

ZAŁĄCZNIK 2

Dr inż. Kamila Goderska
Zakład Fermentacji i Biosyntezy
Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

AUTOREFERAT
*PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS OSIĄGNIĘĆ I DOROBKU NAUKOWO-
BADAWCZEGO*

Poznań 2017

1. Imię i nazwisko: Kamila Goderska

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- magister inżynier technologii żywności, specjalizacja: technologia żywności, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, 8 czerwiec 2000 rok
 - tytuł pracy magisterskiej: „Możliwości wzbogacania kiszonych produktów roślinnych w bakterie probiotyczne”
 - promotor: dr inż. Maria Czarnecka
- doktor nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, specjalność: technologia żywności, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, 20 styczeń 2005 rok
 - tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka środowiskowa i próby stabilizacji bakterii potencjalnie probiotycznych”
 - promotor: prof. dr hab. Zbigniew Czarnecki

3. Przebieg pracy zawodowej:

- od 01.10.2005 do 30.09.2006
 - asystent w Zakładzie Fermentacji i Biosyntezy, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (do 2007 roku Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu)
- od 01.10.2006 do chwili obecnej:
 - adiunkt w Zakładzie Fermentacji i Biosyntezy, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (do 2007 roku Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu)

4. Działalność naukowo-badawcza

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

Moim osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest monografia pod tytułem:

„Badanie wybranych aktywności biologicznych kwasu laktobionowego i jego biosynteza w podłożu zawierającym serwatkę”

Wkład wnioskodawcy w w/w monografię obejmuje: autorstwo hipotez i koncepcji badań, wykonanie doświadczeń i oznaczeń, analizę i opracowanie wyników oraz napisanie i redakcję manuskryptu.

4.2. Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników wskazanego osiągnięcia

4.2.1. Wprowadzenie

Kwas laktobionowy jest to polihydrokys kwas (PHA) zbudowany z cząsteczki galaktozy (chemicznie obojętnego cukru) i cząsteczki kwasu glukonowego (występującego naturalnie w skórze i zdolnego do zatrzymywania znacznych ilości wody), zawierający liczne grupy hydroksylowe. Jego nazwa systematyczna to 4-O- β -D galaktopyranozylo-D-kwas glukonowy. Jest słabym kwasem o masie cząsteczkowej 358,3 Da i charakteryzuje się słodkim smakiem, a jego wartość energetyczna wynosi 2 [kcal/g]. Kwas laktobionowy należy do substancji o mało poznanej strukturze i niewielkim zastosowaniu ze względu na koszty jego otrzymywania. Dlatego też pozyskiwanie tego kwasu na drodze mikrobiologicznej z uzyskaniem jak największej wydajności w procesie bez stosowania oczyszczania enzymów wydaje się być ciekawą alternatywą i nowoczesną drogą jego otrzymywania z wykorzystaniem wiedzy i ukierunkowanych procesów nowoczesnej biotechnologii. Pierwsze badania dotyczące otrzymywania kwasu laktobionowego przeprowadzono z wykorzystaniem szczepów *Zymomonas mobilis* oraz otrzymanych na drodze inżynierii genetycznej szczepów *Escherichia coli*. Uzyskane wyniki ujęto w formie publikacji: Goderska K., Juzwa W., Szewngiel A., Czarnecki Z. Lactobionic acid production by glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 2015; 37(10): 2047-2053. Ze względu na nieliczne doniesienia dotyczące uzyskania kwasu laktobionowego z użyciem *Pseudomonas taetrolens* podjęto próbę fermentacji serwatki wykorzystując szczep z tego gatunku mikroorganizmów. Wyniki opracowano w formie publikacji: Goderska K., Szewngiel A., Czarnecki Z. The utilization of *Pseudomonas taetrolens* to produce lactobionic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2014; 173, 2189-2197.

4.2.2. Cel badań i hipoteza badawcza

Celem pracy było wskazanie nowych kierunków wykorzystania kwasu laktobionowego oraz zależności między warunkami środowiska a skutecznością otrzymywania kwasu laktobionowego na drodze mikrobiologicznej z wykorzystaniem bakterii *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104, co może przyczynić się do przedstawienia rozwiązań o charakterze aplikacyjnym. Ze względu na niewielką liczbę publikacji w tym temacie badania wpisują się w zakres prac nad otrzymywaniem kwasu laktobionowego z jak największą wydajnością, a wykazanie nowych kierunków jego wykorzystania stanowi dodatkową wartość poznawczą. W związku z powyższym, postawiono następujące **hipotezy badawcze**:

- (1) Kwas laktobionowy posiada właściwości prebiotyczne,
- (2) Kwas laktobionowy wykazuje właściwości przeciwutleniające,
- (3) Zastosowanie kontrolowanych warunków środowiska oraz immobilizacja mikroorganizmów mogą podczas hodowli bakterii *Pseudomonas taetrolens* intensyfikować otrzymywanie kwasu laktobionowego w podłożu zawierającym serwatkę.

Weryfikacja poszczególnych hipotez obejmowała:

Ad. (1)

Charakterystykę kwasu laktobionowego jako potencjalnie funkcjonalnego dodatku - właściwości prebiotyczne kwasu laktobionowego względem szczepów bakterii probiotycznych oraz bakterii potencjalnie probiotycznych,

Ad. (2)

Określenie zdolności kwasu laktobionowego do zahamowania procesów utlenienia wykorzystując olej rzepakowy,

Ad. (3)

Badanie wpływu metod hodowli bakterii *Pseudomonas taetrolens* oraz parametrów takich jak pH czy forma mikroorganizmów na efektywność otrzymywania kwasu laktobionowego. Określano stopień konwersji laktozy zawartej w serwatce do kwasu laktobionowego, wykorzystanie laktozy w procesach okresowych i okresowo-dolewowych.

Opracowanie i doskonalenie metody otrzymywania kwasu laktobionowego z serwatki z wykorzystaniem bakterii z gatunku *P. taetrolens*, wydaje się być interesujące zarówno z punktu widzenia lepszego jej zagospodarowania, jak i produkcji tego kwasu na drodze biotechnologicznej. W ten sposób otrzymany LBA charakteryzuje się takimi funkcjami biologicznymi, na które jest dzisiaj bardzo duże zapotrzebowanie w technologii żywności i w żywieniu człowieka.

4.2.3. Wyniki

Ad. (1)

Charakterystyka kwasu laktobionowego jako potencjalnie funkcjonalnego dodatku - właściwości prebiotyczne

Materiał i metodyka: Szczepy bakteryjne o właściwościach probiotycznych lub potencjalnie probiotycznych wobec których testowano właściwości prebiotyczne kwasu laktobionowego: *Lactococcus lactis* ATCC1 (Zakład Fermentacji i Biosyntezy, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), *Lactobacillus acidophilus* DSM 20242 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), *Lactobacillus fermentum* (Zakład Fermentacji i Biosyntezy, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), *Lactobacillus acidophilus* CH-5 (Politechnika Łódzka), *Lactobacillus acidophilus* L-AH1 (Politechnika Łódzka), *Lactobacillus acidophilus* NDCO (Politechnika Łódzka), *Lactobacillus delbrueckii* A (Zakład Fermentacji i Biosyntezy, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), *Lactobacillus casei* (Zakład Fermentacji i Biosyntezy, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), *Lactobacillus casei* Shirota (Zakład Fermentacji i Biosyntezy, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), *Bifidobacterium bifidum* DSM 20239 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), *Bifidobacterium bifidum* DSM 20215 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Przed przystąpieniem do badań stosowane szczepy bakterii probiotycznych hodowano w bulionie MRS w temp. 37°C przez 48 godz. Następnie z hodowli bakterii pobierano próbki o objętości 5 cm³, aby rozcieńczyć je w soli fizjologicznej. Wybrane szczepy w ilości 20 µl, pożywkę w ilości 150 µl oraz 30 µl kwas laktobionowego o różnym stężeniu nanoszono na płytkę titracyjną. Podczas badania wpływu kwasu laktobionowego na wzrost wybranych szczepów bakterii probiotycznych wykorzystywano automatyczny analizator wzrostu (Microplate Reader model ELx808; Dialab, Austria). Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach dla każdego stężenia kwasu laktobionowego. W trakcie przeprowadzonej analizy statystycznej wykorzystano program Excel 2010 oraz Curve Expert Professional 2.2.0 w celu wybrania modelu matematycznego dla eksperymentów badawczych. Modele matematyczne krzywych Gomperta dopasowano do krzywych wzrostu bakterii probiotycznych w podłożu z dodatkiem 0,1% w/v (1 mg/cm³); 0,2% w/v (2 mg/cm³); 0,5% w/v (5 mg/cm³); 0,8% w/v (8 mg/cm³); 1,0% w/v (10 mg/cm³); 1,2% w/v (12 mg/cm³); 1,4% w/v (14 mg/cm³); 1,6% w/v (16 mg/cm³); 1,8% w/v (18 mg/cm³); 2,0% w/v (20 mg/cm³) kwasu laktobionowego.

Wyniki: Analizując przebiegi krzywych wzrostu testowanych mikroorganizmów w podłożu z różnym dodatkiem kwasu laktobionowego można doszukać się podobieństwa dla *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20242, *Lactobacillus acidophilus* L-AH1, *Lactobacillus acidophilus* NDCO, *Lactobacillus delbrueckii* A, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*

casei Shiota, *Bifidobacterium bifidum* DSM 20215, *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 gdzie wyróżniamy krótką fazę wzrostu logarytmicznego w porównaniu do wzrostu *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus acidophilus* CH-5 gdzie faza wzrostu logarytmicznego jest wydłużona. Osobną grupę stanowi *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 i *Bifidobacterium bifidum* DSM 20239, dla których wydłużenie fazy wzrostu logarytmicznego obserwowane jest z dodatkiem 0,5% w/v (5 mg/cm³); 1,0% w/v (10 mg/cm³) i 1,2% w/v (12 mg/cm³) kwasu laktobionowego w przypadku szczepu 1 oraz 1,0% w/v (10 mg/cm³) i 1,4% w/v (14 mg/cm³) kwasu laktobionowego dla szczepu 2. W pożywkach z innymi testowanymi stężeniami kwasu laktobionowego faza wzrostu logarytmicznego jest znacznie krótsza.

Przeprowadzone badania potwierdzają, że kwas laktobionowy posiada zdolność do stymulowania wzrostu bakterii probiotycznych i mógłby zyskać miano substancji prebiotycznej. Zróżnicowany dodatek ilościowy kwasu laktobionowego ma zasadniczy wpływ na dynamikę wzrostu testowanych bakterii probiotycznych a wzrost w pożywce z jego udziałem jest cechą zależną od szczepu mikroorganizmów. Perspektywy wykorzystania kwasu laktobionowego w charakterze prebiotyku wydają się więc obiecujące.

Szczep *Lactococcus lactis* pod wpływem dodatku kwasu laktobionowego, wykazuje niewielki przyrost biomasy, w porównaniu ze wzrostem tego szczepu bez udziału kwasu. Podłoże z dodatkiem 1,2% w/v (12 mg/cm³) LBA (kwas laktobionowy) wykazuje największą gęstość optyczną tej hodowli, a pozostałe - prawie równe lub mniejsze niż próba zerowa.

Dodatek kwasu laktobionowego stymuluje wzrost szczepu *Lactobacillus acidophilus* DSM 20242. Podkreśla to przyrost biomasy każdej hodowli, ze zróżnicowanym udziałem kwasu. Odnośnikiem porównania jest próba zerowa. Największą gęstość optyczną wykazuje *Lactobacillus acidophilus* DSM 20242 z dodatkiem 1,2% w/v (12 mg/cm³) kwasu.

Dodatek kwasu laktobionowego stymuluje wzrost hodowli *Lactobacillus fermentum*. Wskazują na to zmiany gęstości optycznej pożywki, w której prowadzono hodowle, w porównaniu z próbą zerową. Największy - a zarazem najpóźniejszy - przyrost biomasy po 72 godzinach, wykazuje *Lactobacillus fermentum* z dodatkiem 1,6% w/v (16 mg/cm³) LBA. Szczep na pożywce z najmniejszym dodatkiem LBA, uzyskuje najniższy przyrost gęstości optycznej.

Szczep *Lactobacillus acidophilus* CH-5 pod wpływem dodatku kwasu laktobionowego wykazuje zwiększony przyrost biomasy. Podkreśla to krzywa wzrostu każdej hodowli z różnym jego udziałem. Dla porównania służy krzywa wzrostu próby zerowej. Gęstość optyczna hodowli *Lactobacillus acidophilus* CH-5, w największym stopniu jest stymulowana przez dodatek 0,8% w/v (8 mg/cm³) LBA. Dodatkowo w ciągu 72 godzin szczep ten osiąga maksymalny przyrost najpóźniej.

Dodatek kwasu laktobionowego stymuluje w niewielkim stopniu wzrost hodowli *Lactobacillus acidophilus* L-AH1. Wskazują na to zmiany gęstości optycznej pożywek, w których prowadzono hodowle. Porównaniem jest próba bez udziału kwasu. Wyjątek stanowi *Lactobacillus acidophilus* L-AH1 z dodatkiem 1,2% w/v (12 mg/cm³) LBA, który wykazuje

największy - a zarazem najpóźniejszy - przyrost biomasy. Natomiast krzywe wzrostu w pozostałych pożywkach, są prawie równe lub mniejsze niż krzywą próby zerowej.

Szczep *Lactobacillus acidophilus* NDCO pod wpływem dodatku kwasu laktobionowego wykazuje zwiększony przyrost biomasy. Podkreśla to krzywa wzrostu każdej hodowli z różnym jego udziałem w porównaniu z próbą zerową. Gęstość optyczna hodowli *Lactobacillus acidophilus* NDCO, w największym stopniu (a zarazem najpóźniej) jest stymulowana przez dodatek 1,2% w/v (12 mg/cm³) LBA, a w najmniejszym z jego 0,8% w/v (8 mg/cm³) udziałem.

Szczep *Lactobacillus delbrueckii* A pod wpływem dodatku kwasu laktobionowego wykazuje przyrost biomasy. Dowodem na to są zmiany gęstości optycznej pożywek, w których prowadzono hodowle. Najlepszą krzywą wzrostu, a zarazem najwyższą gęstość optyczną osiąganą najpóźniej, wykazuje *Lactobacillus delbrueckii* A z dodatkiem 0,2% w/v (2 mg/cm³) LBA. Na pożywkach z największymi dodatkami LBA, szczep uzyskuje najniższą krzywą wzrostu. Może to oznaczać, że małe udziały kwasu laktobionowego to korzystniejsze warunki dla wzrostu tego szczepu.

Dodatek kwasu laktobionowego stymuluje wzrost hodowli *Lactobacillus casei*. Podkreśla to krzywa wzrostu każdej hodowli z różnym jego udziałem. Największy przyrost biomasy po 72 godzinach, wykazuje *Lactobacillus casei* w pożywce z dodatkiem 0,5% w/v (5 mg/cm³) kwasu, natomiast szczep w podłożu z najmniejszym jego udziałem, maksymalną aktywność uzyskuje najpóźniej.

Szczep *Lactobacillus casei* Shirota pod wpływem dodatku kwasu laktobionowego wykazuje przyrost biomasy. Dowodem na to są zmiany gęstości optycznej płynów hodowli. Największą gęstość optyczną hodowli, wykazuje *Lactobacillus casei* Shirota z dodatkiem 0,1% w/v kwasu, a najmniejszą z dodatkiem 1,4% w/v (14 mg/cm³). Szczepy z największymi dodatkami LBA, uzyskują najniższą krzywą wzrostu. Może to oznaczać, że małe ilości kwasu laktobionowego to korzystniejsze warunki dla wzrostu tego szczepu.

Dodatek kwasu laktobionowego stymuluje wzrost hodowli *Bifidobacterium bifidum* DSM 20239. Dowodem na to są zmiany gęstości optycznej płynów hodowli. Największy przyrost biomasy po 72 godzinach, wykazuje *Bifidobacterium bifidum* DSM 20239 z dodatkiem 1,4% w/v (14 mg/cm³) LBA. Maksymalny przyrost gęstości optycznej hodowli osiągniany jest najpóźniej zarówno dla pożywki z dodatkiem 1,4% w/v (14 mg/cm³) LBA, jaki i 1,0% w/v (10 mg/cm³) LBA.

Dodatek kwasu laktobionowego stymuluje wzrost hodowli *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456. Wskazują na to zmiany gęstości optycznej płynów hodowli. Największy przyrost biomasy wykazuje *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 z dodatkiem 0,1% w/v (1 mg/cm³) LBA, a najmniejszy z dodatkiem 0,2% w/v (2 mg/cm³).

Szczep *Bifidobacterium bifidum* DSM 20215 pod wpływem dodatku kwasu laktobionowego wykazuje przyrost biomasy. Dowodem na to są zmiany gęstości optycznej płynów hodowli. Najwyższą krzywą wzrostu, wykazuje *Bifidobacterium bifidum* DSM 20215 w pożywce z dodatkiem 1,0% w/v (10 mg/cm³) kwasu, a najniższą z dodatkiem 2,0% w/v (20 mg/cm³).

Szczep *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 pod wpływem dodatku kwasu laktobionowego wykazuje zwiększony przyrost biomasy. Podkreśla to krzywa wzrostu każdej hodowli z różnym jego udziałem. Największą gęstość optyczną hodowli po 72 godzinach, jak również najpóźniej uzyskuje *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 z dodatkiem 0,5% w/v (5 mg/cm³) kwasu, najmniejszą szczep w pożywce z udziałem 1,6% w/v kwasu laktobionowego.

Przedstawione rezultaty badań potwierdzają, że właściwości prebiotyczne są szczepozależne co oznacza, że racjonalne wykorzystanie jest możliwe tylko przy znajomości działania konkretnego szczepu probiotycznego. Wszystko zależy od dawki, rodzaju prebiotyku oraz gatunku mikroorganizmów, dlatego każdy szczep należy traktować indywidualnie. Odpowiednie dobranie takiego prebiotyku, który w jak największym stopniu stymuluje wzrost bakterii probiotycznej daje podstawę wykorzystanie takiej kombinacji do stworzenia synbiotyku.

Ad. (2)

Ocena wpływu kwasu laktobionowego na zahamowanie procesu utleniania oleju rzepakowego

Materiał i metodyka: Przed rozpoczęciem badań, do każdej próbki z olejem rzepakowym (Kujawski ZT „Kruszwica” S.A.) w ilości 25 ml, dodawano rozpuszczony w glicerolu kwas laktobionowy (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA). Roztwór ten dodawano z różnym jego udziałem procentowym do 4 próbek. W kolejnych 3 próbkach użyto preparat kwasu laktobionowego (preparat 1- hodowla 3 – 96 godzina, preparat 2 – hodowla 4 – 96 godzina, preparat 3- hodowla 7 – 24 godzina) w ilości 1 cm³. Następnie próbki inkubowano w temperaturze 60°C, zgodnie z testem termostatowym (test Schaala). Odpowiednio po 1., 3., 5. i 10. dniu oznaczono w nich liczbę nadtlenu. Wykonanie oznaczenia przeprowadzono zgodnie z Polską Normą (PN-EN ISO 3960:2012). Liczba nadtlenu jest to ilość milimoli aktywnego tlenu zawarta w 1,0 g oleju. Wyrażana jest liczbą Lea. Liczba Lea określana jest przez ilość cm³ mianowanego roztworu tiosiarczanu sodu (0,002 mol/dm³), użytą do miareczkowania jodu wydzielonego z jodku potasu w wyniku działania nadtlenu zawartych w 1,0 g tłuszczu. Do analizy statystycznej użyto program Excel 2010.

Wyniki: Dodatek kwasu laktobionowego wpływa na zahamowanie procesów utleniania w oleju rzepakowym. Dowodem tego jest zmniejszenie liczby nadtlenu w próbkach tego oleju z udziałem kwasu, w porównaniu z próbką bez jego dodatku (próbka zerowa). Im wyższe stężenie kwasu laktobionowego, tym lepsze jego efekty w obniżeniu stopnia utlenienia. próbki oleju z dodatkiem 1 cm³ preparatu własnego kwasu laktobionowego (preparat 1- hodowla 3 – 96 godzina, preparat 2 – hodowla 4 – 96 godzina, preparat 3- hodowla 7 – 24 godzina), wykazują mniejszą skuteczność w ograniczaniu liczby

nadtlenkowej, niż próbki z różnym udziałem standardu kwasu. W czasie przetrzymywania oleju rzepakowego w temperaturze 60°C liczba Lea ulega wzrostowi i po 10-ciu dniach jej wartość wynosiła 8,35. Dodatek kwasu laktobionowego o stężeniu 1 mg/cm³ (0,1% w/v) obniżył wartość liczby Lea w czasie przetrzymywania oleju rzepakowego w temperaturze 60°C, która w 10-tym dniu przechowywania wynosiła 8,24. Zwiększenie procentowego udziału kwasu laktobionowego w oleju rzepakowym wpłynęło korzystnie na zahamowanie procesu utleniania, a liczba Lea w 10 dniu przetrzymywania oleju w temperaturze 60°C z dodatkiem 0,5 % w/v (5 mg/cm³) kwasu wynosiła 7,33. Najwyższy udział procentowy kwasu laktobionowego w ilości 1% w/v (10 mg/cm³) spowodował obniżenie liczby Lea w 10-tym dniu przechowywania do wartości równej 6,69. W wykonanych eksperymentach postanowiono również przetestować preparaty kwasu laktobionowego uzyskane na drodze syntez mikrobiologicznych zarówno w procesach podczas których zastosowano bakterie wolne *Pseudomonas taetrolens*, jak i kapsułkowane. Wszystkie otrzymane preparaty obniżały wartość liczby Lea w każdym dniu przetrzymywania oleju w temperaturze 60°C w porównaniu z próbką bez dodatku preparatu kwasu laktobionowego. W 10 dniu wartość liczby Lea wynosiła od 8,26 do 7,74.

Uzyskane i przedstawione powyżej wyniki zmian liczby nadtlenkowej w oleju rzepakowym z dodatkiem kwasu laktobionowego wnoszą ciekawe dane potwierdzające jego właściwości antyoksydacyjne i związek ten może być stosowany w przemyśle tłuszczowym celem zapobiegania procesowi utleniania tłuszczów. Test termostatowy prowadzony w temperaturze 60°C daje wyniki odpowiadające wartościom uzyskanym w warunkach przechowywania oleju kilka tygodni a nawet miesięcy. Testy przechowywania trwają zbyt długo dlatego też regularnie w przypadku tłuszczów stosuje się przyspieszone testy w podwyższonej temperaturze (Trojáková i in. 2001). Zmniejszenie liczby nadtlenkowej o 12,2% w przypadku dodatku 0,5% w/v (5 mg/cm³) kwasu laktobionowego do oleju oraz 19,9% w przypadku dodatku 1% w/v (10 mg/cm³) kwasu laktobionowego w 10 dniu testu Schaala wydają się być zadowalające, przyjmując jako odpowiednik kilku miesięczny okres przechowywania w warunkach normalnych. Najlepszy wynik dla pozyskanych w toku badań własnych preparatów kwasu laktobionowego uzyskano dla własnego preparatu nr 3 dodanego w ilości 1 cm³ (22,03 mg/cm³) i wynosił on 7,3% w 10 dniu termostatowania oleju rzepakowego.

Trojáková L., Réblová Z., Pokorný J. (2001): Determination of oxidative stability in mixtures of edible oil with nonlipidic substances. Czech J. Food Sci. 19: 19-23

Ad.(3)

Otrzymywanie kwasu laktobionowego na drodze mikrobiologicznej w bioreaktorze w użyciu *Pseudomonas taetrolens* w formie wolnej i kapsułkowanej

Materiał i metodyka: Procesu biokonwersji laktozy z serwatki do kwasu laktobionowego dokonywano w fermentorze BIOSTAT®B (B. Braun Biotech International, Niemcy) wyposażonym w zbiornik fermentora o objętości 2 dm³, płaszcz grzejny, mieszadło, elektrodę pH, termometr, filtr wlotowy powietrza, rotametr, elektrodę tlenową oraz pompki dozujące kwas i zasadę czy pożywkę. W wysterylizowanym bioreaktorze o pojemności 2 dm³ umieszczano 1 dm³ płynnej pożywki (serwatka) i sterylizowano. Następnie odwirowywano hodowlę bakterii *Pseudomonas taetrolens* (2x50 cm³) i zlewano supernatant. Do osadu dodawano sól fizjologiczną i roztworem z mikroorganizmami (inokulum) zaszczepiano pożywkę w bioreaktorze. Inkubację prowadzono w temperaturze 30°C, przy 120 obrotach mieszadła na minutę i ciągłym napowietrzaniu hodowli (0,5 dm³/min). W odstępach 24 h pobierano próbki (10 cm³). Do regulacji pH stosowano 1M HCl oraz 1M i 2M NaOH. Niezmiennie parametry, które przyjęto we wszystkich prowadzonych hodowlach to: temperatura - 30°C, napowietrzanie - 0,5 dm³/min, mieszanie - 120 obr./min. Do parametrów zmiennych w procesie otrzymywania kwasu laktobionowego należały: czas po jakim odbierano płyn hodowlany i dolewano sterylną serwatkę, forma mikroorganizmów – wolne i immobilizowane oraz pH środowiska.

Warianty prowadzonych hodowli:

- **hodowla 1 i 2:** bakterie wolne, płyn hodowlany (400 cm³) odbierano co 24 h i uzupełniano sterylną serwatką (500 cm³), nieregulowane pH;
- **hodowla 3 i 4:** bakterie wolne, płyn hodowlany (400 cm³) odbierano co 72 h i uzupełniano sterylną serwatką (500 cm³), nieregulowane pH ;
- **hodowla 5:** bakterie immobilizowane, płyn hodowlany (400 cm³) odbierano co 72 h i uzupełniano sterylną serwatką (500 cm³), nieregulowane pH;
- **hodowla 6:** bakterie wolne, płyn hodowlany (400 cm³) odbierano co 72 h i uzupełniano sterylną serwatką (500 cm³), stałe pH=6,25;
- **hodowla 7:** bakterie immobilizowane, płyn hodowlany (500 cm³) odbierano co 72 h i uzupełniano sterylną serwatką (500 cm³), stałe pH=6,25.

Oznaczania zmian zawartości laktozy i kwasu laktobionowego dokonywano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz z wykorzystaniem analizy LC-ESI-MS.

Wyniki: W pierwszym eksperymencie (hodowla nr 1) stosowano wolne (niekapsułkowane) bakterie *P. taetrolens*. Próbkę pobierano co 24 godziny, jednocześnie pobierając płyn hodowlany i uzupełniając go sterylną serwatką. Hodowlę prowadzono z wykorzystaniem mikroorganizmów wolnych przy ciągłym napowietrzaniu (0,5 dm³/min) i termostataowaniu (30°C), natomiast pH nie było regulowane. Najwyższe stężenie kwasu laktobionowego (24,75 mg/cm³) uzyskano w 48 godzinie hodowli. W kolejnych godzinach hodowli stężenie kwasu laktobionowego, będącego produktem biokonwersji laktozy, zmniejszało się do

wartości $3,89 \text{ mg/cm}^3$. W 264 godzinie hodowli zaobserwowano stopniowy wzrost stężenia kwasu laktobionowego, a w 312 godzinie hodowli wynosiło ono $8,53 \text{ mg/cm}^3$.

Drugą prowadzoną hodowlą było utlenianie laktozy z serwatki w bioreaktorze również przez bakterie wolne *Pseudomonas taetrolens*, która była powtórzeniem hodowli 1, zachowane były te same warunki. Stężenie kwasu laktobionowego stopniowo wzrastało do 120 godziny hodowli i wynosiło ono $18,79 \text{ mg/cm}^3$. Po tym czasie stężenie kwasu laktobionowego zmniejszało się, aż do 264 godziny, w której zaobserwowano wzrost stężenia kwasu i jego obniżanie się aż do ostatnich godzin hodowli. W hodowli 2 stężenie uzyskanego w procesie kwasu laktobionowego była niższa niż w hodowli 1, ale na podstawie uzyskanych wyników odbieranie pożywki z bioreaktora i dostarczanie nowej wydłużono w następnych eksperymentach do 72 godzin. W serwatce do 72 godziny hodowli obecna była jeszcze laktoza dlatego też dodatek nowej porcji serwatki zastosowano dopiero w tej godzinie.

Trzecią prowadzoną hodowlą było utlenianie laktozy z serwatki w bioreaktorze przez bakterie wolne *Pseudomonas taetrolens* z wydłużeniem czasu doływu świeżej serwatki. Hodowlę prowadzono z wykorzystaniem mikroorganizmów wolnych przy ciągłym napowietrzaniu ($0,5 \text{ dm}^3/\text{min}$), hodowlę termostatowano (30°C), nie prowadzono regulacji pH.

Najwyższe stężenie kwasu laktobionowego uzyskano w 96 godzinie hodowli i wynosiło ono $16,32 \text{ mg/cm}^3$. Płyn hodowlany pobierano w 120, 216 i 312 godzinie i uzupełniano sterylną serwatką. Po uzupełnianiu hodowli w świeże podłoże nieznacznie wzrastało stężenie kwasu laktobionowego odpowiednio do wartości $7,23 \text{ mg/cm}^3$; $2,22 \text{ mg/cm}^3$; $1,3 \text{ mg/cm}^3$.

Czwartą prowadzoną hodowlą było utlenianie laktozy z serwatki w bioreaktorze przez bakterie wolne *Pseudomonas taetrolens* z wydłużeniem czasu doływu świeżej serwatki, która była powtórzeniem hodowli 3, zachowane były te same warunki. Stężenie kwasu laktobionowego w hodowli stopniowo wzrastało, a w 96 godzinie stwierdzono jego najwyższe stężenie ($8,54 \text{ mg/cm}^3$). Po odbieraniu płynu hodowlanego w 120, 216 i 312 godzinie obserwowano obniżenie stężenia kwasu, a następnie po uzupełnianiu świeżym podłożem, jego stopniowy wzrost. Uzyskane wyniki stężenie otrzymanego kwasu laktobionowego były zdecydowanie wyższe niż w hodowli 3 przez 336 godzin prowadzonych hodowli, tylko do 120 godziny hodowli 3 notowano wyższe stężenia uzyskanego kwasu laktobionowego.

Z uwagi na obiecujące wyniki wstępne otrzymywania kwasu laktobionowego z wykorzystaniem mikrokapsułkowanych bakterii *Pseudomonas taetrolens* kolejne etapy badań stanowiły fermentacje z unieruchomionymi mikroorganizmami. Uzyskane wyniki porównywano z hodowlami, w których wykorzystano bakterie w formie wolnej.

Piątą prowadzoną hodowlą było utlenianie laktozy z serwatki w bioreaktorze przez bakterie *Pseudomonas taetrolens* po procesie kapsułkowania. Hodowlę prowadzono z wykorzystaniem mikroorganizmów kapsułkowanych przy ciągłym napowietrzaniu ($0,5 \text{ dm}^3/\text{min}$), utrzymywano stałą temperaturę hodowli (30°C), nie prowadzono regulacji pH. Po odbieraniu płynu hodowlanego co 72 godziny obserwowano obniżenie stężenia kwasu, a następnie po uzupełnieniu świeżym podłożem, jego stopniowy wzrost. Najwyższe stężenie kwasu laktobionowego uzyskano w 144 godzinie hodowli i wynosiło ono $3,99 \text{ mg}/\text{cm}^3$.

Szóstą prowadzoną hodowlą było utlenianie laktozy z serwatki w bioreaktorze ze stałym pH środowiska przez bakterie wolne *Pseudomonas taetrolens*. Hodowlę prowadzono z wykorzystaniem mikroorganizmów wolnych przy ciągłym napowietrzaniu ($0,5 \text{ dm}^3/\text{min}$), utrzymywano stałą temperaturę hodowli (30°C) oraz prowadzono regulację pH na poziomie 6,25. Po odebraniu płynu hodowlanego co 72 godziny obserwowano obniżenie stężenia kwasu, a następnie po uzupełnieniu świeżym podłożem, jego stopniowy wzrost. Najwyższe stężenie kwasu laktobionowego uzyskano w 216 godzinie hodowli i wynosiło ono $1,47 \text{ mg}/\text{cm}^3$.

Siódmą prowadzoną hodowlą było utlenianie laktozy z serwatki w bioreaktorze z utrzymywanym na stałym poziomie pH środowiska przez bakterie *Pseudomonas taetrolens* po procesie kapsułkowania. Hodowlę prowadzono z wykorzystaniem mikroorganizmów kapsułkowanych przy ciągłym napowietrzaniu ($0,5 \text{ dm}^3/\text{min}$), utrzymywano stałą temperaturę hodowli (30°C) oraz prowadzono regulację pH na poziomie 6,25. Po odebraniu płynu hodowlanego co 72 godziny obserwowano obniżenie stężenia kwasu, a następnie po uzupełnieniu świeżym podłożem, jego stopniowy wzrost. Najwyższe stężenie kwasu laktobionowego uzyskano w 24 godzinie hodowli i wynosiło ono $22,03 \text{ mg}/\text{cm}^3$.

Analiza obrazów mikroskopowych wykazała, iż morfologia komórek mikroorganizmów *Pseudomonas taetrolens* podczas otrzymywania kwasu laktobionowego nie ulegała zmianie. Liczba komórek *Pseudomonas taetrolens* podczas otrzymywania kwasu laktobionowego z wykorzystaniem bakterii kapsułkowanych była bardzo zbliżona do 120 godzin hodowli. Oznaczano również liczbę żywych komórek kapsułkowanych mikroorganizmów *Pseudomonas taetrolens* w procesie utleniania laktozy do kwasu laktobionowego. Posiew wykonano z inokulum po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 30°C , z hodowli stacjonarnej prowadzonej w bioreaktorze po 24 godzinach hodowli, a także z hodowli ciągłej prowadzonej w bioreaktorze po 24 godzinach hodowli. Uzyskane wyniki wskazują na 10-krotny przyrost komórek w kapsułkach w hodowli prowadzonej w bioreaktorze w porównaniu z hodowlą stacjonarną, dlatego też celem optymalizacji produkcji otrzymywania kwasu laktobionowego wykorzystano hodowle w bioreaktorze z kontrolowanymi i monitorowanymi warunkami.

Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

1. Badania potwierdzają, że kwas laktobionowy posiada zdolności do stymulowania rozwoju wybranych szczepów bakterii potencjalnie probiotycznych.
2. Testowane szczepy mikroorganizmów z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* korzystają z kwasu laktobionowego, jako źródła węgla.
3. Na wydajność rozwoju bakterii probiotycznych, kwas laktobionowy wpływa w różnym stopniu. Jest to uzależnione od szczepu danego gatunku mikroorganizmów oraz ilości kwasu.
4. Spośród badanych szczepów największą gęstość optyczną hodowli, uzyskuje *Lactobacillus fermentum*, z dodatkiem 1,6% (16 mg/cm³) kwasu laktobionowego, natomiast najmniejszą *Lactococcus lactis* z udziałem 0,8% (8 mg/cm³) kwasu.
5. Dodatek kwasu laktobionowego wpływa na zahamowanie procesu utleniania w oleju rzepakowym. Dowodem tego jest zmniejszenie liczby nadtlencowej w próbach tłuszczu z udziałem kwasu, w porównaniu z próbą bez jego dodatku (próba zerowa).
6. Im większy udział procentowy kwasu laktobionowego, tym lepsze jego efekty w redukowaniu stopnia utlenienia oleju rzepakowego.
7. Próbkę oleju z dodatkiem 1 cm³ preparatów własnych kwasu laktobionowego, wykazują mniejszą skuteczność w ograniczaniu liczby nadtlencowej, niż próbki z różnym udziałem standardu tego kwasu.
8. Podczas biokonwersji laktozy z wykorzystaniem bakterii *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104 temperatura, czas, napowietrzanie i pH mają wpływ na otrzymywanie kwasu laktobionowego.
9. Stężenie uzyskanego kwasu laktobionowego z wykorzystaniem mikrokapsułkowanych bakterii *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104 jest większa niż z wykorzystaniem niekapsułkowanych bakterii.
10. Istotny wpływ na otrzymywanie kwasu laktobionowego ma pH środowiska, które powinno być utrzymywane w granicach 6,25-6,5.
11. Przeprowadzone badania potwierdziły, iż kapsułki alginianowe były przepuszczalne dla enzymów utleniających laktozę do kwasu laktobionowego, produkowanych zewnątrzkomórkowo przez bakterie *Pseudomonas taetrolens*.
12. Mikrokapsułki alginianowe spełniają ochronną funkcję wobec bakterii *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104, a uzyskane wydajności kwasu laktobionowego z serwatki z wykorzystaniem kapsułkowanych mikroorganizmów są wyższe przy pH utrzymywanym na poziomie 6,25 podczas hodowli w bioreaktorze.
13. Wykonane badania wykazały, iż struktura mikrokapsułek ulegała deformacji a mikroorganizmy wydostawały się z kapsułek do podłoża, czego dowodem była ich obecność w płynie hodowlanym. Strukturę alginianu wapnia osłabiały jony sodu i kwas laktobionowy, obecne w hodowli, a koncentrowanie się biomasy przy membranach kapsułek, powodowało ich rozpad.

Uzyskane w toku realizacji badań wyniki potwierdziły charakter prebiotyczny kwasu laktobionowego oraz jego właściwości przeciwutleniające. Zatem może on stać się nowym składnikiem stosowanym w żywności. Proces otrzymywania kwasu laktobionowego z wykorzystaniem bakterii *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104 na podłożu jakim jest serwatka okazał się bardziej wydajny z zastosowaniem bakterii kapsułkowanych niż mikroorganizmów bez otoczek. Dodatkową zaletą procesu kapsułkowania jest łatwe oddzielenie komórek mikroorganizmów od medium hodowlanego i może zostać wykorzystane w przyszłości. Wykorzystanie produktu ubocznego przemysłu mleczarskiego stanowi dodatkowy atut tego procesu i poszerza zakres zagospodarowania serwatki.

4.3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Od momentu wejścia przeze mnie na ścieżkę naukową, moje zainteresowania naukowo-badawcze pozostają w zakresie pięciu obszarów:

- (1) otrzymywanie kwasu laktobionowego na drodze mikrobiologicznej
- (2) mikroorganizmów probiotycznych,
- (3) mikrobiologicznej syntezy bakteriocyn,
- (4) oceny prebiotycznego potencjału polisacharydów pozyskiwanych z grzybów wielkoowocnikowych (*Macromyces*) oraz różnych mikroorganizmów
- (5) wykorzystania modelu przewodu pokarmowego człowieka do badania przemian składników żywności oraz przeżywalności mikroorganizmów.

Ad.(1).

W ramach zainteresowań dotyczących otrzymywania kwasu laktobionowego na drodze biotechnologicznej realizowałam w latach 2009-2011 grant NCN N312 441737 pt. „Optymalizacja produkcji kwasu laktobionowego z serwatki”, którego byłam kierownikiem. Badania podczas jego realizacji zaowocowały współpracą z dr Wojciechem Juzwą z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności UP w Poznaniu oraz wewnętrzną współpracą. Głównym celem projektu było pozyskanie kwasu laktobionowego z permeatu serwatki z wykorzystaniem różnych szczepów bakterii *Pseudomonas* i *Zymomonas mobilis* oraz *E. coli* zdolnej do nadprodukcji enzymu utleniającego laktozę do kwasu laktobionowego. Ocenie wstępnej poddane zostały preparaty kwasu laktobionowego produkowane przez szczepy muzealne, jak i mikroorganizmy zdolne do nadprodukcji białka powodującego utlenianie laktozy do kwasu laktobionowego hodowane na podłożach z modyfikowanym składem permeatu serwatki. Przeciwutleniacze, do których należy kwas laktobionowy, zyskują coraz większe zainteresowanie wśród producentów zdrowej żywności, gdyż ze względu na możliwość chelatowania metali, są zdolne do unieszkodliwiania reaktywnych form tlenu, a więc wykazują charakter prozdrowotny. Wykazano, że posiadają one właściwości przeciwnowotworowe, przeciwmiażdżycowe, opóźniają rozwój chorób związanych ze starzeniem się organizmu. Silne działanie przeciwutleniające posiada również kwas laktobionowy. Bakterie *Pseudomonas* oraz *Zymomonas mobilis* należą do nielicznych

mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania oksydazy laktozowej powodującej transformację laktozy do kwasu laktobionowego. Według danych literaturowych, w standardowych warunkach hodowli ilość powstałego kwasu laktobionowego zależy od typu hodowli (ciągła czy okresowa), a stopień konwersji laktozy do kwasu laktobionowego może dochodzić do 90% i zależy również od ilości powstającego nadtlenu wodoru i zastosowanej metody jego rozkładu. Jednak zmiany pewnych czynników środowiskowych m. in. składu podłoża hodowlanego, wpływają na zwiększenie ilości otrzymanego kwasu laktobionowego w stosunku do możliwych przemian niewielkich ilości innych cukrów do kwasów polihydroksylowych. Z uwagi na możliwość wykorzystania kwasu laktobionowego otrzymywanego na drodze mikrobiologicznej z użyciem *Pseudomonas* i *Zymomonas mobilis*, badania nad wpływem składu podłoża hodowlanego złożonego głównie z permeatu serwatki na ilość otrzymanego kwasu laktobionowego oraz konstrukcja szczepu kodującego oksydazę laktozową, wydały się być celowe. Wykonano również badania dotyczące oceny prozdrowotnej kwasu laktobionowego i aplikacyjnych jego właściwości. Wykazano, że kwas laktobionowy charakteryzuje się wysoką aktywnością przeciwutleniającą, co stawia go w grupie związków mających korzystny wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt. Ponadto korzystnych jego właściwości upatruje się również w działaniu prebiotycznym, co zostało udowodnione podczas realizacji projektu. Uzyskane wyniki zaowocowały powstaniem publikacji (B.1.8., B.1.10.) oraz ich prezentacją w formie komunikatów na konferencjach krajowych i międzynarodowych (B.5.1., B.7.16., B.7.17., B.7.18., B.7.42.).

Ad.(2).

Początek mojej kariery naukowej związany jest z Zakładem Fermentacji i Biosyntezy Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego UP w Poznaniu, gdzie bezpośrednio po studiach (od 2000 r.), pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Zbigniewa Czarneckiego, realizowałam pracę doktorską pt. „Charakterystyka środowiskowa i próby stabilizacji bakterii potencjalnie probiotycznych”. Nadrzędnym celem badań była charakterystyka wybranych szczepów bakterii z gatunków *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum* jako bakterii potencjalnie probiotycznych z uwzględnieniem wpływu warunków środowiskowych na ich przeżywalność oraz ocena możliwości utrwalania tych bakterii. Badania, które przeprowadziłam w tamtym czasie oraz otrzymane wyniki, wpisane były mocno w obszar biotechnologii. Do dzisiaj, jest on przedmiotem moich zainteresowań naukowych.

Przedmiotem badań mojej pracy doktorskiej były bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Badania obejmowały następujące zagadnienia: charakterystykę właściwości bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem tych, którymi powinny odznaczać się szczepy bakterii potencjalnie probiotycznych jak np. antagonistyczny wpływ w stosunku do bakterii patogennych, przeżywalność w wybranych warunkach środowiska przewodu pokarmowego człowieka czyli w zróżnicowanym pH i w obecności soli żółci w warunkach „*in vitro*”; charakterystykę wpływu dodatku do podłoża wybranych cukrów, w tym uznawanych za

prebiotyki, na dynamikę wzrostu bakterii; ilość wytworzonego kwasu mlekowego oraz zawartość form izomerycznych kwasu mlekowego; utrwalanie bakterii poprzez mikrokapsułkowanie z ciekłym rdzeniem i ocenę wpływu mikrokapsułkowania na ich przeżywalność w środowisku o zróżnicowanym pH; badanie wpływu różnych metod suszenia na stabilność preparatów bakterii podczas przechowywania; próbę aplikacji bakterii do soku marchwiowego jako nośnika dodatków funkcjonalnych akceptowanego przez konsumentów.

Efektem przeprowadzonych badań było wytypowanie bakterii o potencjalnych właściwościach probiotycznych. Ponadto udowodniono antagonistyczny wpływ wszystkich badanych szczepów w stosunku do bakterii *Helicobacter pylori*. Wyższą aktywnością antagonistyczną w stosunku do tej bakterii charakteryzowały się szczepy *Lactobacillus acidophilus* w porównaniu z *Bifidobacterium bifidum*. Ponadto testowane szczepy bakterii *Lactobacillus acidophilus* odznaczały się też aktywnością antagonistyczną w stosunku do bakterii *Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis*.

Część wyników powyższych badań opublikowano w następujących pracach: A.1.1, A.2.1., A.3.1., A.3.2., B.1.2., B.1.3., B.1.5, B.2.4.

Podczas realizacji pracy doktorskiej miałam również okazję rozwinąć warsztat badawczy związany ze stabilizacją mikroorganizmów. Zajmowałam się mikrokapsułkowaniem bakterii z ciekłym rdzeniem oraz otrzymywaniem sypkich preparatów probiotycznych. Ochronny wpływ na przeżywalność testowanych szczepów w niekorzystnych warunkach ma kapsułkowanie z ciekłym rdzeniem, znacznie wydłużające przeżywalność bakterii w zróżnicowanym pH środowiska. Utrwalanie bakterii *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 oraz *Bifidobacterium bifidum* DSM 20239 i analiza stabilności preparatów w okresie przechowywania do 4 miesięcy w temperaturze 4°C wykazała, że najbardziej efektywną metodą ich utrwalania jest suszenie fluidyzacyjne bakterii w kapsułkach. Utrwalane w ten sposób bakterie mogłyby stanowić dodatek do suchych produktów spożywczych. Obecność skrobi kukurydzianej o wysokiej zawartości amylozy uznana jest za czynnik, który zwiększa przeżywalność bifidobakterii w niskim pH, w obecności soli żółci oraz podczas przejścia przez przewód pokarmowy u myszy. Adhezja komórek bakterii do skrobi prawdopodobnie stanowi mechanizm zwiększający przeżywalność bakterii, stąd też próba zastosowania trzech nośników skrobiowych- N-Tack, N- Lock i Hylon VII w procesie suszenia rozpyłowego bakterii. Uzyskana koncentracja żywych komórek bakterii na nośnikach N- Tack, N- Lock i Hylon VII nie jest tak wysoka jak uzyskują w swoich badaniach inni autorzy, stosując jako czynnik osłaniający mleko w proszku. Dotychczas jest to nośnik najbardziej efektywny. Deklarowane przez producenta właściwości stosowanych w badaniach skrobi nie wskazują na ich możliwości wykorzystania w suszeniu rozpyłowym bakterii.

Stabilność bakterii kapsułkowanych, suszonych fluidyzacyjnie jest większa niż bakterii suszonych rozpyłowo z zastosowaniem nośników. W badaniach stosowano także proces liofilizacji bakterii kapsułkowanych. Ponieważ zastosowanie substancji krioochronnych zwiększa jeszcze przeżywalność bakterii zastosowano: odtłuszczone mleko; odtłuszczone

mleko z dodatkiem 5% (w/v) sacharozy i 0,35% (w/v) kwasu askorbinowego oraz 20% (w/v) roztwór sacharozy. Spośród zastosowanych podczas liofilizacji substancji kriochronnych najbardziej efektywne dla bakterii *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 i *Bifidobacterium bifidum* DSM 20239 okazało się odtłuszczone mleko. Spośród wszystkich zastosowanych w doświadczeniach metod suszenia najbardziej efektywnym z technologicznego punktu widzenia okazało się suszenie fluidyzacyjne bakterii kapsułkowanych. Krótki czas suszenia sugeruje ponadto, iż koszty takiego procesu utrwalania bakterii będą mniejsze. Wysoka przeżywalność bakterii podczas procesu, stabilność preparatów do 4 miesiąca przechowywania oraz niski nakład energetyczny powoduje, że metoda ta może stać się alternatywą w produkcji skoncentrowanych preparatów bakterii (B.1.2, B.1.3., B.1.5.).

W toku realizacji pracy doktorskiej udało się uzyskać produkt spożywczy – sok marchwiowy, który mógłby stać się nowym produktem probiotycznym zastępującym produkty z udziałem mleka. Testowane bakterie charakteryzowały się ponadto dobrą przeżywalnością w soku marchwiowym.

Podczas realizacji doktoratu, brałam również udział w badaniach nad możliwością wykorzystania prebiotyków przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Przy deficycie sacharydów w podłożu wszystkie szczepy testowanych bakterii zdolne były do wykorzystania substancji prebiotycznych. Właśnie w hodowli z dodatkiem do podłoży Raftilose oraz Raftiline stwierdzono wyższą liczbę żywych komórek bakterii, w porównaniu z hodowlą bez dodatku sacharydów. Prebiotyki przechodząc w stanie nienaruszonym do jelita grubego i nie będąc trawione w początkowych odcinkach przewodu pokarmowego gospodarza, stają się jedynym źródłem węgla dla bakterii bytujących w końcowym jego odcinku. Realizowane badania wykazały, że wszystkie testowane szczepy zdolne są do wykorzystania substancji o charakterze fruktooligoscharydów jako źródła węgla w procesach budowy. Właściwość ta jest cechą bardzo korzystną, ponieważ może przyczyniać się do wzrostu bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym (B.2.4.).

Bezpośrednio po obronie doktoratu podjęłam dziesięciomiesięczny staż zagraniczny we Francji (11.01.2005r. – 11.11.2005r.) - Post-doctorate position w Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Biochimie Bactérienne, Jouy-en Josas, Cedex, Francja i realizowałam temat: Caractérisation moléculaire de l'autolysine AcMB de *Lactococcus lactis* et évaluation de son activité inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* pod kierunkiem: Marie-Pierre Chapot-Chartier, a w październiku 2005 roku podjęłam pracę w Instytucie Technologii Żywności w Zakładzie Fermentacji i Biosyntezy na stanowisku adiunkta, gdzie kontynuowałam rozpoczęte w pracy doktorskiej badania związane z bakteriami probiotycznymi. Odbyty staż zaowocował doniesieniem (B.7.22.) na konferencji międzynarodowej oraz doświadczeniem w pracy z białkami o charakterze przeciwdrobnoustrojowym.

W obszarze badań dotyczących bakterii fermentacji mlekowej w tym probiotyków nawiązałam współpracę z Dr. Baltasar Mayo Perez z IPLA-CSIC z Villaviciosa w Hiszpanii, co zaowocowało doniesieniem naukowym na konferencji międzynarodowej (B.7.41.). Ponadto odbyłam trzytygodniowy staż zagraniczny w Hiszpanii od 10 października do 1 listopada 2011 roku w Instituto de Productos Lacteos de Asturias (IPLA), dotyczący techniki analitycznej DGGE przydatnej do identyfikacji mikroorganizmów (the culture-independent microbial technique of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) oraz innych (all associated methods required to perform the technique, including isolation of total microbial DNA, PCR, agarose electrophoresis, DNA quantification) pod kierunkiem Dr. Baltasar Mayo Perez (B.7.41.).

Efektom tej współpracy jest również rozdział w książce: **Goderska K.**, Stanton C. (2010): Viability and stability of Bifidobacteria in commercial preparations; Bifidobacteria. Red.: Mayo B., Van Sinderen D. Wydawnictwo: Caister Academic Press, Norfolk, UK.; r. 12, 217-233 (ISBN 978-1-904455-68-4) (B.5.1.).

W obszarze zainteresowań probiotykami powstał również rozdział w książce: **Goderska K.** (2012): Different methods of probiotics stabilization. Probiotics. Red.: Rigobelo E., C. Wydawnictwo: Intech; r. 24, 541-550 (ISBN 978-953-51-0776-7) (B.5.2.).

W ramach badań dotyczących mikroorganizmów probiotycznych nawiązałam również współpracę naukową z Dr. Rasu Jayabalan, Assistant Professor z Department of Life Science, National Institute of Technology, Rourkela, Odisha, która zaowocowała kilkoma publikacjami naukowymi: B.2.8., B.1.12. oraz komunikatami na konferencjach międzynarodowych (B.7.48., B.7.49., B.7.52., B.7.53.). Pan Dr odbył 3 miesięczny staż w Zakładzie Fermentacji i Biosyntezy w 2014 roku pod moim kierunkiem.

Podczas swojej pracy zawodowej rozwinęłam również warsztat dotyczący metody HPLC oznaczania obecności różnych składników w produktach spożywczych. W ramach badań współpracowałam z dr hab. Jolantą Tomaszewską-Gras z Katedry Zarządzania Jakością Żywności UP w Poznaniu. Współpraca ta zaowocowała publikacją naukową (B.1.9.) i komunikatem na konferencji międzynarodowej (B.7.45.).

Byłam również wykonawcą w granie MNiSW N312 157134, pt. Charakterystyka związków lotnych odpowiedzialnych za oryginalny aromat oścypka produkowanego w szałasach pasterskich oraz w zakładach przemysłowych a także określenie wpływu zabiegów technologicznych jak i występującej mikroflory na jego kształtowanie (2008-2011), którego kierownikiem była dr hab. Małgorzata Majcher. Celem projektu była identyfikacja związków lotnych tworzących charakterystyczny aromat oryginalnego polskiego sera owczego – oścypka produkowanego w tradycyjny sposób z mleka owczego niepasteryzowanego oraz

wytwarzanego w zakładach przemysłowych, a także określenie roli zabiegów technologicznych: pasteryzacji, parzenia, solenia i wędzenia oraz obecnej mikroflory w kształtowaniu aromatu tych serów. Przedmiotem badań był oryginalny ser oscypek produkowany metodą tradycyjną na halach z mleka owczego nie pasteryzowanego, jak i wytwarzany w zakładach przemysłowych z mleka owczego pasteryzowanego. Związki lotne izolowane były technikami SPME i SAFE a następnie identyfikowane jakościowo i ilościowo metodą chromatografii gazowej i spektrometrii masowej (GC/MS). Wyznaczenie kluczowych związków odpowiedzialnych za kształtowanie aromatu zostało przeprowadzone metodą olfaktometrii gazowej połączonej z techniką wyznaczania wskaźników rozcieńczeń (GCO/AEDA). W badaniach zajmowałam się izolacją oraz identyfikacją poszczególnych gatunków drobnoustrojów obecnych w mikroflorze oscypka za pomocą tradycyjnych metod wykorzystywanych w mikrobiologii oraz API testów a następnie hodowlą wyizolowanych poszczególnych gatunków, dla których identyfikowano tworzone przez nie związki lotne. Efektem realizowanego projektu było scharakteryzowanie aromatu oscypka produkowanego w warunkach tradycyjnych przez Górali Tatrzańskich i porównanie z aromatem oscypka produkowanego w zakładach przemysłowych. W tym celu przeprowadzono profilową analizę sensoryczną obu rodzajów sera, która skorelowana została z kluczowymi związkami lotnymi wyznaczonymi metodami olfaktometrycznymi. Dodatkowo określano wpływ poszczególnych etapów technologicznych takich jak pasteryzacja mleka, parzenie, solenie i wędzenie na powstawanie charakterystycznych związków aromatycznych. Z tego względu, że tradycyjna produkcja oscypka oparta jest na wykorzystaniu mikroflory charakterystycznej dla regionów górskich w kolejnym etapie badań określano wpływ rodzimej mikroflory mleka owczego oraz tworzącej się mikroflory na powstające związki lotne. Z sera produkowanego metodą tradycyjną oraz z sera produkowanego w zakładach przemysłowych wyizolowane zostały i zidentyfikowane poszczególne gatunki drobnoustrojów a następnie określono ich udział w tworzeniu charakterystycznego aromatu oscypka. Wiedza ta pozwoliła na lepsze poznanie drogi powstawania poszczególnych związków aromatycznych i może zostać wykorzystana do podkreślenia unikalnej specyfiki cech sensorycznych tego typu sera a także do polepszania aromatu innych serów owczych. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w formie publikacji (B.7.1.) oraz komunikatów na konferencjach krajowych i międzynarodowych (B.7.13., B.7.36.).

Podobnie w grantach strukturalnych finansowanych z funduszy Unii Europejskiej: POIG nr: UDA-POIG.01.03.01-00-132/08-00 „Opracowanie indeksu gatunkowego i optymalizacja technologii produkcji wybranych roślin energetycznych” (2010-2015) byłam wykonawcą w 2013 roku. Projekt był realizowany w Konsorcjum Naukowym pod nazwą „Agro-Centrum Innowacyjnych Technologii”. Zespół badawczy którego byłam członkiem, jako niezależny konsorcjant w programie miał możliwość współpracy z wybitnymi specjalistami z dziedziny uprawy i hodowli roślin, w tym z Kutnowską Hodowlą Buraka Cukrowego w Straszku, Hodowlą Roślin w Smolicach Grupa IHAR oraz Instytutem Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach. Celem nadrzędnym projektu było opracowanie indeksu

gatunkowego roślin o cechach przydatnych w produkcji etanolu na cele energetyczne, jak również określenie wpływu zróżnicowanych zabiegów agrotechnicznych na zwiększenie przydatności technologicznej wytypowanych surowców. W badaniach jako surowiec stosowano różne rody/odmiany lub mieszańce buraków cukrowych, żyta, pszenżyta, kukurydzy, pszenicy biorąc również pod uwagę czynniki agrotechniczne ich uprawy (poziom nawożenia azotem) oraz ich lokalizację. Zakres 4 zadań badawczych realizowanych przez zespół obejmował:

- a. charakterystykę stosowanego surowca pod kątem jego podatności na hydrolizę amylolityczną oraz wydajność etanolu w odniesieniu do właściwości użytego surowca skrobiowego lub zawierającego sacharozę,
- b. dopracowanie warunków prowadzenia poszczególnych etapów procesu przygotowania surowca (rozdrabnianie) i fermentacji,
- c. ocenę jakościową otrzymanego etanolu (profil i poziom zanieczyszczeń) w zależności od zastosowanego surowca jaki i zróżnicowania glebowo-klimatycznego
- d. wyznaczenie wskaźników wydajności konwersji skrobi do cukrów fermentujących, rzeczywistej wydajności etanolu ze skrobi lub sacharozy w skali laboratoryjnej oraz analizę wyników eksperymentów polegającą na charakterystyce surowca i procesu fermentacji, która powinna dać podstawy do opracowania procedur technologicznych stosowanych dla poszczególnych grup surowców.

W celu zwiększenia efektywności hydrolizy amylolitycznej surowców skrobiowych (zboż) przeprowadzono badania kilku granulacji frakcji ziarna różniących się zawartością popiołu aby uzyskać najefektywniejszy proces scukrzania oraz fermentacji surowca. Surowce zawierające sacharozę (burak cukrowy-rozdrobniony) bezpośrednio poddano procesowi fermentacji.

W wyniku przeprowadzonych badań określono najdogodniejsze warunki dla procesu fermentacji, porównano czynniki które bezpośrednio wpływają na proces fermentacji i tym samym wydajność etanolu, jak również uzyskano odpowiedź jak dane rody/odmiany czy mieszańce zachowują się podczas procesu fermentacji. Sukcesywnie otrzymane destylety poddawano analizie chromatograficznej w celu oszacowania profilu zanieczyszczeń destylatu. Na bieżąco obliczano wskaźniki konwersji skrobi do cukrów fermentujących, rzeczywistej wydajności etanolu ze skrobi w zależności od plonowania w skali laboratoryjnej. W celu określenia efektywności procesu zastosowano programy komputerowe ułatwiające charakterystykę danego procesu. Na podstawie danych uzyskanych z poszczególnych eksperymentów polegających na charakterystyce surowca i procesu fermentacji opracowano wskazówki które mogą dać podstawy do opracowania procedur technologicznych zwiększających efektywność procesu produkcji etanolu stosownie do poszczególnych grup surowców. Mój udział opierał się na charakterystyce mikrobiologicznej surowca oraz produktu odpadowego otrzymywania alkoholu etylowego.

Powyższe wyniki przedstawiano w postaci komunikatów naukowych na konferencjach (B.7.47., B.7.46.).

Ad. (3).

Od 2005 roku rozpoczęłam intensywne badania związane z syntezą bakteriocyn przez *Lactobacillus acidophilus*. W latach 2007-2008 realizowałam projekt badawczy interdyscyplinarny MEiN/MNiI 1/52/WI/07/UMR pt. Antagonizm bakterii z gatunku *Lactobacillus acidophilus* wobec wybranych bakterii patogennych człowieka z uwzględnieniem charakterystyki substancji o działaniu antagonistycznym. Byłam głównym wykonawcą tego projektu. Projekt dotyczył charakterystyki antagonizmu wybranych szczepów *Lb. acidophilus* wobec różnych szczepów bakterii patogennych najczęściej spotykanych jako źródło zakażeń przewodu pokarmowego człowieka. Do swoich badań autorzy wybrali szczepy bakterii *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* i enterokoki. Realizacja projektu przyczyniła się do charakterystyki substancji przeciwbakteryjnych wytwarzanych przez *Lb. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242, w tym głównie białek o charakterze bakteriocyn wytwarzanych przez obydwa szczepy. Autorzy pozyskali czysty i jednorodny preparat białkowy produkowany przez *Lb. acidophilus* DSM 20079. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie wyróżnionej publikacji (B.1.7.) oraz prezentowano w formie komunikatów naukowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych (B.7.12., B.7.15., B.7.29., B.7.35., B.7.39.).

Opublikowane prace z zakresu mikrobiologicznej syntezy bakteriocyn przyczyniły się do nawiązania przeze mnie współpracy z Uniwersytetem Rzeszowskim. W 2013 byłam opiekunem 2-tygodniowego stażu naukowego Pani mgr Eweliny Gawęł, doktorantki z tej jednostki badawczej. Wspólnie prowadziłyśmy badania nad intensyfikacją produkcji bakteriocyn w hodowlach bioreaktorowych. Ponadto zakres badań obejmujący mikroorganizmy probiotyczne stał się interesujący dla dr Sonia Agudo Pena z Abbot Laboratories Poland Sp. z.o.o., która odbyła w Zakładzie Fermentacji i Biosyntezy 10-miesięczny staż pod moim kierunkiem. Przeprowadzone wspólnie eksperymenty naukowe zaowocowały komunikatami naukowymi na konferencjach krajowych i międzynarodowych (B.7.20., B.7.50., B.7.51., B.7.54., B.7.55.), a wspólne publikacje są obecnie w przygotowaniu.

Ad. (4).

Od 2011 roku byłam wykonawcą w projekcie NCN 2583/B/2011/40 pt. „Ocena biologicznego oddziaływania wybranych grzybów wielkoowocnikowych na mikroflorę probiotyczną”, którego kierownikiem była dr hab. Barbara Stachowiak. Przedmiotem badań był potencjał prebiotyczny rozpuszczalnych frakcji polisacharydowych (RFP) izolowanych z *Pleurotus ostreatus* (bocznik ostrygowaty), *Lentinula edodes* (twardziak jadalny), *Ganoderma lucidum* (lakownica lśniąca), *Pholiota nameko* (łuskwiak nameko), a także *Agaricus bisporus* (pieczarka dwuzarodnikowa). Większość z tych grzybów określana jest mianem „leczniczych”, ze względu na udokumentowane właściwości prozdrowotne, za które w dużej mierze odpowiedzialne są grzybowe polisacharydy. Badania dotyczące projektu

realizowano w ramach współpracy wewnątrzzakładowej oraz wspólnie z dr hab. Julią Regułą (Katedra Higieny Żywnienia Człowieka UP w Poznaniu) oraz z zespołem Katedry Warzywnictwa UP w Poznaniu. Realizacja projektu przebiegała dwutorowo. Prowadzone były szeroko zakrojone badania nad wpływem RFP na rozwój mikroflory probiotycznej. W tym obszarze przetestowano przydatność różnych metod do oznaczeń oddziaływania pozyskanych RFP na rozwój mikroflory probiotycznej w hodowlach płynnych i płytkowych (na podłożach stałych). Ostatecznie potencjał prebiotyczny RFP oceniano wykorzystując turbidymetr wyposażony w mikroplótkowy czytnik absorbancji. W badaniach wykorzystano 14 kultur probiotycznych, w tym 6 popularnych preparatów komercyjnych: Lakcid, Trilac, Lacidofil, Duo-Lactil Junior, Dicoflor 60, Acidolac. Jednym ze szczepów testowych był nowy probiotyk *Lactobacillus casei* CRL-431, który otrzymano dzięki uprzejmości Ch. Hansen A/S. Zebrane dane poddano obróbce wykorzystując program CurveExpert Professional. Do opisu dynamiki wzrostu kultur probiotycznych wykorzystano model Gompertza. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że potencjał prebiotyczny wykazywały RFP pozyskane z boczniaka ostrygowatego, z twardziaka jadalnego i pieczarki dwuzarodnikowej. Spektakularny efekt odnotowano dla boczniaka.

Ocena oddziaływania badanych grzybów na mikroflorę probiotyczną badana była również w warunkach modelu przewodu pokarmowego "in vitro", bezpośrednio z moim udziałem. Trawieniu poddawane były diety nieprawidłowe, których efektem jest rozwój tzw. chorób niezakaźnych dietozależnych: otyłość, cukrzyca, miażdżyca, dna moczanowa. Są to więc diety: wysokotłuszczowa, wysokowęglowodanowa, wysokobiałkowa, będące modyfikacją diety prawidłowej pod względem nadmiernej podaży odpowiednich makroskładników. Składnikiem tych diet były susze badanych grzybów. Kontrolę stanowiła dieta bez dodatku suszu. Probiotyki wprowadzane były do trawionej treści pokarmowej, a ich rozwój monitorowany był w trakcie trawienia.

Drugim nurtem badawczym była charakterystyka składu i struktury grzybowych glukanów wykazujących prebiotyczny charakter. Podstawowym problemem w realizacji tych badań okazała się konieczność oczyszczenia/odbiłączenia RFP (bez strat ilościowych i bez destrukcji struktury polisacharydów). W kolejnym etapie przeprowadzono hydrolizę odbiłączonej RFP i skład monomerów oznaczano na aparacie UHPLC sprzężonym z detektorem Corona®. Wyniki analiz wskazują, że RFP z boczniaka składają się głównie z podjednostek glukozy. Zawierają również galaktozę i fruktozę. Badania nad charakterystyką struktury RFP są kontynuowane.

W chwili obecnej wyniki realizowanych badań prezentowane były jedynie w formie pracy konferencyjnej (B.6.2.) ale będą przedmiotem publikacji.

Od 2010 roku byłam wykonawcą w projekcie NCN 2144/B/P01/2010/38 pt. „Synteza nowych oligo- i polisacharydów przy udziale transferaz bakteryjnych oraz ocena właściwości pozyskanych frakcji węglowodanowych”, którego kierownikiem był dr inż. Artur Szewiel. Przedmiotem badań było oszacowanie optymalnych warunków reakcji transfruktozylacji w celu wydajnej syntezy poli- i oligofruktanu, a także syntezy analogów sacharozy (glukozę podstawiano ksylozą). Reakcje monitorowano przy użyciu spektrometru mas sprzężonego z

ultrasprawnym chromatografem cieczowym (LC-MS) oraz techniką chromatografii żelowej z poczwórną detekcją (refraktometryczną, rozpraszania światła, wiskozymetryczną i spektrofotometryczną). Uzyskane frakcje charakteryzowano jakościowo, wyznaczając dystrybucję mas cząsteczkowych oraz parametry hydrodynamiczne. Badano praktyczne zastosowanie uzyskanych preparatów – oceniano przyswajalność pozyskanych sacharydów dla kultur probiotycznych oraz wpływ tychże sacharydów jako stabilizatorów w układach zdyspergowanych.

Opracowano metodę optymalizowania warunków reakcji transfruktozylacji w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem pomiarów turbidymetrycznych na płytkach mikrotitracyjnych, co pozwala na testowanie wielu wariantów doświadczenia w tym samym czasie. Wyniki opracowywano dopasowując do punktów pomiarowych model funkcji MMF i szacując na podstawie tego modelu parametry uzyskanych funkcji wzrostowych. Metodą składowych głównych typowano czynniki decydujące o przebiegu reakcji, wykorzystano także sztuczne sieci neuronowe jako metodę nieparametryczną. W efekcie uzyskano 2,5-krotny wzrost szybkości reakcji oraz 60% wzrost wydajności. Oszacowane optymalne parametry reakcji transfruktozylacji metodami trybidymetrycznymi zweryfikowano eksperymentalnie. Potwierdzono kluczowy wpływ jonów metali na efektywność pozyskiwania fruktanów. W mediach gdzie zastosowano suplementację jonami żelaza uzyskiwano 50% wyższą precypitację fruktanu w stosunku do mediów, gdzie wprowadzono potas. Dowiedziono, że jony metali wpływają na parametry hydrodynamiczne pozyskiwanego fruktanu – wydajność była tym wyższa im cząsteczka cechowała się bardziej zwartą, sferyczną strukturą przy stosunkowo wysokiej masie cząsteczkowej.

Stwierdzono, że pozyskany preparat fruktozylotransferazy wykazuje wysoką i co istotne, długotrwałą aktywność katalityczną w temperaturze do 40°C. W wyniku działania niniejszego surowego preparatu enzymatycznego ¼ z wprowadzonych do układu reakcyjnego reszt fruktozylowych zostaje włączonych w tworzący się fruktan. Zaobserwowano, czego dotychczas nie odnotowano w literaturze dotyczącej syntezy fruktooligosacharydów i fruktanów o stopniu polimeryzacji >5, że gromadzące się w czasie reakcji monosacharydy powodują obniżenie masy cząsteczkowej powstającego fruktanu, nie ulega przy tym zmianie polidispersyjność tej frakcji, nie odnotowano także istotnego wpływu gromadzących się monosacharydów na wydajność procesu. Kolejnym aspektem, umożliwiającym zastosowanie stosowanego preparatu enzymatycznego w praktyce przemysłowej jest możliwość operowania wysokimi stężeniami sacharozy w czasie syntezy, co pozwoliłoby uniknąć rozwoju niepożądanych mikroorganizmów w czasie wielodobowej reakcji transfruktozylacji przy względnie niskiej temperaturze (maksymalnie 40°C). Stosowany preparat enzymatyczny nie wymaga suplementacji jonami poliwalentnymi, jednakże zaobserwowano, że jony Mn^{2+} znacząco podwyższają aktywność transferyczną, a hamują aktywność hydrolityczną enzymu, jony Fe^{3+} podwyższają wydajność precypitacji etanolowej.

Oceniano potencjał fruktozylacyjny izolatów bakterii (z rodzaju *Bacillus*), pozyskanych z maszyn i urządzeń cukrowni. Dokonano fenotypowania poszczególnych izolatów, a także oceniano przebieg krzywych wzrostu testując wpływ cukrów prostych jako podstawowego źródła węgla. Porównując fenotypy izolatów ze szczepami wzorcowymi (syntetyzującymi fruktan i analog fruktozy, Fru-Xyl) stwierdzono na podstawie wyników analizy PCA, że testowane szczepy odbiegają zdecydowanie od wzorców, co potwierdzono eksperymentalnie (szczepy te nie syntetyzowały analogów sacharozy, a umiarkowanie fruktan). Wykorzystując bazę danych firmy Biolog (USA), dane przekształcono i opracowano technikami analiz statystycznych wielowymiarowych, wytypowano gatunki bakterii z rodzaju *Bacillus*, które ze względu na zbieżność metabolizmu cukrów mogą wykazywać zdolność syntetyzowania analogów sacharozy. Postępowanie to w efekcie doprowadziło do odwrócenia procesu *screening'u*, ten rodzaj wyszukiwania gatunków bakterii odpowiedzialnych za syntezę analogów sacharozy nie został dotychczas zaprezentowany w literaturze przedmiotu.

Pozyskiwano preparat enzymatyczny (EC 2.4.1.161) z podłoży bakterii z rodzaju *Bacillus* a następnie dokonywano optymalizacji parametrów syntezy analogów sacharozy stosując jako donor reakcji sacharozę, a akceptor ksylozę. Dowiedziono z wykorzystaniem planów centralnych kompozycyjnych, że wzajemny stosunek sacharozy i ksylozy oraz stężenie substratów reakcji odgrywa kluczową rolę w efektywności procesu – ograniczono do zera syntezę oligomerów fruktozy. W literaturze brak jest danych o wpływie stężenia substratów na efektywność transferu reszt fruktozy na ksylozę z jednoczesnym ograniczeniem syntezy fruktanu.

Oznaczano przyswajalność pozyskanych fruktanów przez bakterie mlekowe (probiotyczne), wbrew wcześniejszym doniesieniom β -2-6-fruktan był przyswajany przez testowane bakterie LAB, nie zaobserwowano znaczącego wpływu gatunku, ani szczepu na liczebność populacji w porównaniu do próby zerowej – suplementowanej fruktozą (testowano bakterie z rodzaju *Lactobacillus*). Fruktany zmieniały jednakże znacząco profil kwasów organicznych w podłożu, na podłożu suplementowanym fruktozą produkowały przede wszystkim kwas mlekowy, a na podłożach wzbogaconych fruktanem odnotowano znaczący wzrost stężenia kwasu octowego.

Podsumowując, mocnymi stronami projektu są wyniki dotyczące wpływu warunków syntezy na parametry hydrodynamiczne makrocząsteczek oraz wydajność syntezy, w tym opracowana metoda optymalizacji przy wykorzystaniu płytek mikrotitracyjnych. Pozytywnym, praktycznym aspektem, który poddano analizie jest ocena przyswajalności pozyskanych frakcji sacharydowych przez mikroflorę probiotyczną. Znaczący wkład w światowy dorobek mają również dane dotyczące kinetyki syntezy analogu sacharozy (Fru-Xyl). Mój udział w projekcie dotyczył głównie części dotyczącej prebiotycznego charakteru pozyskanych fruktanów oraz profilu kwasów organicznych w podłożach. Wyniki

zaprezentowano w formie publikacji (B.1.11., B.2.5.) oraz doniesień na konferencjach krajowych i zagranicznych (B.7.4., B.7.9., B.7.40., B.7.44.).

Ad. (5).

W okresie finalizowania pracy doktorskiej i latach następnych uczestniczyłam w Projekcie badawczy zamawiany KBN 094/P06/2003 pt. Weryfikacja zasad technologii wytwarzania i wykorzystania żywności bogatej w naturalne antyoksydanty pod względem jej działania prozdrowotnego (2003-2007) w zakresie: - Określenie przemian chemicznych i strat wybranych naturalnych przeciwutleniaczy roślinnych w modelu *in vitro* przewodu pokarmowego z uwzględnieniem interakcji z mikroflorą jelitową. Kierownikiem tego zadania był prof. dr hab. Zbigniew Czarnecki. Celem projektu były kompleksowe badania nad zachowaniem aktywności biologicznej przeciwutleniaczy na drodze od wybranego surowca roślinnego (nasiona roślin strączkowych, aronia) do organizmu ludzkiego, poprzez przemiany zachodzące w przewodzie pokarmowym pod wpływem działania mikroflory jelitowej. Obserwacji zmian zachodzących w przewodzie pokarmowym dokonywano w opracowanym i skonstruowanym przeze mnie w Zakładzie Fermentacji i Biosyntezy modelu. Przewód pokarmowy *in vitro* odzwierciedla warunki środowiskowe panujące w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego (jama ustna, żołądek, jelito cienkie, jelito grube) z uwzględnieniem wybranych rodzin mikroorganizmów *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae* i *Enterococceae*.

Skonstruowany model przewodu pokarmowego pozwolił na śledzenie zmian wybranych składników żywności w badanych produktach na poszczególnych etapach procesu trawienia. Produkty te uzyskane w wyniku obróbki biotechnologicznej lub hydrotermicznej fasoli kolorowej to mąka typu instant i ekstrudaty oraz sok z aronii. Przeprowadzone badania wykazały, że warunki środowiskowe odtworzone na poszczególnych etapach procesu trawienia wpływają w istotny sposób na zmiany naturalnych przeciwutleniaczy w produktach otrzymanych z surowców roślinnych. Stwierdzono zróżnicowany charakter zmian związków fenolowych w trakcie prowadzonego procesu trawienia, a najistotniejsze zmiany w składzie trawionych produktów zaobserwowano w wyniku działania mikroflory jelitowej zarówno w przypadku oznaczania ogólnej sumy polifenoli oraz aktywności antyoksydacyjnej. Charakter tych zmian uzależniony był od rodzaju produktu oraz od zastosowanej wcześniej obróbki technologicznej surowca. Zmiany naturalnych antyoksydantów w oznaczanych produktach związane były również z warunkami panującymi na poszczególnych etapach modelu przewodu pokarmowego.

Wyniki uzyskane podczas realizacji projektu przedstawiono w publikacjach (B.1.1., B.1.4., B.2.2. i B.2.6) oraz w komunikatach naukowych na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych (B.7.8., B.7.23., B.7.26., B.7.27., B.7.30.). Ponadto wynikiem współpracy w w/w zespole była publikacja przeglądowa pt. Modele przewodu pokarmowego *in vitro* do badań nad biodostępnością składników odżywczych (B.3.1.).

Opracowany warsztat badawczy wykorzystałam do rozwoju dalszych moich zainteresowań dotyczących bakterii probiotycznych i ich interakcji z *Helicobacter pylori*. Nawiązałam międzynarodową współpracę z Profesor Teresa Alarcon z *Department of Microbiology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP), Madrid, Departament of Preventive Medicine, Public Health and Microbiology, Medicial School, Autonoumos University of Madrid*, która zaowocowała obiecującymi wynikami dotyczącymi hamującego działania szczepów bakterii potencjalnie probiotycznych wobec klinicznych szczepów *Helicobacter pylori* pobranych od pacjentów szpitala w Hiszpanii. Wyniki prezentowano na konferencjach krajowych i międzynarodowych (B.7.20., B.7.50., B.7.51., B.7.54, B.7.55.).

4.4. Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego:

Mój całkowity dorobek naukowy wg punktacji MNiSW wynosi 411 punkty. Sumaryczny Impact Factor (IF) dla opublikowanych przeze mnie prac wynosi 9,769. Liczba cytowań wg bazy Web of Science – 38, Index Hirscha – 3.

Dotychczas opublikowałam 106 prac, z czego 91 po uzyskaniu stopnia doktora. Na mój dorobek składa się:

- 23 (20 po doktoracie) oryginalnych prac twórczych (w tym 6 z IF, pozostałe znajdują się w wykazie czasopism punktowanych - część B, opublikowanym w Komunikacie MNiSW z dnia 09.12.2016),
- 2 artykuły przeglądowe,
- rozdziały: w monografiach - 2 i w podręcznikach akademickich -4 (w recenzowanym wydawnictwie zbiorowym pod nr ISBN),
- 3 prace opublikowane w całości w materiałach konferencyjnych,
- 3 artykuły popularnonaukowe
- 67 komunikatów konferencyjnych (w tym 36 na konferencjach o zasięgu międzynarodowym),
- 2 opracowania z realizacji projektów badawczych.

Uczestniczyłam w 23 międzynarodowych i 31 krajowych konferencjach i sympozjach naukowych, na których wygłosiłam 3 referaty.



Poznań, dnia 24.04.2017 r.