

AUTOREFERAT

EWELINA CELIŃSKA

KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI,

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU

POZNAŃ 2017

1. IMIĘ I NAZWISKO: **Ewelina Celińska** (z d. Matulewicz)

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU
 - a. **Doktor nauk rolniczych w zakresie biotechnologii**, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (UPP), 2012, (Promotor: Prof. dr hab. Włodzimierz Grajek):

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Konstrukcja i charakterystyka rekombinowanego szczepu *Yarrowia lipolytica* zawierającego heterologiczne geny szlaku katabolizmu glicerolu*

 - b. **Magister biotechnologii**, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (UAM), 2008, (Promotor: Prof. dr hab. Jan Sadowski):

Tytuł pracy magisterskiej: *Charakterystyka profilu transkrypcyjnego kinaz białkowych MAP i fosfataz białkowych PP2C u *Arabidopsis thaliana* w stresie suszy*

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH
 - a. 2013- obecnie: **Adiunkt**, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności (UPP)

 - b. 2008-2013: **Asystent**, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności (UPP)
 - i. X 2009 – III 2010: **urlop macierzyński**

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. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W Dz. U. z 2016 R. POZ. 1311.)

a. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

Heterologiczna ekspresja genu kodującego alfa-amylazę z *Sitophilus oryzae* w wybranych drożdżowych systemach ekspresyjnych wraz z oceną wybranych właściwości technologicznych rekombinowanego enzymu

b. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA:

- i. **Celińska E**, Borkowska M, Białas W. 2017. Enhanced production of insect raw-starch-digesting alpha-amylase accompanied by high erythritol synthesis in recombinant *Yarrowia lipolytica* fed-batch cultures at high-cell-densities. *Process Biochemistry* 52:78–85.

IF₂₀₁₆ = 2.529, MNiSW₂₀₁₆ = 30 pkt

- ii. **Celińska E**, Borkowska M., Białas W. 2016. Evaluation of a recombinant insect-derived amylase performance in simultaneous saccharification and fermentation process with industrial yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(6):2693-2707.

IF₂₀₁₆ = 3.376, MNiSW₂₀₁₆ = 35 pkt

- iii. **Celińska E**, Borkowska M, Białas W. 2016. Evaluation of heterologous alpha-amylase production in two expression platforms dedicated for *Yarrowia lipolytica* - commercial Po1g-pYLSC (php4d) and custom-made A18-pYLTEF (pTEF). *Yeast* 33(5):165-181.

IF₂₀₁₆ = 2.259, MNiSW₂₀₁₆ = 25 pkt

- iv. **Celińska E**, Białas W, Borkowska M, Grajek W. 2015. Cloning, expression, and purification of insect (*Sitophilus oryzae*) alpha-amylase, able to digest granular starch, in *Yarrowia lipolytica* host. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(6):2727-2739.

IF₂₀₁₅ = 3.376, MNiSW₂₀₁₅ = 35 pkt

- c. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

WPROWADZENIE

W obliczu nieustannie wzrastającego zapotrzebowania na przyjazne środowisku i ekonomicznie korzystne procesy produkcyjne, technologie i produkty biotechnologiczne zyskują rosnące znaczenie w światowej gospodarce. Rosnąca świadomość konsumentów, jak również stosowne regulacje prawne, wymuszają przekierowanie gospodarki opartej na kopalnych zasobach węgla i chemii nieorganicznej, w kierunku gospodarki wykorzystującej zasoby odnawialne oraz biokatalizatory. Produkcja preparatów enzymatycznych, zarówno tych stosowanych w procesach przemysłowych, jak i tych używanych w gospodarstwach domowych, stanowi wiodącą branżę współczesnej biotechnologii przemysłowej.

Amylazy (EC 3.2.1.-) stanowią heterogenną grupę hydrolaz, katalizujących rozkład polimerów glukozy połączonych wiązaniami α -glikozydowymi do mono- i oligomerów. Jak oszacowano, enzymy amylolityczne stanowią $\sim 30\%$ światowego rynku biokatalizatorów [1]. Są one powszechnie stosowane w przemyśle papierniczym, tekstylnym, piekarniczym, gorzelniczym, kosmetycznym, oraz w produktach chemii gospodarczej. Ponadto, według stosownych kalkulacji, 60% bioetanolu dostępnego na rynku światowym jest nadal produkowane ze skrobi w toku procesów bazujących na preparatach amylolitycznych, a pozostałe 40% - z sacharozy (pozyskiwanej z trzciny cukrowej i buraka cukrowego). Pomimo znacznych nakładów finansowych i promowania badań w tym zakresie, technologia wytwarzania bioproduktów z biomasy odpadowej złożonej w głównej mierze z ligninocelulozy nie osiągnęła jeszcze poziomu opłacalności. Biorąc pod uwagę znaczne, i wciąż rosnące, znaczenie procesów biotechnologicznych w światowej produkcji biochemikaliów i innych wartościowych bioproduktów, każde usprawnienie aktualnie działających technologii wydaje się być ekonomicznie uzasadnione [2]. W obliczu tego procesy biotechnologiczne oparte na substracie skrobiowym oraz preparatach amylolitycznych nadal stanowią aktualny temat [3][4].

Pomimo faktu, iż amylazy powszechnie występują w organizmach różnych gatunków roślin i zwierząt, to jedynie enzymy pochodzenia mikrobiologicznego zajmują istotne miejsce w światowej produkcji komercyjnych preparatów enzymatycznych. Aktualnie światowy rynek preparatów amylolitycznych został zdominowany przez enzymy syntetyzowane przez grzyby strzępkowe, głównie z rodzaju *Aspergillus* i *Rhizopus*, oraz bakterie z rodzaju *Bacillus*. Kluczową przewagą procesów mikrobiologicznych jest relatywna łatwość manipulacji parametrami hodowli w warunkach przemysłowych, niskie koszty produkcji i podatność na zwiększanie skali. W sektorze badań i rozwoju większość prac odnoszących się do charakterystyki nowych biokatalizatorów o

potencjalnie pożądanymi właściwościami także dotyczy enzymów pochodzenia mikrobiologicznego. Inne źródła enzymów są mniej eksplorowane, głównie za sprawą mało efektywnych procedur izolacji i oczyszczania enzymów z natywnych źródeł. Rozwój w zakresie inżynierii genetycznej i heterologicznej ekspresji białek pozwala jednak obejść te ograniczenia. Heterologiczna nadekspresja białek pozwala produkować enzymy z „niszowych” źródeł (w tym także z mniej efektywnych producentów mikrobiologicznych) w komórkach wydajnych gospodarzy mikrobiologicznych, pociągając za sobą wszystkie korzyści płynące z produkcji mikrobiologicznej.

Główne kierunki rozwoju narzędzi inżynierii genetycznej kształtowały się na przestrzeni kilku ostatnich dekad. W wyniku szeroko zakrojonych badań opracowano konwencjonalne systemy ekspresyjne rutynowo stosowane w heterologicznej ekspresji białek i powszechnie akceptowane w sektorze badań i rozwoju, jak również w niektórych branżach przemysłu. Do konwencjonalnych systemów ekspresyjnych należą *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* czy *Pichia pastoris*. Zróżnicowane warianty szczepów tych gatunków o zmodyfikowanym podłożu genetycznym są aktualnie komercyjnie dostępne na rynku wraz z całym wachlarzem dedykowanych dla nich narzędzi inżynierii genetycznej. Poza konwencjonalnymi systemami ekspresyjnymi, coraz większe znaczenie zyskują systemy niekonwencjonalne. Szczególnie atrakcyjne w tym zakresie wydają się być systemy ekspresyjne oparte na gatunku drożdży niekonwencjonalnych *Yarrowia lipolytica*. Za atrakcyjnością *Y. lipolytica* jako platformy do nadekspresji heterologicznych białek przemawiają wyniki bezpośrednich analiz porównawczych, gdzie równolegle testowano kilka systemów ekspresyjnych (*Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *Arxula adeninivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*) [5][6]. Wyniki tych doświadczeń pokazały, że *Y. lipolytica* charakteryzuje się kilkoma szczególnie cennymi właściwościami, pożądanymi w heterologicznej nadekspresji białek, tj.: 1) wysokim poziomem nadekspresji i sekrecji heterologicznych białek (dzięki ko-translacyjnej translokacji polipeptydu do światła retikulum endoplazmatycznego, co wyróżnia *Y. lipolytica* na tle wielu innych gatunków drożdży); 2) stabilnością i powtarzalnością procesu; 3) relatywnie niskim poziomem glikozylacji; 4) zdolnością do wzrostu w niedrogich podłożach, a także odpornością na zanieczyszczenia i wysokie ciśnienie osmotyczne, charakterystyczne dla substratów odpadowych (pożyczanych w procesach przemysłowych). Do tej pory, *Y. lipolytica* zastosowano do nadekspresji ponad 130 białek [7]. Wśród nich nadeksprimowano także enzymy o znaczeniu przemysłowym, w tym m.in. 1) inwertazę z *S. cerevisiae* (np.[8][9], stosowaną m.in. przy produkcji syropów glukozowo-fruktozowych i w cukiernictwie), 2) lakkazę z różnych gatunków grzybów (np.[10], stosowaną w przemyśle tekstylnym, spożywczym, czy ochronie środowiska naturalnego), a także 3) celulazę, ksylanazę, czy inulinazę z różnych gatunków grzybów (np.[11][12]), oraz 4) amylazę z roślin [13][14] i grzybów [6],

stosowane do biotechnologicznej obróbki biomasy roślinnej, celem wytwarzania wartościowych bioproduktów.

Klasyczne strategie skringowe mające na celu izolację mikroorganizmów o założonych właściwościach obejmują przeszukiwanie naturalnych nisz środowiskowych w miejscu zwiększonego występowania substratu lub czynnika stresowego, np. izolacja mikroorganizmów termofilnych ze źródeł geotermalnych, osmoofilnych – ze środowisk czy produktów spożywczych o wysokiej zawartości substancji osmoaktywnych (solankach, syropach, miodach), czy lipolitycznych – ze środowisk o znacznej zawartości tłuszczów (oleje, margaryny, gleby skażone substancjami tłuszczowymi). Jak pokazały liczne badania podejście to można ekstrapolować na strategie poszukiwawcze mające na celu identyfikację nowych biokatalizatorów (enzymów) o pożądanym właściwościach, jak np. termostabilnych (z organizmów termofilnych), aktywnych w niskich temperaturach (z organizmów psychrofilnych), wysoce aktywnych względem określonego substratu (np. lipazy z mikroorganizmów wydajnie wzrastających z substratów tłuszczowych).

CEL NAUKOWY PODJĘTYCH PRAC, WSTĘPNE ZAŁOŻENIA ORAZ OGÓLNY ZARYS BADAŃ

W obliczu ciągłego zapotrzebowania licznych gałęzi przemysłu na nowe preparaty o aktywności amylolitycznej, oraz możliwości wytwarzania enzymów na drodze heterologicznej nadekspresji w gospodarzach mikrobiologicznych, podjęłam prace mające na celu **biotechnologiczną produkcję aktywności amylolitycznej pochodzącej z niszowego źródła w wybranym organizmie gospodarza mikrobiologicznego, ze szczególnym uwzględnieniem enzymów działających na natywną skrobię**. Przy wstępnym wyborze organizmu donora, kierowano się klasycznym podejściem poszukiwania enzymów wysoce aktywnych względem danego substratu (tj. skrobi) w organizmach efektywnie wzrastających na tym substracie. Jako organizm donorowy wybrano chrząszcza z rodziny ryjkowcowatych (*Curculionidae*) – wołka ryżowego (*Sitophilus oryzae*). Wołek ryżowy (*S. oryzae*) jest powszechnie znanym szkodnikiem, żerującym na przechowywanych plonach zbożowych bogatych w skrobię, stanowiących jego jedyne źródło pożywienia. Dotychczasowe zainteresowanie tym gatunkiem, zarówno w kręgach naukowych jak i przemysłowych, było związane głównie z opracowywaniem metod ograniczających szkody powodowane przez żerujące owady. W niniejszej pracy zgrubnie założono, że wysoka ekspansywność *S. oryzae* żerującego na substratach skrobiowych jest w pewnym stopniu uzależniona od wydajnych enzymów amylolitycznych występujących w przewodzie pokarmowym owada. Wybór organizmu gospodarza, przeznaczonego do nadprodukcji heterologicznego białka, został już w pierwszej fazie planowania badań zawężony do systemów drożdżowych, ze względu na liczne właściwości predysponujące je do biotechnologicznej produkcji preparatów enzymatycznych, a w szczególności: 1) łatwość przeprowadzania manipulacji genetycznych, 2) wysoka produkcja

biomasy, często skorelowana z wysoką produkcją enzymu, 3) zdolność do przeprowadzania modyfikacji potranslacyjnych (zwłaszcza glikozylacji, która nierzadko ma kluczowe znaczenie dla stabilności enzymów) oraz 4) wydzielanie białek do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co znacznie ułatwia procedury oczyszczania białek. Spośród dostępnych drożdżowych systemów ekspresyjnych wybrano gatunek drożdży niekonwencjonalnych *Y. lipolytica*. Dla celów porównawczych, ekspresję heterologicznego genu przeprowadzono także w organizmie modelowym – *S. cerevisiae*.

Zakres przeprowadzonych prac obejmował: 1) szczegółową analizę bioinformatyczną sekwencji nukleotydowej *Amy1* z *S. oryzae* dostępnej w bazie danych GenBank (HQ158012.1), 2) zaprojektowanie i przygotowanie konstrukcji genowych dla *Y. lipolytica* i *S. cerevisiae* zawierających rekombinowany gen, 3) charakterystykę uzyskanych rekombinantów, włączając ocenę zdolności produkcyjnych i sekrecyjnych oraz oszacowanie liczby kopii rekombinowanego genu zintegrowanego z genomem gospodarza, 4) hodowle bioreaktorowe w skali 5 L wybranych rekombinantów, wraz z intensyfikacją procesu produkcji dla wybranych szczepów poprzez zastosowanie hodowli okresowo-dolewowych przy wysokiej gęstości komórek (ang. fed-batch at high-cell density), 5) oczyszczanie i wstępną charakterystykę rekombinowanego enzymu, wraz z oceną jego przydatności w procesach jednoczesnej hydrolizy i fermentacji (ang. simultaneous saccharification and fermentation; SSF). **Prace zostały wykonane w ramach dwóch kierowanych przez mnie projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.**

WYNIKI PRZEPROWADZONYCH BADAŃ WRAZ Z INTERPRETACJĄ I Dyskusją

Wstępne badania przeprowadzone w ramach podjętego tematu skupiały się na przeprowadzeniu szczegółowej **analizy bioinformatycznej sekwencji** kodującej docelowy gen *Amy1* z *S. oryzae* (dalej: *SoAMY* – *Sitophilu oryzae* alpha-amylase), zdeponowanej w bazie danych GenBank pod numerem akcesyjnym (gb|HQ158012.1). Etap ten miał kluczowe znaczenie dla dalszych prac **ze względu na brak jakichkolwiek danych literaturowych wskazujących na funkcjonalność genu i prawidłowość zdeponowanej sekwencji** (sekwencja *Amy1* w tamtym czasie figurowała w bazie GenBank jako „prowizoryczna”; ang. provisional). Szczegółowa analiza sekwencji nukleotydowej miała również fundamentalne znaczenie przy projektowaniu konstrukcji genowych. Analizy przeprowadzono w oparciu o ogólnodostępne narzędzia bioinformatyczne m.in. BioEdit, PrediSi, SignalIP, NCBI-BLAST/ConservedDomains, Expasy-ProtParam. Przeprowadzone analizy wykazały, że zadana sekwencja nukleotydowa (1458 nt) koduje białko (486 AA; AA - amino acid; aminokwas) o teoretycznej masie cząsteczkowej 53.9 kDa i punkcie izoelektrycznym 4.92. Na poziomie sekwencji aminokwasowej polipeptyd wykazywał podobieństwo do innych alfa-amylaz z owadów, m.in. 70% podobieństwo do alfa-amylazy z

Anthonomus grandis (gb|AAN77138.1|) i nieznanego białka z *Dendroctonus ponderosae* (gb|AEE61654.1), oraz 68% podobieństwo do amylazy A i amylazy B z *Ips typographus* (gb|ADQ54210.1 i gb|ADQ54211.1). Przetłumaczona *in silico* sekwencja aminokwasowa zawierała w swojej strukturze **domeny typowe dla alfa-amylaz**: domenę katalityczną (*AmyAc_bac_euk_AmyA*) oraz C-kończącą domenę (*C-terminal-all-beta*), której obecność może wskazywać na zdolność enzymu do adsorpcji na powierzchni granul skrobiowych, a tym samym - trawienia skrobi niekleikowanej. Zdolność do trawienia natywnej skrobi, jest jedną z najbardziej pożądanych charakterystyk alfa-amylaz stosowanych w procesach przemysłowych [15] (omówione poniżej), jak również główną właściwością heterologicznego enzymu poszukiwaną w ramach podjętych prac. Szczególną uwagę poświęcono analizie N-końcowej sekwencji polipeptydu SoAMY. Zastosowane narzędzia bioinformatyczne wskazały, że białko **zawiera 17 AA peptyd sygnałny** (M-K-VLALLVTVCFSV-ASA*), który kieruje syntetyzowany polipeptyd do szlaku sekrecyjnego w komórce natywnej. Celem oszacowania potencjalnej funkcjonalności natywnego peptydu sygnałnego SoAMY w komórkach drożdżowych, dokonano porównania jego sekwencji z typową strukturą peptydu sygnałnego drożdży. Według danych literaturowych, typowa struktura peptydu sygnałnego drożdży (ang. „Sec-type”) zawiera: 1) N-domenę z zawierającą co najmniej jedną resztę AA naładowaną pozytywnie (R, K), 2) H-domenę zbudowaną z ciągu hydrofobowych reszt AA (np. A, L, V, F, C) formujących alfa-helisę, niezbędną przy translacji polipeptydu przez membranę komórkową, zakończoną resztą AA „łamiącą” helisę (P lub G), ułatwiająca cięcie przez specyficzną peptydazę sygnałną, 3) C-domenę stanowiącą miejsce rozpoznawane przez specyficzną peptydazę sygnałną, o sekwencji konsensusowej A-X-A (X- dowolna reszta AA). Okazało się, że **natywny dla SoAMY peptyd sygnałny wykazuje wysokie podobieństwo strukturalne do typowego peptydu sygnałnego, funkcjonującego w komórkach drożdżowych**. Ostatecznie, kierując się poprzednimi doświadczeniami [16], zdecydowano o optymalizacji zawartości kodonów w sekwencji nukleotydowej i dostosowaniu jej do ekspresji w systemach drożdżowych, celem uniknięcia ograniczeń wynikających z odległości filogenetycznej organizmu donora i zastosowanych gospodarzy. Sekwencja aminokwasowa pozostała niezmienną. Sekwencję nukleotydową SoAMY ze zoptymalizowaną zawartością kodonów zdeponowano w bazie danych GenBank (NCBI) pod numerem akcesyjnym (gb|KP027641).

W kolejnym etapie badań przygotowano narzędzia inżynierii genetycznej umożliwiające transfer genu *SoAMY* do komórek biorcy. Wybrano dwa komercyjnie dostępne **systemy ekspresyjne**: **(1) dedykowany dla *S. cerevisiae* episomalny wektor pYES2** wraz z kompatybilnym szczepem INVSc1 (genotyp: *MAT α his3 Δ 1leu2 trp1-289 ura3-52*; fenotyp: *His⁻, Leu⁻, Trp⁻, Ura⁻*) (Life Technologies, Invitrogen, USA), **(2) dedykowane dla *Y. lipolytica* integracyjne wektory pYLSC** oraz **pYLEX** wraz z kompatybilnym szczepem Po1g (genotyp: *Mata leu2-270 ura3-302::URA3 xpr2-332*

axp-2; fenotyp: *Leu⁻, ΔAEP, ΔAXP, Suc⁺, platforma pBR*) (YLEX Expression kit; Yeastern Bio- tech Co., Ltd., Tajwan). Ponadto, w ramach przeprowadzonych prac przygotowano kolejny system ekspresyjny **(3) dedykowany dla *Y. lipolytica***, na bazie **szczepu A18** (genotyp: *Mata ura3-302:pXPR2::SUC2*; fenotyp: *Suc⁺, Ura⁻*; skonstruowany i udostępniony przez zespół Pani Prof. Małgorzaty Robak; Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu; charakterystyka dostępna w [17][8]) oraz **de novo skonstruowanego wektora pYLTEF**. System pYES2-INVSc1 (1) opiera się na wektorze episomalnym z ori 2μ, selekcji prototrofów *Ura⁺*, oraz ekspresji klonowanego genu na skutek podaży induktora (galaktozy), regulowanej przez silny promotor *GAL1*. Zgodnie ze sztuką, ekspresja indukowana jest preferowaną opcją przy wysokiej nadekspresji genów kierowanej przez silne promotory. Taka strategia pozwala rozpręgnąć fazę wzrostu komórek gospodarza, od fazy nadprodukcji heterologicznego białka, co nierzadko okazuje się być optymalnym rozwiązaniem. Z kolei wszystkie zastosowane wektory dedykowane dla *Y. lipolytica* to wektory integracyjne, niosące selekcyjny gen komplementujący auktotrofię, oraz silne promotory niezależne od podaży induktora. Uprzednie prace pokazały, że w komórkach *Y. lipolytica* wektory episomalne były niestabilne, bądź też były utrzymywane w niskiej liczbie kopii [18]. Z tego względu integrację heterologicznych konstrukcji zwyczajowo ukierunkowuje się w jedno z kilku zweryfikowanych miejsc w genomie gospodarza, jak np. *rDNA* [19][20], elementy zeta – terminalne powtórzenia transpozonu Ylt1 [19][21][22], czy syntetyczne platformy wektora pBR322 [23][24]. W komercyjnie dostępnych wektorach pYLSC i pYLEX (2) ekspresja genu *SoAMY* była regulowana przez semi-konstitutyny, silny promotor *php4*, którego indukcja jest w pewnym stopniu zależna od fazy wzrostu hodowli (najbardziej aktywna na końcu fazy logarytmicznej i we wczesnej fazie stacjonarnej). Integracja kompletnych konstrukcji pYLSC-/pYLEX-*SoAMY* była ukierunkowana w region syntetycznej platformy pBR322, obecnej w genomie gospodarza (Po1g) w jednej kopii. Projektując kasetę ekspresyjną wektora pYLTEF (3), gen *SoAMY* umieszczono pod kontrolą konstitutywnego, silnego promotora *pTEF* (czynnik elongacji translacji; TEF1 – translation elongation factor 1) i terminatora *tTEF*. W obręb kasety ekspresyjnej wprowadzono gen selekcyjny *URA3*, umożliwiający selekcję prototrofów *URA⁺*. Całą kasetę ekspresyjną oflankowano sekwencjami komplementarnymi do regionów *rDNA* w komórkach biorcy. Regiony *rDNA* występują w ponad 200 kopiach w haploidalnym genomie *Y. lipolytica* [25], co generuje znaczną liczbę potencjalnych miejsc integracji, jak również możliwość amplifikacji liczby kopii heterologicznych elementów przy odpowiedniej manipulacji presją selekcyjną. Z drugiej strony, wiadomo, że regiony *rDNA* to „gorące miejsca” (ang. „hot-spots”) rekombinacji, co może powodować niestabilność wprowadzanych konstrukcji. Całość kasety pYLTEF wykonano na bazie uprzednio przygotowanego wektora bazowego pV2 [16], na drodze amplifikacji poszczególnych elementów na matrycy DNA genomowego *Y. lipolytica*, subklonowania amplikonów w wektorach

pośrednich, weryfikacji poprzez sekwencjonowanie, oraz finalnego składania konstrukcji docelowej na zasadzie „jeden-element-za-drugim”. Kompletność konstrukcji genowych, jak również prawidłowa orientacja wszystkich elementów składowych była każdorazowo weryfikowana przed przystąpieniem do procedury transformacji komórek drożdżowych.

Kompletne konstrukcje genowe wprowadzano do komórek biorcy stosując standardowe protokoły biologii molekularnej. Dzięki właściwościom heterologicznego białka SoAMY, obszerne biblioteki klonów mogły być w szybki i niedrogi sposób przeszukiwane stosując prosty test płytkowy (podłoże zestalone agarem zawierające skrobię, oraz barwienie 5% roztworem I₂ w KI). W ten sposób **bibliotekę** liczącą **kilkaset szczepów** w krótkim czasie **zweźono do kilkudziesięciu** klonów, odrzucając szczepy dla których nie obserwowano strefy przejaśnienia po barwieniu płynem Lugola, bądź wytworzona strefa przejaśnienia była mniej wyraźna.

Zgodnie z danymi literaturowymi, liczba kopii episomalnych plazmidów drożdżowych, utrzymywanych i replikowanych dzięki obecności ori 2 μ (jak w przypadku konstrukcji pYES2-SoAMY), wynosi ponad 50. W przypadku systemów dedykowanych dla *Y. lipolytica* w ramach podjętych prac należało dokonać **oszacowania liczby kopii heterologicznej sekwencji SoAMY** zintegrowanych z genomem gospodarza. W tym celu zastosowano odpowiednio zmodyfikowany protokół techniki ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time quantitative PCR). Analizę przeprowadzono dla 60 szczepów rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica* o fenotypie SoAMY^r (pochodne szczepów Po1g oraz A18). Zgodnie z uzyskanymi wynikami, w genomach analizowanych szczepów *Y. lipolytica* **heterologiczna sekwencja SoAMY występowała w 1 do 4 kopii**. Choć technika real-time qPCR jest metodą dość powszechnie stosowaną do określania liczby kopii zadanej sekwencji w cząsteczkach DNA, jest nadal uważana za metodę szacunkową, wymagającą weryfikacji np. technikami hybrydizacyjnymi. W ramach podjętych prac celem weryfikacji wyników uzyskanych metodą real-time qPCR dokonano analizy korelacji pomiędzy uzyskaną wartością $\Delta\Delta C_T$ (wskazującą na szacunkową liczbę kopii badanej sekwencji) a nabytą aktywnością amyloolityczną w AU/L (AU – activity units; jednostki aktywności amyloolitycznej oznaczone metodą Somogyi-Nelson [26]). Analizę przeprowadzono dla trzech wybranych szczepów różniących się wartościami $\Delta\Delta C_T$, wskazującymi na obecność 4, 3, i 1 kopii heterologicznej sekwencji SoAMY w genomie gospodarza. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono **wysoki poziom korelacji** (współczynnik Pearsona =0.944 dla **$\Delta\Delta C_T$:AU/L**) pomiędzy wartościami $\Delta\Delta C_T$ a nabytą aktywnością amyloolityczną dla trzech badanych szczepów. Obserwację tę ekstrapolowano na całą bibliotekę klonów z uprzednio wyznaczonymi wartościami $\Delta\Delta C_T$, pamiętając o ograniczeniach towarzyszących temu założeniu, jak m.in. dodatkowe kopie genów w miejscach nieaktywnych transkrypcyjnie, które nastąpiły na skutek rekombinacji niehomologicznej (przy integracjach wielokopijnych). Zaskakującą obecność wielu kopii sekwencji SoAMY dla systemu Po1g-pYLSC/pYLEX,

skonstruowanego dla integracji monokopijnych, można wytłumaczyć zjawiskiem łączenia niehomologicznych końców (ang. NHEJ – *n*on-*h*omologous *e*nd *j*oining), prowadzącym do integracji obcej cząsteczki DNA z genomem gospodarza na zasadzie rekombinacji niehomologicznej. Zjawisko to zostało zidentyfikowane i opisane dla *Y. lipolytica* jako zachodzące z wysoką częstotliwością [27][28]. W doniesieniach literaturowych, jako metodę zapobiegającą zjawisku NHEJ w komórkach *Y. lipolytica* zaproponowano i zastosowano delecję genu *Ku70*, kodującego białko zaangażowane w proces naprawy DNA [27][28].

Już w trakcie wstępnych etapów planowania eksperymentów założono, że docelowe heterologiczne białko będzie kierowane do szlaku sekrecyjnego komórek gospodarza, co ostatecznie miało ułatwić procedury oczyszczania białka z medium hodowlanego. Kierując się tym założeniem, dokonano analizy bioinformatycznej N-końcowej sekwencji białka kodowanego przez gen *SoAMY* oraz porównano strukturę natywnego peptydu sygnałowego *SoAMY* z typowym peptydem sygnałowym funkcjonującym w komórkach drożdżowych, obserwując znaczne podobieństwo analizowanych sekwencji (omówiono powyżej). Z tego względu, zdecydowano się uzależnić sekrecję białka *SoAMY* wyłącznie od funkcjonalności natywnego peptydu sygnałowego w trzech zastosowanych systemach ekspresyjnych: 1) INVSc1-pYES2, 2) Po1g-pYLEX, 3) A18-pYLTEF. Natomiast w przypadku systemu Po1g-pYLSC – białko zostało zaopatrzone w peptyd sygnałowy natywny dla *Y. lipolytica*, spXPR2 (13 reszt AA; natywny dla zewnątrzkomórkowej proteazy 2; XPR2-*extracellular protease* 2). Przy projektowaniu syntetycznych konstrukcji, peptyd sygnałowy spXPR2 wraz z peptydem sygnałowym zewnątrzkomórkowej lipazy 2 (spLip2) są najczęściej stosowanymi elementami kierującymi białka do szlaków sekrecyjnych w komórkach *Y. lipolytica* [29]. Niemniej jednak w licznych badaniach wykazano, że peptydy sygnałowe natywne dla heterologicznych białek także mogą być funkcjonalne w komórkach *Y. lipolytica*, co pokazano m.in. dla białek pochodzących z grzybów strzępkowych [30][31], czy z roślin [13]. **We wszystkich zastosowanych w niniejszej pracy systemach ekspresyjnych białko było efektywnie wydzielane na zewnątrz komórki**, co badano poprzez porównawczą analizę aktywności enzymatycznych w mediach hodowlanych i ekstraktach białek wewnątrzkomórkowych. Analizy te przeprowadzono w trakcie hodowli w małej skali (o objętości 50-100 mL), jak również w trakcie hodowli bioreaktorowych typu okresowego (ang. batch). Jak pokazały uzyskane wyniki, zewnątrzkomórkowa frakcja *SoAMY* była każdorazowo bardziej aktywna. Co więcej, wyniki sekwencjonowania metodą degradacji Edmana (Biocentrum, Kraków) N-końca oczyszczonego polipeptydu *SoAMY* z frakcji zewnątrzkomórkowej wykazały, że **natywny peptyd sygnałowy białka *SoAMY* jest prawidłowo przetwarzany w szlaku sekrecyjnym drożdży, a miejsce odcięcia peptydu sygnałowego jest zgodne z miejscem odcięcia przewidzianym narzędziami bioinformatycznymi (MKVLALLVTVCFSVASA* QKDPHFL)**, wskazując

na funkcjonalność owadziego peptydu sygnałowego w szlakach sekrecyjnych zastosowanych komórek drożdżowych.

Co ciekawe, w trakcie badań mających na celu określenie wydajności sekrecji białka SoAMY zidentyfikowano istotne ograniczenie systemu ekspresyjnego A18-pYLTEF. Jak zaobserwowano, zewnątrzkomórkowa aktywność SoAMY w hodowlach komórek *Y. lipolytica* A18-pYLTEF była relatywnie niska w porównaniu z wartościami odnotowanymi dla pozostałych rekombinowanych szczepów (>10-krotnie niższa aktywność maksymalna, wyrażona w AU/L, w porównaniu do szczepów Po1g-pYLSC/pYLEX-SoAMY, dla hodowli prowadzonych w tych samych warunkach), a ponadto, malała wraz z czasem trwania hodowli. Celem wyjaśnienia tego zjawiska zbadano stabilność oczyszczonego białka SoAMY w supernatantach mediów pohodowlanych szczepów *Y. lipolytica* Po1g i A18. Okazało się, że białko **SoAMY jest niestabilne w płynach pohodowlanych szczepu A18**, a sam szczep charakteryzuje się wysoką aktywnością proteolityczną. Najprawdopodobniej przyczyną zaobserwowanej niestabilności rekombinowanej alfa-amylazy była obecność **enzymów proteolitycznych, specyficznych względem polipeptydu SoAMY**. W przypadku szczepu *Y. lipolytica* Po1g, geny kodujące główne zewnątrzkomórkowe proteazy zostały inaktywowane (ΔAEP , ΔAXP), celem zwiększenia stabilności heterologicznych białek zewnątrzkomórkowych. Natomiast takiego zabiegu nie przeprowadzono dla szczepu A18. Z tego względu po etapie wstępnych badań i hodowlach bioreaktorowych typu okresowego, system ekspresyjny A18-pYLTEF wykluczono z dalszych analiz. Podobnie, ze względu na relatywnie niski plon (ang. titer; definiowany w jednostkach AU/L) zewnątrzkomórkowej SoAMY oraz wysokie koszty induktora i zdefiniowanego medium hodowlanego, niezbędnego dla utrzymania episomalnego plazmidu w komórkach, system ekspresyjny INVSc1-pYES2 także wykluczono z dalszych badań.

W kolejnym etapie prac skupiono się na **optymalizacji warunków hodowli bioreaktorowych** pod kątem zwiększenia produkcji owadziej alfa-amylazy w systemie *Y. lipolytica* Po1g-pYLSC, **uznanym za najbardziej wydajny spośród testowanych drożdżowych systemów ekspresyjnych**. Wybrany system ekspresyjny charakteryzuje się kilkoma właściwościami, które w sposób szczególny predysponują go do nadprodukcji białek w warunkach hodowli bioreaktorowych. Wśród nich można wymienić, stabilną integrację kasety ekspresyjnej z genomem gospodarza, semi-konstrytuwny i auto-indukowalny charakter zastosowanego promotora regulującego ekspresję heterologicznego genu, czy odporność komórek *Y. lipolytica* względem wysokiego ciśnienia osmotycznego, co będzie miało istotne znaczenie w przypadku hodowli typu okresowo-dolewowego (omówione poniżej). W konsekwencji, dobrane metody hodowlane mogły być znacznie uproszczone. Pierwsze hodowle bioreaktorowe prowadzono w podłożu zdefiniowanym (YNB z glicerolem jako jedynym źródłem węgla), jednak szybko okazało się, że zastosowane

medium hodowlane nie zapewnia wystarczającej podaży substancji odżywczych, a tym samym generuje niski plon biomasy oraz heterologicznego białka. Kolejne próby przeprowadzono w bogatym podłożu YPG, zasobnym w ekstrakt drożdżowy, pepton oraz glicerol. Zastosowanie glicerolu jako głównego źródła węgla było podyktowane praktycznymi przesłankami. Mianowicie, glicerol nie interferował z wynikami testu Somogyi-Nelson (oznaczenie aktywności amylolitycznej na podstawie stężenia uwolnionych cukrów redukujących, do którego podawano surowe media hodowlane), a jest równie efektywnie utylizowany przez komórki *Y. lipolytica* co glukoza. Podaż glukozy wiązałaby się z koniecznością zastosowania dodatkowych etapów oczyszczania badanej próby, mających na celu usunięcie cukrów redukujących, przed przystąpieniem do oznaczenia aktywności amylolitycznej. Hodowle bioreaktorowe typu okresowego w medium hodowlanym YPG pozwoliły uzyskać wyższe plony biomasy i heterologicznego białka. Jednakże, po odnotowaniu wyższych wartości aktywności amylolitycznej we wczesnej fazie stacjonarnej hodowli, zewnątrzkomórkowa aktywność SoAMY gwałtownie spadała. Jak się okazało, zastosowana metoda kontroli pH hodowli, oparta jedynie na podaży zasady w warunkach silniejszego zakwaszania medium, choć powszechnie stosowana dla hodowli *Y. lipolytica*, była nieodpowiednia w tym układzie eksperymentalnym ponieważ białko okazało się być wysoce wrażliwe na zasadowe pH. Co istotne, białko w tych warunkach ulegało odwracalnej inaktywacji, bowiem możliwe było odzyskanie aktywności na drodze oczyszczania (omówione poniżej). Z tego względu w kolejnych próbach, zastosowano inną metodą regulacji pH hodowli, poprzez podaż zarówno kwasu jak i zasady, celem ustabilizowania pH na poziomie około 5.5. W efekcie zaobserwowano niemal dwukrotny wzrost w uzyskanym plonie SoAMY, a co najważniejsze, wyeliminowano uprzednio obserwowane zjawisko inaktywacji enzymu w medium hodowlanym. Finalne prace mające na celu optymalizację produkcji białka SoAMY w hodowlach bioreaktorowych *Y. lipolytica* Po1g-pYLSC-SoAMY skupiały się wokół hodowli typu okresowo-dolewowego. Hodowle okresowo-dolewowe, zwłaszcza prowadzone przy wysokiej gęstości komórek (ang. fed-batch cultures at high cell density), są uważane za efektywną strategię bioprosesową w przypadku nadprodukcji heterologicznych białek, co wykazano także dla hodowli *Y. lipolytica* [31][32][33][34]. Szczep *Y. lipolytica* Po1g-pYLSC-SoAMY, niosący cztery kopie heterologicznej sekwencji, hodowano w medium bogatym YPG. W trakcie hodowli podawano pięciokrotnie stężone medium YPG w trzech porcjach, w 24-godzinnych interwałach, poczynając od 24 godziny hodowli. Szybkość mieszania, napowietrzanie, wartość stabilnie utrzymywanego pH i temperatura zostały dobrane na podstawie wcześniejszych doświadczeń. W efekcie, **w hodowlach typu okresowo-dolewowego zwiększono produkcję heterologicznego białka SoAMY ponad 160-krotnie w porównaniu do hodowli okresowych, prowadzonych w analogicznych warunkach (142.84 vs 22979.2 AU/L)**. Wraz ze wzrostem finalnego plonu białka SoAMY, odnotowano znaczny wzrost w pozostałych parametrach

kinetycznych procesu. Dzięki zastosowanym warunkom hodowli, **akumulacja biomasy *Y. lipolytica* finalnie wyniosła 69.05 gDCW/L** (gDCW- gram suchej masy; DCW- dry cellular weight), co stanowi jeden z najwyższych dotychczas odnotowanych wyników. Kinetyka produkcji białka SoAMY w hodowlach okresowo-dolewowych przebiegała nieco odmiennie od kinetyki produkcji SoAMY w hodowlach okresowych, aczkolwiek zmiany te były spodziewane. Najwyższą akumulację białka SoAMY w medium hodowlanym, a także znaczną akumulację biomasy drożdżowej, odnotowano po czasie podania ostatniej porcji medium zasilającego - w drugiej fazie hodowli. Co ciekawe, przyrost plonu białka był znaczny, nawet pomimo całkowitego zużycia głównego substratu (glicerolu). Celem wyjaśnienia tego zjawiska, przeprowadzono serię eksperymentów pobocznych. Wstępna hipoteza zakładała, że *Y. lipolytica* może efektywnie wykorzystywać ekstrakt drożdżowy i pepton jako źródło węgla, w sytuacji, gdy inne łatwo przyswajalne źródło węgla (glicerol) zostało w pełni wykorzystane. Wykonano hodowle analizowanego szczepu *Y. lipolytica* w mediach o zawartości ekstraktu drożdżowego i peptonu odpowiadającej medium YPG, różniących się natomiast zawartością glicerolu (100, 20 i 0 g/L; odpowiednio: YPG100, YPG20 i YP). Badano przyrost biomasy i tempo utylizacji glicerolu. Jak pokazały wyniki przeprowadzonych analiz, plon biomasy *Y. lipolytica* był porównywalny we wszystkich zastosowanych wariantach hodowlanych (YPG100, YPG20, YP), z jedynie nieznaczną przewagą hodowli w podłożu YPG20. W konsekwencji stwierdzono, że dostępność przyswajalnego dla komórek *Y. lipolytica* węgla wprowadzonego w postaci ekstraktu drożdżowego i peptonu przyczyniła się do obserwowanego przyrostu biomasy i białka SoAMY w hodowlach okresowo-dolewowych w fazie, gdy glicerol został już całkowicie zutylizowany. W kolejnym etapie prac **ustalono skład elementarny złożonych komponentów medium hodowlanego – ekstraktu drożdżowego i peptonu, oraz biomasy *Y. lipolytica* i białka SoAMY** (Środowiskowe Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań). W efekcie możliwe było **wyliczenie uproszczonego bilansu mas dla badanego procesu, opisującego rozkład pomiędzy poszczególne produkty** (biomasa, białko SoAMY, erytrytol, mannitol i kwas cytrynowy) **atomów węgla i azotu pochodzących z komponentów medium hodowlanego** (glicerol, ekstrakt drożdżowy i pepton). Co ciekawe, dobrane warunki hodowli pozwoliły uzyskać znaczną produkcję innych wartościowych bioproduktów metabolizmu *Y. lipolytica*. Mianowicie, maksymalne stężenie erytrytolu, cennej substancji słodzącej o obniżonej kaloryczności, wyniosło 83.58 g/L, a kwasu cytrynowego - 34.31 g/L. Te bioprodukty mogą być uważane za wartość dodaną opracowywanego procesu produkcyjnego, choć w odniesieniu do syntezy białka SoAMY, stanowią produkty uboczne.

Jak omówiono powyżej, białko SoAMY było wydajnie wydzielane przez komórki *Y. lipolytica* do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a jedynie znikoma frakcja ulegała retencji wewnątrz komórki (lub też, jeszcze nie została wydzielona na zewnątrz). Na etapie planowania konstrukcji genowych,

sekwencję nukleotydową kodującą białko SoAMY, zaopatrzone na 3' końcu w sekwencję kodującą znacznik 6xHisTag (trakt sześciu histydyn, kodowany na C-końcu białka). W efekcie, celem **oczyszczenia białka SoAMY z medium hodowlanego do widocznej homogenności możliwe było zastosowanie jedynie dwu-etapowej procedury**. Metoda polegała na wytrącaniu białka z medium hodowlanego siarczanem amonu, a następnie oczyszczaniu poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa ze złożem niklowym (Ni²⁺-IMAC: Nickel²⁺-Immobilized Metal Affinity Chromatography). Choć pierwotne próby wiązały się ze znacznymi stratami oczyszczanego białka na etapie wytrącania siarczanem amonu (wydajność oczyszczania na poziomie 5%), to uzyskany preparat charakteryzował się wysokim stopniem oczyszczenia (25-krotny), a oczyszczone białko było widoczne jako pojedynczy prążek w trakcie rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) oraz niedenaturujących (native PAGE). Aktualnie są prowadzone **prace nad zastosowaniem alternatywnych metod oczyszczania białka SoAMY z płynów pohodowlanych na drodze separacji w wodnych systemach dwu-fazowych** (ang. aqueous two phase separation; ATPS) (Zał. 5 II 3).

W efekcie przeprowadzonych prac, opracowano stabilny proces wydajnej biotechnologicznej produkcji białka o aktywności amylolitycznej, pochodzącego z niszowego źródła, w komórkach gospodarza mikrobiologicznego. Znaczna ilość homogennego materiału uzyskiwana z hodowli bioreaktorowych po procesie oczyszczania metodami chromatograficznymi, umożliwiła prace nad poznaniem właściwości heterologicznego białka. Przy czym, szczegółowe właściwości biochemiczne enzymu pozostawały poza obszarem zainteresowań prowadzonych badań. Kluczowym parametrem było **określenie zdolności białka SoAMY do trawienia różnych gatunków skrobi, a w szczególności skrobi niekleikowanej**. Warunki testów enzymatycznych ustalono w oparciu o dane literaturowe, które uzyskano badając natywne białko SoAMY, pozyskane na drodze izolacji z owada jako mieszaninę dwóch izoenzymów [35][36][37]. W ramach niniejszej pracy, przeprowadzono jedynie krótkie eksperymenty weryfikacyjne, celem potwierdzenia uprzednio udokumentowanych właściwości, jak optymalne pH, siła jonowa buforu i temperatura dla reakcji enzymatycznej. Uzyskane wyniki korespondowały z danymi literaturowymi (pH 5.0 – 5.5, bufor octanowy 100 mM, temperatura 40°C). Aktywność amylolityczną rekombinowanej SoAMY badano względem 11 gatunków skrobi, tj. skrobia ziemniaczana Z1, skrobia ziemniaczana Z2S, skrobia ziemniaczana woskowa, skrobia pszeniczna, skrobia ziemniaczana rozpuszczalna, skrobia ryżowa woskowa, skrobia kukurydziana, skrobia kukurydziana woskowa, skrobia tapiokowa, skrobia grochowa, skrobia z amarantusa. Do testu, każdy typ skrobi przygotowano w postaci kleikowanej (przez autoklawowanie) oraz niekleikowanej. Aktywność amylolityczną względem badanych gatunków skrobi badano stosując test enzymatyczny Nelson-Somogyi, a w przypadku skrobi niekleikowanych - dodatkowo weryfikowano poprzez obserwacje skaningowym mikroskopem

elektronowym (ang. scanning electron microscopy; SEM) granul traktowanych i nietraktowanych enzymem (Wydziałowa Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań). W efekcie przeprowadzonych analiz, nie stwierdzono znacznych różnic w efektywności trawienia przez SoAMY różnych gatunków skrobi w postaci kleikowanej, choć obserwowane różnice w ilości uwolnionych cukrów redukujących były istotne statystycznie. Natomiast w odniesieniu do skrobi niekleikowanych, zaobserwowane różnice w efektywności trawienia przez SoAMY były znaczne i w dużej mierze uzależnione od wielkości granul skrobiowych, a także zawartości frakcji amylozy i amylopektyny w określonych gatunkach skrobi (co stanowiło przedmiot innych opracowań, np. [36]). O ile skrobie ziemniaczane oraz skrobia tapiokowa były odporne na trawienie przez rekombinowaną amylazę SoAMY, **zaobserwowano uwalnianie cukrów redukujących z niekleikowanej skrobi pochodzącej z ryżu, kukurydzy, grochu i amarantusa**. Odporność skrobi ziemniaczanych i tapiokowej na trawienie enzymami amylolytycznymi była szeroko dyskutowana w literaturze przedmiotu. Absolutny wyjątek od zaobserwowanych prawidłowości stanowiła skrobia pszeniczna, która nie była trawiona w ogóle, bez względu na sposób przygotowania – kleikowana czy niekleikowana. Ta obserwacja była jednak łatwo wytłumaczalna obecnością inhibitorów alfa-amylaz na powierzchni granul skrobi pszenicznej. Takie zjawisko zostało już wcześniej opisane dla amylaz owadzych, w tym dla natywnej alfa-amylazy z wołka ryżowego [38]. Co ciekawe, w opracowaniach naukowych zaproponowano stosowanie mąki grochowej jako repelentu ograniczającego żerowanie *S. oryzae* na plonach zbożowych [39], natomiast w niniejszej pracy wykazano, że skrobia grochowa (w czystej postaci) może być wydajnie trawiona przez enzym trawienny wołka ryżowego i tym samym mogłaby stanowić źródło pożywienia dla owada.

W wyniku przeprowadzonych badań **ustalono, że SoAMY należy do grupy enzymów zdolnych do trawienia niekleikowanej skrobi** (ang. raw starch digesting; RSD), czyli ataku na niekleikowaną granulę skrobiową i uwalniania z niej oligosacharydów. W odniesieniu do procesów biotechnologicznych bazujących na substracie skrobiowym, taka właściwość pozwala na prowadzenie procesów obróbki skrobi zgodnie z technologią jednoczesnej hydrolizy i fermentacji (ang. simultaneous saccharification and fermentation; SSF). Tradycyjny proces biotechnologiczny z substratem skrobiowym jest prowadzony dwuetapowo – w pierwszej kolejności substrat jest poddawany wstępnej obróbce (ang. pre-treatment), włącznie z podgrzaniem substratu do temp. >90°C, a w drugim etapie prowadzona jest właściwa fermentacja (ok. 30°C). W przypadku technologii SSF, wstępna obróbka substratu jest zbędna, co powoduje, że rozdzielenie etapów obróbki substratu (>90°C) i fermentacji (30°C) w czasie i przestrzeni nie jest konieczne. W konsekwencji, ograniczone zostają koszty inwestycyjne związane z aparaturą, a ponadto, wyeliminowany zostaje najbardziej kosztochłonny etap wstępnej obróbki substratu -

podgrzewania skrobi do $>90^{\circ}\text{C}$ (a następnie schładzania do 30°C). Oszacowano, że 10-20% finalnej ceny jednostkowej bioetanolu produkowanego ze skrobi stanowi nakład energii potrzebny do wstępnej termicznej obróbki substratu [3]. Ograniczenie zużycia energii potrzebnej do kleikowania skrobi zostało wskazane jako jedno z kluczowych zagadnień, jakie należy rozwiązać, celem usprawnienia procesów biotechnologicznych opartych na skrobi [40].

Finalnym zagadnieniem w ramach podjętej tematyki badawczej było dokonanie **oceny przydatności preparatu rekombinowanej alfa-amylazy SoAMY w procesie SSF**. W tym celu dokonano porównania efektywności działania komercyjnego preparatu amyloolitycznego (Stargen001TM; Genecor Int., USA; dalej nazywany: Stargen; rutynowo stosowany w procesach SSF) z preparatem przygotowanym na bazie alfa-amylazy SoAMY. Porównania dokonano na przykładzie modelowego procesu SSF, względem natywnej skrobi ryżowej. Komercyjny preparat Stargen zawiera alfa-amylazę i glukoamylazę z *Aspergillus* spp. Preparat na bazie amylazy SoAMY suplementowano komercyjnie dostępną aktywnością glukoamylazy (SpritaseGA 14400L; Enzym - Novozymes Polska). Preparaty porównywano w hodowlach SSF dwóch gatunków drożdży: przemysłowo stosowanego szczepu gorzelniczego *S. cerevisiae* Ethanol Red (Lesaffre; Francja) oraz termotolerancyjnego szczepu *Kluyveromyces marxianus* DSMZ 5422 (DSMZ; Niemcy). Termotolerancyjność jest właściwością szczególnie pożądaną w przypadku procesów SSF, ponieważ pozwala ustalić lepszy kompromis pomiędzy optimum temperaturowym aktywności enzymu (zwykle koło $40\text{-}50^{\circ}\text{C}$) a optimum wzrostu komórek drożdżowych (zwykle $28\text{-}30^{\circ}\text{C}$, a w przypadku szczepów termotolerancyjnych $\geq 35\text{-}45^{\circ}\text{C}$, w zależności od szczepu). W trakcie hodowli SSF analizowano produkcję etanolu przez komórki drożdżowe oraz ich żywotność, a w próbach kontrolnych bez drożdży - stopień uwalniania oligosacharydów z granul skrobiowych, oraz rozkład długości uwalnianych oligosacharydów od dp1 do dp7, w dwóch warunkach temperaturowych - 30°C i 37°C . W badanym układzie eksperymentalnym, najbardziej efektywny pod kątem produkcji etanolu okazał się być szczep gorzelniczy *S. cerevisiae* Ethanol Red w hodowlach suplementowanych komercyjnym preparatem amyloolitycznym Stargen. Niższe stężenia etanolu uzyskano w hodowlach *K. marxianus*, co było spowodowane wrażliwością szczepu na podwyższone jego stężenia (powyżej 26 g/L), uwidocznioną spadkiem żywotności populacji drożdży. Co ciekawe, w hodowlach *K. marxianus*, nie zaobserwowano istotnych różnic w produkcji etanolu czy żywotności komórek pomiędzy hodowlami suplementowanymi różnymi preparatami amyloolitycznymi (Stargen vs bazujący na SoAMY). Obserwacja ta sugeruje, że preparat skomponowany na bazie amylazy SoAMY był równie wydajny w uwalnianiu z granul skrobiowych źródła węgla dostępnego dla populacji komórek *K. marxianus*, co preparat komercyjny, w zadanych warunkach eksperymentalnych. Z kolei w hodowlach SSF ze szczepem *S. cerevisiae*, różnice pomiędzy dwoma wariantami hodowli różniącymi się zastosowanym preparatem amyloolitycznym

były wyraźniej zaznaczone na korzyść preparatu komercyjnego. W próbach kontrolnych, bez podaży szczepów drożdży, monitorowano profil oligosacharydów uwalnianych z granul skrobiowych. Wyniki tych analiz pokazały, że preparat komercyjny Stargen generował bardziej homogenny profil produktów rozkładu skrobi, gdzie 95.14 do 97.65% (w/v) oznaczonych cukrów stanowiła glukoza (dp1). Natomiast w przypadku preparatu skomponowanego na bazie owadziej alfa-amylazy, profile generowanych produktów trawienia skrobi były bardziej zróżnicowane, a glukoza stanowiła 82.81 do 90.37% (w/v) cukrów uwolnionych z granul skrobiowych (w badanym zakresie dp1-dp7). Niewątpliwie, pełniejszy rozkład polimeru do monomerów jest bardziej pożądanym w przypadku dalszej utylizacji przez mikroorganizmy. Jednocześnie należy zaznaczyć, że obserwowany wynik może być efektem odmiennych proporcji pomiędzy aktywnością alfa-amylazy i glukoamylazy w preparacie komercyjnym i skomponowanym na bazie SoAMY. W przypadku preparatu zawierającego SoAMY, obie aktywności podano w stosunku 1:1, uwzględniając wyniki testów aktywności wykonanych przed hodowlami. Natomiast w przypadku preparatu Stargen, mierzono aktywność już przygotowanej, komercyjnie dostępnej mieszaniny dwóch aktywności amylolitycznych, uwzględniając jedynie łączną aktywność wypadkową, a proporcje obu aktywności w gotowym preparacie nie były znane. Niemniej jednak, powyższy eksperyment wykazał, że **rekombinowana owadzia alfa-amylaza może być przydatna jako komponent preparatu amylolitycznego w procesach SSF z wykorzystaniem przemysłowych ras drożdży**. Natomiast sposób formułacji preparatu zawierającego SoAMY wymaga dalszych prac.

Podsumowując, obiektem badań w niniejszych pracach był gen kodujący alfa-amylazę z niszowego źródła – owada, wołka ryżowego (*S. oryzae*). Po przeprowadzeniu szczegółowej analizy bioinformatycznej słabo poznanej sekwencji, docelowy gen klonowano w czterech wybranych drożdżowych systemach ekspresyjnych. W wyniku przeprowadzonych prac skryningowych, serii hodowli bioreaktorowych i eksperymentów pobocznych, wytypowano najefektywniejszy spośród badanych systemów ekspresyjnych. Zastosowane rozwiązania hodowlane pozwoliły opracować stabilny i wydajny proces biotechnologicznej produkcji owadziego enzymu w komórkach drożdży niekonwencjonalnych *Y. lipolytica*. Oczyszczony preparat enzymatyczny testowano pod kątem zdolności do trawienia różnych gatunków skrobi. Stwierdzono, że rekombinowana amylaza jest zdolna do uwalniania oligosacharydów z natywnych granul wybranych gatunków skrobi, a tym samym należy do grupy amylaz RSD. Dokonano oceny przydatności uzyskanego preparatu enzymatycznego w modelowym procesie jednoczesnej hydrolizy i fermentacji z zastosowaniem przemysłowej rasy drożdży, wykazując przydatność enzymu w tym zakresie.

Wyniki powyższych prac zostały przedstawione w postaci serii monotematycznych publikacji naukowych (Załącznik 5 I B 1, Załącznik 5 I B 2, Załącznik 5 I B 3, Załącznik 5 I B 4), referatu wygłoszonego na konferencji międzynarodowej (Załącznik 5 II K 2) oraz komunikatu konferencyjnego w formie posteru (Załącznik 5 III B 2).

BIBLIOGRAFIA:

- [1] M.J.E.C. van der Maarel, B. van der Veen, J.C.M. Uitdehaag, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen, Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family., *J. Biotechnol.* 94 (2002) 137–155. doi:10.1016/S0168-1656(01)00407-2.
- [2] F.W. Bai, W.A. Anderson, M. Moo-Young, Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 89–105. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.09.002.
- [3] S. Lee, Ethanol from corn, in: S. Lee, J. Speight, S. Loyalka (Eds.), *Handb. Altern. Fuel Technol.*, CRC Press, Boca Raton, 2007: pp. 232–343.
- [4] W.H. Van Zyl, M. Bloom, M.J. Viktor, Engineering yeasts for raw starch conversion, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95 (2012) 1377–1388. doi:10.1007/s00253-012-4248-0.
- [5] G. Gellissen, G. Kunze, C. Gaillardin, J.M. Cregg, E. Berardi, M. Veenhuis, I. Van Der Klei, New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* - A comparison, *FEMS Yeast Res.* 5 (2005) 1079–1096. doi:10.1016/j.femsyr.2005.06.004.
- [6] C.H. Yang, Y.C. Huang, C.Y. Chen, C.Y. Wen, Heterologous expression of *Thermobifida fusca* thermostable alpha-amylase in *Yarrowia lipolytica* and its application in boiling stable resistant sago starch preparation, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37 (2010) 953–960. doi:10.1007/s10295-010-0745-2.
- [7] C. Madzak, *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 4559–4577. doi:10.1007/s00253-015-6624-z.
- [8] Z. Lazar, E. Walczak, M. Robak, Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC⁺ transformants, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 6982–6989. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.032.
- [9] Z. Lazar, T. Rossignol, J. Verbeke, A.M. Crutz-Le Coq, J.M. Nicaud, M. Robak, Optimized invertase expression and secretion cassette for improving *Yarrowia lipolytica* growth on sucrose for industrial applications, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40 (2013) 1273–1283. doi:10.1007/s10295-013-1323-1.
- [10] C. Madzak, L. Otterbein, M. Chamkha, S. Moukha, M. Asther, C. Gaillardin, J.M. Beckerich, Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Yeast Res.* 5 (2005) 635–646. doi:10.1016/j.femsyr.2004.10.009.
- [11] N. Boonvitthya, S. Bozonnet, V. Burapatana, M.J. O'Donohue, W. Chulalaksananukul, Comparison of the heterologous expression of *trichoderma reesei* endoglucanase II and

- cellobiohydrolase II in the yeasts *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*, *Mol. Biotechnol.* 54 (2013) 158–169. doi:10.1007/s12033-012-9557-0.
- [12] C.H. Zhao, W. Cui, X.Y. Liu, Z.M. Chi, C. Madzak, Expression of inulinase gene in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and single cell oil production from inulin-containing materials, *Metab. Eng.* 12 (2010) 510–517. doi:10.1016/j.ymben.2010.09.001.
- [13] C.S. Park, C.C. Chang, J.Y. Kim, D.M. Ogrydziak, D.D. Ryu, Expression, secretion, and processing of rice alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 6876–6881.
- [14] R. Ledesma-Amaro, T. Dulermo, J.M. Nicaud, Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce biodiesel from raw starch, *Biotechnol. Biofuels.* 8 (2015) 148. doi:10.1186/s13068-015-0335-7.
- [15] H. Sun, P. Zhao, X. Ge, Y. Xia, Z. Hao, J. Liu, M. Peng, Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010) 988–1003. doi:10.1007/s12010-009-8579-y.
- [16] E. Celińska, W. Grajek, A novel multigene expression construct for modification of glycerol metabolism in *Yarrowia lipolytica*., *Microb. Cell Fact.* 12 (2013) 102. doi:10.1186/1475-2859-12-102.
- [17] E. Walczak, M. Robak, WZROST Z SACHAROZY KLONÓW DROZDZY YARROWIA LIPOLYTICA Z GENEM INWERTAZY Z SACCHAROMYCES CEREVISIAE, *Acta Sci. Pol., Biotechnol.* 8 (2013) 25–36.
- [18] L. Liu, P. Otoupal, A. Pan, H.S. Alper, Increasing expression level and copy number of a *Yarrowia lipolytica* plasmid through regulated centromere function, *FEMS Yeast Res.* 14 (2014) 1124–1127. doi:10.1111/1567-1364.12201.
- [19] T. Juretzek, M. Le Dall, S. Mauersberger, C. Gaillardin, G. Barth, J.-M. Nicaud, Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Yeast.* 18 (2001) 97–113. doi:10.1002/1097-0061(20010130)18:2<97::AID-YEA652>3.0.CO;2-U.
- [20] M.T. Le Dall, J.M. Nicaud, C. Gaillardin, Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Curr. Genet.* 26 (1994) 38–44. doi:10.1007/BF00326302.
- [21] G. Pignede, H.J. Wang, F. Fudalej, M. Seman, C. Gaillardin, J.M. Nicaud, Autocloning and amplification of LIP2 in *Yarrowia lipolytica*., *Appl. Env. Microbiol.* 66 (2000) 3283–3289. doi:10.1128/AEM.66.8.3283-3289.2000.Updated.
- [22] F. Bordes, F. Fudalej, V. Dossat, J.-M. Nicaud, A. Marty, A new recombinant protein expression system for high-throughput screening in the yeast *Yarrowia lipolytica*., *J. Microbiol. Methods.* 70 (2007) 493–502. doi:10.1016/j.mimet.2007.06.008.
- [23] S. Blanchin-Roland, R.R. Cordero Otero, C. Gaillardin, Two upstream activation sequences control the expression of the XPR2 gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*., *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 327–338. doi:10.1128/MCB.14.1.327.Updated.
- [24] C. Madzak, B. Tréton, S. Blanchin-Roland, Strong hybrid promoters and integrative

- expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 (2000) 207–216.
- [25] S. Casaregola, C. Feynerol, M. Diez, P. Fournier, C. Gaillardin, Genomic organization of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Chromosoma.* 106 (1997) 380–390. doi:10.1007/s004120050259.
- [26] N. Nelson, A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.* 153 (1944) 375–380.
- [27] J. Verbeke, A. Beopoulos, J. Nicaud, Efficient homologous recombination with short length flanking fragments in Ku70 deficient *Yarrowia lipolytica* strains, *Biotechnol Lett.* 35 (2013) 571–576. doi:10.1007/s10529-012-1107-0.
- [28] A. Kretzschmar, C. Otto, M. Holz, S. Werner, L. Hübner, G. Barth, Increased homologous integration frequency in *Yarrowia lipolytica* strains defective in non-homologous end-joining, *Curr. Genet.* (2013) 1–10. doi:10.1007/s00294-013-0389-7.
- [29] C. Madzak, C. Gaillardin, J.M. Beckerich, Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: A review, in: *J. Biotechnol.*, 2004. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.10.027.
- [30] S. Müller, T. Sandal, P. Kamp-Hansen, H. Dalbøge, Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*, *Yeast.* 14 (1998) 1267–1283. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199810)14:14<1267::AID-YEA327>3.0.CO;2-2.
- [31] J.M. Nicaud, C. Madzak, P. van den Broek, C. Gysler, P. Duboc, P. Niederberger, C. Gaillardin, Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Yeast Res.* 2 (2002) 371–379. doi:Pii S1567-1356(02)00082-X.
- [32] C.C. Chang, D.D.Y. Ryu, C.S. Park, J. Kim, Improvement of Heterologous Protein Productivity Using Recombinant *Yarrowia lipolytica* and Cyclic Fed-Batch Process Strategy, (1998).
- [33] C.C. Chang, D.D.Y. Ryu, C.S. Park, J.Y. Kim, D.M. Ogrydziak, Recombinant bioprocess optimization for heterologous protein production using two-stage, cyclic fed-batch culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49 (1998) 531–537. doi:10.1007/s002530051209.
- [34] J.K.D.M. Ogrydziak, Recombinant bioprocess optimization for heterologous protein production using two-stage , cyclic fed-batch culture, (1998) 531–537.
- [35] J.E. Baker, Purification of isoamylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), by high-performance liquid chromatography and their interaction with partially-purified amylase inhibitors from wheat, *Insect Biochem.* 17 (1987) 37–44. doi:10.1016/0020-1790(87)90141-7.
- [36] J.E. Baker, DIGESTION OF STARCH GRANULES BY α -AMYLASES FROM THE RICE WEEVIL ,

- Sitophilus oryzae : EFFECT OF STARCH TYPE , FAT EXTRACTION, GRANULE SIZE , MECHANICAL DAMAGE , A N D DETERGENT TREATMENT, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22 (1992) 529–537.
- [37] J.E. Baker, S.M. Woo, Purification , Partial Characterization , and Postembryonic Levels of Amylases From *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 428 (1985) 415–428.
- [38] J.E. Baker, S.M. Woo, J.. Throne, F. P.L, Correlation of alpha-amylase inhibitor content in eastern soft wheats with development parameters of the rice weevil (coleoptera: Curculionidae), *Environ. Entomol.* 20 (1991) 53–60.
- [39] P. Pretheep-Kumar, S. Mohan, K. Ramaraju, Protein-enriched pea flour extract protects stored milled rice against the rice weevil, *Sitophilus oryzae.*, *J. Insect Sci.* 4 (2004) 26.
- [40] O.J. Sanchez, C.A. Cardona, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 5270–5295. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.013.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Pierwsze udokumentowane prace naukowe miałam okazję prowadzić w trakcie I roku studiów magisterskich. W ramach programu Socrates-Erasmus odbyłam staż naukowy (5 miesięcy 2006/2007) na Wydziale Biochemii, **Uniwersytetu Paris 7, Denis Diderot (Paryż, Francja;** Zał. 5 III L 2), w zespole Prof. Nathalie Janel. W trakcie stażu zostałam zaangażowana w prace eksperymentalne przy realizacji projektu badawczego, którego celem była **ocena chemoprewencyjnego wpływu diety wzbogaconej w polifenole z czerwonego wina na rozwój chorób układu krwionośnego w mysim modelu hiperhomocysteinemii** (Zał. 5 II I 7). W trakcie stażu miałam okazję pracować w międzynarodowym zespole naukowców, zapoznać się z licznymi technikami z zakresu biologii molekularnej, oraz ze specyfiką pracy eksperymentalnej opartej na zwierzęcych liniach komórkowych oraz mysich modelach chorób ludzkich. Hiperhomocysteinemia jest dysfunkcją metabolizmu polegającą na występowaniu zwiększonego stężenia homocysteiny w osoczu krwi obwodowej na skutek zaburzeń w katabolizmie tego aminokwasu. Schorzenie jest skojarzone z występowaniem licznych dolegliwości, w tym także – jest uważane za niezależny czynnik ryzyka powodujący przedwczesny rozwój arteriosklerozy. Jednym z problemów podjętych w trakcie badań, w których uczestniczyłam, było zweryfikowanie uprzednio uznanego, progowego stężenia homocysteiny w osoczu krwi, powyżej którego rozpoczynają się procesy patologiczne związane z arteriosklerozą. Wzrost stężenia homocysteiny powyżej tej wartości progowej miałoby stanowić przesłankę dla rozpoczęcia profilaktyki chorób naczyniowych u pacjentów ze zdiagnozowaną hiperhomocysteinemią. Na podstawie korelacji pomiędzy znanymi markerami występowania arteriosklerozy i hiperhomocysteinemii – obniżoną aktywnością enzymów PON1 i CBS (paraoxonase 1; cystathionine β-synthase), oraz stężeniem homocysteiny w osoczu krwi obwodowej u myszy ze zróżnicowanym nasileniem hiperhomocysteinemii, wyznaczono rzeczoną progową wartość homocysteiny. Kolejny nurt badań realizowanych w trakcie stażu dotyczył określenia wpływu ekstraktu polifenoli z czerwonego wina na chemoprewencję występowania hiperhomocysteinemii, oraz skojarzonych z tą chorobą dolegliwości – przewlekłymi stanami zapalnymi oraz schorzeniami układu krwionośnego. Badania realizowano z wykorzystaniem myszy ze zróżnicowanym nasileniem hiperhomocysteinemii wywołanej na skutek czynników genetycznych i środowiskowych. Nasilenie negatywnych skutków zdrowotnych skojarzonych z występowaniem hiperhomocysteinemii w warunkach podaży polifenoli z czerwonego wina badano z wykorzystaniem markerów molekularnych (m.in. ekspresji genów cytokin prozapalnych, czy markerów dysfunkcji endotelium). W efekcie podjętych badań **wykazano, że umiarkowana konsumpcja polifenoli z czerwonego wina ma prozdrowotne działanie w mysim modelu hiperhomocysteinemii**. Moje zaangażowanie w prowadzone badania zostało docenione i uwzględnione w publikacjach powstałych w efekcie prac eksperymentalnych przeprowadzonych z moim udziałem (Zał. 5 II A 13; Zał. 5 II A 14).

Zdobyte w trakcie tego stażu doświadczenia, w sposób kluczowy wpłynęły na moje dalsze decyzje zawodowe.

W trakcie przygotowania pracy licencjackiej i magisterskiej pod kierunkiem Prof. dr hab. Jana Sadowskiego (Zakład Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu) moje zainteresowania skupiały się wokół zagadnień związanych z **wykorzystaniem narzędzi wielkoskalowych (omicznych) w analizie molekularnych podstaw stresu roślin w odpowiedzi na warunki środowiskowe**. Badania realizowane w trakcie prac dyplomowych dotyczyły wykorzystania głównego narzędzia genomiki funkcjonalnej – **mikromacierzy DNA**. Szczegółowym przedmiotem analizy był szlak sygnalizacji kwasu abscysynowego (ABA) i jego regulatory – fosfatazy PP2C (ang. protein phosphatase 2C), oraz kinazy MAPK (ang. mitogen-activated protein kinase). Obiekt badań stanowiła roślina modelowa – rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*). W ramach podjętych prac dokonano analizy profilu ekspresji kinaz białkowych MAPK i fosfataz białkowych PP2C u *A. thaliana* w stresie suszy, wskazano podrodziny rzeczonych kinaz i fosfataz, które były nadreprezentowane w obserwowanych profilach ekspresyjnych, wniosując na tej podstawie o ich zaangażowaniu w szlak sygnalizacji stresu suszy, jak również dokonano analizy struktury sekwencji regulatorowych genów o zmiennym poziomie ekspresji w badanych warunkach. Analizy sekwencji promotorów przeprowadziłam w oparciu o liczne narzędzia bioinformatyczne (m.in. MEME, PLACE, nsiteM, z oceną statystyczną przeprowadzoną w POBO) celem poszukiwania motywów konserwatywnych w rejonach promotorowych genów koregulowanych. Pod opieką Dr hab. Agnieszki Ludwików miałam okazję zapoznać się z metodologią obróbki wielkoskalowych danych z eksperymentów mikromacierzowych (m.in. program GeneSpring, baza danych TAIR oraz MIPS), jak również z technikami pracy w laboratorium biologii molekularnej w obszarze badań nad obiektami roślinnymi. Charakter prowadzonych badań pozwolił mi zdobyć znaczne doświadczenie w zakresie posługiwania się różnymi narzędziami bioinformatycznymi i przeszukiwania baz danych, co było przydatne w niektórych moich dalszych przedsięwzięciach. Swoje umiejętności w zakresie obróbki wielkoskalowych danych doskonaliłam także w późniejszym czasie w trakcie warsztatów i szkoleń poświęconych temu zagadnieniu (m.in. Zał. 5 III A 2).

Następnie jako asystent w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, UPP, zostałam zaangażowana jako wykonawca w **międzynarodowym projekcie badawczym, pt. *Production and Upgrading of 2,3-Butanediol from Biomass*** (akronim *PUBB*), finansowanym w latach 2008-2011, w ramach 6 programu ramowego, europejskiego obszaru badawczego – biotechnologia przemysłowa (6th EU Framework Programme, European Research Area - Industrial Biotechnology (ERA-IB); Główny beneficjent: Johann Heinrich von Thunen-Institute, Institute of Agricultural Technology and Biosystems Engineering, Braunschweig, Niemcy) (Zał. 5 II I 6). Finalnym celem projektu było **opracowanie procesu biotechnologicznej produkcji 2,3-butanodiolu z biomasy odpadowej oraz jego dalsze wykorzystanie**

w syntezie wartościowych polimerów. Niniejszy projekt wpisował się w nurt aktualnie silnie rozwijającej się dziedziny badań, nazywanej zieloną chemią. Zielona chemia zakłada opracowywanie procesów produkcji biochemikaliów charakteryzujących się ograniczonym stosowaniem i wytwarzaniem czynników szkodliwych dla środowiska naturalnego. Koncepcja ta wymusza globalne spojrzenie na proces produkcyjny, włączając korzystanie z odnawialnych źródeł węgla i energii, stosowanie bezpiecznych katalizatorów, a także efektywną gospodarkę odpadami i energią. 2,3-Butanodiol stanowiący zasadniczy przedmiot projektu *PUBB* to cenny związek chemiczny, szeroko wykorzystywany w licznych gałęziach przemysłu, m.in. jako prekursor przy produkcji poliuretanów, poliestrów, czy jako dodatek do paliw. W ramach projektu prowadziłam prace z zakresu izolacji drobnoustrojów zdolnych do nadprodukcji 2,3-butanodiolu. Kluczowym założeniem było pozyskanie mikroorganizmów bezpiecznych, należących do I klasy ryzyka biologicznego. W tamtym czasie, za najefektywniejszych producentów 2,3-butanodiolu uważano gatunki z rodzaju *Klebsiella*, których wykorzystanie w praktyce produkcyjnej było znacznie ograniczone ze względu na przynależność do II klasy ryzyka biologicznego. Natomiast nieliczne badania wskazywały na potencjał bakterii fermentacji mlekowej w zakresie produkcji 2,3-butanodiolu i właśnie na tej grupie mikroorganizmów skupiłam swoje badania. Szczepy były izolowane na podłożach selektywnych względem tej grupy mikroorganizmów z rozmaitych nisz środowiskowych (głównie fermentowane produkty spożywcze ulegające fermentacji spontanicznej). Identyfikacja potencjału szczepów do produkcji 2,3-butanodiolu przebiegała wieloetapowo. W efekcie przeprowadzonych prac, spośród blisko 700 izolatów bakterii fermentacji mlekowej utworzono kolekcję 40 szczepów o podwyższonej zdolności do produkcji 2,3-butanodiolu. Dalsze prace miały na celu dokonanie oceny efektywności produkcji cennego metabolitu przez wyizolowane szczepy hodowane w podłożach o zróżnicowanym składzie, w oparciu o metodologię statystycznego planowania eksperymentów. W ramach projektu przygotowałam pracę przeglądową (Zał. 5 II A 12), która obecnie zyskała status publikacji często cytowanej (ang. highly cited paper; >200 cytowań) w bazie danych Web of Science.

Moje kolejne przedsięwzięcia naukowe pozostały w tematyce zielonej chemii, czyli produkcji biochemikaliów metodami biotechnologicznymi. Dalsze prace prowadziłam w ramach projektu pt. ***Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych***, (akronim *ZIELONA CHEMIA*) finansowanego w latach 2010-2015 przez Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka ze środków UE (Zał. 5 II I 4). Zasadniczym celem projektu było opracowanie procesu biotechnologicznej syntezy wartościowych bioproduktów (1,3-propanodiolu, erytrytolu, kwasu bursztynowego i fumarowego) z glicerolu, powstałego jako produkt odpadowy po procesie produkcji biodiesel'a. Projekt miał charakter konsorcyjny i łączył wspólne prace naukowców z pięciu instytucji naukowych w Polsce (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Politechnika

Poznańska). W KBiMŻ (UPP) zasadnicze prace dotyczyły opracowania procesów biotechnologicznej produkcji 1,3-propanodiolu, który jest wartościowym prekursorem stosowanym m.in. przy produkcji poliestrów i poliuretanów. Wstępne prace przygotowawcze polegały na szczegółowej analizie dostępnych danych literaturowych w obszarze zielonej chemii, ze szczególnym uwzględnieniem produkcji 1,3-propanodiolu. W rezultacie przygotowałam dwie obszerne prace przeglądowe (Załącz. 5 II A 11 i Załącz. 5 II A 10) oraz uczestniczyłam w przygotowaniu kolejnej, jako współautor (Załącz. 5 II A 9). W ramach projektu moje **zainteresowania i prowadzone przez mnie prace skupiały się wokół dwóch obszarów: 1) modyfikacji szlaku katabolizmu glicerolu w komórkach drożdży niekonwencjonalnych *Y. lipolytica* z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej, 2) produkcji 1,3-propanodiolu przez bakterie o wzmocnionym potencjale w tym zakresie dzięki zastosowaniu zabiegów z zakresu nieukierunkowanej mutagenizacji i inżynierii genetycznej.**

W ramach pierwszego wyróżnionego obszaru badań w projekcie *ZIELONA CHEMIA* przygotowałam swoją rozprawę doktorską, pod kierunkiem Prof. dr hab. Włodzimierza Grajka. Celem pracy było **przygotowanie konstrukcji genowej do ekspresji heterologicznych genów szlaku katabolizmu glicerolu w drożdżach niekonwencjonalnych *Y. lipolytica*.** Przygotowana przez mnie konstrukcja genu obejmowała trzy kasety ekspresyjne (promotor-gen-terminator) oraz gen markerowy (*ura3*), oflankowane sekwencjami *rDNA* ukierunkowującymi miejsce zajścia rekombinacji homologicznej. Kasety ekspresyjne obejmowały geny kodujące bakteryjne enzymy zaangażowane w katabolizm glicerolu, umieszczone pod kontrolą promotora indukowanego obecnością glicerolu w medium hodowlanym. Całość stanowiła w tamtym czasie najbardziej złożoną konstrukcję genową przeznaczoną do modyfikacji genetycznej *Y. lipolytica*, wraz z konstrukcją opracowaną przez naukowców koncernu DuPont (Patent No US2012/0142082 A1; 2012). **Uzyskany rekombinowany szczep *Y. lipolytica* charakteryzowano** pod kątem liczby kopii wprowadzonej kasety ekspresyjnej, stabilności jej utrzymywania, oraz poziomu ekspresji heterologicznych genów. Wstępne hodowle porównawcze pokazały, że rekombinowany szczep wykazywał zwiększoną produkcję biomasy w porównaniu do szczepu wyjściowego, gdy glicerol był podawany jako źródło węgla, czego nie obserwowano w przypadku podaży glukozy. Rekombinowany szczep *Y. lipolytica* następnie testowano w hodowlach bioreaktorowych pod kątem zdolności do utylizacji glicerolu i syntezy wartościowych bioproduktów. Zaobserwowano zwiększoną produkcję biomasy drożdżowej bogatej w tłuszcze, oraz wysoką produkcję kwasu cytrynowego (Załącz. 5 II A 6, Załącz. 5 III B 6). Skonstruowany szczep *Y. lipolytica* zdeponowano w kolekcji czystych kultur National Collection of Yeast Cultures w Norwich (Wielka Brytania) pod numerem NCYC3825. Przygotowana **rozprawa doktorska została uhonorowana nagrodą indywidualną II-stopnia przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** (Załącz. 5 II J 1).

Badania dotyczące drugiego z wyróżnionych obszarów działań w projekcie *ZIELONA CHEMIA* prowadziłam w głównej mierze po obronie rozprawy doktorskiej. W ramach tych prac, wartościowe

szczyty wyizolowane w toku wcześniejszych zadań skrinigowych miały zostać poddane próbom intensyfikacji zdolności produkcyjnych. Izolaty pochodziły z rozmaitych nisz ekologicznych i przynależały do różnych gatunków, w tym, *Clostridium butyricum*, *Hafnia alvei*, oraz *Citrobacter freundii*. Zasadniczą trudnością wynikającą bezpośrednio z założeń projektu była konieczność pracy z drobnoustrojami natywnymi (dzikimi; ang. wild type), w sytuacji, gdy ich podłoże genetyczne nie było przygotowane do prac z zakresu inżynierii genetycznej. Powodowało to konieczność skonstruowania narzędzi inżynierii genetycznej od podstaw, korzystając z elementów konstrukcji genowych dostępnych komercyjnie oraz fragmentów sekwencji DNA amplifikowanych na matrycy DNA genomowego modyfikowanych szczepów. Ponadto, konieczne było dostosowanie klasycznych protokołów biologii molekularnej do niestandardowych obiektów. Prowadziłam prace z izolatami należącymi do gatunku *Clostridium butyricum*, gdzie zastosowano metody tradycyjnej mutagenizacji oraz tasowania genomowego, *Hafnia alvei*, gdzie zaadoptowałam system ukierunkowanej mutagenizacji oparty na intronach grupy IIa do delekcji genu kodującego dehydrogenazę mleczanową, oraz *Citrobacter freundii*, gdzie skonstruowałam nowy wektor episomalny przeznaczony do indukowanej nadekspresji genu kodującego dehydrogenazę 1,3-propanodiolu. Wszystkie te szczepy posiadały potwierdzoną zdolność do produkcji 1,3-propanodiolu w stanie natywnym, a celem podjętych prac było ulepszenie ich technologicznych właściwości poprzez zastosowanie zróżnicowanych strategii i narzędzi biologii molekularnej. W zakresie **ulepszania zdolności produkcyjnych *C. butyricum* zastosowałam metody mutagenizacji nieukierunkowanej** przy wykorzystaniu fizycznych i chemicznych czynników mutagenicznych. Istotnym utrudnieniem w przypadku tej strategii była zdolność komórek *C. butyricum* do przetrwalnikowania, co wymagało precyzyjnego doboru warunków mutagenizacji (Zał. 5 III B 10 i Zał. 5 III B 11). Selekcjonowano szczepy o podwyższonej tolerancji na wysokie stężenia toksycznych metabolitów. Następnie, mutanty o wyeksponowanych pożądanym cechach były poddawane **tasowaniu genomowemu** celem dalszego ulepszenia ich właściwości technologicznych. W ramach projektu *ZIELONA CHEMIA* służyłam także pomocą przy **genotypowaniu uzyskanych fuzantów po procedurze tasowania genomowego** oraz **badaniu molekularnych podstaw zwiększonej produktywności szczepów *C. butyricum*** (Zał. 5 III K 1). Warsztatowo zbliżone zadania, polegające na **genotypowaniu fuzantów i mutantów drożdży *S. cerevisiae***, powierzono mi w ramach innego projektu konsorcyjnego, w którym miałam okazję pracować (Zał. 5 II I 5, Zał. 5 III K 2). W odniesieniu do **ulepszania zdolności produkcyjnych izolatów *H. alvei* zastosowałam metodę ukierunkowanej mutagenizacji, wykorzystującej działanie intronów z grupy IIa**. Przedmiotowy szczep *H. alvei* AD27 został wyizolowany w ramach prac skrinigowych w projekcie *ZIELONA CHEMIA*. Jak pokazały wyniki testów hodowlanych, produkcja 1,3-propanodiolu przez *H. alvei* AD27 była silnie sprzężona ze znaczną produkcją kwasu mlekowego. Choć kwas mlekowy nie wykazuje szczególnie silnej toksyczności względem komórek bakteryjnych, to produkcja znacznych ilości tego metabolitu

przyczyniała się do obniżenia wydajności produkcji 1,3-propanodiolu. Z tego względu, celem ograniczenia syntezy kwasu mlekowego w komórkach *H. alvei* AD27, dostosowano komercyjnie dostępny zestaw TargeTron® do ukierunkowanej mutagenizacji, dedykowany dla komórek *E. coli*, do delekcji genu kodującego dehydrogenazę mleczanową - finalną aktywność w szlaku syntezy kwasu mlekowego. W efekcie ograniczono syntezę kwasu mlekowego przez *H. alvei* AD27, choć obserwowane zmiany były zależne od zastosowanych warunków hodowlanych (Zał. 5 II A 2). Odminną strategię zastosowałam przy **modyfikacji genetycznej *C. freundii* AD970, gdzie celem usprawnienia procesu syntezy 1,3-propanodiolu nadekspresowano gen kodujący dehydrogenazę 1,3-propanodiolu**, finalną aktywność w szlaku redukcyjnym katabolizmu glicerolu. Nadekspresja enzymów katalizujących terminalne reakcje w danym szlaku metabolicznym, stanowi jedną ze strategii inżynierii metabolicznej mającej na celu przekierowanie strumienia węgla z centralnego szlaku katabolizmu w pożądanym kierunku. W odniesieniu do syntezy 1,3-propanodiolu, taki zabieg jest szczególnie uzasadniony ze względu na silną toksyczność bezpośredniego prekursora 1,3-propanodiolu, aldehydu 3-hydroksypropionowego względem komórek producenta. Zwiększona aktywność dehydrogenazy 1,3-propanodiolu wiązałaby się jednocześnie z szybszą konsumpcją toksycznego intermediatu. W efekcie przeprowadzonych zabiegów, uzyskano zwiększoną ekspresję docelowego genu a w konsekwencji – wyższą aktywność kodowanego enzymu. Porównawcze testy hodowlane pokazały, że szczep modyfikowany produkował większe ilości 1,3-propanodiolu, przy jednoczesnym braku akumulacji aldehydu 3-hydroksypropionowego, która była obserwowana dla szczepu wyjściowego w zadanych warunkach hodowlanych. Wprowadzona modyfikacja genetyczna przyczyniła się także do zmian w profilu produkowanych metabolitów (Zał. 5 II A 4, Zał. 5 II K 4).

Co szczególnie interesujące, w ramach prac prowadzonych w projekcie *ZIELONA CHEMIA* nieoczekiwanie **odkryto zdolność drożdży *Y. lipolytica* do znacznej produkcji 2-fenyletanolu (2-FE)** (Zał. 5 II A 7, Zał. 5 II A 3, Zał. 5 II K 1, Zał. 5 III B 1, Zał. 5 III B 3, Zał. 5 III B 7, Zał. 5 III B 8). 2-FE jest wysoce wartościowym związkiem chemicznym **o przyjemnym różanym zapachu**, szeroko stosowanym w aromatyzacji różnego typu kosmetyków, środków chemii gospodarczej, czy nawet niektórych produktów spożywczych. Tradycyjnie naturalny 2-FE jest pozyskiwany z kwiatów roślin ozdobnych, choć większość 2-FE dostępnego na rynku to syntetyczny produkt otrzymywany na drodze procesów syntezy chemicznej. Cena naturalnego 2-FE jest kilkaset razy wyższa niż jego syntetycznego odpowiednika (US\$ 3.5 vs US\$ 1000), a metody otrzymywania naturalnego 2-FE na drodze ekstrakcji z materiału roślinnego są mało efektywne. Stąd opracowanie wydajnego procesu produkcji naturalnego 2-FE metodami biotechnologicznymi wydaje się być szczególnie atrakcyjne. Próby **intensyfikacji procesu produkcji 2-FE w hodowlach rekombinowanego szczepu *Y. lipolytica* NCYC3825 pozwoliły uzyskać jedno z najwyższych stężeń 2-FE uzyskiwanych w hodowlach mikroorganizmów (> 2 g/L)** (Zał. 5 II A 7). Podjęłam także prace mające na celu dokonanie **charakterystyki molekularnych podstaw**

syntezy 2-FE w komórkach *Y. lipolytica*. W tym celu zastosowałam podejście z zakresu „wstecznej” / „odwróconej” inżynierii metabolicznej (ang. **reverse metabolic engineering**), gdzie o zaangażowaniu białka w syntezę 2-FE wnioskowano na podstawie jego nadreprezentacji (bądź obecności) w profilu białkowym, w warunkach indukcji syntezy 2-FE. W wyniku przeprowadzonych prac zidentyfikowano białka potencjalnie zaangażowane w syntezę 2-FE w komórkach *Y. lipolytica* (Zał. 5 II A 3), a ich rzeczywista rola w tym procesie jest aktualnie weryfikowana z wykorzystaniem narzędzi biologii syntetycznej we współpracy z naukowcami z ośrodka INRA-AgroParisTech (Grignon/Jouy-en-Josas, Francja). Nieoczekiwanie w trakcie tej analizy dokonano także obserwacji dotyczącej molekularnych podstaw przejścia pomiędzy stanami morfologicznymi komórek *Y. lipolytica* (komórkowe – filamentowe) w zależności od charakteru podanego źródła azotu.

Obserwacja dotycząca znacznej produkcji wartościowej substancji zapachowej w hodowlach *Y. lipolytica* przyczyniła się do **podjęcia nowej tematyki badawczej**, kontynuowanej po zakończeniu projektu *ZIELONA CHEMIA*. Celem tego obszaru badań jest **wykorzystanie różnych gatunków drożdży niekonwencjonalnych do produkcji wartościowych związków zapachowych**, w szczególności pochodnych aminokwasów. Do niedawna trwały prace nad utworzeniem biblioteki ponad 70 izolatów drożdży niekonwencjonalnych (w tym *Pichia*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Wickerhamomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*) zidentyfikowanych poprzez sekwencjonowanie rejonu DNA genomowego, o wstępnie potwierdzonej zdolności do produkcji wartościowych związków zapachowych. Zadania te były prowadzone w ramach prac projektów magisterskich wykonanych pod moim kierunkiem. Część badań została wykonana i jest aktualnie realizowana we współpracy z Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii w Poznaniu (Zał. 5 II K 1) oraz z Politechniką Łódzką.

W ramach projektu *ZIELONA CHEMIA* realizowałam także inne poboczne zadania, które były prezentowane w trakcie konferencji naukowych (Zał. 5 II K 5, Zał. 5 II K 6, Zał. 5 III B 4, Zał. 5 III B 5, Zał. 5 III B 9, Zał. 5 III B 12). Moja aktywność naukowa w tym obszarze została zauważona na forum naukowców zajmujących się tematyką zielonej chemii - byłam **wielokrotnie proszona o wykonanie recenzji artykułów naukowych z tej dziedziny** (Zał. 5 III P), oraz **zaproszono mnie do napisania artykułu komentującego postęp badań w tym zakresie dla renomowanego czasopisma naukowego** (Zał. 5 II A 5).

Już w trakcie trwania projektu *ZIELONA CHEMIA*, a w szczególności po jego zakończeniu, moje zainteresowania naukowe skupiłam wokół zagadnień związanych z **nadprodukcją białek heterologicznych w rekombinowanych komórkach *Y. lipolytica***. Zasadnicza część prac będących efektem działań w tym zakresie stanowi główne osiągnięcie naukowe, wskazane w pkt. 4 niniejszego autoreferatu (Zał. 5 I B 1, Zał. 5 I B 2, Zał. 5 I B 3, Zał. 5 I B 4, oraz Zał. 5 II I 1, Zał. 5 II I 2, Zał. 5 II I 3, Zał. 5 II K 2, Zał. 5 III B 2). W efekcie mojej aktywności publikacyjnej i popularyzatorskiej w tym zakresie

nawiązałam kontakt z naukowcami z czołowych ośrodków naukowych w obszarze badań nad *Y. lipolytica*. W konsekwencji **zaproszono mnie do przygotowania projektu badawczego złożonego w ramach konkursu Horizon2020** (konkurs H2020-NMBP-2016-2017) wraz z naukowcami oraz przedstawicielami przemysłu z Grecji (lider), Francji, Polski, Niemiec, Danii i Wielkiej Brytanii. Ponadto, **nawiązałam kontakt z naukowcami z kluczowego europejskiego ośrodka zajmującego się badaniami nad *Y. lipolytica* - INRA–AgroParisTech**: Institut National de la Recherche Agronomique (Grignon/Jouy-en-Josas, Francja). W rezultacie bliskości podejmowanej aktualnie tematyki badawczej oraz wspólnych celów naukowych, zdecydowałam się wnioskować o odbycie stażu naukowego w tej jednostce, w zespole Prof. Jean-Marc'a Nicaud (BimLip-Biologie Intégrative du Métabolisme Lipidique Microbien). Finansowanie pobytu uzyskałam na drodze konkursowej z **EMBO** (European Molecular Biology Organization, Heidelberg, Niemcy; Zał. 5 III L 1). W ramach wnioskowania o finansowanie stażu przedłożyłam wniosek konkursowy przedstawiający projekt prac do zrealizowania w ośrodku goszczącym, który został pozytywnie oceniony przez zewnętrznych recenzentów. Zaproponowana tematyka badawcza zasadzała się w obszarze aktualnie silnie rozwijającej się dziedziny biologii syntetycznej mającej służyć potrzebom inżynierii metabolicznej. W ramach stażu miałam okazję pracować w czołowym europejskim zespole w zakresie inżynierii genetycznej, inżynierii metabolicznej, biologii syntetycznej oraz innych obszarów badań z wykorzystaniem drożdży *Y. lipolytica*. Zasadniczym celem prac zrealizowanych w trakcie stażu było **skonstruowanie systemu modułów do wykorzystania w technologii klonowania modularnego GoldenGate, dostosowanych do komórek *Y. lipolytica***. Utworzono kolekcję modułów (amplikonów w wektorach donorowych) zawierających szereg elementów regulatorowych, genów (reporterowych, bądź zaangażowanych w przekształcenia metaboliczne), genów kodujących markery selekcyjne, oraz sekwencji ukierunkowujących miejsce zajścia rekombinacji homologicznej w genomie *Y. lipolytica*. Wygenerowany zestaw modułów umożliwia efektywne składanie obszernych kaset ekspresyjnych zgodnie ze strategią GoldenGate. Jako ilustrację funkcjonalności wytworzonego systemu modułów oraz dostosowania technologii GoldenGate do komórek *Y. lipolytica* złożono obszerną konstrukcję genową, zawierającą trzy kasety ekspresyjne (promotor-gen-terminator) i gen markerowy, oflankowane sekwencjami ukierunkowującymi miejsce zajścia rekombinacji homologicznej. Łącznie konstrukcja obejmowała 12 elementów oraz wektor docelowy, co stanowi jeden z najbardziej skomplikowanych, dotychczas opisanych wektorów złożonych tą metodą. Geny ujęte w kasetach ekspresyjnych kodowały aktywności enzymatyczne zaangażowane w syntezę karotenoidów, stąd selekcja pozytywnych klonów była znacznie ułatwiona – na podstawie intensywności zabarwienia kolonii. Część wykonanych prac została już opracowana i opublikowana w renomowanym czasopiśmie naukowym (Zał. 5 II A 1). Dalsze wspólne prace są aktualnie kontynuowane zarówno przez moich kolegów w ośrodku goszczącym, jak i przeze mnie w jednostce macierzystej.

W bezpośrednim związku z zajmowanym przez mnie stanowiskiem w jednostce macierzystej, istotnym obszarem mojej działalności naukowej pozostaje **aktywność dydaktyczna** (Zał. 5 III I). Uczestniczę w realizacji przedmiotów z zakresu Mikrobiologii, Podstaw Mikrobiologii oraz Mikrobiologii Żywności dla studentów różnych kierunków I stopnia. Prowadzę zajęcia z zakresu Bezpieczeństwa i Higieny w Produkcji Żywności, a także wybrane zagadnienia z zakresu Biotechnologii Żywności, Mikrobiologicznych Metod Przetwórstwa Żywności, czy Nowoczesnych Techniek w Diagnostyce Mikrobiologicznej, gdzie jestem autorem materiałów dydaktycznych. Prowadzę wykłady w języku polskim z zakresu Biotechnologicznej produkcji białek oraz Biotechnologicznej produkcji substancji zapachowych. Poza zajęciami w języku polskim prowadzę także zajęcia w języku angielskim: Konwersatorium z języka specjalistycznego, wykłady z zakresu Inżynierii Metabolicznej w Produkcji Biochemikaliów, oraz ćwiczenia z zakresu mikrobiologii i mikrobiologii żywności. Jestem także współautorem materiałów dydaktycznych i współprowadzącym intensywnego kursu z zakresu Technologii Bioprosesowej dla studentów zagranicznych, uczestniczących w programie Socrates-Erasmus. W trakcie mojej pracy w jednostce macierzystej, pełniłam funkcję opiekuna praktyk (dla 4 studentów UPP, w tym 1 z zagranicy), opiekuna pomocniczego prac magisterskich (dla 5 studentów UPP), a także promotora prac dyplomowych (dla 4 studentów UPP, oraz 2 studentów z UAM) (Zał. 5 III J).

Obecnie coraz większą część moich aktywności zawodowych zajmuje **działalność organizatorska** (Zał. 5 III N, Zał. 5 III Q). W poprzedniej kadencji pełniłam funkcję Elektora w Uczelnianym Kolegium Elektorów z ramienia macierzystego Wydziału. Obecnie jestem członkiem Rady Naukowej Katedry Biotechnologii Mikrobiologii Żywności, oraz Wydziałowej Komisji ds. Studiów. W bezpośrednim nawiązaniu do moich szczegółowych kompetencji, obecnie jestem członkiem Rektorskiej Komisji ds. GMO, oraz pełnię funkcję Kierownika Zakładu Inżynierii Genetycznej, działającego na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu, UPP. W macierzystej Jednostce zajmuję się koordynacją prac związanych z zamkniętym użyciem GMM, w tym przygotowywaniem wniosków (obecnie zgłoszeń) kierowanych do Ministerstwa Środowiska o wydanie zgody (obecnie rejestrację) na zamknięte użycie GMM.

Podsumowując swój dotychczasowy dorobek naukowy, byłam bądź nadal jestem **autorem, kierownikiem i głównym wykonawcą trzech projektów badawczych** (MNIŚW, NCN). Uczestniczyłam jako **wykonawca** w realizacji **wysokobudżetowych projektów międzynarodowych** (FP6, ERA-IB), **zagranicznych** (Ministère del'Agriculture; Universite Paris7) i **krajowych** (PBS, POIG). Jestem **autorem** łącznie **19 publikacji** naukowych (**18 indeksowanych w bazie JCR**), w tym **pomysłodawcą, twórcą koncepcji pracy** i ewentualnego przebiegu eksperymentów, **głównym wykonawcą oraz redaktorem manuskryptów w 14 pracach**. Odbyłam **dwa zagraniczne staże naukowe w czołowych ośrodkach badawczych, każdorazowo** skutkujących **publikacją** uzyskanych przeze mnie wyników (jako współautor lub pierwszy autor) w renomowanych czasopismach naukowych. **Wszystkie moje publikacje**, w których jestem pierwszym autorem, za wyjątkiem jednej, zostały **opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych** znajdujących się **w pierwszym kwartylu (Q1)** w międzynarodowej klasyfikacji czasopism w danej dziedzinie. Jestem **stypendystą międzynarodowego programu EMBO** (European Molecular Biology Organization), **uczestnikiem programu COST** (European Cooperation in Science and Technology) oraz **laureatem nagrody Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** za osiągnięcia naukowe. **Nawiązałam współpracę z czołowymi ośrodkami naukowymi w Europie**, skutkującą **wspólną realizacją zadań** badawczych, czy **współpracą przy przygotowaniu projektu** badawczego złożonego w ramach programu **Horizon2020**, gdzie zaproponowano mi funkcję **lidera zadań** realizowanych na UPP. Jestem **inicjatorem nowych koncepcji badawczych realizowanych w jednostce macierzystej**, w tym także **we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi w Polsce**. Regularnie pełnię funkcję **recenzenta dla renomowanych czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym**. **Wypromowałam sześciu dyplomantów** zarówno w jednostce macierzystej (UPP), jak i zewnętrznej (UAM). Pełnię funkcję **kierownika Zakładu Inżynierii Genetycznej** przy Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu (UPP) i koordynuję prace związane z zamkniętym użyciem GMM w tej jednostce. Syntetyczne zestawienie mojego dorobku naukowego zawiera Tabela 1.

Tabela 1. ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO HABILITANTA na 30-01-2017

Rodzaj aktywności	Przed doktoratem	Po doktoracie	łącznie
Prace oryginalne w czasopismach uwzględnionych w bazie JCR:	2	11	13
w tym jako pierwszy autor:	0	10	10
Prace przeglądowe w czasopismach uwzględnionych w bazie JCR:	4	1	5
w tym jako pierwszy autor:	3	1	4
Prace nie uwzględnione w bazie JCR:	1	0	1
Łączna liczba publikacji:	19		
w tym jako pierwszy autor, twórca koncepcji i główny wykonawca pracy:	14		
Referaty wygłoszone na konferencjach:	2	4	6
Komunikaty posterowe przedstawione na konferencjach:	3	8	11
Projekty (kierownik):	0	3	3
Projekty (wykonawca):	2	2*	4
Recenzje publikacji:	3	20	23
Wypromowani dyplomanci:	0	6	6
Sumaryczny IF habilitanta wg JCR:	30.348	37.17	67.518
Sumaryczna punktacja MNiSW ₂₀₁₆	240	375	615
Indeks Hirsh'a wg WoS:	8		
Łączna liczba cytowań wg WoS:	413		

* realizację projektów rozpoczęto przed uzyskaniem stopnia doktora, ale zasadnicze prace wykonano po uzyskaniu stopnia doktora

Ewelina Celińska