

Dr Monika Kordowska-Wiater

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

tel. 81-462-33-57

e-mail: monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl

Załącznik 2

Autoreferat dotyczący działalności naukowo- badawczej

Lublin 2018

Spis treści

1. Dane personalne	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
3. Doświadczenie zawodowe	4
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2. Zestawienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia	4
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	7
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	25
5.1. Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora	25
5.2. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	27
6. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego	37
6.1. Wskaźniki dokonań naukowych	38
6.2. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego	38
6.3. Zestawienie czasopism, w których opublikowano prace naukowe	39

1. Dane personalne:

Imię i nazwisko: Monika Kordowska-Wiater

Adres służbowy: Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka

ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

Tel. (81) 462 33 57

e-mail: monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl

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

2000.11.15 – doktor nauk biologicznych w zakresie biologii,

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi;

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Fermentacja ksylozy i glukozy do etanolu z udziałem modyfikowanych genetycznie drożdży z gatunków Pichia stipitis i Saccharomyces cerevisiae*”;

Promotor: Prof. dr hab. Zdzisław Targoński;

1994.06.10 – zaświadczenie o ukończeniu szkolenia pedagogicznego dla nauczycieli

akademickich,

Akademia Rolnicza w Lublinie, Międzywydziałowe Studium Pedagogiczne;

1993.07.09 – magister biotechnologii,

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi;

Tytuł pracy magisterskiej: „*Morfologia, właściwości metaboliczne i fizjologiczne szczepów Rhizobium wyizolowanych z brodawek korzeniowych roślin motylkowatych dziko żyjących*”;

Promotor: Prof. dr hab. Zbigniew Lorkiewicz

3. Doświadczenie zawodowe

Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych

- 2001.01.01 – obecnie** adiunkt,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie (do 2008 roku Akademia Rolnicza w Lublinie),
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii (do 2005 roku Wydział Rolniczy),
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka;
Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności (w latach 2006-2017);
Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa (w latach 2001-2006).
- 1993.10.01 – 2000.12.31** asystent,
Akademia Rolnicza w Lublinie,
Wydział Rolniczy,
Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl publikacji powiązanych tematycznie pod tytułem:

„Produkcja arabitolu z arabinozy przez drożdże naturalne i modyfikowane: skryning, identyfikacja i optymalizacja procesu biotransformacji”

4.2. Zestawienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

O1. **Kordowska-Wiater M., Kubik-Komar A., Targoński Z.:** 2012, Optimization of arabitol production by karyoductant SP-K 7 of *S. cerevisiae* V₃₀ and *P. stipitis* CCY 39501 using

response surface methodology, *Polish Journal of Microbiology*, 61, 4, 291-297.

(MNiSW*=15 pkt., IF* = 0,768, liczba cytowań wg WoS* = 2 i wg Scopus = 2)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wiodącym udziale w planowaniu eksperymentu, zebraniu literatury, opracowaniu metodyki i wykonaniu doświadczeń, analizie i opracowaniu części wyników, interpretacji i dyskusji wyników, napisaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

O2. Kordowska-Wiater M., Kubik-Komar A., Targoński Z.: 2013, Application of response surface methodology for the optimization of arabinose biotransformation to arabitol by *Candida parapsilosis*, *Central European Journal of Biology*, 8(9), 835-842.

(MNiSW *=20 pkt., IF* = 0,633, liczba cytowań wg WoS* = 3 i wg Scopus = 3)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wiodącym udziale w planowaniu eksperymentu, zebraniu literatury, opracowaniu metodyki i wykonaniu doświadczeń, analizie i opracowaniu części wyników, interpretacji i dyskusji wyników, napisaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

O3. Kordowska-Wiater M. : 2015, Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects, *Journal of Applied Microbiology*, 119 (2), 303-314.

(MNiSW *=30 pkt., IF* = 2,156, liczba cytowań wg WoS* = 7 i wg Scopus = 10)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji artykułu przeglądowego, zebraniu literatury, napisaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy wynosi 100%.

O4. Kordowska-Wiater M., Kuzdrański A., Czernecki T., Targoński Z., Frąc M., Oszust K.: 2017, The production of arabitol by a novel plant yeast isolate *Candida parapsilosis* 27RL-4. *Open Life Sciences*, 12, 1, 326-336 .

(MNiSW ^=14 pkt., IF* = 0,448, liczba cytowań wg WoS* = 0 i wg Scopus = 0)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentu, zebraniu literatury, zebraniu prób środowiskowych, wykonaniu części doświadczeń, i opracowaniu części wyników, ich analizie, interpretacji i dyskusji wyników, napisaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

O5. **Kordowska-Wiater M.**, Kuzdraliński A., Czernecki T., Targoński Z., Frąc M., Oszust K.: 2017, The ability of a novel strain *Scheffersomyces* (Syn. *Candida*) *shehatae* isolated from rotten wood to produce arabitol. Polish Journal of Microbiology, 66, 3, 335-343.
(MNiSW *=15 pkt., IF* = 0,746, liczba cytowań wg WoS* = 0 i wg Scopus = 0)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentu, zebraniu literatury, zebraniu prób środowiskowych, wykonaniu części doświadczeń, i opracowaniu części wyników, ich analizie, interpretacji i dyskusji wyników, napisaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

O6. **Kordowska-Wiater M.**, Lisiecka U., Kostro K.: 2018, Improvement of *Candida parapsilosis* by genome shuffling for the efficient production of arabitol from L-arabinose. Food Science and Biotechnology, <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0369-2>
(MNiSW *=20 pkt., IF* = 0,699, liczba cytowań wg WoS* = 0 i wg Scopus = 0)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentu, zebraniu literatury, wykonaniu większości doświadczeń, analizie i opracowaniu większości wyników, interpretacji i dyskusji wyników, napisaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

* wg załączników do Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za odpowiedni rok (wg roku opublikowania). Impact Factor (IF) - zgodnie z rokiem wydania (dla publikacji z lat 2017-2018 przyjęto wartość IF wyliczoną dla 2016 roku. Liczba cytowań wg Web of Science Core Collection.

^ czasopismo w roku 2017 uzyskało IF, po 2-letnim okresie karencji związanej ze zmianą nazwy, natomiast pod aktualną nazwą znajduje się na liście B Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Łącznie:

- **Sumaryczny impact factor publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: 5,441.**
- **Suma punktów za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego według wykazu czasopism naukowych MNiSW: 114.**

Oświadczenia współautorów prac, określające szczegółowo ich indywidualny wkład w powstanie publikacji znajdują się w **Załączniku 4**.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

W ramach prowadzonej w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka działalności statutowej VKT/DS/3 pt. „Mikrobiologiczna synteza związków biologicznie czynnych” realizowałam prace badawcze i prowadziłam studia literaturowe dotyczące biotechnologicznej produkcji arabitolu – polialkoholu o właściwościach słodzących, który może być używany jako zamiennik sacharozy. Uzyskane rezultaty opublikowałam w postaci cyklu prac [O.1 - O.6], które uważam za swoje największe osiągnięcie naukowe i przedkładam jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Wprowadzenie

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) podaje, że główną przyczyną popularnych chorób cywilizacyjnych, takich jak nadwaga (39% populacji dorosłych) i otyłość (13% populacji), jest nadmierne spożywanie podstawowych środków słodzących (sacharozy, glukozy i fruktozy) wraz z żywnością i napojami. Dopuszczalny udział tych sacharydów jako źródeł energii dla człowieka nie powinien przekraczać 10%, a okazuje się, że sięga 13 -15%, podnosząc ryzyko zachorowań na choroby metaboliczne oraz choroby uzębienia [Edwards i in., 2016]. Jednym ze sposobów zapobiegania tym chorobom jest zastępowanie sacharydów dodawanych do żywności i napojów przez producentów innymi środkami słodzącymi o minimalnej wartości odżywczej. Substancje te muszą spełnić kilka warunków: nie mogą szkodzić zdrowiu człowieka, powinny mieć słodkość wyrażoną przez względną siłę słodzącą, z porównywalnym smakiem do sacharozy, muszą być łatwo przetwarzane, trwałe podczas produkcji i przechowywania żywności, a dodatkową ich zaletą są niskie koszty pozyskiwania. Związki słodzące przed dopuszczeniem do powszechnego użytku, muszą przejść szereg badań, w tym klinicznych, aby wykluczyć ich szkodliwość dla człowieka. Substancje słodzące jako dodatki do żywności oprócz swojej słodkości muszą spełniać jeszcze dodatkowe kryteria, takie jak: brak negatywnych skutków związanych z reakcjami rozkładu, odporność termiczna w zakresie od -30 do +260⁰C, stabilność w zakresie pH od 2,5 do 8, obojętność wobec innych składników żywności [Mielcarz i in., 2009].

Poliole (aldiole, alkohole wielowodorotlenowe) należą do substancji słodzących. Otrzymuje się je przez redukcję odpowiednich cukrów, a dzięki brakowi grup redukcyjnych są mniej reaktywne niż odpowiadające im aldozy i ketozy. Słodkość polioli jest na ogół

mniejsza niż sacharozy, dlatego stosuje się je jako tzw. wypełniające substancje słodzące (ang. bulk sweeteners). Polialkohole, podobnie jak cukry, można zaliczyć do grupy tzw. słodzików odżywczych, dostarczających energii, gdyż są częściowo trawione w przewodzie pokarmowym [Edwards i in., 2016]. Dzielimy je na uwodorowane monosacharydy, do których zalicza się: erytrytol, ksylitol, arabitol, mannitol, sorbitol, uwodorowane disacharydy jak laktitol, maltitol oraz pochodną - izomalt, oraz mieszaninę uwodornionych mono, di i/lub oligosacharydów [Grembecka, 2015]. Zwykle występują naturalnie w małych ilościach w owocach, niektórych warzywach i grzybach. Substancje te nie mają określonej wartości A.D.I. (acceptable daily intake) czyli dopuszczalnego dziennego pobrania, stąd wynika, że polialkohole jako słodziki i wypełniacze są bezpieczne dla zdrowia. Ponieważ spożyte w większych ilościach mogą wywoływać biegunki, wzdęcia lub dyskomfort brzuszny, produkty, które zawierają powyżej 10% polioli muszą być odpowiednio oznakowane i zawierać ostrzeżenie dla konsumentów [Grembecka, 2015].

Arabitol, podobnie jak ksylitol, należy do pentitoli o wzorze sumarycznym $C_5H_{12}O_5$ i masie molowej 152,14 g/mol. Występuje w postaci bezbarwnych i bezwonnych kryształków o temperaturze topnienia 101-104°C, które dobrze rozpuszczają się w wodzie. Ma on słodkość zbliżoną do sacharozy, ale o wiele niższą wartość kaloryczną wynoszącą 0,2 kcal/g, podczas gdy wartość energetyczna sacharozy wynosi 4,0 kcal/g, a innych polioli ok. 2,4 kcal/g. Arabitol nie podtrzymuje wzrostu bakterii w jamie ustnej, więc nie przyczynia się do powstawania próchnicy zębów. Wykazano, że redukuje on zawartość tkanki tłuszczowej i odkładanie się tłuszczu w przewodzie pokarmowym. Dzięki właściwościom podobnym do ksylitolu może mieć podobne zastosowanie w przemyśle spożywczym: w produkcji lodów, polew, gum do żucia, twardych cukierków i toffi. Może być również wykorzystywany jako dodatek do leków [Kumdam i in., 2014]. Z uwagi na cenne właściwości i duży potencjał aplikacyjny związek ten został wprowadzony na listę 12 chemikaliów otrzymywanych bezpośrednio z cukrów zawartych w biomase roślinnej, stanowiących główne cele dla dalszych badań i rozwoju w biotechnologii przemysłowej [Erickson i in., 2012].

Podstawową metodą wytwarzania jest metoda chemiczna polegająca na redukcji arabinozy do arabitolu w obecności katalizatora Ru/C w temperaturze 240°C i pod ciśnieniem 100 barów. Inną metodą jest chemiczna redukcja laktonów kwasu arabinowego i liksonowego w obecności katalizatora i w temperaturze 100 °C [Kumdam i in., 2013]. Obecnie koszty produkcji tego słodzika są bardzo wysokie. W ostatnich latach trwają badania nad opracowaniem tańszej metody biotechnologicznej z wykorzystaniem mikroorganizmów,

szczególnie drożdży, opartej o biotransformację lub biokonwersję. Problemem wciąż jest pozyskanie tanich, odpadowych surowców do produkcji. Cukier pentozowy - L-arabinoza występująca w surowcach ligninocelulozowych np. odpadach z produkcji rolnej, jest bardzo dobrym substratem, ale proces jej pozyskania w formie czystej jest kosztowny. Tańszą alternatywą jest użycie glukozy lub glicerolu jako źródła węgla dla drożdży, ale proces jest mało efektywny. Kolejnym problemem dla naukowców jest wyselekcjonowanie wydajnych mikroorganizmów i optymalizacja procesu biotransformacji oraz odzysk produktu w czystej postaci. Publikacje naukowe pojawiające się w ostatnich latach pokazują coraz większe zainteresowanie pozyskaniem biotechnologicznym i zastosowaniem arabitolu w przemyśle spożywczym w przyszłości.

Cel naukowy oraz omówienie wyników badań

Celem cyklu prac stanowiących Osiągnięcie naukowe było poszukiwanie metod intensyfikacji procesu biotransformacji L-arabinozy do arabitolu wykorzystując do tego celu zarówno wyselekcjonowane ze środowisk naturalnych szczepy drożdży, jak i drożdże modyfikowane genetycznie.

Szczegółowe cele pracy obejmowały:

1. Przegląd piśmiennictwa na temat dotychczasowych postępów w badaniach nad produkcją arabitolu przez drożdże i przygotowanie artykułu przeglądowego z uwagi na brak tego typu publikacji w literaturze międzynarodowej.
2. Wykorzystanie drożdży wyselekcjonowanych we wcześniejszych etapach pracy naukowej do badań nad optymalizacją produkcji arabitolu z L-arabinozy z użyciem statystycznej metody płaszczyzny odpowiedzi (RSM).
3. Pozyskanie nowych izolatów drożdży o wysokich uzdolnieniach do biotransformacji arabinozy do arabitolu ze środowiska bogatego w ligninocelulozy.
4. Uzyskanie modyfikowanych genetycznie drożdży *Candida parapsilosis* o wysokich uzdolnieniach do wytwarzania arabitolu z L-arabinozy.

Omówienie wyników

Ad.1. Przegląd piśmiennictwa na temat dotychczasowych postępów w badaniach nad produkcją arabitolu przez drożdże.

Z poczucia potrzeby zgromadzenia i usystematyzowania wiedzy o mikrobiologicznej produkcji arabitolu z wykorzystaniem drożdży powstała praca przeglądowa [O.3]. W artykule opisałam zarówno drożdże pochodzenia naturalnego, jak i modyfikowane zdolne do utylizacji substratów odpadowych i wydzielania form L lub D-arabitolu, procesy metaboliczne zachodzące w komórkach, postępy w badaniach optymalizacyjnych, sposoby odzysku produktu oraz perspektywy na przyszłość.

Dotychczas w wyniku prac skринingowych prowadzonych przez różnych badaczy wyselekcjonowano kilka gatunków drożdży pochodzących zarówno z kolekcji kultur, jak i wyizolowanych ze środowiska np. *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. entomaea*, *C. shehatae*, *C. aurangiensis*, *C. succiphila*, *Pichia guilliermondii*, *P. stipitis* prowadzących wydajną transformację L-arabinozy do arabitolu w hodowlach okresowych na poziomie ok. 0,4-1,0 g/g substratu w warunkach optymalnych. Drożdże hodowano w płynnych pożywkach zawierających zwykle od 20 do 50 g arabinozy/l, w temperaturach mieszczących się w zakresie 25-37°C i w warunkach tlenowych z wytrząsaniem na poziomie 120-200 obr./min. Na ogół produkcji arabitolu nie towarzyszyły inne produkty uboczne.

Wytwarzanie D-arabitolu z glukozy również było przedmiotem badań. Jednak tylko kilka gatunków drożdży dało zadowalające wyniki. Należały do nich *Pichia ohmeri*, *Metchnikowia reukaufii*, *Zygosaccharomyces rouxii* i *Kodamera ohmeri*, których wydajności arabitolu z glukozy sięgały 0,4-0,5 g/g. Drobnoustroje inkubowano w temperaturach 30-37°C, w warunkach tlenowych z wytrząsaniem na poziomie 125-250 obr./min lub w bioreaktorze zapewniającym mieszanie hodowli z szybkością 350-1000 obr./min. Zwykle zawartość glukozy w pożywkach mieściła się w zakresie 100-200 g/l. Proces fermentacji był jednak dość długi i często drożdże wydzielaly produkty uboczne takie jak glicerol, etanol i rybitol.

Skrining szczepów drożdży zdolnych do wykorzystania glicerolu odpadowego jako źródła węgla i produkujących arabitol prowadzono w ostatnim dziesięcioleciu. Dotychczas najlepszym szczepem był *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7483, który wytwarzał arabitol w bioreaktorze w warunkach optymalnych z wydajnością 0,55 g/g oraz drożdże *Candida quercitrusa*, które w bioreaktorze w podłożu zawierającym 250 g/l glicerolu produkowały arabitol z wydajnością 0,41 g/g po 7 dniach hodowli.

W artykule przeglądowym przedstawiono szlaki metaboliczne drożdży produkujących arabitol zarówno z arabinozy, jak i glukozy i glicerolu. Substraty są pobierane przez komórki za pomocą aktywnego symportu cukier/proton lub dyfuzji ułatwionej (arabinoza, glukoza)

albo dyfuzji prostej (glicerol). Początkowy etap metabolizmu L-arabinozy obejmuje jej redukcję do arabitolu, który następnie jest utleniany do L-ksylulozy, ta z kolei jest konwertowana do ksylitolu, a ksylitol do D-ksylulozy. Ta pentoza po ufosforylowaniu jest dalej metabolizowana w cyklu pentozofosforanowym. Jeśli wystąpi nierównowaga kofaktorowa np. podczas słabego natleniania, komórki akumulują arabitol i wydzielają go do podłoża. Podczas metabolizmu glukozy w pierwszym etapie zachodzi jej fosforylacja i powstały glukozo-6-fosforan może być konwertowany do D-rybulozo-5-fosforanu lub D-ksylulozo-5-fosforanu, które w dalszych etapach przekształcane są w D-arabitol. Natomiast glicerol w komórkach drożdży ulega fosforylacji i przemianie do fosforanu dihydroksyacetonu, a następnie aldehydu 3-fosfoglicerynowego, który poprzez szlak glukoneogenezy przekształcany jest do glukozo-6-fosforanu i dalsze etapy przebiegają wg szlaku dla glukozy.

Wiele badań poświęcono modyfikacjom genetycznym drożdży, aby zwiększyć ich uzdolnienia odnośnie metabolizmu arabinozy, zwykle pozyskiwanej z substratów ligninocelulozowych. Jedną z metod było stosowanie międzyrodzajowej fuzji protoplastów. Lucca i in. [2002] uzyskał hybrydy *Saccharomyces cerevisiae* i *Torulaspora delbrueckii* wytwarzające arabitol z glukozy razem z etanolem i glicerolem. W bioreaktorze w warunkach optymalnych fusant PB2 produkował arabitol z wydajnością 0,27 g/g. Interesującą propozycję przedstawił Cheng-Chang i in. [2005], którzy uzyskali fuzanty drożdżopodobne protoplastów *Schizosaccharomyces pombe* i *Lentinula edodes*. Fuzant był zdolny do produkcji arabitolu z glukozy i arabinozy z wydajnościami odpowiednio 0,59 i 0,76 g/g. Innym wariantem fuzji protoplastów jest fuzja protoplastów jednego organizmu i wyizolowanych jąder komórkowych z innego mikroorganizmu. Takie hybrydy zwane karioduktantami powstały z połączenia protoplastów *S. cerevisiae* i jąder komórkowych *P. stipitis* zostały uzyskane przeze mnie w badaniach do pracy doktorskiej. Okazało się, że są one zdolne do wydajnej produkcji arabitolu z L-arabinozy, a najlepszy z nich w warunkach wytrząsania produkował polioliol z wydajnością powyżej 0,5 g/g [O.1]. Jednak najwięcej doniesień naukowych dotyczy konstrukcji rekombinantów *S. cerevisiae*, aby uzyskały zdolność do asymilacji L-arabinozy, której szczepy naturalne nie posiadają, co jest postrzegane jako ich wada, uniemożliwiająca pełną asymilację cukrów pozyskanych z hydrolizatów biomasy roślinnej. Na podstawie dostępnych w literaturze naukowej doniesień wiadomo, że modyfikacje genetyczne drożdży *S. cerevisiae* obejmowały transformację komórek brakującymi genami metabolizmu arabinozy pochodzącymi z bakterii *Escherichia coli* lub *Bacillus subtilis* albo z drożdży

fermentujących pentozy np. *P. stipitis* i genami drożdżowego szlaku pentozofosforanowego. Uzyskane najefektywniejsze rekombinanty wytwarzały arabitól z L-arabinozy z wydajnością 0,33-1,14 g/g w warunkach hodowli wytrząsanych przy 200 obr./min, w temp. 30°C. Były one zdolne do utylizacji mieszaniny cukrów takich jak glukoza, arabinoza i ksyloza i wydzielały również etanol, a niektóre ksylitol.

Z dostępnych publikacji można wywnioskować, że proces mikrobiologicznej produkcji arabitolu wymaga doboru optymalnych warunków hodowli zarówno wytrząsanych jak i bioreaktorowych. Wśród czynników środowiskowych wpływających na asymilację substratu jak i wydzielanie produktu ma wpływ temperatura inkubacji, skład podłoża, pH, dostęp tlenu związany z objętością kultury i szybkością wytrząsania lub mieszania. Natlenianie jest kluczowym czynnikiem, gdyż wpływa na równowagę kofaktorów redoks, które z kolei determinują rodzaj i stężenie produktu wydzielanego do podłoża. Uogólniając zebrane dane można stwierdzić, że optymalne temperatury dla drożdży wytwarzających arabitól mieszczą się w zakresie 28-45°C, natomiast szybkości wytrząsania albo mieszania w bioreaktorze mieszczą się w przedziałach, odpowiednio, 125-250 i 350-1000 obr./min. Stężenia źródeł węgla są następujące: arabinoza – 20-100 g/l, glukoza – 20-600 g/l i glicerol 100-350 g/l. Zakres pH mieści się w przedziale 3,6-7,0 w zależności od mikroorganizmu. Badania nad ilością wprowadzanego inokulum do pożywki sugerują zakres od 2 do 8% zawiesiny młodych komórek. Metody optymalizacyjne prowadzono dwiema metodami: metodą konwencjonalną "jednej zmiennej w czasie" lub metodą statystyczną „płaszczyzny odpowiedzi (RSM)".

Końcowym etapem produkcji jest odzysk arabitolu z medium hodowlanego. Oczyszczanie arabitolu jest niezbędne, aby uzyskać go w formie krystalicznej wymagającej minimum 65% czystości. Gdy w podłożu arabitól jest jedynym produktem, tak się dzieje najczęściej prowadząc hodowlę na arabinozie, wówczas odzysk jest stosunkowo prosty, podobny do odzysku ksylitolu, złożony z etapu odbarwiania na węglu aktywnym, usunięciu jonów na kolumnie jonowymiennej, zagęszczaniu i krystalizacji. Gdy źródłem węgla dla drożdży jest glukoza, glicerol lub mieszanina węglowodanów, odzysk produktu jest bardziej skomplikowany z uwagi na mieszaninę wytwarzanych metabolitów. Istnieją pomysły stosowania mikroorganizmów wykorzystujących inne poliole niż arabitól z medium pohodowlanego, lub stosowanie ekstrakcji za pomocą acetonu, następnie butanolu zakończonej procesem krystalizacji.

Z ilości dostępnych publikacji naukowych jednoznacznie wynika, że w ciągu ostatnich lat wzrasta na świecie zainteresowanie arabitolem jako interesującym zamiennikiem sacharozy o cennych właściwościach prozdrowotnych. W różnych ośrodkach naukowych realizowane są projekty nad nowymi rozwiązaniami technologicznymi dotyczącymi m.in. przygotowania tanich, odpadowych surowców, skringingu mikroorganizmów i wydajnych metod oczyszczania, aby uzyskać produkt wysokiej jakości spełniający oczekiwania konsumentów.

Ad.2. Wykorzystanie drożdży wyselekcjonowanych we wcześniejszych etapach pracy naukowej do badań nad optymalizacją produkcji arabitolu z L-arabinozy z użyciem statystycznej metody płaszczyzny odpowiedzi (RSM).

W początkowym etapie badań wykorzystałam drożdże znajdujące się w kolekcji Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, które były już wstępnie przebadane pod kątem zdolności do produkcji arabitolu z arabinozy, a wyniki tych badań nie wchodziły w skład osiągnięcia. Początkowo zajmowałam się karioduktantami drożdży *Saccharomyces cerevisiae* V₃₀ i *Pichia stipitis* CCY 39501, uzyskanymi w trakcie realizacji pracy doktorskiej i opisanymi w publikacji [2.D.4]. Podczas charakterystyki 6 szczepów zmodyfikowanych drożdży okazało się, że są one zdolne do asymilacji arabinozy, a w wyniku badań skringingowych okazało się, że produkują arabitól z różnymi wydajnościami, co było przedmiotem doniesienia naukowego [6.B.18]. Karioduktantem, który wytwarzał najwięcej arabitolu z arabinozy był karioduktant SP-K7 i został on przedmiotem badań optymalizacyjnych opisanych w publikacji [O.1]. Do badań optymalizacyjnych wybrałam metodę statystyczną płaszczyzny odpowiedzi RSM (response surface methodology), która jest zbiorem technik matematycznych i statystycznych użytecznych do modelowania i analizowania sytuacji, gdzie badana odpowiedź podlega wielu zmiennym. Ta metoda była używana np. do optymalizacji produkcji ksylitolu przez drożdże [Sampaio i in. 2006, Vasques i in. 2006, Sarrouh i da Silva, 2010]. W pierwszym etapie zastosowałam metodę Plackett-Burmana, która umożliwia skringing n zmiennych za pomocą $n+1$ eksperymentów i bardzo dobrze nadaje się do badań wstępnych nad wyłonieniem najważniejszych czynników wpływających na proces biotransformacji arabinozy do arabitolu. Została skonstruowana macierz, uwzględniająca 7 czynników (zmiennych) i 8 wariantów eksperymentów różniących się wartościami niskimi i wysokimi poszczególnych zmiennych, dobranymi na podstawie literatury i wstępnych badań własnych. Tymi zmiennymi były: stężenie arabinozy, stężenie ekstraktu drożdżowego oraz słodowego, stężenia soli $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i KH_2PO_4 , temperatura i

szybkość obrotów wytrząsarki. Natomiast odpowiedzią było maksymalne stężenie arabitolu. Przeprowadziłam płynne hodowle okresowe karioduktanta zgodnie z macierzą Placketa-Burmana, a analiza próbek płynów pochodzących za pomocą techniki HPLC obejmowała stężenia arabinozy i arabitolu w trakcie hodowli. Badany szczep drożdży wyprodukował najwięcej arabitolu (16,71 g/l) z wydajnością 0,355 g/g w eksperymencie 8, w którym wszystkie zmienne były na wysokim poziomie tzn. stężenie arabitolu wynosiło 50 g/l, stężenia ekstraktu drożdżowego i słodowego oraz $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i KH_2PO_4 po 10 g/l, temperatura 32°C i 200 obr./min. Na podstawie uzyskanych wyników stężenia arabitolu można było oszacować wartości wpływu zmiennych na proces biotransformacji czyli uszeregować zmienne według ich znaczenia dla efektywności procesu. Wyłoniłam wówczas 3 czynniki o największym znaczeniu: szybkość obrotów platformy wytrząsarki Infors HT Minitron, stężenie arabinozy w podłożu i temperatura inkubacji, które wykorzystałam w tworzeniu modelu CCD (central composite design) niezbędnego do oszacowania płaszczyzn odpowiedzi. Układ modelu CCD dla trzech zmiennych obejmował 20 eksperymentów, z których 15 różniło się wartościami badanych zmiennych, zaś ostatnie 5 było powtórzeniami eksperymentu 15, aby sprawdzić jego powtarzalność. Przeprowadziłam szereg hodowli okresowych karioduktanta SP-K7 według zaprojektowanego modelu, a uzyskane wyniki stężenia arabitolu w zakresie 0,13-18,92 g/l zostały poddane analizie statystycznej ANOVA, na bazie której sporządzono równanie regresji oraz wykresy płaszczyzn odpowiedzi wartości szacowanych z uwzględnieniem wartości eksperymentalnych. Uzyskano model dopasowany do wartości eksperymentalnych, a optymalne poziomy badanych czynników wpływających na biotransformację arabinozy do arabitolu przez drożdże były następujące: szybkość obrotów 150 obr./min, stężenie L-arabinozy na poziomie 32,5 g/l i temperatura 28°C. Następnie wykonałam eksperyment weryfikacyjny, sprawdzający dopasowanie modelu i uzyskałam 16,8 g/l arabitolu, wydajność procesu sięgała 0,52 g/g. Uzyskane stężenie polioliu było o około 9% niższe niż szacowane w modelu stężenie 18,367 g/l, co można zaakceptować jako potwierdzenie użyteczności zastosowanego modelu statystycznego.

Następnym szczepem drożdży wybranym do badań była *Candida parapsilosis* DSM 70125. Drożdże te wcześniej zostały sprawdzone pod kątem ich uzdolnień do biotransformacji L-arabinozy do arabitolu, a wyniki tych badań zaprezentowałam w publikacji [2.D.13], która nie weszła w skład osiągnięcia. Ten szczep okazał się najlepszy spośród przebadanych szczepów drożdży z rodzaju *Pichia* i *Candida*, będących w posiadaniu Katedry. Określiłam wpływ różnych czynników na produkcję arabitolu przez *C. parapsilosis*

stosując wspomnianą w powyższej publikacji metodę statystyczną RSM, co opisałam w publikacji [O.2]. Układ doświadczenia przebiegał według schematu podanego dla karioduktanta SP-K7. Badałam wpływ 7 zmiennych (stężenie arabinozy, stężenie ekstraktu drożdżowego oraz słodowego, stężenia soli $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i KH_2PO_4 , temperatura i szybkość obrotów wytrząsarki) w doświadczeniu według macierzy Placketta-Burmana. Dla tego szczepu również eksperyment 8, w którym wszystkie badane zmienne były na wysokich poziomach, dał najwyższe stężenia arabitolu sięgające 24,1 g/l. Na podstawie uzyskanych wyników oznaczono efekt każdej niezależnej zmiennej, wszystkie czynniki wpływały pozytywnie na proces produkcji arabitolu, a 3 najistotniejszymi czynnikami okazały się: szybkość obrotów platformy wytrząsarki Infors HT Minitron, temperatura hodowli i stężenie arabinozy w podłożu. Te zmienne wykorzystałam do przygotowania modelu CCD i według niego przeprowadziłam serię 15 eksperymentów hodowlanych, badających wpływ zmiennych o ustalonych wartościach na 5 poziomach w różnych kombinacjach oraz 5 eksperymentów potwierdzających powtarzalność całego układu. W efekcie końcowym uzyskałam średnie najwyższe stężenie arabitolu wynoszące 14,24 g/l dla zmiennych: szybkość obrotów wytrząsania 150 obr./min, temperatura 28°C i stężenie L-arabinozy na poziomie 32,5 g/l. Na podstawie uzyskanych wyników z wszystkich eksperymentów otrzymałam 3 wykresy płaszczyzn odpowiedzi potwierdzające, że stężenie arabitolu było silnie zależne od wybranych czynników i dobrze były dobrane ich zakresy. Wartość współczynnika $R^2 = 0,83$ świadczyła o dopasowaniu modelu do danych eksperymentalnych. Model oszacował stężenie arabitolu na 14,3 g/l. W hodowli weryfikacyjnej drożdży przeprowadzonej według modelu stężenie polioliu wyniosło 15,45 g/l, a wydajność 0,475 g/g, co potwierdziło przydatność modelu w produkcji arabitolu przez *C. parapsilosis* DSM 70125.

Ad 3. Pozyskanie nowych izolatów drożdży o wysokich uzdolnieniach do biotransformacji arabinozy do arabitolu ze środowiska bogatego w ligninocelulozy.

Kolejnym etapem badań była izolacja drożdży ze środowiska i określenie ich potencjału w asymilacji arabinozy i produkcji arabitolu. Wyniki badań opisałam w publikacjach [O.4] i [O.5]. W artykule [O.4] opisałam sposób izolacji drożdży z pobranych osobiście prób pochodzących z gleby, rozkładającego się drewna, części roślin, liści, kwiatów i kłosów zbóż. Z każdej, odpowiednio przygotowanej próbki o masie 5 g wykonano szereg rozcieńczeń dziesięciokrotnych i posiewy na podłożu YGC z chloramfenikolem dedykowane do izolacji drożdży i pleśni. Po inkubacji płytek Petriego wyizolowałam 100 pojedynczych kolonii drożdży, które dwukrotnie przeszczepiałam na nowe podłoża i każdą kolonię

sprawdziłam mikroskopowo, aby potwierdzić obecność drożdży. Wszystkie izolaty przeszczepiłam na skosy z agarom brzezkowym uzyskując w ten sposób kolekcję szczepów do badań skriningowych.

W kolejnym etapie badań wszystkie izolaty sprawdziłam pod kątem uzdolnień do asymilacji L-arabinozy jako źródła węgla. Szczepy, które wykazały wzrost w podłożu selektywnym, zostały przeznaczone do badania zdolności do produkcji arabitolu. Kolejny etap skiriningu prowadziłam w hodowlach płynnych, wytrząsanych przy 150 obr./min., w 28°C, w podłożu zawierającym L-arabinozę, ekstrakt drożdżowy, ekstrakt słodowy, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i KH_2PO_4 o pH 5,5 przez 3 doby. W pobieranych codziennie próbkach hodowli oznaczana była zawartość biomasy poprzez pomiar gęstości optycznej (OD_{600}), pH, stężenie arabinozy i arabitolu za pomocą chromatografii HPLC, w wybranych próbach oznaczano stężenie etanolu za pomocą chromatografii gazowej GC/MS. Zastosowana dwuetapowa metoda skiriningu wyłoniła 55 izolatów zdolnych do asymilacji L-arabinozy, z których 35 produkowało arabitol, a 16 z nich z wydajnością na poziomie co najmniej 0,2 g/g. Okazało się, że najefektywniejsze były izolaty z liści drzew i krzewów owocowych. Najwyższe stężenie arabitolu uzyskałam w hodowli szczepu oznaczonego 27RL-4 pochodzącego z liści malin, który wyprodukował 10.42 ± 0.04 g/l arabitolu z 20 g/l arabinozy dając wydajność $0,51 \pm 0,01$ g/g.

Wyselekcjonowany szczep drożdży został poddany charakterystyce morfologicznej komórek z użyciem mikroskopu świetlnego – komórki były owalne, elipsoidalne, pączkujące wielobocznie i tworzące pseudogrzebnię. Kolonie były kremowo-białe, wypukłe, gładkie i maziste. Wykonano identyfikację genetyczną szczepu z wykorzystaniem metody PCR stosując startery ITS1 i ITS4. Otrzymano produkt amplifikacji – region zawierający koniec 3' 18S rDNA, ITS1, 5,8S rDNA, ITS2 i koniec 5' 26S rDNA, który następnie został zsekwencjonowany i porównany z innymi sekwencjami zawartymi w bazie NCBI GenBank®. Na podstawie tej analizy zidentyfikowano drożdże jako *Candida parapsilosis*. Sekwencja badanego fragmentu rDNA została zgłoszona do NCBI GenBank® pod numerem dostępowym KP783504. Drożdże poddano również identyfikacji biochemicznej za pomocą zautomatyzowanego Systemu Biolog, badającego zdolność do asymilacji 59 i oksydacji 35 substratów jako źródeł węgla. Analiza potwierdziła, że jest to gatunek *C. parapsilosis*. Jednocześnie wykazała uzdolnienia drożdży do asymilacji różnych substratów węglowych np. D-melezytozy, palatynozy, sacharozy, glukozy, ksylozy, galaktozy i innych.

Następnie przeprowadziłam optymalizację hodowli szczepu *C. parapsilosis* 27RL-4 metodą „jednej zmiennej w czasie”, gdzie badanymi zmiennymi były: początkowe stężenia arabinozy (20-80 g/l), początkowe pH (4,5-6), temperatura inkubacji (24-32°C) oraz szybkość wytrząsania (100-200 obr./min.). Hodowle prowadzono w podłożach płynnych na wytrząsarce przez maksymalnie 4 doby i co 24 godz. pobierano próbki do oznaczeń biomasy, arabinozy i arabitolu oraz pH. W hodowlach sprawdzających wpływ stężenia cukru, prowadzonych w temp. 28°C i przy szybkości 150 obr./min okazało się, że szczep asymilował 20-25 g/l arabinozy, niezależnie od jej początkowego stężenia w pożywce, a najwyższa produkcja polioliu zachodziła w podłożu zawierającym 20 g/l arabinozy. Kiedy hodowle prowadzono w podłożach zawierających 32,5-80 g/l arabinozy, stężenia produktu mieściły się w zakresie – 5,66 – 9,05 g/l, a wydajności wynosiły 0,27-0,4 g/l. Natomiast najwięcej wytworzonej biomasy komórkowej odnotowano w hodowli z 80 g/l arabinozy. Odczyn hodowli spadał do wartości ok. 2,5-3,46.

Hodowle, w których badano wpływ pH na produkcję arabitolu prowadziłam w podłożu zawierającym 20 g/l arabinozy, w temp. 28°C i przy szybkości 150 obr./min. Stwierdziłam niewielkie różnice w produkcji arabitolu w zakresie 9,67 – 10,72 g/l i wydajności w zakresie 0,5 – 0,53 g/g. Stężenia biomasy drożdży również były zbliżone niezależnie od początkowego pH i wynosiły 3,95 – 4,51 g/l i pH w hodowlach obniżało się wraz z upływem czasu. Przeprowadzony wariant hodowli z dodatkiem CaCO₃ przy pH początkowym 5,5 praktycznie dawał takie same rezultaty odnośnie produkcji arabitolu, jak w hodowli bez CaCO₃, lecz biomasy było mniej o 12% i pH osiągnęło na koniec hodowli wartość 6,5. Ogólnie można stwierdzić, że ta zmienna wywierała niewielki efekt na proces produkcji arabitolu.

W eksperymencie optymalizacyjnym dotyczącym wpływu szybkości wytrząsania na produkcję arabitolu, co odpowiada poziomowi natleniania hodowli, jednoznacznie wykazałam, że stosowane 150 obr./min jest optymalne, najniższe 100 obr./min. znacznie pogorszyło efektywność badanego szczepu, stężenie produktu spadło o ok. 80%, a wydajność procesu o 40%, 200 obr./min również nie było korzystne dla produkcji arabitolu (spadek stężenia o 16%, chociaż wydajność wzrosła o 12%). Badanie wpływu temperatur hodowli drożdży wykazało, że zarówno w 24°C, jak i w 32°C uzyskane stężenia i wydajności polioliu były niższe niż te uzyskane w temp. 28°C, spadek wynosił odpowiednio 16% i 12% dla 24°C oraz 5% i 2% dla 32°C.

Dodatkowo sprawdzono zdolność drożdży do produkcji arabitolu z glukozy jako tańszego i łatwiej dostępnego źródła węgla. Hodowle prowadzono w podłożach zawierających 50 i 100 g/l glukozy 5 dób w warunkach temp. 28°C, i przy szybkości wytrząsania 150 obr./min. Badany szczep wytwarzał arabitol jako główny metabolit w stężeniach 2,48 g/l po 3 dobach i 6,1g/l po 5 dobach. W próbkach hodowli wykryto również glicerol i rybitol jako produkty uboczne.

Konkludując, spośród 100 izolatów otrzymano szczep *C. parapsilosis* 27RL-4 wydajnie produkujący arabitol. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że optymalne warunki hodowli dla tego szczepu to: stężenie arabinozy w podłożu wynoszące 20 g/l, początkowe pH 5,5, temperatura inkubacji 28°C i szybkość wytrząsania 150 obr./min.

Oprócz drożdży *C. parapsilosis* 27RL-4 kolejnym szczepem o potencjale w asymilacji arabinozy i produkcji arabitolu okazał się izolat pozyskany z rozkładającego się drewna, oznaczony 20B-3 i opisany w publikacji [O.5]. Spośród 11 izolatów otrzymanych z fragmentów butwiejących drzew liściastych tylko cztery wykazały się zdolnością do asymilacji arabinozy w podłożu selektywnym. W drugim etapie selekcji tylko ten jeden szczep wydzieliał arabitol do podłoża hodowlanego z wydajnością powyżej 0,2 g/g. Szczep ten został scharakteryzowany morfologicznie i biochemicznie oraz genetycznie zidentyfikowany, a następnie dokonano optymalizacji produkcji arabitolu za pomocą metody „jednej zmiennej w czasie”. W wyniku analizy genetycznej opartej o reakcję PCR z użyciem starterów ITS1 i ITS4, a następnie sekwencjonowaniu produktu amplifikacji drożdże zidentyfikowano jako *Scheffersomyces shehatae* (synonim *Candida shehatae*) za pomocą bazy NCBI GenBank®, a uzyskaną sekwencję nukleotydów fragmentu rDNA zgłoszono do tejże bazy pod numerem dostępu KP783503.1. Przypisanie tych drożdży do nowo utworzonego rodzaju *Scheffersomyces* zaproponowali Kurtzman i Suzuki [2010], którzy umiejscowili w nim niektóre gatunki *Pichia* i *Candida* związane ze środowiskiem drzew na podstawie związków filogenetycznych. Ogólnie, gatunek *C. shehatae* jest znany z uzdolnień do asymilacji D-ksylozy pochodzącej z hydrolizatów hemicelulozowych i produkcji etanolu lub ksylitolu [Tanimura i in. 2012, Antunes i in. 2014], natomiast znacznie mniej przebadany pod kątem produkcji arabitolu z arabinozy.

Podczas charakterystyki morfologicznej stwierdziłam, że komórki drożdży hodowane na agarze YPG są okrągłe lub owalne, pączkują wielobocznie i zaczynają tworzyć pseudogrybnię. Ich kolonie zaś są biało-kremowe, gładkie, wypukłe i z równym brzegiem.

Testy biochemiczne przeprowadziłam z użyciem zautomatyzowanego Systemu Biolog. Okazało się, że drożdże asymilowały wiele węglowodanów (m.in. celobiozę, maltozę, maltotriozę, palatynozę, trehalozę, glukozę, galaktozę), nieco słabiej kwasy karboksylowe, polialkohole i polimery węglowodanowe. Dobrze utleniały węglowodany i polimery użyte w badaniu.

W badaniach optymalizacyjnych szczepu *S. shehatae* 20B-3 określono początkowe stężenie L-arabinozy (z zakresu 20-80 g/l), początkowe pH medium hodowlanego (z zakresu 3,5-6), temperaturę inkubacji (24-32°C) i szybkość obrotów platformy wytrząsarki (100-200 obr./min.). W analizie przebiegu hodowli stosowano następujące metody: HPLC do oznaczenia stężenia arabinozy i arabitolu, GC/MS do detekcji etanolu, pomiar pH oraz OD₆₀₀ do oznaczenia stężenia biomasy komórkowej, przeliczonej następnie na zawartość suchej masy wg stosownej krzywej wzorcowej. W pierwszym wariancie hodowli z różnymi stężeniami arabinozy, z początkowym pH podłoża 5,5 oraz w temp. 28°C i przy wytrząsaniu 150 obr./min. drożdże zużywały w ciągu 4 dni ok. 17 g/l arabinozy z 20 g/l w podłożu, w ciągu 5 dni ok. 18 g/l z 50 g/l i ok. 30 g/l z 80 g/l. W prowadzonych hodowlach drożdże wyprodukowały odpowiednio 4,03, 6,42 i 7,97 g/l arabitolu z wydajnościami odpowiednio; 0,24, 0,36 i 0,26 g/g. Niezależnie od stężenia cukru wytwarzały zbliżone stężenia biomasy wynoszące ok. 2 g/l. Ponieważ niecelowe było stosowanie podwyższonego stężenia substratu, kolejny wariant hodowli prowadzono w pożywce zawierającej 20 g/l arabinozy, ale o różnym pH, w temperaturze i szybkości wytrząsania jak poprzednio. Analiza stężeń produktu wykazała, że optymalnym pH początkowym była wartość 4,0, wówczas drożdże wydzieliły do podłoża blisko 5,9 g/l arabitolu z wydajnością 0,37 g/g, co było wzrostem stężenia i wydajności o ok. 45% i 54% w stosunku do poprzedniej hodowli w podłożu z 20 g/l cukru i o pH na poziomie 5,5. Dalsze badania optymalizacyjne dotyczące wpływu temperatury 24 i 32°C oraz szybkości wytrząsania wynoszących 100 i 200 obr./min wykazały jedynie pozytywny wpływ temperatury 32°C na wydajności szczepu 20B-3 *S. shehatae*. W tej temperaturze drożdże wytworzyły o 15% więcej arabitolu w porównaniu z hodowlą w temp. 28°C, z wydajnością wyższą o 29%. Tak więc podsumowując etap optymalizacyjny badań stwierdziłam, że najlepsze warunki do hodowli *S. shehatae* to: stężenie arabinozy wynoszące 20 g/l, pH podłoża równe 4,0, temperatura na poziomie 32°C i szybkość wytrząsania na poziomie 150 obr./min. Eksperyment weryfikacyjny potwierdził skuteczność optymalizacji, gdyż drożdże w tych warunkach wyprodukowały ostatecznie z 17,52 g/l arabinozy 6,2 g/l arabitolu w ciągu 4 dób z wydajnością 0,35 g/g. Były to również warunki korzystne dla

wzrostu drożdży. Badania porównawcze ze szczepem referencyjnym *C. shehatae* ATCC 22984 wykazały, że nowy izolat produkował arabitol w wyższych stężeniach i z wyższymi wydajnościami w większości wariantów hodowli optymalizacyjnych, szczególnie zawierających wysokie stężenia arabinozy oraz w hodowli prowadzonej przy 200 obr./min.

S. shehatae przebadalam również pod kątem produkcji arabitolu z glukozy i ksylozy w hodowlach wytrząsanych. Stwierdziłam, że ksyloza w stężeniu 20 g/l była metabolizowana do ksylitolu (0,2 g/l po 2 dniach) i etanolu (0,45 g/l po 3 dniach), natomiast nie stwierdzono obecności arabitolu. Natomiast podczas asymilacji 50 g/l lub 100 g/l glukozy drożdże wydzielaly arabitol w stężeniach 0,77 g/l i 4,00 g/l odpowiednio po 2 i 5 dniach inkubacji w temp. 28°C przy szybkości wytrząsania 150 obr./min, co było wynikiem zbliżonym do szczepu referencyjnego *C. shehatae*. W hodowli pojawiły się także inne metabolity: glicerol, rybitol i etanol, które swoje maksymalne stężenia osiągały w różnym czasie hodowli. Drożdże wytworzyły stosunkowo niewiele biomasy, szczególnie w podłożu zawierającym 100 g/l glukozy, gdzie duża jej część (41%) nie została wykorzystana, co świadczy o tym, że drożdże preferowały niższe stężenia tego cukru.

Ad. 4. Uzyskanie modyfikowanych genetycznie drożdży *Candida parapsilosis* o wysokich uzdolnieniach do wytwarzania arabitolu z L-arabinozy.

Oprócz skringingu nowych szczepów drożdży ze środowiska, postanowiłam uzyskać efektywny szczep drożdży do transformacji arabinozy do arabitolu za pomocą technologii zwanej metodą tasowania genomów (ang. genome shuffling). Do eksperymentu opisanego w publikacji [O.6] wybrałam drożdże *C. parapsilosis* DSM 70125, które były przebadane we wcześniejszych etapach moich prac i okazały się najlepszymi producentami arabitolu. Metoda genome shuffling łączy klasyczną mutagenezę z rekombinacją. Jej zaletą jest fakt, że wykorzystuje pełną genetyczną różnorodność populacji i oferuje możliwość łączenia użytecznych mutacji z wielu różnych osobników oraz nie wymaga wyspecjalizowanego sprzętu do jej wykonania. Mikroorganizmy nie są uważane za modyfikowane genetycznie, więc bez problemu mogą być używane w przemyśle spożywczym. W literaturze są doniesienia o drożdżach poddanych tasowaniu genów w różnych celach. Najwięcej informacji dotyczy drożdży *S. cerevisiae*, które poddawano tej metodzie, aby uzyskać szczepy o zwiększonej tolerancji na etanol, na inhibitory zawarte w hydrolizatach ligninocelulozowych i o zwiększonych osiągnięciach fermentacyjnych. Drożdże *P. stipitis* doskonalono, aby poprawić produkcję etanolu z materiałów ligninocelulozowych, *P. anomala*, aby poprawić produkcję

polialkoholi z glukozy, a *Pachysolen tannophilus*, aby zwiększyć ich tolerancję na inhibitory fermentacji. Natomiast drożdże *Candida krusei* doskonalono pod kątem poprawy tolerancji na kwas octowy, a *C. versatilis* i *Hansenula anomala* pod kątem zwiększenia tolerancji na sól i poprawę aromatu podczas produkcji sosu sojowego.

Pierwszym etapem metody genome shuffling jest mutageneza wyjściowego szczepu i skryning mutantów. Mutagenezę *C. parapsilosis* prowadziłam poprzez naświetlanie promieniami UV przez 1 min, po czym komórki były inkubowane w ciemności, wysiewane na podłoże selektywne z arabinozą i inkubowane 3 doby w temp. 28°C. W tym etapie uzyskałam 60 kolonii, które poddałam drugiemu etapowi selekcji czyli hodowli płynnej, wytrząsanej w pożywce z arabinozą. Analiza płynów pohodowlanych wykazała, że 28 mutantów wytwarzało więcej arabitolu niż szczep wyjściowy, a wśród nich najlepszymi okazały się 4 mutanty: M10, M17, M20 i M46, które produkowały 3,22-3,99 g/l arabitolu z wydajnościami 0,17-0,24 g/g, co stanowiło o 41,67-99,5% więcej w porównaniu ze szczepem wyjściowym w warunkach pożywki selektywnej, pozbawionej dodatków w postaci ekstraktu drożdżowego i słodowego, które stymulują wzrost drożdży, ale zawierają dodatkowe źródła węgla organicznego. Te mutanty wybrałam do dalszych badań.

Kolejnym etapem był proces genome shuffling mutantów z I etapu. Komórki mieszaniny mutantów najpierw poddałam protoplastyzacji stosując enzym lityczny Lyticase w buforze z KCl w temp. 28°C przez 60 min. Powstałe protoplasty rozdzieliłam na dwie części i zastosowałam różne metody ich inaktywacji. Jedną część inaktywowałam termicznie (60°C, 20 min.) a drugą poprzez naświetlanie światłem UV (5,5 min). Stosowanie dwóch metod inaktywacji, a następnie połączenie inaktywowanych komórek opiera się na zasadzie komplementarności uszkodzeń protoplastów. Po połączeniu zawiesiny inaktywowanych protoplastów, poddałam je fuzji w środowisku 40% glikolu polietylenowego (PEG 6000) w temp. 28°C przez 30 min. Następnie zawiesina była wysiewana na płytki Petriego z podłożem regeneracyjno-selekcyjnym, aby uzyskać kolonie fuzantów po inkubacji. Jednocześnie na każdym etapie procesu wykonywałam stosowne posiewy kontrolne, które świadczyły o poprawności wykonania eksperymentów. Uzyskałam 17 izolatów pierwszej rundy genome shuffling. Wszystkie były sprawdzone pod kątem produkcji arabitolu z arabinozy w hodowlach wytrząsanych w pożywce selektywnej. 8 fuzantów wykazało zwiększone efektywności produkcyjne w porównaniu do szczepu wyjściowego, a tylko 2 izolaty wytwarzały arabitól w stężeniach wyższych od szczepu wyjściowego o 60% z wydajnościami wyższymi o 50%. One również zużywały szybciej arabinozę. Użyłam je do drugiej rundy

procesu prowadzonej według tej samej procedury. W efekcie uzyskałam 50 kolonii izolatów na podłożu selektywnym. W drugim etapie selekcji okazało się, że 15 szczepów efektywniej produkowało arabitól niż szczep wyjściowy, a 9 dawało lepsze wyniki od najlepszych fuzantów I rundy genome shuffling. Najlepsze dwa fuzanty, GSII-16 i GSII-3, produkowały odpowiednio 5,18 i 4,97 g/l poliolu z wydajnościami 0,33 g/g osiągając wyniki lepsze od szczepu wyjściowego o 57%. Analiza HPLC wykazała, że arabitól był u wszystkich fuzantów jedynym metabolitem wydzielanym do podłoża. Ogólnie, fuzanty II rundy cechowały się wyższą efektywnością produkcji arabitolu niż fuzanty I rundy. W trakcie trwania całego eksperymentu sprawdzałam stabilność uzyskanych szczepów i były one stabilne przez cały okres badań i po ich zakończeniu.

Ważnym badaniem było określenie zawartości DNA w komórkach fuzantów drożdży za pomocą cytometrii przepływowej. Odpowiednio przygotowane komórki drożdży wybarwione były jodkiem propidyny, który wiąże się z DNA w trakcie inkubacji. Następnie w zawiesinach wybarwionych komórek mierzono intensywność fluorescencji. Nie wykazano szczególnych różnic w zawartości DNA i ploidalności pomiędzy fuzantami a szczepem wyjściowym, co oznacza, że różnice fizjologiczne szczepów pochodzą od wymiany genów podczas rekombinacji genetycznej w czasie procesu genome shuffling, a nie od obecności dodatkowych chromosomów, co też obserwowali inni badacze [Hou, 2009; Wang i Hou, 2010].

W ostatnim etapie badań dwa fuzanty II rundy GSII-16 i GSII-3 poddałam hodowli w warunkach optymalnych dla *C. parapsilosis* DSM 70125, wyznaczonych metodą RSM. Szczepy produkowały 11,83 i 11,75 g/l arabitolu, co przewyższało osiągi szczepu wyjściowego o 15-16%. Wydajności na poziomie ok. 0,48 – 0,49 g/g również były wyższe niż szczepu wyjściowego. Badane fuzanty szybciej asymilowały arabinozę niż *C. parapsilosis* i produkowały podobną ilość biomasy komórkowej. Z przeprowadzonych badań wynika, że możliwe jest uzyskanie zmodyfikowanych metabolicznie komórek drożdży, efektywnie produkujących arabitól z L-arabinozy. Jednocześnie potwierdziłam, że proces ten jest ściśle uzależniony od składu i objętości pożywki w hodowli.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki mają charakter zarówno poznawczy jak i aplikacyjny. Jako główne osiągnięcia badań można wskazać:

1. Zastosowanie statystycznej metody Blacketa-Burmana połączonej z metodą płaszczyzny odpowiedzi (RSM) do optymalizacji produkcji arabitolu z L-arabinozy przez karioduktanta *P. stipitis* i *S. cerevisiae* SP-K7 oraz przez drożdże *C. parapsilosis* DSM 70125 pozwoliło na wyłonienie 3 najważniejszych czynników wpływających na proces: szybkości obrotów podczas hodowli wytrząsanych, temperatury inkubacji i stężenia L-arabinozy. Dla obu szczepów optymalne okazały się następujące warunki: szybkość obrotów platformy wytrząsarki wynosząca 150 obr./min, temperatura 28°C i początkowe stężenie arabinozy w pożywce na poziomie 32,5 g/l. Szybkość obrotów wytrząsania na poziomie 150 obr./min pozwala na natlenianie hodowli na umiarkowanym poziomie, co potwierdzają wszystkie doniesienia naukowe. W tych warunkach szczep SP-K7 wytwarzał 16,8 g/l arabitolu z wydajnością 0,52 g/g, a *C. parapsilosis* 15,45 g/l polioliu z wydajnością 0,475 g/g.
2. Prawidłowo dobrane czynniki i ich poziomy użyte w metodzie RSM pozwoliły na dobre dopasowanie modelu i dużą zgodność przewidywanych i otrzymanych stężeń arabitolu produkowanego przez oba szczepy drożdży.
3. Izolacja 100 szczepów drożdży ze środowiska i skringing wyłoniły dwa efektywne izolaty, które scharakteryzowano biochemicznie, morfologicznie i zidentyfikowano genetycznie jako *C. parapsilosis* i *S. shehatae*.
4. *C. parapsilosis* 27RL-4 w warunkach zoptymalizowanych metodą „jednej zmiennej w czasie”, a więc w podłożu zawierającym 20 g/l arabinozy, o pH 5,5, w temperaturze 28°C i przy szybkości wytrząsania 150 obr./min wytwarzał 10,42-10,72 g/l arabitolu z wydajnością 0,51-0,53 g/g .
5. *S. shehatae* 20B-3 po optymalizacji metodą „jednej zmiennej w czasie” w podłożu zawierającym 20 g/l arabinozy, o pH 4,0, w temperaturze 32°C i przy szybkości wytrząsania 150 obr./min wytwarzał 6,2 g/l arabitolu z wydajnością 0,35 g/g.
6. Oba wyselekcjonowane gatunki drożdży były zdolne do produkcji arabitolu z glukozy. *C. parapsilosis* 27RL-4 wytwarzał arabitol jako główny metabolit w stężeniach 2,48 g/l i 6,1 g/l z 50 lub 100 g/l glukozy w podłożu, natomiast *S. shehatae* 20B-3 produkował odpowiednio 0,77 g/l i 4,00 g/l arabitolu w temp. 28°C przy szybkości wytrząsania 150 obr./min.
7. Drożdże *C. parapsilosis* DSM 70125 zostały poddane metodzie tasowania genomów, aby uzyskać zmodyfikowany szczep produkujący arabitol z jeszcze lepszymi osiągnięciami. W wyniku fuzji rekurencyjnej złożonej z dwóch rund

otrzymałam dwa najefektywniejsze fuzanty GSII-16 i GSII-3, które produkowały 11,83 i 11,75 g/l arabitolu z wydajnościami na poziomie ok. 0,48 – 0,49 g/g. W warunkach optymalnych szczep wyjściowy wytwarzał mniej produktu o 15-16%.

8. Wszystkie przeprowadzone eksperymenty hodowlane z udziałem badanych szczepów drożdży potwierdziły, że biotransformacja arabinozy do arabitolu jest procesem bardzo czułym na zmieniające się warunki hodowli, takie jak natlenianie będące konsekwencją szybkości wytrząsania i objętości pożywki hodowlanej, skład pożywki obejmujący nie tylko źródło węgla, ale i dodatek soli mineralnych i ekstraktów, początkowe pH pożywki oraz temperatura inkubacji.

Literatura

1. Antunes F.A.F., Chandel A.K., Milessi T.S.S., Santos J.C., Rosa C.A., da Silva S.S., (2014) Bioethanol production from sugarcane bagasse by a novel brazilian pentose fermenting yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: evaluation of fermentation medium. Int. J. Chem. Engin., <https://www.hindawi.com/journals/ijce/2014/180681/>
2. Cheng-Chang L., Pao-Chuan H., Jeng-Leun M., Der-Feng T., (2005) Construction of an intergeneric fusion from *Schizosaccharomyces pombe* and *Lentinula edodes* for xylan degradation and polyol production. Enzyme Microb. Technol. 36: 107–117.
3. Edwards C.H., Rossi M., Corpe C.P., Butterworth P.J., Ellis P.R., (2016) The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: alternatives for the future. Trends In Food Sci. & Technol. 56: 158–166.
4. Grembecka M., (2015) Sugar alcohols – their role in the modern world of sweeteners: a review. Eur. Food Res. Technol. 241: 1-14.
5. Hou L., (2009) Novel methods of genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Lett. 31: 671-677.
6. Kumdam H., Murthy S.N., Gummadi S.N., (2013) Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. AMB Express 3: 23.
7. Kumdam H., Murthy S.N., Gummadi S.N., (2014) Arabitol production by microbial fermentation – biosynthesis and future application. Int. J. Sci. App. Res. 1(1): 01-12.
8. Kurtzman C.P., Suzuki M., (2010) Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleroyzyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. Mycoscience 51: 2–14.
9. Lucca, M.E., Spencer, J.F.T. and de Figueora, L.I.C., (2002) Glycerol and arabitol production by an intergeneric hybrid, PB2, obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 472–476.
10. Mielcarz M., (2009) zamienniki cukru do produkcji wyrobów spożywczych. Przegląd Piekarski i Cukierniczy. 57 (1): 56–60.
11. Sampaio F.C., de Faveri D., Mantovani H.C., Lopez Passos F.M., Perego P., Converti A., (2006) Use of response surface methodology for optimization of xylitol production by the new yeast strain *Debaryomyces hansenii* UFV-170. J. Food Engin. 76: 376-386.
12. Sarrouh B.F., da Silva S.S., (2010) Application of response surface methodology for optimization of xylitol production from lignocellulosic hydrolysate in a fluidized bed reactor. Chem. Eng. Technol. 33: 1481-1487.
13. Tanimura A., Nakamura T., Watanabe I., Ogawa J., Shima J., (2012) Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. SpringerPlus 1: 27.

14. Vasquez M.P., de Souza M.B., Pereira N., (2006) RSM analysis of the effects of the oxygen transfer coefficient and inoculum size on the xylitol production by *Candida guilliermondii*. Appl. Biochem. Biotechnol. 129-132: 256-264.
15. Wang H, Hou L., (2010) Genome shuffling to improve fermentation properties of top-fermenting yeast by the improvement of stress tolerance. Food Sci. Biotechnol. 19(1): 145-150.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Działalność naukową rozpoczęłam w 1993 roku wraz z podjęciem pracy na etacie asystenta w Katedrze Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa na Wydziale Rolniczym Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie: Uniwersytet Przyrodniczy). Zostałam włączona w prace Zespołu, kierowanego przez prof. dr hab. Zdzisława Targońskiego, zajmującego się badaniami nad hydrolizą materiałów ligninocelulozowych i wykorzystaniem otrzymanych cukrów w procesach fermentacyjnych. Obszar moich badań ogólnie dotyczył wykorzystania glukozy i ksylozy przez drożdże, aby zintensyfikować proces produkcji etanolu z hydrolizatów biomasy roślinnej. Badania były częściowo finansowane przez Komitet Badań Naukowych w ramach projektu badawczego nr 5 PO6G 058 14 (grant promotorski). Charakterystykę drożdży fermentujących ksylozę przedstawiłam w publikacji przeglądowej [2.D.1]. Wyselekcjonowałam drożdże wydajnie fermentujące ksylozę do etanolu (z wydajnością 0,2 g/g) z gatunku *P. stipitis* (szcep CCY 39501). Otrzymałam 11 mutantów drożdży gorzelniczych *S. cerevisiae* V₃₀ i 8 mutantów *S. cerevisiae* Ja(a) z defektem oddechowym (RD-mutanty) za pomocą bromku etyldyny, które wykazywały metabolizm beztlenowy. Uzyskane mutanty hodowane jednocześnie z *P. stipitis* w różnych kombinacjach wykorzystałam do kofermentacji glukozy i ksylozy w podłożach modelowych, co zaprezentowałam w publikacji [2.D.3] i w doniesieniach konferencyjnych [6.B.2.], i [6.B.4.]. Zaobserwowałam 3-4 krotnie wyższy stopień konwersji ksylozy i wyższe stężenia etanolu od 0,55 do 6 g/l w porównaniu z hodowlami kontrolnymi o okresowej regulacji pH i o 1,1 – 4,6 g/l etanolu więcej w hodowlach o stałym pH. Najlepszymi układami kofermentacyjnymi były wspólne hodowle *P. stipitis* z mutantem V₃₀I 40 i z mutantem JaI 16, w których uzyskałam około 20 g/l etanolu. Ponieważ *P. stipitis* podlegała represji katabolicznej glukozą, otrzymałam 4 mutanty badanego szczepu o ograniczonej represji katabolicznej, które jednak w kofermentacjach nie przyniosły dalszego przyspieszenia konwersji ksylozy i poprawienia osiągnięć fermentacyjnych, co przedstawiłam w doniesieniu [6.B.3.]. Kolejną strategią było

przeprowadzenie kariodukcji protoplastów *S. cerevisiae* i wyizolowanych jąder komórkowych z *P. stipitis*, aby uzyskać zmodyfikowane genetycznie drożdże *S. cerevisiae* V₃₀. Uzyskałam 7 karioduktantów fermentujących wydajnie glukozę i ksylozę do etanolu i ksylitolu. Charakteryzowały się one m.in. wyższą tolerancją na stężenia etanolu w podłożu niż *P. stipitis*. Najlepszym karioduktantem okazał się izolat SP-K 8, który produkował około 19 g/l etanolu z wydajnością 0,5 g/g. Wyniki tych badań przedstawiłam w doniesieniu [6.B.5.]. W ostatnim etapie pracy doktorskiej przeprowadziłam proces jednoczesnego scukrzania i fermentacji (SSF) wybranych surowców ligninocelulozowych: słomy pszennej i trocin brzożowych, które są bogatym źródłem ksylozy. W procesie scukrzania wykorzystałam enzymy celulolityczne i β -glukozydazę, natomiast fermentację prowadziły układy mieszane drożdży *P. stipitis* CCY 39501 wraz z RD-mutantem V₃₀I 40 oraz wybrane karioduktanty SP-K 3 i SP-K 8, które aktywnie fermentowały oba cukry z hydrolizatów do etanolu. W tym procesie najwyższe stężenia etanolu uzyskałam w hodowli mieszanej oraz w hodowli karioduktanta SP-K 3– 16 g/l etanolu. Wyniki częściowo zaprezentowałam w doniesieniu [6.A.4.].

Rezultaty tych badań stanowiły podstawę rozprawy doktorskiej pt.: „*Fermentacja ksylozy i glukozy do etanolu z udziałem modyfikowanych genetycznie drożdży z gatunków Pichia stipitis i Saccharomyces cerevisiae*”, napisanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Zdzisława Targońskiego, którą obroniłam 15 listopada 2000 roku przed komisją powołaną przez Radę Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie i decyzją Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologia. Za pracę doktorską uzyskałam nagrodę indywidualną II^o przyznaną przez J.M. Rektora Akademii Rolniczej w Lublinie.

W trakcie prowadzenia badań do doktoratu i doskonaleniu swojego warsztatu badawczego zainteresowałam się wykorzystaniem cukrów pentozowych, pochodzących z hydrolizatów ligninocelulozowych do produkcji polialkoholi. Okazało się, że drożdże z rodzaju *Pichia* i *Candida*, które są zdolne do asymilacji ksylozy, wydzielają do podłoża hodowlanego ksylitol. Ten pentitol może być stosowany jako zamiennik sacharozy do słodzenia oraz jako dodatek do żywności w produkcji polew, gum do żucia, cukierków, dżemów. Związek ten daje odczucie słodkości zbliżone do sacharozy, ale nie powoduje wzrostu stężenia glukozy i insuliny we krwi, więc może być używany przez diabetyków oraz nie powoduje próchnicy zębów, bo nie jest rozkładany przez mikroorganizmy jamy ustnej. Jego biotechnologiczna produkcja została przedstawiona w publikacji [2.D.2]. Natomiast wyniki wstępnych badań

eksperymentalnych dotyczących wykorzystania drożdży z rodzaju *Candida* zaprezentowałam w formie doniesień konferencyjnych [6.A.1.] i [6.A.2.]. Równocześnie przebadalam uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej karioduktanty *S. cerevisiae* V₃₀ i *P. stipitis* CCY 39501 pod kątem uzdolnień do produkcji ksylitolu z ksylozy, a wyniki tych badań zaprezentowałam na konferencji naukowej [6.B.6.].

5.2. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej, a nie opublikowane przed obroną, zostały opublikowane w postaci 3 oryginalnych prac twórczych: [2.D.4., 2.D.5., 2.D.8.]. Kontynuowałam badania nad produkcją etanolu i ksylitolu przez drożdże, co zostało zaprezentowane na 2 konferencjach krajowych [6.B.7., 6.A.5.]. Natomiast cenne właściwości i zastosowanie ksylitolu zostały przedstawione w publikacji przeglądowej [2.D.6.]. W trakcie dalszego zdobywania wiedzy w temacie biotechnologicznego wykorzystania pentoz narodziła się koncepcja realizacji zagadnienia dotyczącego wykorzystania L-arabinozy przez drożdże i produkcji arabitolu. L-arabinoza jest drugim po ksylozie cukrem pentozowym obecnym w hydrolizatach ligninocelulozowych, który jest znacznie trudniej asymilowany przez drobnoustroje i na ten temat stan wiedzy i przeprowadzonych badań był niewielki. W początkowym okresie badań wykonywane były eksperymenty dotyczące selekcji drożdży z rodzaju *Pichia* i *Candida* dostępnych w kolekcji Katedry Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności: *P. stipitis* CCY 39501, *P. guilliermondii* DSM 70052, *C. shehatae* 3504, *C. shehatae* ATCC 22984, *C. pseudotropicalis* IPF 65, *C. parapsilosis* DSM 70125. *C. parapsilosis* DSM 70125 okazała się najlepszym producentem arabitolu, który wydzielala w stężeniach 10-14 g/l w podłożu zawierającym początkowo 20 g/l arabinozy, dając najwyższą wydajność 0,78 g/g i produktywność 0,036 g/g×h. Innymi dobrymi producentami arabitolu okazały się drożdże *P. guilliermondii* DSM 70052 i *C. shehatae* ATCC 22984, które produkowały pentitol z wydajnościami, odpowiednio, 0,43 g/g i 0,50 g/g, w warunkach optymalnych czyli przy 150 obr./min i w temp. 28°C. Wyniki te zostały opublikowane w artykule [2.D.13] i były punktem wyjścia do kolejnych badań, które zostały przedstawione jako Osiągnięcie naukowe. Uzyskane przeze mnie karioduktanty *S. cerevisiae* V₃₀ i *P. stipitis* CCY 39501: SP-K2, SP-K3, SP-K4, SP-K7 i SP-K8, które były zdolne do asymilacji arabinozy, zostały również poddane doświadczeniu selekcyjnemu nad produkcją arabitolu z L-arabinozy. Wszystkie karioduktanty oraz szczep kontrolny asymilowały arabinozę i produkowały arabitól, a szybkość procesów metabolicznych była uzależniona od szybkości wytrząsania. Najwyższe stężenia produktu otrzymano w hodowlach

karioduktantów prowadzonych przy 150 obr./min platformy wytrząsarki Infors HT Minitron w temperaturze 28°C po 2 lub 3 dobach inkubacji (11,97 – 17 g/l). Wydajności arabitolu mieściły się w przedziale 0,67 – 0,95 g/g, a produktywności w zakresie 0,023 – 0,054 g/g×h. Najlepszymi uzdolnieniami do biotransformacji arabinozy do arabitolu wykazał się karioduktant SP-K 7 niezależnie od warunków hodowli. Pod względem wydajności i produktywności szczep SP-K 4 również dał zadowalające wyniki. Te dwa karioduktanty zostały przebadane pod kątem wpływu temperatury na proces produkcji arabitolu i wykazano, że optimum temperaturowe stanowiło 28°C. Wzrost biomasy drożdży również zależał od napowietrzania hodowli i osiągał najwyższe wartości (ok. 9 g/l) podczas wytrząsania przy 200 obr./min. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane na XXVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w formie doniesienia [6.B.18.], a najlepszy szczep SP-K 7 został poddany optymalizacji statystycznej RSM, zaś uzyskane wyniki weszły w skład Osiągnięcia naukowego.

Równoległe z badaniami w zakresie produkcji biotechnologicznej polioli, doskonaliłam swój warsztat badawczy dotyczący analizy mikrobiologicznej żywności i szeroko pojętych badań nad różnymi aspektami mikrobiologicznymi żywności. W latach 2001-2009 prowadziłam współpracę z firmą Osmofrost Sp. z. o.o. w Osmolicach w zakresie analiz mikrobiologicznych mrożonych owoców i warzyw produkowanych w tym zakładzie na podstawie umowy o współpracy w ramach projektu pt. „Analiza mikrobiologiczna i fizykochemiczna mrożonych owoców i warzyw”. W latach 2004-2007 współpracowałam również z Zakładem Przetwórstwa Spożywczego Maków w Makowie w zakresie wykonywania analiz mikrobiologicznych mrożonek owocowych i warzywnych. Analiza obejmowała oznaczanie ogólnej liczby bakterii, bakterii mlekowych, bakterii octowych, drożdży i pleśni, *Enterobacteriaceae*, bakterii z grupy coli i *Escherichia coli*, enterokoków, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* i *Proteus* sp. w próbach mrożonek, które były dostarczane do laboratorium. Wszystkie analizy były wykonywane przeze mnie i współpracowników zgodnie z obowiązującymi polskimi, a później europejskimi (po wejściu Polski do Unii Europejskiej) normami i pozwoliły mi również na gruntowne śledzenie zmian w ustawodawstwie dotyczącym jakości mikrobiologicznej żywności. Wszystkie wyniki były przekazywane firmom w postaci raportów, które osobiście przygotowywałam. Uzyskane wyniki, za zgodą Zarządu firmy Osmofrost, były przedmiotem publikacji naukowych [2.D.9. i 2.D.12.]. W artykule [2.D.9.] przedstawiono mikrobiologiczną ocenę mrożonych owoców jagodowych:

truskawek, malin, porzeczek czarnych i czerwonych, agrestu i borówki czernicy, wyprodukowanych w 2001 r. Analiza gotowych wyrobów obejmowała wspomniane wyżej mikroorganizmy. Największą liczbę bakterii mezofilnych, bakterii mlekowych i drożdży odnotowano w próbach borówek (4 – 5 log jtk/g), a najniższą w próbach mrożonego agrestu (1 - 2 log jtk/g). Liczba pleśni była najniższa w truskawkach, a najwyższa w porzeczkach czarnych i czerwonych, jagodach i malinach (3 log jtk/g). Nie stwierdzono w owocach obecności bakterii coli, *Proteus* spp., *S. aureus*, *Salmonella* spp. i *Listeria* spp. Jakość mikrobiologiczna analizowanych mrożonych owoców w przypadku większości prób spełniała wymagania polskie i zagraniczne. W artykule [2.D.12.] została przedstawiona jakość mikrobiologiczna 78 prób mrożonych warzyw (fasoli szparagowej, pora, kalafiora, kalafiora Romanesco, brukselki, cebuli, kapusty białej, jarmużu, brokułu). W próbach oznaczano obecność lub liczbę bakterii chorobotwórczych z rodzaju *Salmonella* ssp., *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* i *C. perfringens* oraz wskaźniki zanieczyszczenia fekalnego takie jak: bakterie z grupy coli, bakterie coli typu fekalnego, *E. coli* i enterokoki. W żadnej próbie nie stwierdzono obecności bakterii *Salmonella* ssp. Pałeczki *L. monocytogenes* wykryto w 10,3% prób (próbki brukselki, jarmużu, brokułu, pora, fasolki, kalafiora i kalafiora Romanesco). *B. cereus* i *S. aureus* wykryto odpowiednio w 12,8 oraz 6,4% prób, lecz stopień zanieczyszczenia mrozonek przez te bakterie był niewielki, niezagrażający zdrowiu konsumentów. Bakterie *Cl. perfringens* występowały łącznie w 14,1% prób. Bakterie wskaźnikowe zanieczyszczenia fekalnego były obecne w większości badanych warzyw: bakterie z grupy coli stwierdzono w 93,6% prób, coli fekalne w 83,3%, *E. coli* w 69,2%, a enterokoki w 78,2% prób mrozonek. Liczba bakterii wskaźnikowych zanieczyszczenia fekalnego na ogół mieściła się w przedziale 0,2 - 3,66 log jtk/g. Ogólny stan sanitarno-zdrowotny mrożonych warzyw budził zastrzeżenia, a uzyskane wyniki wskazywały na potrzebę polepszenia jakości produkcji.

Tematykę jakości mikrobiologicznej żywności w kontekście metod przechowywania kontynuowałam w badaniach nad wpływem sposobu pakowania na jakość mikrobiologiczną pasztetów, które jako wyroby garmażeryjne cieszą się w Polsce dużym zainteresowaniem od lat. Przebadano 20 prób pasztetów mięsnych i drobiowych, pakowanych w różne opakowania: słoiki, puszki, opakowania aluminiowo-polipropylenowe, próżniowo w folię PE/PA oraz w papier pergaminowy bezpośrednio z lady chłodniczej, a wyniki zostały opublikowane w artykule [2.D.10]. Oznaczenia wykonywano zgodnie z polskimi normami i obejmowały one: ogólną liczbę bakterii mezofilnych i psychrotrofowych, bakterii mlekowych, drożdży i pleśni,

bakterii z grupy coli i enterokoków, obecność bakterii proteolitycznych, beztlenowców przetrwalnikujących oraz *B. cereus*, *S. aureus* i *Salmonella* spp. Stwierdzono najmniejszą liczbę bakterii w pasztetach w puszkach. W pasztetach pakowanych w puszki, słoiki i folię PE/PA nie wykryto bakterii chorobotwórczych. Nigdzie nie były obecne bakterie coli, natomiast enterokoki jako odporniejsze na różne metody utrwalania żywności wykryto w 35% prób. Pakowanie próżniowe natomiast sprzyjało rozwojowi bakterii fermentacji mlekowej. Wszystkie pasztesy oceniono jako bezpieczne dla zdrowia konsumentów. Tematyka jakości mikrobiologicznej produktów mięsnych i wpływu metod utrwalania żywności na ich mikroflorę była kontynuowana w trakcie mojej współpracy z dr. hab. inż. Dariuszem Stasiakiem z Katedry Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością UP w Lublinie, zajmującym się zastosowaniem ultradźwięków w przemyśle mięsnym. Nasza współpraca dotyczyła wpływu ultradźwięków na mikroorganizmy bytujące na mięsie i ewentualnego ich użycia do eliminacji mikroflory niepożądaney i przedłużania trwałości mięsa. Do badań były wykorzystane skrzydełka drobiowe, które poddawano działaniu ultradźwięków o częstotliwości 40 kHz i natężeniu ok. 2 W/cm² stosując różne czasy sonikacji (1, 3, 6 min) i różne ośrodki (woda destylowana i 1% wodny roztwór kwasu mlekowego). Badaliśmy wpływ sonikacji na zmianę ogólnej liczby bakterii na powierzchni skrzydełek i liczby bakterii *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sv. Anatum, którymi zakażano skrzydełka poprzez posiewy bakterii pobranych z wymazów na odpowiednie podłoża mikrobiologiczne. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskaliśmy pozytywny efekt niezależnie od czasu działania i stosowanego ośrodka (cieczy roboczej); ogólna liczba bakterii na powierzchni skrzydełek spadła o 1,8 log jtk/cm² po 6 min nadźwiękawiania w wodzie, a liczba pałeczek *Salmonella* spadła o 3,6 log jtk/cm² po sonikacji w roztworze kwasu mlekowego. Stwierdzono efekt wymywania bakterii z powierzchni mięsa do ośrodka, jednak jeśli był to roztwór kwasu mlekowego, bakterie *Salmonella* jako wrażliwe, były całkowicie eliminowane. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy [2.A.1.]. Podobna tematyka była przedmiotem badań zaprezentowanych w publikacji [2.A.6.], gdzie badaliśmy wpływ sonikacji na przeżywalność bakterii Gram-ujemnych: *E. coli*, *S. enterica* ssp. *enterica* sv. Anatum, *Proteus* sp. i *Pseudomonas fluorescens*, które występują na mięsie i mogą być przyczyną chorób przewodu pokarmowego (*E. coli*, *S. enterica*) lub prowadzą do zmian gnilnych mięsa (*Proteus* sp. i *P. fluorescens*). Stopień redukcji bakterii zależał od czasu działania ultradźwięków, rodzaju ośrodka i rodzaju bakterii. Najskuteczniejsze było działanie ultradźwięków przez 6 min w 1% roztworze kwasu mlekowego, kiedy to uzyskaliśmy redukcję bakterii w zakresie od ok. 1,5 log jtk/cm² (dla *E. coli* i *Proteus* sp.) do powyżej 4 log jtk/cm² (dla *P. fluorescens*). Badania

prorowadzone z wykorzystaniem trzykrotnym niewymienianego roztworu kwasu mlekowego potwierdziły przydatność tej metody w przemysłowym zastosowaniu do eliminacji bakterii Gram-ujemnych. Działanie ultradźwięków na bakterie chorobotwórcze Gram-dodatnie: *S. aureus* i *B. cereus* zanieczyszczające skrzydełka drobiowe zostało zaprezentowane w rozdziale w monografii [2.C.5]. Ponieważ bakterie Gram-dodatnie są z reguły bardziej odporne na działanie czynników bójących, zastosowano czasy działania ultradźwięków 5, 10, 15 min oraz roztwory kwasu mlekowego o stężeniach 0,8, 2,4 i 4 %. Całkowitą eliminację gronkowca z powierzchni skrzydełek drobiowych ($3,5 \log \text{ jtk/cm}^2$) uzyskano po 15 min sonikacji w 2,4% roztworze kwasu mlekowego, natomiast laseczki *Bacillus* były eliminowane podczas 10 min sonikacji w 0,8% roztworze tego kwasu lub podczas 5 min sonikacji w 2,4% kwasie (redukcja bakterii odpowiednio o 3 i $3,8 \log \text{ jtk/cm}^2$). Podczas powyższych działań bakterie nie przeżywały w cieczy roboczej. Wyniki wszystkich badań, które były przeprowadzone jednoznacznie potwierdziły przydatność procesu nadźwiękawiania porcji mięsnych w kontekście eliminacji niepożądanego mikroflory.

Moje zainteresowania naukowe dotyczące przeżywalności mikroorganizmów w żywności kontynuowałam współpracując z dr hab. inż. Pawłem Glibowskim, badając stabilność mikroflory w emulsjach - potencjalnych zamiennikach tłuszczu, złożonych z izolatu białek serwatkowych lub polirycynooleinianu poliglicerolu z dodatkiem inuliny i oleju rzepakowego, z których połowa była konserwowana sorbinianem potasu. Oznaczenia mikrobiologiczne wykonywane wg stosownych norm po 1 dobie od wytworzenia oraz po 7, 14, 28, 42 i 56 dniach przechowywania, dotyczyły ogólnej liczby bakterii mezofilnych, drożdży i pleśni, bakterii z grupy coli, liczby *S. aureus*, obecności *Salmonella* spp. i *Listeria* spp. oraz liczby bakterii lipolitycznych. Wyniki pokazały, że większość kombinacji była mikrobiologicznie stabilna osiągając liczebność na poziomie kilku-kilkudziesięciu jtk/g, tylko dodatek izolatu białek serwatkowych powodował intensywny wzrost mikroorganizmów (do 10^{10} jtk/g po 8 tygodniach przechowywania), który jednak można było zahamować sorbinianem potasu. W otrzymanych emulsjach nie stwierdzono obecności bakterii chorobotwórczych, lipolitycznych oraz drożdży i pleśni. Biorąc pod uwagę inne aspekty przeprowadzonych badań, emulsje z dodatkiem inuliny mogą znaleźć zastosowanie jako zamienniki popularnych emulsji do smarowania pieczywa. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w publikacji [2.A.8].

Moje zainteresowania badawcze dotyczące wykorzystania drożdży rozwinęłam poprzez współpracę z Prof. dr hab. Anną Wagner i dr Beatą Hetman z Katedry Kwarantanny i

Ochrony Roślin UP w Lublinie. Pomysł zrodził się z potrzeby poszukiwania metod ochrony roślin alternatywnych wobec powszechnie stosowanych fungicydów, których pozostałości bardzo często trafiają na stoły konsumentów wraz z owocami i warzywami. Współpraca z mojej strony polegała na selekcji drożdży o uzdolnieniach antagonistycznych wobec grzybów fitopatogennych powodujących choroby roślin uprawnych w trakcie wegetacji, jak i po zbiorze. W początkowym etapie badań, opublikowanych w artykule [2.D.11.] sprawdzono 18 szczepów drożdży z rodzaju *Candida* (11), *Pichia* (3), *Saccharomyces* (2), *Kluyveromyces* (1) i *Yarrowia* (1) w postaci zawiesin w układach *in vitro* na płytkach Petriego. Na pożywkę nanoszono zawiesiny drożdży, a następnie inokulowano ją fragmentami grzybni *Botrytis cinerea*. Na podstawie badań selekcyjnych zostały wyłonione szczepy drożdży *C. butyri* JCM 1501, *C. melibiosica* 2515, *C. parapsilosis* DSM 70125 i *P. stipitis* CBS 5773, które przeznaczono do badań *in vivo* na jabłkach zainfekowanych sztucznie grzybem. W doświadczeniu infekcyjnym zaobserwowano ograniczony wzrost grzybni *B. cinerea*, a procent hamowania nekrozy po 5 dniach był najwyższy w kombinacji z *P. stipitis* (98,5%), a w innych kombinacjach wynosił 70-75%. Wraz z upływem czasu widoczny był spadek zdolności hamowania i po 2 tygodniach oddziaływanie hamujące sięgało od 10% dla *C. butyri* do 52%, dla *P. stipitis*. W obserwacjach mikroskopowych stwierdzono deformację strzępek i zarodników *B. cinerea*. Takie same badania selekcyjne były prowadzone również na innych grzybach strzępkowych, patogenach owoców, takich jak *Colletotrichum gloeosporioides*, *Monilinia fructigena* czy *Alternaria alternata*. Interesujące wyniki uzyskane zostały podczas badań oddziaływań antagonistycznych drożdży *C. melibiosica* 2515 na grzyby *B. cinerea*, *A. alternata* i *A. radicina* atakujące korzenie marchwi podczas przechowywania, co opublikowano w artykule [2.A.9.]. Oprócz badań *in vitro* i *in vivo* na korzeniach marchwi, została podjęta próba wyjaśnienia sposobu działania drożdży: produkcji związków lotnych, jak i wydzielania zewnątrzkomórkowych enzymów litycznych. Drożdże hamowały wzrost *B. cinerea* na marchwi po 5 dniach od inokulacji w 35%, a *A. radicina* w ok. 38%, po 2 tygodniach przechowywania wzrost grzybów był ograniczony o ok. 20%, a w przypadku podwójnej aplikacji zawiesiny drożdży sięgał 39-49%. Stwierdzono uzdolnienia drożdży do produkcji enzymów litycznych: β -glukanazy i chitynazy, wykazujących aktywności odpowiednio 34-232,86 U/ml i 20,74-43,7 U/ml, w zależności od stosowanego induktora w pożywce hodowlanej dla *C. melibiosica*. W metodzie płytkowej zaobserwowano również wydzielanie związków lotnych przez drożdże, a obserwacje mikroskopowe potwierdziły zniekształcenie zarodników *A. radicina*. Przydatność drożdży *C. melibiosica* jako czynników biokontroli przeciwko chorobom pozbiorowym marchwi została potwierdzona. Podjęłam tą

ciekawą i obszerną tematykę również w publikacji przeglądowej [2.A.7.], w której przedstawiałam rezultaty badań nad różnymi drożdżami w ochronie owoców i warzyw, zastosowanie drożdży w hamowaniu grzybów fitopatogennych pochodzenia glebowego, mechanizmy antagonizmu drożdży i ich wpływ na indukcję odporności roślin, metody poprawy skuteczności drożdży i komercyjne preparaty ochronne a także perspektywy stosowania drożdży jako czynniki biologicznej ochrony roślin. Temat aktywności antagonistycznej drożdży pojawił się również w publikacji [2.A.13.], w której zostały przebadane drożdże wyizolowane ze środowiska pod kątem wytwarzania białek killerowych, hamujących wzrost lub działających bójezo na komórki innych mikroorganizmów. Fenotyp killerowy występuje często u drożdży ze środowisk naturalnych i może być wykorzystany w przemyśle fermentacyjnym (np. w winiarstwie lub fermentacji warzyw) w komponowaniu kultur starterowych jednocześnie zapobiegających rozwojowi niepożądanych mikroorganizmów lub we wspomnianej wcześniej biokontroli wzrostu fitopatogenów. Zastosowano metodę płytkową, studzienkową, wykorzystując znane szczepy wrażliwe. Drugim aspektem badań była optymalizacja warunków produkcji toksyn killerowych przez drożdże. Spośród 102 izolatów uzyskano 24 szczepy o pozytywnej aktywności killerowej i 10 o aktywności słabej. Najwyższa aktywność była obserwowana wśród izolatów ze środowisk leśnych i kwiatów. Zaprezentowane badania były wstępem do dalszych badań nad produkcją białek killerowych przez drożdże.

Równolegle z powyższymi badaniami brałam udział jako wykonawca w projekcie naukowym dotyczącym opracowania preparatu probiotycznego w oparciu o bakterie *Lactobacillus rhamnosus* - szczepy PEN, OXY i E/N (numer projektu 0603/R/P01/2007/03). Pierwszy etap badań koncentrował się na optymalizacji składu pożywki hodowlanej dla poszczególnych szczepów. Punktem wyjścia było podłoże MRS rutynowo stosowane do hodowli bakterii mlekowych, które zostało poddane modyfikacjom pod kątem źródła węgla, stężenia źródła azotu i ewentualnego dodatku witamin z grupy B i aminokwasów. W badaniach skriningowych okazało się, że korzystnie na przyrost biomasy bakterii wpływa glukoza z dodatkiem pirogronianu sodu, źródła azotu (ekstrakt drożdżowy, mięśny i pepton K) wystarczy dodać w ilości 0,22 g/l (100 razy mniej niż w MRS), natomiast suplementacja dodatkowymi aminokwasami i witaminami nie jest potrzebna. Na bazie wykonanych eksperymentów wyłoniono najważniejsze trzy czynniki wpływające na wzrost wszystkich szczepów za pomocą modelu statystycznego Placketta-Burmana; były to glukoza z pirogronianem, ekstrakt mięśny oraz mieszanina soli organicznych i nieorganicznych. Te trzy

zmienne posłużyły do kompozycji statystycznego modelu CCD (central composite design), a następnie wyłonieniu wartości optymalnych trzech badanych zmiennych za pomocą równania regresji i metody płaszczyzny odpowiedzi (RSM). Dokładne wyniki zostały przedstawione w publikacjach [2.A.2., 2.A.3. i 2.A.5]. Warto nadmienić, że otrzymane pożywki hodowlane były tańsze od podłoża MRS, a przyrost biomasy bakterii był zdecydowanie większy lub wymagał krótszego czasu hodowli. Hodowle weryfikacyjne w bioreaktorze potwierdziły zadowalające dopasowanie modelu. W dalszej części projektu badania koncentrowały się na zwiększeniu przeżywalności bakterii w trakcie liofilizacji i podczas przechowywania preparatu bakteryjnego. Wykonano skринing różnych krioprotektantów w aspekcie przeżywalności bakterii i do dalszych badań w metodzie Placketta-Burmana wybrane zostały trzy: spirulina, sacharoza i laktuloza o największym wpływie na żywotność komórek *L. rhamnosus* E/N. Te protektanty posłużyły do skomponowania modelu CCD, wykonaniu serii eksperymentów i wyłonieniu stężeń substancji, które stanowiłyby optymalne medium protekcyjne dla bakterii. Dla szczepu E/N stężenia były następujące: spirulina – 1,304 % w/v, laktuloza 5,48 % w/v i sacharoza 13,04 % w/v. Model przewidział przeżywalność bakterii na poziomie 89,62%, natomiast eksperymentalnie oznaczona przeżywalność po liofilizacji wyniosła 87,5%. Uzyskane wyniki przedstawiono w publikacji [2.A.4.] oraz został uzyskany patent P-393189 [2.B.2]. Wyniki uzyskane dla szczepu PEN zostały zaprezentowane w postaci doniesienia konferencyjnego [6.B.17.].

W obszar badań nad bakteriami mlekowymi wpisuje się dodatkowo badanie dotyczące wpływu prebiotyków na wzrost bakterii mlekowych w biojogurtach, co przedstawia publikacja [2.D.14.]. Jogurty były produkowane przez bakterie probiotycznej szczepionki jogurtowej ABT1, zawierającej *S. thermophilus*, *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* sp. na bazie proszku mlecznego z dodatkiem inuliny, fruktooligosacharydów lub skrobi odpornej w stężeniach 1, 2 i 3% w/w. Analiza liczby poszczególnych bakterii wykazała, że fruktooligosacharydy i inulina wpływały korzystnie na wzrost bakterii *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* sp., natomiast skrobia oporna na *S. thermophilus*. Wszystkie jogurty spełniały wymogi FAO/WHO odnośnie zawartości żywych komórek bakterii przez 14 dni (7-9 log jtk/g). Dodatek prebiotyków powodował wzrost lepkości i twardości biojogurtów oraz spadek synerezy.

Kolejny projekt, finansowany ze środków Unii Europejskiej z Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka PO IG 01.01.02-00-074/09, w którym brałam udział, dotyczył biokonwersji glicerolu do kwasów dikarboksyłowych. Zadania, które realizowałam, miały na

celu modyfikacje genetyczne grzybów z rodzaju *Rhizopus* charakteryzujących się uzdolnieniami do produkcji kwasu fumarowego, stosowanego w przemyśle spożywczym jako naturalny środek konserwujący i zakwaszający. Jedną z metod, która została użyta w projekcie, była fuzja protoplastów dwóch gatunków *R. oryzae* NBRC 4756 i *R. microsporus* z żyta, aby wzmocnić produkcję kwasu fumarowego. Młode, kiełkujące strzępki grzybów były trawione enzymami litycznymi, aby otrzymać protoplasty. Protoplasty były następnie poddane inaktywacji termicznej lub chemicznej i w różnych kombinacjach przeprowadzono ich fuzję chemiczną. W efekcie uzyskano 14 fuzantów. Najlepsze izolaty poddano drugiej rundzie fuzji, w której otrzymano 8 fuzantów. Najlepszy izolat A2-7 produkował średnio 4,1 g/l kwasu fumarowego z glicerolu z wydajnością 0,27 g/g., co było wynikiem 1,46 razy wyższym w porównaniu ze szczepami rodzicielskimi. Wyniki opublikowane zostały w artykule [2.D.15]. Inną metodą doskonalenia szczepów *Rhizopus*, opublikowaną jako rozdział w monografii [2.C.7.] było użycie po raz pierwszy kolchicyny do poliploidyzacji, a następnie benomylu do haploidyzacji szczepów *R. oryzae* i *R. microsporus*, aby spowodować losowe zmiany materiału genetycznego. W kolejnym kroku zastosowano selekcję mutantów na podłożu z glicerolem i zielenią brylantową, aby wyizolować najefektywniejsze szczepy, które następnie były sprawdzone pod kątem zdolności produkcyjnych kwasu fumarowego w podłożu płynnym z glicerolem. Wyizolowano po 10 szczepów *R. oryzae* R-15 i R-18 oraz 6 izolatów *R. microsporus* R-67. Uzyskano 5 szczepów *R. oryzae*, które produkowały kwas efektywniej niż szczepy rodzicielskie, dając wydajności 0,18-0,21 g/g. Dwa najefektywniejsze mutanty produkowały kwas fumarowy z wydajnością wyższą o około 17% w porównaniu do szczepów rodzicielskich. W czasie trwania projektu wszystkie zmodyfikowane szczepy były stabilne. Podsumowując ten etap badań, można stwierdzić, że modyfikacje grzyba *Rhizopus*, mimo że dość trudne do przeprowadzenia z uwagi na specyfikę tego mikroorganizmu, zakończyły się sukcesem.

Kolejną tematyką badawczą, którą podjęłam w ramach projektu 5015/B/P01/2011/40 były badania nad właściwościami antymikrobiologicznymi powłok jadalnych. Temat zgłębiałam we współpracy z dr hab. inż. Dariuszem Kowalczykiem z Katedry Biochemii i Chemii Żywności UP w Lublinie. W badaniach wstępnych oznaczałam działanie biobójcze filmów jadalnych skomponowanych na bazie różnych polimerów: karboksymetylocelulozy, utlenionej skrobi ziemniaczanej, izolatu białka sojowego i żelatyny z dodatkiem sorbitolu, wosku kandelila i emulgatora oraz konserwantu – sorbinianu potasu w różnych stężeniach metodą dyfuzyjno-krążkową na płytkach Petriego. Stosowałam bakterie i grzyby strzępkowe

często występujące w żywności, powodujące niepożądane zmiany jakości higienicznej i handlowej m. in. warzyw i owoców: *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Pectobacterium carotovorum*, *B. cinerea*, *M. fructigena*, *A. alternata* i *R. nigricans*. Badane były również inne właściwości powłok: grubość, zawartość wilgoci, przepuszczalność pary wodnej i światła oraz różne właściwości mechaniczne. Ogólnie powłoki z dodatkiem sorbinianu potasu działały hamująco na bakterie i grzyby, a działanie zależało od stężenia konserwantu, rodzaju polimeru i drobnoustroju. Badania zostały opisane w publikacji [2.A.10.], a podsumowując wszystkie właściwości powłok, najlepsza okazała się powłoka na bazie karboksymetylocelulozy. Podobne badania były wykonane na powłokach jadalnych skomponowanych z mleczanu chitozanu oraz mleczanu z dodatkiem utlenionej skrobi ziemniaczanej lub żelatyny. Naturalne właściwości antymikrobiologiczne mleczanu chitozamu zostały oznaczone poprzez analizę minimalnych stężeń hamujących i bójczych podczas działania na powyżej wymienione bakterie i grzyby strzępkowe. Podczas metody dyfuzyjno-krażkowej wykazałam, że hamująco wobec bakterii i grzybów *A. alternata* i *M. fructigena* działał film wytworzony z samego mleczanu chitozanu lub film zawierający mleczan z dodatkiem żelatyny, który charakteryzował się najlepszymi właściwościami mechanicznymi i obniżoną przepuszczalnością, co zostało opisane w publikacji [2.A.11.]. W kolejnych etapach badań podjęta była próba zastosowania filmu złożonego z karboksymetylocelulozy i wosku kandelila z sorbinianem potasu do powlekania gruszek i moreli zainfekowanych grzybami pleśniowymi w trakcie przechowywania [2.A.14, 2.A.15]. Powłoka była efektywna wobec *B. cinerea* i *M. fructigena* na obu rodzajach owoców. Powleczone filmem gruszki i morele wykazywały wolniejsze dojrzewanie, utrzymywały właściwy kolor i twardość. Niestety pojawiły się oznaki oddychania beztlenowego powodujące zmiany jakości sensorycznej owoców.

Dzięki moim wcześniejszym badaniom nad bakteriami mlekowymi oraz pracom związanym z jakością mikrobiologiczną żywności zostałam zaproszona przez dr hab. Michała Świecę z Katedry Biochemii i Chemii Żywności do udziału w projekcie nad opracowaniem synbiotycznych kiełków roślin strączkowych. Kiełki od lat stosowane są w diecie ludzi ze względu na dostępność mikroelementów, witamin i innych substancji odżywczych. Do badań wykorzystano nasiona soi, soczewicy, fasoli adzuki i fasoli mung, które kiełkowały w obecności popularnych bakterii probiotycznych o udokumentowanym działaniu prozdrowotnym: *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* i drożdży probiotycznych *S. cerevisiae* var. *bouardii*. Badania selekcyjne miały na celu wyłonienie najlepszej kombinacji

rośliny i mikroorganizmu, który dobrze utrzymuje się na materiale roślinnym. Do tej pory ukazały się dwie publikacje [2.D.18.] i [2.D.19.], w których opisane zostały warunki kiełkowania nasion w obecności *L. acidophilus* i *L. rhamnosus*. Stwierdziliśmy, że przeżywalność i wzrost *L. acidophilus* zależały od temperatury kiełkowania, metody inokulacji i gatunku rośliny. Wzrost bakterii był odnotowany na kiełkach soi i soczewicy w liczbie ok. 1×10^7 i odpowiednio 7×10^6 jtk/g świeżej masy po kiełkowaniu w temp. 30-35°C. Kiełki soi uzyskały najlepsze przyrosty i spełniały wymóg obecności odpowiedniej liczby bakterii probiotycznych w porcji kiełków przeznaczonych do jednorazowego spożycia. *L. rhamnosus* osiągał najwyższą liczebność na kiełkach soi i soczewicy rosnących w temp. 25°C, która wynosiła odpowiednio 7×10^6 i 3×10^6 jtk/g świeżej masy. Kiełki soi okazały się również najlepszym nośnikiem dla *L. rhamnosus*. Publikacje opisujące badania skryningowe dla *L. plantarum* i *S. cerevisiae* var *boulardii* oraz jakość mikrobiologiczną i bezpieczeństwo kiełków oraz przeżywalność bakterii są obecnie w recenzjach. Niektóre wyniki zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych międzynarodowych i krajowych [6.A.7., 6.B.30., 6.B.31., 6.B.34., 6.B.35].

Podsumowując, w okresie zatrudnienia w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie prowadzone przeze mnie badania dotyczyły następujących zagadnień:

- fermentacja etanolowa glukozy i ksylozy przez mieszane kultury drożdży lub drożdże modyfikowane;
- biotransformacja cukrów pentozowych do polialkoholi przez drożdże;
- wykorzystanie właściwości antagonistycznych drożdży w biokontroli grzybów powodujących choroby płodów rolnych;
- biokonwersja glicerolu do kwasu fumarowego przez grzyby z rodzaju *Rhizopus*;
- jakość mikrobiologiczna żywności;
- alternatywne metody eliminacji niepożądanych mikroorganizmów w żywności;
- wykorzystanie bakterii fermentacji mlekowej w preparatach i produktach synbiotycznych.

6. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego

Mój łączny dorobek naukowy stanowi **95 pozycji**, w tym:

- 41 oryginalnych prac twórczych (38 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora)
- 1 monografia naukowa (1 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora)
- 8 rozdziałów w monografiach (8 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora)

- 5 komunikatów naukowych na konferencje międzynarodowe (5 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora)
- 38 komunikatów naukowe na konferencje krajowe (28 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora)
- 2 patenty (2 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora).

6.1. Wskaźniki dokonań naukowych

- Suma punktów za publikacje, według załączników do Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego lub Komitetu Badań Naukowych za odpowiedni rok (wg roku opublikowania) wynosi: **641** (629 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora),
- Sumaryczny *impact factor* publikacji naukowych według listy *Journal Citation Reports* (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: **22,617** (**22,617** po uzyskaniu stopnia naukowego doktora),
- liczba prac opublikowanych w czasopismach indeksowanych przez *Journal Citation Reports* (JCR) wynosi **20** (łącznie 404 punktów*),
- Indeks Hirscha opublikowanych prac według bazy Web of Science Core Collection (na dzień 9.06.2018) wynosi 6, według bazy Web of Science All Databases wynosi: 8, według bazy Scopus 9,
- Liczba cytowań publikacji (na dzień 9.06.2018) według bazy Web of Science Core Collection wynosi 87 (bez autocytowań 79), według bazy Web of Science All Databases wynosi: 133 (bez autocytowań 124), a według bazy Scopus wynosi: 169.

6.2. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego

Rodzaj publikacji	Liczba	Punkty MNiSW*	IF**
Przed uzyskaniem stopnia doktora			
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR)	-	-	-
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR)	3	12	-
Rozdziały w monografiach	-	-	-
Łącznie publikacje	3	12	-

Po uzyskaniu stopnia doktora			
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR)	20	404	22,169
W tym stanowiące szczególne osiągnięcie	5	100	4,993
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR)	16	100	
W tym stanowiące szczególne osiągnięcie	1	14	0,448
Rozdziały w monografiach	8	40	
W tym stanowiące szczególne osiągnięcie	-		
Monografia naukowa	1	25	
Łącznie publikacje	46	569	22,617
Publikacje niepunktowane			
- Przed uzyskaniem stopnia doktora	-	-	-
- Po uzyskaniu stopnia doktora	1	-	-
Łącznie publikacje	1	-	-
Komunikaty naukowe			
- Przed uzyskaniem stopnia doktora	10	-	-
- Po uzyskaniu stopnia doktora	33	-	-
Łącznie komunikaty naukowe	43	-	-
Patenty	2	60	
RAZEM	95	641	22,617

* wg załączników do Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego lub wykazów Komitetu Badań Naukowych (lata 1996-2003) za odpowiedni rok (wg roku opublikowania). **IF zgodnie z rokiem wydania

6.3. Zestawienie czasopism, w których opublikowano prace naukowe

Czasopismo	Punkty MNiSW*	Liczba prac		Suma punktów*
		Przed doktoratem	Po doktoracie	
Czasopisma znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)				
Bulletin of the Veterinary Institute in <u>Puławy</u>	20		1	20
Postępy Mikrobiologii	15		1	15
Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus	20		1	20
Acta Biologica Hungarica	20		1	20
Polish Journal of Microbiology	9/15/15		3	39
Letters in Applied Microbiology	20		1	20
Brazilian Journal of Microbiology	15		1	15

Food and Bioprocess Technology	40		1	40
International Journal of Biological Macromolecules	25		1	25
Scientia Horticulturae	35		1	35
International Journal of Food Sciences and Technology	25		1	25
Czech Journal of Food Sciences	15		1	15
Journal of Chemistry	20		1	20
Acta Biochimica Polonica	15		1	15
Central European Journal of Biology	20		1	20
Journal of Applied Microbiology	30		1	30
Food Science and Biotechnology	20		1	20
Medycyna Weterynaryjna	10		1	10
Czasopisma wymienione w części B wykazu czasopism naukowych MNiSW				
Postępy Mikrobiologii	4	1		4
Biotechnologia	4/4/4/5	2	2	17
Acta Microbiologica Polonica	6		2	12
Electronic Journal of Polish Agricultural Universities	6		1	6
Progress In Plant Protection	4		1	4
Przemysł Spożywczy	1/5/12		3	18
Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria	9		1	9
Open Life Sciences	14		1	14
Żywność Nauka Technologia Jakość	3/4/4/4/13		5	28
Czasopisma naukowe nieujęte w wykazie czasopism naukowych MNiSW				
Journal of International Scientific Publications: Agriculture & Food	-	-	1	-
Monografie**	25	-	1	25
Rozdziały w monografiach w języku polskim**	5	-	5	25
Rozdziały w monografiach w języku angielskim**	5		3	15
Komunikaty naukowe na konferencje międzynarodowe	-	-	5	-
Komunikaty naukowe na konferencje krajowe	-	10	27	-
Patenty	30	-	2	60
RAZEM	-			641

* wg załączników do Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego lub wykazów Komitetu Badań Naukowych (lata 1996-2003) za odpowiedni rok (wg roku opublikowania).

**wg Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 27 października 2015r. w sprawie kryteriów i trybu przyznawania kategorii naukowej jednostkom naukowym.

Monika Kordowska-Lwiata