu lat prowadzone są badania nad biotechnologicznymi metodami syntezy laktonu oraz sposobami jego wydzielania z hodowli. W ramach tych działań uczestniczyłam w badaniach nad toksycznością gamma-dekalaktonu względem komórek dzikiego szczepu drożdży *Y. lipolytica* W29, monitorując ich wzrost i zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną w podłożach ze zróżnicowanym dodatkiem laktonu. Porównywano wydajność biotransformacji kwasu rycynolowego do gamma-dekalaktonu przez dziki szczep W29 i modyfikowany szczep MTLY-40-2p, w którym zostały usunięte geny trzech z pięciu oksydaz acetylo-CoA (Aox). Oba szczepy wykazywały zdolność do przeprowadzenia biotransformacji, przy czym w hodowli szczepu modyfikowanego, z uwagi głównie na ograniczenie aktywności enzymu Aox3, nie obserwowano degradacji powstającego laktonu. Ważnym aspektem poruszonym w tych badaniach był wpływ natlenienia na wydajność biosyntezy związku zapachowego. Wyniki prac związanych z pozyskiwaniem gamma-dekalaktonu w hodowli drożdży z gatunku *Y. lipolytica* przedstawiono w następujących rozdziałach w monografiach II.2.4 i II.2.7 oraz publikacji II.4.49 (wymienionych w zał. nr 4 do wniosku).

Warto nadmienić, że jestem współautorką polskojęzycznego artykułu przeglądowego opisującego taksonomię, morfologię, fizjologię oraz charakterystykę genetyczną gatunku *Y. lipolytica* (artykuł II.4.29) i anglojęzycznego artykułu przeglądowego dotyczącego przypadków zakażeń drożdżami tego gatunku (artykuł II.4.46). W pracy II.4.29 opisane zostało

również biotechnologiczne znaczenie gatunku drożdży, uwzględniając historyczne badania sięgające lat 60-tych XX wieku oraz współczesna ich rola w biotechnologii żywności i ochronie środowiska, ze szczególnym uwzględnieniem białek enzymatycznych produkowanych przez te mikroorganizmy.

**5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

W 2000 roku rozpoczęłam naukę w III Liceum Ogólnokształcącym im. Marii Dąbrowskiej w Płocku. W 2003 roku zostałam laureatką konkursu IX Sesji Sejmu Dzieci i Młodzieży – Moja ojczyzna państwem demokratycznym, a rok później laureatką XI Edycji Konkursu Chemicznego im. Ignacego Łukasiewicza. Uzyskałam stypendium Prezesa Rady Ministrów za bardzo dobre wyniki w nauce w roku szkolnym 2001/2002 oraz 2002/2003. W 2004 roku uzyskałam świadectwo maturalne wraz z nagrodą I stopnia im. Marii Dąbrowskiej oraz tytuł „Najlepszy Maturzysta” nadawany przez Prezydenta Miasta Płocka.

W październiku 2004 roku podjęłam studia dzienne w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie na Międzywydziałowym Studium Biotechnologii, które ukończyłam z wynikiem bardzo dobrym w czerwcu 2009 roku na specjalizacji biotechnologia w przemyśle spożywczym, broniąc pracy dyplomowej pt.: „Ocena zdolności szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości ochratoksyny A w środowisku” pod kierunkiem dr hab. Krystyny Steckiej, prof. IBPRS. Praca magisterska została wyróżniona nagrodą specjalną IX edycji konkursu firmy Bayer „Ambasador Zrównoważonego Rozwoju”.

W październiku 2009 roku rozpoczęłam dzienne studia doktoranckie w Katedrze Chemii Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie. W 2013 roku obroniłam z wyróżnieniem pracę doktorską pt. „Badania nad właściwościami katalitycznymi drożdży *Yarrowia lipolytica* w reakcjach biotransformacji” wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Białeckiej-Florjańczyk. W trakcie studiów doktoranckich uzyskałam dwukrotnie stypendium projakościowe oraz stypendium w ramach projektu systemowego Samorządu Województwa Mazowieckiego współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej „Potencjał naukowy wsparciem dla gospodarki Mazowska – stypendia dla doktorantów”.

W 2010 roku podjęłam pracę zawodową w wymiarze ½ etatu jako asystent w Zakładzie Technologii Fermentacji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie, poszerzając swój dorobek naukowy o publikacje i doniesienia konferencyjne z zakresu charakterystyki właściwości funkcjonalnych oraz

zastosowania bakterii fermentacji mlekowej w przemyśle rolno-spożywczym. Współpracę tę kontynuowałam nadal po 2013 roku, czyli po zakończeniu pracy w Instytucie i zatrudnieniu w SGGW, a jej efektem są liczne publikacje naukowe wykazane w zał. 4: II.4.23 - II.4.25, II.4.30 – II.4.35, II.4.37, II.4.38, II.4.42, II.4.44, II.4.47, II.4.58. Prowadzenie badań nad wykorzystaniem preparatów bakteryjnych w warunkach produkcyjnych zrodziło potrzebę prowadzenia wspólnych badań z dr hab. inż. Barbarą Wróbel z Instytutu Technologiczno-Przyrodniczego - Państwowego Instytutu Badawczego, oddział w Falentach (publikacje II.4.14, II.4.16 - II.4.18, II.4.23, II.4.24, II.4.31 - II.4.34, II.4.44, II.4.47). Podczas pracy nad publikacją dotyczącą metabolizmu 1,2-propanodiolu przez wybrane gatunki bakterii z rodzaju *Lactobacillus* współpracowałam z dr hab. Darią Szymanowską - Powalowską, prof. UPP z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu Wydziału Nauk o Żywności i Żywienia (II.4.35).

Wspólnie z naukowcami IBPRS w Warszawie od 2008 roku uczestniczyłam w opracowaniu składu biopreparatów nowej generacji do kiszenia pasz, zawierających izolowane ze środowiska szczepy bakterii fermentacji mlekowej o szczególnych cechach użytkowych. Jeden z preparatów stanowił podstawę biotechnologicznej metody detoksykacji pasz skażonych ochratozyną A (kancerogenną toksyną produkowaną przez pleśnie rozwijające się na płodach rolnych). Druga grupa preparatów miała na celu przedłużanie okresu trwałości i stabilności cech jakościowych kiszonych pasz na cele energetyczne oraz żywieniowe. Rozwiązania te wpływają na ograniczenie problemu ochrony zdrowia zwierząt i ludzi spożywających produkty pochodzenia zwierzęcego w sensie społecznym, ekologicznym i ekonomicznym oraz spełniają oczekiwania rolników i konsumentów zdrowej proekologicznej żywności.

Od 2016 roku realizowałam wspólne działania naukowe z Instytutem Przemysłu Organicznego (Sieć Badawcza Łukasiewicz), a efektem tej współpracy były liczne prace badawcze opublikowane w latach 2017 – 2022 (P1, P2, P4, P5, P6, II.2.8, II.4.39, II.4.51, II.4.53, II.4.55, II.4.57), których współautorem była mgr inż. Małgorzata Wołoszynowska. Współpraca ta dotyczyła przede wszystkim analiz chromatograficznych otrzymywanych przeze mnie olejów mikrobiologicznych z hodowli drożdży *Y. lipolytica* oraz analiz mieszanin po reakcjach estryfikacji i transestryfikacji katalizowanych przez lipazy pochodzenia mikrobiologicznego.

W 2018 roku podjęłam wspólne badania z Katedrą i Kliniką Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Współpraca z dr hab. n. med. Magdaleną Paplińską-Gorycą pozwoliła na poszerzenie tematyki prowadzonych przeze



mnie badań nad drożdżami z gatunku *Y. lipolytica* o prace nad ekspresją genów uczestniczących w szlakach biosyntezy tłuszczów (publikacje P3 i P6).

Zainteresowana zastosowaniem metod inżynierii genetycznej do pozyskiwania nowych biokatalizatorów mających zastosowanie w otrzymywaniu dodatków do żywności nawiązałam w 2017 roku współpracę z dr Damianem Mieleckim z Zakładu Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Efektem współpracy miało być uzyskanie szczepu zdolnego do syntezy związków zielonej nuty zapachowej (aldehydów oraz alkoholi C6 i C9). Wspólne działania naukowe pozwoliły na przeprowadzenie próby otrzymania modyfikowanych szczepów drożdży *Y. lipolytica* zdolnych do nadekspresji dwóch genów pochodzących z rośliny *Arabidopsis thaliana* (*LOX* oraz *HPL* kodujących odpowiednio enzym lipooksygenazę oraz hydroperoksyliazę). Efektem działań naukowych była prezentacja na XLIV Przeglądzie Dorobku Kół Naukowych SGGW 8.12.2017 r. pt.: “Przygotowanie szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* zdolnych do nadekspresji wybranych genów *AtLOX* oraz *AtHPL* pochodzących z rośliny *Arabidopsis thaliana*” (Widomska M., Pielnińska A., Mielecki D., Fabiszewska A.).

W roku 2021 nawiązałam współpracę z dr Tomaszem Stępniewskim z firmy InterAx Biotech AG (Villigen, Szwajcaria) w celu kontynuacji doświadczeń opublikowanych w czasopiśmie *Biotechnology Letters* (II.4.55) z wykorzystaniem techniki dokowania substratu i modelowania dynamicznego białek enzymatycznych. Wspólnie realizowany projekt naukowy ma na celu udzielić odpowiedzi na pytanie, dlaczego reakcje estryfikacji z udziałem kwasów cynamonowych katalizowane przez lipazę B z drożdży *C. antarctica* zachodzą z bardzo małą wydajnością w porównaniu z ich nasyconymi pochodnymi bez podwójnego wiązania w łańcuchu alifatycznym. Obecnie w przygotowaniu znajduje się publikacja naukowa autorstwa: Fabiszewska A., Stępniewski T., Zieniuk B., Jasińska K.

Podsumowując interdyscyplinarne podejście w mojej pracy naukowej do rozwiązywania podejmowanych przeze mnie tematów badawczych chciałabym podkreślić, że wszystkie one odpowiadają na teraźniejsze problemy społeczeństw. Uważam, że jest to filozofia, która powinna przyświecać współczesnym naukom o życiu. Stawiam hipotezy badawcze i dociekam odpowiedzi na zadane pytania w zakresie badań podstawowych, ale jednocześnie zdaję sobie sprawę ze służebnej roli nauki wobec praktyki, poszukując możliwości wykorzystania potencjału drzemiącego w świecie mikroorganizmów dla podnoszenia jakości życia człowieka.

## **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.**

### **6.1. Osiągnięcia dydaktyczne**

Moja działalność dydaktyczna prowadzona jest przede wszystkim na Wydziale Technologii Żywności SGGW w Warszawie. Prowadziłam również zajęcia dla Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu (później Wydziału Ogrodnictwa i Biotechnologii), Wydziału Żywienia Człowieka, Wydziału Leśnego oraz Wydziału Inżynierii Produkcji. Pracę dydaktyczną rozpoczęłam podczas studiów doktoranckich, a mój średni wymiar roczny realizowanych zajęć dydaktycznych w ciągu ostatnich 3 lat wynosi około 260 godzin.

Prowadzę ćwiczenia laboratoryjne, ćwiczenia audytoryjne oraz wykłady z zakresu chemii ogólnej, nieorganicznej oraz organicznej. Byłam koordynatorem przedmiotu „Chemia” dla studentów stacjonarnych kierunku ochrona zdrowia roślin (Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu) od roku akademickiego 2015/16 do roku 2019/20. Koordynowałam przedmiot „Chemia ogólna i organiczna” dla studentów kierunku dietetyka – studia niestacjonarne (Wydział Żywienia Człowieka) od roku akademickiego 2016/17 do roku 2020/21 oraz dodatkowo dla kierunku żywienie człowieka i ocena żywności od roku akademickiego 2017/18 do roku 2020/21. Powyższych ról nie podjęłam jedynie w roku akademickim 2018/19 z uwagi na urlop macierzyński. Od roku akademickiego 2020/21 pełnię rolę koordynatora przedmiotu „Chemia ogólna i nieorganiczna” dla studentów kierunków technologia żywności i żywienie człowieka oraz bezpieczeństwa żywności – studia stacjonarne (Wydział Technologii Żywności).

Opracowałam ćwiczenie dla studentów studiów III stopnia (obecnie Szkoły Doktorskiej SGGW) pt. “Oznaczanie aktywności lipolitycznej drożdży”, które współprowadziłam w ramach przedmiotu „Współczesne trendy badawcze w chemii żywności”. Przygotowałam i przeprowadziłam wykłady z przedmiotu fakultatywnego „Technologia preparatów enzymatycznych” dla studentów II stopnia kierunku technologia żywności i żywienie człowieka. Ponadto od roku akademickiego 2017/18 wykładam przedmiot “Food chemistry” w języku angielskim w Szkole Głównej Turystyki i Hotelarstwa Vistula.

Od roku 2014 byłam opiekunem projektów badawczych studentów Koła Naukowego Biotechnologów KNBiotech sekcji biokatalizy enzymatycznej, wielokrotnie nagradzanych oraz wyróżnianych podczas Przeglądu Dorobku Kół Naukowych SGGW oraz na konferencjach ogólnopolskich. Wśród najważniejszych osiągnięć wymienić należy następujące nagrody i wyróżnienia studentów realizujących projekty pod moją opieką:

- I nagroda publiczności za poster pt. "Ocena możliwości zastosowania odpadów przemysłu spożywczego w mikrobiologicznej syntezie lipaz przez drożdże *Y. lipolytica*" (Patrycja Mazurczak, Bartłomiej Zieniuk, Agnieszka Pielnińska) podczas IV Międzyuczelnianego Sympozjum Biotechnologicznego Symbioza (29-31.05.2015);

- I nagroda za projekt "Drożdże *Yarrowia lipolytica* jako biotechnologiczna mikrofabryka" (Patrycja Mazurczak, Bartłomiej Zieniuk, Agnieszka Pielnińska) podczas VII Konkursu Studenckich Projektów Naukowych SGGW w Warszawie (15.01.2016);

- Wyróżnienie za referat pt. "Wykorzystanie olejowych odpadów po procesie wędzenia ryb w produkcji oleju mikrobiologicznego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* KKP 379" (Patrycja Mazurczak, Bartłomiej Zieniuk, Agnieszka Pielnińska) podczas XLII Przeglądu Dorobku Kół Naukowych SGGW (15.01.2016)

- I nagroda za poster "Próba biotechnologicznego zagospodarowania odpadów przemysłu spożywczego i paliwowego z wykorzystaniem lipolitycznych drożdży *Yarrowia lipolytica*" (Patrycja Mazurczak, Bartłomiej Zieniuk, Agnieszka Pielnińska) podczas XLIII Przeglądu Dorobku Kół Naukowych SGGW (9.12.2016);

- III nagroda za referat pt. "Jakościowa analiza produktów hydrolizy triacylogliceroli katalizowanych przez enzymy lipolityczne *Yarrowia lipolytica* w hodowli okresowej" (Aleksandra Zielińska) podczas XLIII Przeglądu Dorobku Kół Naukowych SGGW (9.12.2016);

- Wyróżnienie za referat pt. "Badania nad wpływem hydrofobowego źródła węgla na syntezę enzymów lipolitycznych przez szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* ATCC 90812" (Agata Bienkowska, Katarzyna Kozik) podczas XLIII Przeglądu Dorobku Kół Naukowych SGGW (9.12.2016);

- Wyróżnienie za projekt "Biotechnologiczne wykorzystanie niekonwencjonalnych drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica*" (Marta Wiatrowska, Julia Sygocka, Bartłomiej Zieniuk), podczas IX Konkursu Studenckich Projektów Naukowych (30.11.2017);

- Wyróżnienie za referat "Wpływ źródła węgla na przebieg procesów syntezy oleju mikrobiologicznego przez drożdże *Yarrowia lipolytica*" (Julia Sygocka, Bartłomiej Zieniuk) podczas XLIV Przeglądu Dorobku Kół Naukowych SGGW (8.12.2017);

- I nagroda za doniesienie pt. "Wpływ olejów ekstrahowanych z nasion wybranych roślin na aktywność lipolityczną drożdży *Yarrowia lipolytica*" (Maria Strąk, Bartłomiej Zieniuk) podczas III Ogólnopolskiego Spotkania Młodych Technologów Żywności organizowanego w SGGW w Warszawie (27.09.2019);

- Wyróżnienie za doniesienie pt. "Wpływ wybranych metod sterylizacji na jakość mikrobiologiczną folii skrobiowych oraz badania nad metodami jej degradacji" (Katarzyna Kozik) podczas XLVI Przeglądu Dorobku Kół Naukowych SGGW w Warszawie (6.12.2019);

- Wyróżnienie za doniesienie pt. "Wpływ wybranych czynników procesu liofilizacji na aktywność enzymów lipolitycznych drożdży *Yarrowia lipolytica*" (Karina Jasińska) podczas XLVI Przeglądu Dorobku Kół Naukowych SGGW w Warszawie (6.12.2019);

- Wyróżnienie za referat pt. "Selekcja drożdży olejogennych z gatunku *Yarrowia lipolytica* pod względem wydajności syntezy oleju mikrobiologicznego w podłożach z odpadowym źródłem węgla" (Paulina Siedlecka) podczas XLVIII Przeglądu Dorobku Kół Naukowych SGGW w Warszawie (10.12.2021);

- I nagroda za poster pt. "Roślinna alternatywa serów dojrzewających jako innowacja wśród analogów nabiału" (Jan Kacprzak, Aleksandra Gawinowska, Dominika Dmowska) podczas XLVIII Przeglądu Dorobku Kół Naukowych SGGW w Warszawie (10.12.2021).

Byłam promotorem 11 prac magisterskich, 9 prac inżynierskich oraz 1 pracy licencjackiej studentów Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie: Wydziału Technologii Żywności (kierunków technologia żywności i żywienie człowieka oraz bezpieczeństwo żywności), Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu (obecnie Wydziału Biologii i Biotechnologii, kierunku biotechnologia) oraz Wydziału Rolnictwa i Biologii (obecnie Wydziału Biologii i Biotechnologii, kierunku biologia). Byłam recenzentem 15 prac inżynierskich i 1 pracy magisterskiej. Obecnie pełnię rolę promotora jednej pracy magisterskiej oraz trzech prac inżynierskich.

Byłam promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim dr inż. Bartłomieja Zieniuka (tytuł rozprawy doktorskiej “Enzymatyczna synteza i badanie aktywności biologicznej estrów związków fenolowych jako dodatków do żywności”, promotor prof. dr hab. Ewa Białecka-Florjańczyk), która została obroniona z wyróżnieniem 12.10.2021 roku w Instytucie Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Obecnie jestem promotorem pomocniczym dwóch prac doktorskich realizowanych w Szkole Doktorskiej SGGW w Warszawie w dyscyplinie technologia żywności i żywienia pod opieką dr hab. Doroty Nowak:

- mgr inż. Katarzyny Wierzchowskiej (tytuł pracy “Badania nad otrzymaniem oleju mikrobiologicznego z komórek drożdży olejogennych i opracowanie koncepcji jego wykorzystania w produkcji emulsji spożywczych”, rozpoczęcie kształcenia w Szkole Doktorskiej w roku 2020/21);
- mgr inż. Kariny Jasińskiej (tytuł pracy “Badania nad enzymatyczną modyfikacją związków fenolowych i jej wykorzystaniem do poprawy jakości produktów spożywczych bogatych w tłuszcz”, rozpoczęcie kształcenia w Szkole Doktorskiej w roku 2021/22).

## **6.2. Osiągnięcia organizacyjne**

Aktywnie włączam się w działalność organizacyjną Instytutu Nauk o Żywności SGGW w Warszawie i Wydziału Technologii Żywności (dawniej Wydziału Nauk o Żywności). Byłam członkiem Rady Wydziału Nauk o Żywności w kadencji 2016 - 2019. Następnie byłam członkiem Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia w kadencji 2019 – 2020 oraz obecnie jestem członkiem tejże rady w kadencji 2020 - 2024. Od 2020 roku jestem członkinią komisji naukowej w ramach prac Rady Dyscypliny oraz członkinią zespołu roboczego ds. programów studiów na Wydziale Technologii Żywności.

Jestem absolwentką Międzywydziałowego Studium Biotechnologii, dlatego część mojej działalności organizacyjnej związana jest z kierunkiem biotechnologia w SGGW w Warszawie. Od 2014 roku jestem zaangażowana w prace Koła Naukowego Biotechnologów KNBiotech. W 2016 roku podjęłam się funkcji opiekuna sekcji biokatalizy enzymatycznej, a od 2017 pełnię funkcję opiekuna koła. W ramach koła działa obecnie 6 sekcji tematycznych: biokatalizy enzymatycznej, chemiczna, bioinformatyczna, roślinna, zwierzęca i biotechnologii żywności. Koło naukowe od lat angażuje się w organizację Pikniku Naukowego Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik, Dni SGGW oraz współpracuje z Warszawskim Stowarzyszeniem Biotechnologicznym "Symbioza". Członkowie koła w ramach swojej działalności realizują indywidualne i zespołowe projekty naukowe, uczestniczą w pozyskiwaniu środków w ramach grantów, przygotowują wystąpienia na konferencje, mają możliwość przygotowania własnych publikacji naukowych oraz uczestniczą w popularyzacji nauki.

Od 2017 roku aktywnie włączam się w organizację stoiska Wydziału podczas Dni SGGW, odpowiadając za aktywności na stoisku Koła Naukowego Biotechnologów oraz od 2017 roku przygotowuję kącik dziecięcy z aktywnościami dla najmłodszych uczestników tej imprezy plenerowej odwiedzających pokazy Wydziału Technologii Żywności.

Od 2019 do 2021 roku byłam członkiem Rady Programowej ds. kierunku biotechnologia przy Wydziale Ogrodnictwa i Biotechnologii, a od 2021 jestem członkiem Rady Programowej przy Wydziale Biologii i Biotechnologii SGGW w Warszawie. Ponadto pełnię role: opiekuna praktyk studenckich na kierunku biotechnologia (od roku akademickiego 2019/20), członkini zespołu roboczego ds. promocji i współpracy ze szkołami średnimi oraz zespołu roboczego ds. praktyk Rady Programowej przy Wydziale Biologii i Biotechnologii (od 2021 roku).

### **6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę**

Od 2017 roku uczestniczę w organizacji stoiska Koła Naukowego Biotechnologów KNBiotech podczas Pikniku Naukowego Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik. Pełniłam rolę koordynatora wystawcy oraz opiekuna stoiska podczas 23. edycji Pikniku ("My i maszyny" w 2019 roku) oraz 24. edycji hybrydowej ("Klimat i my" w 2021 roku).

Prowadziłam zajęcia dotyczące właściwości kationów i anionów w roztworach wodnych dla uczniów gimnazjum w ramach otwartych laboratoriów SGGW w dniu 19.05.2016 roku. Przeprowadziłam według autorskiego konspektu w dniu 4.10.2021 roku lekcję hybrydową z uczniami klasy 4 Szkoły Podstawowej nr 11 im. Bolesława Chrobrego w Płocku

pt. „Nauka wokół nas”. W 2021 roku podjęłam współpracę z SGGW TV, przygotowując scenariusz i biorąc udział w nagraniu filmów popularnonaukowych dla kanału YouTube SGGW Science: „Olej mikrobiologiczny”, „Życie w maszynie” oraz „Zielona chemia”.

Jestem współautorką publikacji popularnonaukowej w Piśmie SGGW Agricola (nr 110, grudzień 2020, ISSN 1640-4734) pt. „Badania w Katedrze Chemii oraz Katedrze Technologii i Oceny Żywności Instytutu Nauk o Żywności”.

## **7. Inne ważne informacje dotyczące kariery zawodowej**

### **7.1. Dorobek publikacyjny**

Mój dorobek publikacyjny obejmuje 82 oryginalne prace twórcze, w tym 72 artykuły naukowe oraz 10 rozdziałów w monografiach naukowych. 38 artykułów zostało opublikowanych w czasopismach znajdujących się na liście JCR (Journal Citation Report). Pełne zestawienie dorobku publikacyjnego przedstawiono w tabeli 3. Wartość punktowa wszystkich publikacji według wykazu czasopism naukowych MEiN zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 2454, w tym po uzyskaniu stopnia naukowego doktora 2269. Sumaryczny Impact Factor wynosi 112,829; w tym po uzyskaniu stopnia naukowego doktora 105,495. Łączna liczba cytowań według bazy Web of Science to 397 (bez autocytowań 315), zaś według bazy Scopus 424 cytowań (bez autocytowań 340). Mój indeks Hirsha wynosi 13 (wg bazy Web of Science oraz Scopus).

Pełna lista moich osiągnięć naukowych znajduje się w załączniku 4 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego. W tabeli 4 zestawiono został dorobek naukowy przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.

Tabela 3. Zestawienie dorobku publikacyjnego

Lp.	Nazwa czasopisma	Liczba punktów MEiN	IF	IF 5-letni
<b><i>Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</i></b>				
1	Rozdział w monografii (2010, 2012)	3 x 1 4 x 1	-	-
2	Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering (2010, 2011, 2012 x 2, 2013 x 3)	6 x 2 5 x 5	-	-
3	Wiadomości Chemiczne (2011)	6	-	-
4	Episteme: Czasopismo Naukowo-Kulturalne (2011, 2012, 2013)	6 x 1 5 x 1 4 x 1	-	-
5	Żywność. Nauka. Technologia. Jakość (2011)	9	0,155	0,295 (z 2013 r.)
6	Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego (2011 x 2, 2013)	0 x 2 2 x 1	-	-
7	Ultrasonics Sonochemistry (2012)	45	3,516	3,708
8	Journal of Molecular Catalysis (Enzymatic B) (2012)	25	2,823	2,805
9	Postępy Mikrobiologii (2012)	15	0,207	0,227
10	Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie (2013)	5	-	-
11	Problemy Inżynierii Rolniczej (2013)	4	-	-
12	Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (2013)	15	0,633	0,761
<b>Razem pozycje 1 - 12</b>		<b>185</b>	<b>7,334</b>	<b>7,796</b>
<b><i>Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</i></b>				
<b><i>Wchodzące w skład Osiągnięcia</i></b>				
13	Żywność. Nauka. Technologia. Jakość (2017)	13	-	-
14	Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych (2019)	20	-	-
15	Biomolecules (2019)	100	4,082	5,362
16	Foods (2021)	100	5,561	5,940
17	International Journal of Molecular Sciences (2022)	140	6,208	6,628
18	Processes (2022)	70	3,352	3,338
<b>Razem pozycje 13 - 18</b>		<b>443</b>	<b>19,203</b>	<b>21,268</b>
<b><i>Pozostałe</i></b>				
19	Applied Biochemistry and Microbiology (2014)	15	0,735	0,772
20	Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering (2014 x 2, 2015 x 2, 2016 x 2, 2017 x 2, 2018)	5 x 2 12 x 7	-	-
21	Episteme: Czasopismo Naukowo-Kulturalne (2014)	4	-	-
22	Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences (2014)*	7	-	-
23	Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego (2014)	5	-	-
24	Annals of Microbiology (2015)	15	1,232	1,331
25	Postępy Mikrobiologii (2015)	15	0,236	0,290
26	Chilean Journal of Agricultural Research (2015)	25	0,637	0,943
27	Electronic Journal of Biotechnology (2017)	15	1,881	1,591
28	Chemical and Biochemical Engineering Quarterly (2017)	20	1,383	1,275
29	Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych (2017)	13	-	-
30	Rozdział w monografii (2017 x 2, 2018, 2020 x 4, 2021)	5 x 4 20 x 3 0 x 1	-	-
31	Mini-Reviews in Medicinal Chemistry (2018)	30	2,842	2,952

\*czasopismo na liście JCR od 2020 roku, nie posiada IF

Tabela 3. Zestawienie dorobku publikacyjnego (ciąg dalszy)

32	Journal of Polymers and the Environment (2018, 2021)	30 70	2,765 4,705	2,896 4,261
33	World Journal of Microbiology and Biotechnology (2018, 2019 x 2, 2022)	20 x 1 70 x 3	2,652 2,477 x 2 4,253	2,391 2,518 x 2 4,272
34	Żywność. Nauka. Technologia. Jakość (2018)	13	-	-
35	Current Pharmaceutical Biotechnology (2018)	30	1,516	1,743
36	Bioprocess and Biosystems Engineering (2020)	70	3,210	2,970
37	Biotechnology and Biotechnological Equipment (2020)	40	1,632	2,029
38	Przemysł spożywczy (2020)	5	-	-
39	Sustainability (2020)	70	3,251	3,473
40	Fermentation (2020, 2021)	20 40	3,975 5,123	-
41	Biocatalysis and Biotransformation (2021)	40	2,325	2,303
42	Proceedings (2021 x 2)	5 x 2	-	-
43	Biotechnology Letters (2021)	70	2,716	2,672
44	Biomolecules (2021 x 2)	100 x 2	6,064 x 2	6,191 x 2
45	Energies (2021)	140	3,252	3,333
46	Applied Sciences (2021)	100	2,838	2,921
47	Waste and Biomass Valorization (2022)	70	3,449	3,575
48	Antioxidants (2022)	100	7,675	7,886
49	Molecules (2022)	140	4,927	5,110
<b>Razem pozycje 19 – 49</b>		<b>1826</b>	<b>86,292</b>	<b>78,407</b>
<b>Razem pozycje 13 - 49</b>		<b>2269</b>	<b>105,495</b>	<b>99,675</b>
<b>Razem pozycje 1 - 49</b>		<b>2454</b>	<b>112,829</b>	<b>107,471</b>

Tabela 4. Zestawienie dorobku naukowego przed i po uzyskaniu stopnia doktora

	<b>Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</b>	<b>Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</b>	<b>Łącznie</b>
<b>Publikacje naukowe</b>	<b>23</b>	<b>59</b>	<b>82</b>
- publikacje naukowe znajdujące się w bazie JCR (w tym wykorzystane w Osiągnięciu)	5 -	33 (4)	38
- publikacje nie znajdujące się w bazie JCR (w tym wykorzystane w Osiągnięciu)	16 -	18 (2)	34
- rozdziały w monografiach	2	8	10
<b>Projekty naukowo-badawcze</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
- krajowe finansowane przez NCN lub MNiSW/MEiN	1	3	4
- krajowe finansowane ze środków unijnych	2	0	2
- pozostałe (np. „grant wewnętrzny”)	2	2	4
<b>Doniesienia konferencyjne</b>	<b>19</b>	<b>5</b>	<b>24</b>
- komunikaty naukowe prezentowane w formie posterów na konferencjach zagranicznych	0	1	1
- komunikaty naukowe prezentowane w formie posterów na konferencjach krajowych	14	0	14
- referaty/wykłady wygłoszone na konferencjach naukowych zagranicznych	0	1	1
- referaty wygłoszone na konferencjach naukowych krajowych	5	1	6
- komunikaty naukowe zaprezentowane w formie artykułu na konferencjach zagranicznych	0	2	2



## 7.2. Udział i rola w projektach badawczych

Podczas mojej pracy naukowej brałam udział w pozyskiwaniu środków finansowych na działalność badawczą oraz badawczo-dydaktyczną. Angażowałam się w realizację projektów i zadań badawczych w roli zarówno wykonawcy jak i kierownika projektu. W trakcie studiów doktoranckich byłam wykonawcą w zadaniu realizowanym na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi pt. „Wpływ mikrobiologicznej jakości kiszonych pasz objętościowych na stan higieny mleka pochodzącego z gospodarstw ekologicznych” oraz w projekcie badawczym finansowanym przez Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „Badania nad możliwościami wykorzystania drożdży w procesach syntezy estrów organicznych”. Następnie kierowałam projektem pt. „Próba zagospodarowania glicerolu w pożywkach stosowanych w mikrobiologicznej produkcji enzymów lipolitycznych” w ramach wewnętrznego trybu konkursowego dla młodego pracownika nauki Wydziału Nauk o Żywności SGGW w roku 2012/2013. Istotne doświadczenie zebrałam także pełniąc rolę wykonawcy w dwóch projektach w ramach Programu Innowacyjna Gospodarka Poddziałanie 1.3.2 ("Nowy szczep bakterii *Lactobacillus plantarum* S o zdolności degradacji ochratoksyny A i jego zastosowanie do dekontaminacji pasz objętościowych" oraz "Nowy szczep bakterii *Lactobacillus buchneri* A oraz wieloskładnikowy preparat do konserwowania roślin wysokoskrobiowych").

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora kierowałam dwoma grantami w ramach wewnętrznego trybu konkursowego dla młodego pracownika nauki Wydziału Nauk o Żywności SGGW w roku 2015 oraz 2017 o tytułach: „Czynniki warunkujące efektywną produkcję i działanie lipaz i lipooksygenaz przez drożdże *Yarrowia lipolytica* - Badania nad czynnikami determinującymi wysoką aktywność zewnątrzkomórkowej lipazy drożdży *Yarrowia lipolytica* w podłożach zawierających lipidowe źródła węgla” oraz “Enzymy syntetyzowane przez drożdże *Yarrowia lipolytica* jako biokatalizatory – Wykorzystanie właściwości lipolitycznych drożdży *Yarrowia lipolytica* do waloryzacji odpadowego oleju po procesie wędzenia ryb”.

W roku 2019 otrzymałam finansowanie działania badawczego w ramach konkursu MINIATURA 3 pt.: “Analiza przebiegu szlaków biosyntezy tłuszczów w komórkach drożdży modelowych *Yarrowia lipolytica* w podłożach zawierających lipidowe źródło węgla” finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki. W latach 2021 – 2022 kierowałam projektem badawczym pt.: „Roślinna alternatywa serów dojrzewających z udziałem pleśni jako innowacja wśród analogów nabiału” finansowanym ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki w ramach programu "Studenckie koła naukowe tworzą innowacje". W 2021 roku pełniłam rolę wykonawcy w projekcie Narodowego Centrum Nauki OPUS 15 pt.: “Charakterystyka

determinantów genetycznych biosyntezy kwasu propionowego oraz analiza ich funkcjonalności w wybranych bakteriach fermentacji mlekowej”.

### **7.3. Udział w konferencjach**

W czasie dotychczasowej pracy naukowej byłam współautorką licznych doniesień konferencyjnych, w tym wzięłam udział w 18 krajowych i międzynarodowych konferencjach, sympoziach i seminariach. Prezentowałam łącznie 23 doniesienia konferencyjne, w tym 6 były to prezentacje ustne. Zaprezentowałam jeden wykład plenarny na zaproszenie University of Sargodha w Pakistanie.

### **7.4. Działalność w towarzystwach naukowych i zespołach eksperckich oraz konsorcjach i sieciach badawczych, recenzje grantów**

Przygotowując wniosek grantowy w ramach konkursu SONATA 11 w 2016 roku zainicjowałam utworzenie konsorcjum przy realizacji wspólnego projektu badawczego „Odpowiedź komórek drożdży olejogennych na obecność triacylogliceroli w podłożu hodowlanym na przykładzie modelowego gatunku *Yarrowia lipolytica*”, w skład którego weszła Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (Lider Konsorcjum), Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (Partner) oraz Instytut Przemysłu Organicznego w Warszawie (Partner). W 2021 roku pełniłam rolę członkini Rady Naukowej sympozjum “9 and 3/4 Intercollegiate Biotechnology Symposium SYMBIOZA”, którego organizatorem było Warszawskie Stowarzyszenie Biotechnologiczne “Symbioza”. Od 2022 roku należę do Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności Oddział Warszawski.

W 2013 roku pełniłam funkcję edytora zarządzającego w dziale Inżynieria wydawnictwa Versita. Obecnie jestem edytorem dwóch numerów specjalnych w czasopiśmie “Applied Sciences” oraz “Agronomy” wydawnictwa MDPI. Oba czasopisma znajdują się na liście JCR. W 2018 roku byłam recenzentem grantu w ramach programu Narodowego Centrum Nauki “Diamentowy Grant”. W 2022 roku przygotowałam opinię dla Zastępcy Głównego Inspektora Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych.

### **7.5. Współpraca międzynarodowa, współpraca z przemysłem, recenzje publikacji**

W 2021 roku rozpoczęłam istotną współpracę z naukowcami z firmy InterAx Biotech AG (Villigen, Szwajcaria) oraz z Pompeu Fabra University, która zaowocowała wspólnym działaniem naukowym i zastosowaniem nowych technik badawczych. Obecnie przygotowujemy publikację naukową dotyczącą badań z zakresu biokatalizy enzymatycznej.

W 2022 roku zdecydowałam się na ważną współpracę z dr Nilessem Kolhe, który obronił swoją pracę doktorską pt. “Uranium interactions with marine yeast *Yarrowia lipolytica*” w Savitribai Phule Pune University w Indiach. Wspólnie przygotowaliśmy projekt pt. “Searching for specific biocatalysts for phenolics lipophilization - an insight into isoenzymes of *Yarrowia lipolytica* yeast lipases (Poszukiwanie specyficznych bioaktywatorów do reakcji lipofilizacji związków fenolowych - badania nad izoenzymami lipaz drożdży *Yarrowia lipolytica*)” w ramach konkursu Narodowego Centrum Nauki Polonez BIS 2, którego rozstrzygnięcie nastąpi w grudniu bieżącego roku. Projekt ma na celu otrzymanie efektywnych biokatalizatorów opartych na enzymach lipolitycznych drożdży *Y. lipolytica* i ich wykorzystanie w reakcjach lipofilizacji kwasów fenolowych, w tym w sposób szczególny kwasu cynamonowego i jego pochodnych, nad którymi prowadzę badania w zespole w Katedrze Chemii SGGW.

Posiadam różnorodne doświadczenie w zakresie współpracy z przemysłem. W 2008 roku odbyłam miesięczną praktykę zawodową w Okręgowej Mleczarni Spółdzielczej w Sierpcu. Współpracowałam z firmą POLSIL Biopreparaty Sp. J. w ramach pracy nad opracowaniem, produkcją oraz dystrybucją preparatów do kiszenia pasz i preparatów do kiszenia surowców roślinnych z przeznaczeniem na biogaz produkowanych w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie. W 2020 roku nawiązałam współpracę z firmą Veg ProBio (porozumienie nr CIiTT/37/2020), której efektem było złożenie oferty w ramach konkursu Bon na Innowacje oraz złożenie i uzyskanie projektu badawczego w ramach programu MEiN “Studenckie koła naukowe tworzą innowacje”. Pełniąc funkcję opiekuna praktyk studenckich na kierunku biotechnologia kontaktuję się z różnymi instytutami naukowymi oraz przedsiębiorstwami branżowymi w ramach obowiązków związanych z organizacją studenckich praktyk zawodowych.

Wykonałam łącznie 58 recenzji publikacji w czasopismach naukowych, w tym po uzyskaniu stopnia naukowego doktora 57. 56 recenzji zostało wykonanych dla czasopism zagranicznych, w tym 54 recenzji wykonałam dla czasopism ujętych w wykazie Journal Citation Reports (JCR).

## **7.6. Otrzymane nagrody i wyróżnienia**

Istotnym osiągnięciem uzyskanym przeze mnie w trakcie trwania studiów magisterskich było wyróżnienie w sesji posterowej na XXXIV Przeglądzie Dorobku Kół Naukowych SGGW w 2007 roku doniesienia naukowego mojego współautorstwa pt. „Chemoselektywna hydroliza

wiązań estrowych z udziałem drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*” (Białecka-Florjańczyk E., Majewska E., Kapturowska A., Stobnicka A.). W 2009 roku otrzymałam nagrodę specjalną w 9. edycji konkursu firmy Bayer „Ambasador Zrównoważonego Rozwoju” za pracę magisterską pt.: „Ocena zdolności szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości ochratoksyny A w środowisku”.

W trakcie trwania studiów doktoranckich byłam wyróżniana stypendium naukowym za wyniki w nauce dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2011/2012 oraz 2012/2013. Moja praca naukowa nad przygotowaniem rozprawy doktorskiej została doceniona poprzez stypendium i udzielenie wsparcia towarzyszącego w ramach projektu systemowego Samorządu Województwa Mazowieckiego pn. *Potencjał naukowy wsparciem dla gospodarki Mazowsza – stypendia dla doktorantów* (Priorytet VIII Regionalne kadry gospodarki, Działanie 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji, nr umowy 74/ES/ZS-II/W-052/12). Za uzyskane osiągnięcia naukowe JM Rektor SGGW wyróżnił mnie dyplomem uznania w 2013 roku.

W 2012 roku zdobyłam nagrodę główną w Ogólnopolskim Konkursie „Student – Wynalazca” organizowanym przez Politechnikę Świętokrzyską w Kielcach w ramach Projektu „Systemowe Wsparcie Wynalazczości Studenckiej” – Program „KREATOR INNOWACYJNOŚCI - wsparcie innowacyjnej przedsiębiorczości akademickiej”. Ponadto przy okazji tego osiągnięcia byłam adresatką listu gratulacyjnego Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz dyplomu uznania Światowej Organizacji Własności Intelektualnej (WIPO Certificate of Merit).

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora zdobyłam I nagrodę XXII Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ (V International Session of Young Scientific Staff), która odbyła się w dniach 18-19 maja 2017 w Szczecinie za doniesienie pt. „Drożdże *Yarrowia lipolytica* jako biotechnologiczna platforma do zagospodarowania lipidowego odpadu przemysłu rybnego.” (Fabiszewska A., Mazurczak P., Zieniuk B., Białecka-Florjańczyk E., Nowak D.). JM Rektor SGGW wyróżnił mnie dwukrotnie zespołową nagrodą naukową II stopnia w 2019 i 2020 roku oraz nagrodą zespołową za działalność organizacyjną w 2021 roku. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w 2020 roku w uznaniu osiągnięć naukowych JM Rektor SGGW przyznał mi okresowe zwiększenie wynagrodzenia w ramach motywacyjnego systemu wynagradzania pracowników.

Jestem współautorką wynalazków, które nagradzane były na wystawach wynalazczości:

- a. rozwiązanie „Biotechnologiczna metoda dekontaminacji pasz zanieczyszczonych ochratoksyną A” („Biotechnological method for decontamination of feed contaminated with ochratoxin A”), twórcy: Zielińska K., Stecka K., Kapturowska A., Kupryś M.

- medal złoty z wyróżnieniem podczas 5 Międzynarodowej Warszawskiej Wystawy Wynalazków (5th International Warsaw Invention Show), Warszawa, 3-5.11.2011
- b. rozwiązanie „Biotechnologiczna metoda dekontaminacji pasz zanieczyszczonych ochratoksyną A i patogenami” („Biotechnological method for decontamination of feed contaminated with ochratoxin A and pathogens”), twórcy: Zielińska K., Stecka K., Kapturowska A., Kupryś M, Miecznikowski A.
- medal srebrny podczas Międzynarodowych Targów iENA w Norymberdze „Pomysły – Wynalazki - Nowe produkty”, 27-30.10.2011
  - medal złoty: XV Międzynarodowy Salon Wynalazków i Innowacyjnych Technologii „ARCHIMEDES” w Moskwie w dniach 20-23.03.2012
  - medal brązowy podczas 40 Międzynarodowej Wystawy Wynalazków. „International Exhibition Of. Inventions Of Geneva”. Genewa, 18-22.04.2012
- c. rozwiązanie „Biotechnologiczna metoda konserwowania roślin wysokoskrobiowych przeznaczonych do produkcji pasz, biopaliw ciekłych i gazowych” („Biotechnological method of preservation of high starch plants for the production of fodders, liquid and gaseous biofuels”), twórcy: Zielińska K., Fabiszewska A., Stecka K., Świątek M.
- złoty medal XVI Moskiewskiego Salonu Wynalazków i Innowacyjnych Technologii „ARCHIMEDES – 2013”, 2-5.04.2013
  - medal srebrny Międzynarodowych Targów Innowacji w Zagrzebiu, 12-17.10.2013
  - srebrny medal podczas 65 Międzynarodowych Targów „Pomysły, Wynalazki, Nowe Produkty iENA 2013”, Norymberga, 31.10-3.11.2013
  - nagroda: Special Certificate President of Istanbul Aydin University na Międzynarodowych Targach Innowacji w Zagrzebiu 12-17.10.2013
  - nagroda: Dyplom Volga State University of Technology University na Międzynarodowych Targach Innowacji w Zagrzebiu 12-17.10.2013
  - medal srebrny: Belgijskie i Międzynarodowe Targi Innowacji i Technologii Eureka w Brukseli 14-16.11.2013
  - list gratulacyjny Marszałka Województwa Mazowieckiego Adama Struzika, 2.12.2013

Byłam także laureatką nagrody EuroLider 2012 w kategorii produkt pt.: „Grupa biopreparatów do kiszenia pasz i probiotycznych” razem z zespołem twórców: Grzybowski R.A., Stecka K.M., Zielińska K.J., Piasecka-Józwiak K., Miecznikowski A.H., Kupryś M.

### 7.7. Odbyte szkolenia i kursy

Swoje kompetencje zawodowe podnosiłam podczas szkoleń i kursów. W 2009 roku uczestniczyłam w szkoleniach „System zarządzania w laboratorium i jego akredytacja”, „Zintegrowany system zarządzania jakością (ISO 9001, ISO 22000) w przemyśle spożywcym” oraz „Auditor wewnętrzny oceniający system zarządzania w laboratorium” organizowanych przez Centrum Analityczne SGGW.

Z uwagi na pracę w projektach w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka wzięłam udział w szkoleniach organizowanych przez Ośrodek Przetwarzania Informacji (OPI) pt. „Ochrona własności intelektualnej w jednostkach naukowych” w Warszawie 28.03.2011, szkoleniu „Rozliczanie projektów w ramach Poddziałania 1.1.1, 1.3.1 i 1.3.2 Programu Operacyjna Gospodarka, 2007-2013” w Warszawie w dniu 31.05.2011 oraz w dniu 29.05.2012 i szkoleniu "Prawo zamówień publicznych w realizacji projektów współfinansowanych ze środków z Unii Europejskiej Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Poddziałania 1.1.1, 1.3.1 i 1.3.2 Programu Innowacyjna Gospodarka” w Kielcach w dniach 20-21.06.2011.

Poszerzałam swoją wiedzę z zakresu analizy statystycznej danych, uczestnicząc w seminariach organizowanych przez firmę StatSoft „Zastosowanie statystyki i data mining w badaniach naukowych” w Warszawie w 2011 i 2013 roku, oraz szkoleniu „DOE-komputerowe wspomaganie planowania i analizy statystycznej badań innowacyjnych” w dniach 21-22.11.2011 w Krakowie i szkoleniu „Metody wizualizacji danych” w dniu 21.11.2012 w Krakowie. Ponadto doskonaliłam swoją wiedzę i umiejętności z zakresu ochrony własności patentowej. Brałam udział w szkoleniu dla uczestników studiów doktoranckich SGGW w Warszawie w dniu 11.04.2011 oraz szkoleniu „Jak publikować, aby móc patentować - praktyczne wskazówki dla naukowców” organizowanym przez SGGW w Warszawie w dniu 31.05.2017.

W ostatnim czasie poszerzałam wiedzę istotną z punktu widzenia działalności dydaktycznej oraz zarządzania zespołem, uczestnicząc w warsztacie „Radzenie sobie ze stresem w obecnej sytuacji epidemiologicznej” (organizator formy - firma OPTIMA, 12.05.2021), szkoleniu „Uczelnia wobec zaburzeń psychicznych - komunikacja i formy wsparcia edukacyjnego studentów i kandydatów na studia z zaburzeniami psychicznymi” (Blue ocean consulting, 30.06.2021) oraz szkoleniu „Komunikacja: Przywództwo sytuacyjne Blancharda” (Cloud Team, 24.02.2022).

  
(podpis wnioskodawcy)