

## **ZAŁĄCZNIK 2**

Dr inż. Barbara Stachowiak  
Zakład Fermentacji i Biosyntezy  
Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

# **AUTOREFERAT**

## **dotyczący działalności naukowo-badawczej**

**Poznań 2014**

**1. Imię i nazwisko:** Barbara Stachowiak

**2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:**

- magister inżynier technologii żywności, specjalizacja: biotechnologia i mikrobiologia żywności, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, 31 maj 1996 rok
  - tytuł pracy magisterskiej: „Przebieg fermentacji propionowej w układzie z komórkami immobilizowanymi w alginianie i jej wpływ na właściwości mechaniczne żelu”
  - promotor: prof. dr hab. Krystyna Trojanowska
- doktor nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, specjalność: biotechnologia i mikrobiologia żywności, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, 10 maj 2001 rok
  - tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka właściwości fungistatycznych kompostów łubinowych”
  - promotor: prof. dr hab. Krystyna Trojanowska

**3. Przebieg pracy zawodowej:**

- od 01.06.2001 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 cykl pięciu publikacji naukowych (1 artykuł przeglądowy i 4 oryginalne prace twórcze) ujętych pod wspólnym tytułem:

**„Synteza astaksantyny przez drożdże *Xanthophyllomyces dendrorhous* i ich mutanty na podłożach przygotowanych w oparciu o ekstrakty roślinne i przy różnym natężeniu oświetlenia”**

- (1) **Stachowiak B.**, Czarnecki Z. (2006): Drożdże *Phaffia rhodozyma* jako potencjalne źródło naturalnej astaksantyny. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2,(47), 17-28 (15 pkt. MNiSW).
  - (2) **Stachowiak B.** (2013): Efficiency of selected mutagens in generating *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains hyperproducing astaxanthin. *Polish Journal of Microbiology*, 62, (1), 67-72, (IF<sub>2013</sub>=0,871; 15 pkt. MNiSW).
  - (3) **Stachowiak B.** (2012): Astaxanthin synthesis by yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its mutants on media based on plant extracts. *Indian Journal of Microbiology*, 52, (4), 654-659 (IF<sub>2012</sub>=0,457; 15 pkt. MNiSW).
  - (4) **Stachowiak B.** (2013): Effect of illumination intensities on astaxanthin synthesis by *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its mutants. *Food Science and Biotechnology*, 22, (4), 1033-1038, (IF<sub>2013</sub>=0,656; 15 pkt. MNiSW).
  - (5) **Stachowiak B.** (2014): Astaxanthin synthesis by *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its mutants on carrot extract medium under different illumination intensity. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50, (5), 471-476, (IF<sub>5-letni</sub>=0,656; 15 pkt. MNiSW).
- Sumaryczny IF – 2,64
  - Punkty MNiSW – 75

Punkty za publikacje naliczono zgodnie komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 17 grudnia 2013 roku w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach.

Wkład wnioskodawcy w w/w publikacje obejmuje: autorstwo hipotez i koncepcji badań, wykonanie doświadczeń i oznaczeń, analizę i opracowanie wyników oraz napisanie i redakcję manuskryptów (w przypadku publikacji (1) załączono oświadczenie współautora).

## 4.2. Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników wskazanego osiągnięcia

### 4.2.1. Wprowadzenie

Astaksantyna – 3,3'-dihydroksy-β,β-karoten-4,4'-dion – należy do grupy barwników karotenoidowych. Jest ksantofilem o wzorze sumarycznym C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub> i masie cząsteczkowej 596,84 Da. Barwnik ten został po raz pierwszy wyizolowany z homarów w 1938 roku.

Komersyjne wykorzystanie astaksantyny wiąże się przede wszystkim z przemysłem paszowym. W chwili obecnej, jest ona najważniejszym i najdroższym, obok kantaksantyny, barwnikiem stosowanym w akwakulturze. Roczna sprzedaż astaksantyny na światowym rynku wynosi 257 mln dolarów, co stanowi ¼ wartości całego rynku karotenoidów. Astaksantyna znajduje największe zastosowanie w przemysłowym żywieniu ryb łososiowatych i krewetek, gwarantując charakterystyczne wybarwienie ich tkanek (zwierzęta nie syntetyzują astaksantyny *de novo*) i wpływając tym samym na preferencje konsumenckie.

Barwnik ten jest również niezbędnym składnikiem pokarmu dla rybek akwariowych i dla dużych ryb ozdobnych. Badania naukowe wskazują, że astaksantyna korzystnie wpływa na wybarwienie żółtka jaja oraz skóry i tkanki mięsnej tuszek brojlerów.

W akwakulturze wykorzystywana jest przede wszystkim astaksantyna syntetyczna, która stanowi 95% rynku. W krajach Unii Europejskiej posiada ona numer rejestracyjny E 161j. Koszt produkcji 1 kg syntetycznej astaksantyny szacowany jest na około 1 000 dolarów, natomiast rynkowa wartość przekracza 2 000 dolarów. Jak dotąd synteza chemiczna jest najtańszą metodą pozyskiwania tego barwnika na skalę przemysłową.

Atrakcyjność komercyjna astaksantyny wiąże się również z jej wyjątkowym potencjałem przeciwutleniającym wynikającym z budowy molekularnej. Podobnie jak większość karotenoidów, astaksantyna ma postać polienowego łańcucha węglowego. Na obu jego końcach znajdują się sześciocłonowe pierścienie benzoidowe z dwoma polarnymi podstawnikami: grupą hydroksylową przy węglu C3 (węgiel asymetryczny) i karbonylową przy węglu C4. Obecność dwóch grup polarnych wyróżnia astaksantynę wśród innych karotenoidów, a jednocześnie nadaje jej unikalne właściwości. Dzięki strukturze: polarno-niepolarno-polarnej astaksantyna chroni całą komórkę – potrafi wpasować hydrofobowy polienowy łańcuch węglowy wewnątrz dwuwarstwowej lipidowej błony komórkowej, a jej terminalne polarne pierścienie mogą być umiejscowione wewnątrz błony lub blisko jej powierzchni. Wykazano wysoką skuteczność astaksantyny w ochronie błon fosfolipidowych i lipidów przed peroksydacją. Dane literaturowe wskazują, że jej przeciwutleniająca aktywność jest 10-krotnie wyższa w porównaniu z innymi karotenoidami, takimi jak zeaksantyna, luteina, kantaksantyna i  $\beta$ -karoten oraz 500-krotnie w porównaniu z witaminą E. Z uwagi na udokumentowane właściwości przeciwutleniające i związane z tym korzyści zdrowotne, jest ona proponowana jako suplement diety w profilaktyce wielu chorób, których podłożem jest stres oksydacyjny. Stanowi też bioaktywny komponent kosmetyków. W branży farmaceutycznej i kosmetycznej zastosowanie znajduje tylko astaksantyna z systemów naturalnych.

Z uwagi na potencjał przeciwutleniający, a także atrakcyjną barwę, astaksantyna budzi duże zainteresowanie również wśród producentów żywności. Jednak na mocy obowiązującego w Unii Europejskiej ROZPORZĄDZENIA PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY (WE) nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności, zabrania się wprowadzania do żywności astaksantyny syntetycznej. Także w Stanach Zjednoczonych nie ma ona statusu GRAS (ang. generally recognised as safe). Przyczyną tych restrykcji prawnych jest fakt, że astaksantyna syntetyczna różni się od naturalnej. Ta ostatnia, występuje głównie w formie *trans* (3S,3'S) i (3R,3'R), podczas gdy uzyskana na drodze syntezy chemicznej, jest mieszaniną stereoizomerów (3R,3'R), (3R,3'S) i (3S, 3'S) w proporcji 1:2:1. Diastereoizomery astaksantyny różnią się właściwościami fizykochemicznymi, biologicznymi i biodostępnością. Istnieją zatem obawy dotyczące szkodliwego wpływu syntetycznej astaksantyny na zdrowie człowieka i na środowisko. Również konsumenci preferują produkty naturalne, bądź zawierające dodatki naturalne.

Podstawowym źródłem naturalnej astaksantyny na rynku są słodkowodne mikroalgi *Hematococcus pluvialis*. Gromadzą one do 4% tego barwnika w suchej biomacie. Jest to najwyższa koncentracja astaksantyny spotykana w Naturze. Jednak hodowla mikroalg wymaga obecności światła, jest kosztowna, czasochłonna i skomplikowana (np. *H. pluvialis* gromadzą astaksantynę jedynie w warunkach stresu środowiskowego), dodatkowo w systemach otwartych (stawach) jest narażona na kontaminację. Cena 1 kg astaksantyny z *H. pluvialis* to kwota 6 000 - 7 000 dolarów. Wchodzi ona w skład nielicznych preparatów witaminowych, suplementów diety i kremów ochronnych.

Astaksantyna z mikroalg *H. pluvialis* produkowana jest w Stanach Zjednoczonych, Japonii i Indiach. Najważniejszy producent astaksantyny naturalnej z alg - Cyanotech Corporation (Kona, Hawaia) - wskazuje, że dzienna dawka astaksantyny już na poziomie 4 mg, chroni organizm ludzki przed stresem oksydacyjnym, przy czym za dawkę maksymalną uznaje się 12 mg na dobę.

Za potencjalne przemysłowe źródło astaksantyny naturalnej uznawane są czerwone drożdże *Xanthophyllomyces dendrorhous* (stan anamorficzny *Phaffia rhodozyma*). Zostały one szeroko przebadane od momentu ich izolacji w 1969 roku. Jednak pomimo znacznych osiągnięć w tym zakresie, do dzisiaj nie udało się opracować ekonomicznie atrakcyjnej metody pozyskiwania astaksantyny z ich udziałem.

Teoretycznie pod względem technologicznym i ekonomicznym *X. dendrorhous* wykazują szereg zalet. Przede wszystkim astaksantyna jest głównym karotenoidem przez nie produkowanym (stanowi 85-90% ogółu syntetyzowanych barwników). Są one znacznie łatwiejsze i tańsze w hodowli w porównaniu z *H. pluvialis*, m.in. asymilują szeroką gamę substratów węglowych zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych (dobór podłoża hodowlanego nie nastrocza problemów), szybciej rosną, a podczas hodowli w fermentorach można uzyskać wysoki plon biomasy. Wśród zalet, wymienia się często tę, że synteza astaksantyny przez *X. dendrorhous* nie jest związana z obecnością światła. Problem ten nie jest jednak do końca wyjaśniony. Nieliczne prace z tego zakresu wyraźnie wskazują, że tzw. umiarkowane natężenia oświetlenia może istotnie poprawić wydajność produkcji barwnika przez te drożdże. Brak natomiast precyzyjnych informacji, jakie konkretnie wartości natężenia oświetlenia stymulują karotenogenezę u *X. dendrorhous*.

Podstawową przeszkodą w wykorzystaniu *X. dendrorhous* jako źródła astaksantyny dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego jest z pewnością niski poziom jej syntezy przez szczepy dzikie, który wynosi 0,2-0,4 g/kg s.s. Jest to 10-krotnie mniej niż w przypadku alg *H. pluvialis* hodowanych przemysłowo. Szacuje się, że pozyskanie szczepów drożdży *X. dendrorhous* zdolnych do syntezy astaksantyny na poziomie 5-10-krotnie wyższym niż w przypadku szczepów dzikich, może znacznie obniżyć koszty wytwarzania preparatów naturalnej astaksantyny, a tym samym jej cenę rynkową.

Szczepy *X. dendrorhous* nadprodukuje astaksantynę pozyskiwane są najczęściej poprzez wywołanie mutacji punktowych u szczepów dzikich z zastosowaniem typowych czynników mutagennych lub na drodze inżynierii genetycznej poprzez tworzenie rekombinantów,

zdolnych do syntezy tego barwnika. Ten ostatni kierunek badawczy ma raczej charakter poznawczy (otrzymane rekombinanty bardzo często słabo rosną). Natomiast na drodze mutagenizacji udało się pozyskać kilka mutantów ze spektakularną wydajnością astaksantyny (nawet do 10 g/kg s.s.). Lecz podobnie jak w przypadku rekombinantów syntetyzujących astaksantynę, powszechnym problemem jest ich słaby wzrost na standardowych podłożach laboratoryjnych, a także brak stabilności (częste rewersje). Stąd zwykle nie znajdują one zastosowania przemysłowego, choć sposób ich pozyskiwania jest często przedmiotem patentów.

Jedną z proponowanych możliwości obniżenia kosztów pozyskiwania astaksantyny z udziałem drożdży *X. dendrorhous*, jak również ich mutantów, jest dobór taniego podłoża wzrostowego. Wielkie nadzieje budzi możliwość wykorzystania naturalnych podłoży przygotowanych na bazie wyciągów roślinnych lub uciążliwych odpadów rolno-spożywczych. Obiecującym pomysłem jest również wprowadzenie do podłoży wzrostowych dla *X. dendrorhous* i ich mutantów grzybowych płynów pohodowlanych oraz ekstraktów roślinnych. Podłoża takie, choć ich skład jest zmienny (nie jest wystandaryzowany), często są źródłem niezidentyfikowanych substancji wzrostowych i prekursorów astaksantyny.

W ostatnich latach w opinii naukowców zaczął dominować pogląd, że to czynniki środowiskowe, obecne w naturalnym środowisku bytowania *X. dendrorhous* odgrywają najważniejszą rolę w karotenogenezie u tych drożdży. Zasiedlają one specyficzną niszę ekologiczną. Izolowane są niemal wyłącznie z bogatych w cukry wydzielin drzew liściastych, rosnących w chłodnych regionach wysokogórskich. Koegzystują tam z różnymi gatunkami grzybów strzępkowych, często zaliczanych do fitopatogenów. W środowisku tym narażone są na silny stres oksydacyjny, związany głównie z ekspozycją na światło słoneczne, będące źródłem promieni UV, które na poziomie komórki promują tworzenie wolnych rodników, odpowiedzialnych za niszczenie struktur komórkowych. Ponadto soki wypływające po ścięciu drzewa zawierają związki, które katalizują tworzenie się tlenu singletowego podczas ekspozycji na światło UV. Źródłem wolnych rodników tlenowych mogą być również fitopatogenne grzyby tworzące w środowisku naturalnym konsorcja razem z *P. rhodozyma*. Fitopatogenna aktywność tych grzybów jest związana z obecnością oksydacyjnych enzymów, które degradują ścianę komórkową roślin. Proces ten generuje reaktywne formy tlenu - ROS (ang. reactive oxygen species ), takie jak  $H_2O_2$  i  $^1O_2$ .

Fizjologiczną rolę komórkowych karotenoidów jest ochrona mikroorganizmów przed szkodliwym działaniem ROS. Jak wspomniano wyżej, generatorem ROS jest światło. Pojawia się zatem pytanie o rzeczywistą rolę światła w karotenogenezie u *X. dendrorhous*, gdyż jak wspomniano wyżej, nie została ona dotąd wyjaśniona.

Więcej informacji wskazujących na *X. dendrorhous* jako na potencjalne przemysłowe źródło astaksantyny, a także zasadność podjęcia przez habilitantkę tej tematyki badawczej przedstawiono w pracy:

**Stachowiak B.**, Czarnecki Z. (2006): Drożdże *Phaffia rhodozyma* jako potencjalne źródło naturalnej astaksantyny. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2,(47), 17-28.

#### 4.2.2. Cel badań i hipoteza badawcza

Głównym celem pracy było pozyskanie stabilnych szczepów drożdży *X. dendrorhous* nadprodukujących astaksantynę oraz opracowanie warunków ich hodowli intensyfikujących produkcję barwnika. W związku z powyższym, postawiono następujące **hipotezy badawcze**:

- (1) Na drodze mutagenizacji dzikich drożdży *X. dendrorhous* można uzyskać stabilne mutanty nadprodukujące astaksantynę,
- (2) Zastosowanie podłoży przygotowanych na bazie ekstraktów roślinnych do hodowli drożdży *X. dendrorhous* i ich mutantów może poprawić poziom syntezy astaksantyny,
- (3) Zastosowanie odpowiedniego natężenia oświetlenia podczas hodowli drożdży *X. dendrorhous* i ich mutantów może intensyfikować syntezę ataksantyny.

Weryfikacja poszczególnych hipotez obejmowała:

##### **Ad. (1)**

Przeprowadzenie mutacji szczepu *X. dendrorhous* DSM 5626 z udziałem promieniowania UV, benomylu, metylosulfonianu etylu i bromku etydy, następnie izolację szczepów potencjalnie nadprodukujących astaksantynę i ocenę poziomu syntezy astaksantyny u izolatów, ocenę stabilności fenotypowej wyselekcjonowanych szczepów (poziomu produkcji barwnika i wydajności biomasy), i selekcję stabilnych szczepów-mutantów nadprodukujących astaksantynę do dalszych badań.

##### **Ad. (2)**

Przeprowadzenie hodowli wyselekcjonowanych mutantów na podłożach przygotowanych w oparciu o wyciągi roślinne: ziemniaczanym, marchwiowym i słodowym, ocenę parametrów wzrostu i poziomu syntezy astaksantyny i na tej podstawie wskazanie podłoża intensyfikującego produkcję barwnika przez *X. dendrorhous* DSM 5626 i wyselekcjonowane mutanty.

##### **Ad. (3)**

Przeprowadzenie hodowli *X. dendrorhous* DSM 5626 i wyselekcjonowanych mutantów na podłożach: kontrolnym (YM) i wytypowanym w poprzednim, tj. (2) etapie badań, przy natężeniu oświetlenia w zakresie 0 - 5 000 lx, ocenę parametrów wzrostu i poziomu syntezy astaksantyny i na tej podstawie wskazanie natężenia oświetlenia intensyfikującego syntezę astaksantyny przez szczep *X. dendrorhous* DSM 5626 i wyselekcjonowane mutanty.

### 4.2.3. Wyniki

Na poszczególnych etapach realizacji pracy prowadzono hodowle płynne drożdży *Xanthophyllomyces dendrorhous* DSM 5626 i ich mutantów na podłożu YM (kontrola) i podłożach przygotowanych na bazie wyciągów roślinnych oraz przy różnym natężeniu oświetlenia (zakres 0 - 5 000 lx).

W prowadzonych hodowlach, o ile nie zaznaczono inaczej, zachowano stałe następujące warunki hodowli: naczynie hodowlane – kolbka Erlenmayera poj. 250 mL (objętość robocza hodowli - 80 mL, w tym 5% inokulum); pH podłoża hodowlanego - 5,0; temperatura – 22°C; czas hodowli - 120 godzin; obroty - 200 rpm, natężenie oświetlenia – 600 lx. Pozostałe warunki hodowli oraz wszystkie zmiany w/w parametrów hodowli podano poniżej, w części metodycznej, oddzielnie dla poszczególnych etapów doświadczeń.

W zakończonych hodowlach kontrolowano następujące parametry: wydajność biomasy (g s.s./L) oraz komórkową (g/kg s.s.) i objętościową (mg/L) wydajność karotenoidów ogółem i astaksantyny. W hodowlach na podłożach roślinnych kontrolowano poziom zużycia cukrów oraz wyznaczano współczynnik wydajności biomasy z substratu  $Y_{X/S}$ .

#### Ad. (1)

#### **Pozyskanie szczepów drożdży *X. dendrorhous* nadprodukujących astaksantynę na drodze mutagenizacji**

**Materiał i metodyka:** W pierwszym etapie badań podjęto próbę pozyskania szczepów nadprodukujących astaksantynę na drodze mutagenizacji. W badaniach wykorzystano szczep drożdży *Xanthophyllomyces dendrorhous* DSM 5626 (szczep rodzicielski) z niemieckiej kolekcji DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen). Szczep ten hodowano na stałym i płynnym podłożu YM (1% glukoza; 0,5% pepton; 0,3% ekstrakt drożdżowy; 0,3% ekstrakt słodowy i 2% agar w celu zestalenia podłoża).

Przeprowadzono mutacje *Xanthophyllomyces dendrorhous* DSM 5626 z udziałem następujących mutagenów: promieniowania UV ( $\lambda = 254$  nm), benomylu, metanosulfonianu etylu (EMS) oraz bromku etyldyny. Po przeprowadzeniu mutacji, hodowle płytkowe inkubowano w temperaturze 22°C, przy natężeniu oświetlenia 600 lx przez 14 dni. Po tym czasie wzrokowo oceniano barwę i intensywność zabarwienia wyrostłych kolonii. Na skosy agarowe wysiewano/izolowano szczepy o barwie kolonii intensywnie różowej, malinowej i bordowej, a więc potencjalnie zdolne do nadprodukcji astaksantyny. Po 10 dniach inkubacji, przeprowadzono hodowle płynne w celu oceny poziomu syntezy astaksantyny. Szczepy nadprodukujące barwnik w porównaniu ze szczepem rodzicielskim, pasażowano przez skosy agarowe YM w odstępach 4-tygodniowych. Dla każdego pasaży przeprowadzono hodowle płynne. Za stabilne szczepy uznano te, u których podczas kolejnych pasaży nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy kontrolowanymi parametrami.

**Wyniki:** Spośród przebadanych mutagenów najbardziej skuteczny w pozyskiwaniu szczepów nadprodukujących astaksantynę okazał się benomyl. Mutacje z jego udziałem wygenerowały pięć stabilnych szczepów, które produkowały astaksantynę na poziomie 0,28-



0,39 g/kg s.s. tj. 50-100% więcej niż szczep rodzicielski. Wykorzystanie EMSu do mutacji *X. dendrorhous* DSM 5626 w badaniach własnych zakończyło się niepowodzeniem ze względu na brak wzrostu potencjalnie wysokopigmentujących izolatów na skosach agarowych. W przypadku promieniowania UV, otrzymano jeden stabilny szczep 26UV produkujący astaksantynę na poziomie istotnie wyższym niż szczep rodzicielski. W efekcie mutacji z bromkiem etyldyny na podłożu z dodatkiem mutagenu obserwowano dużą ilość drobniotkich kolonii o barwie ciemnoróżowej i bordowej. Izolacje z nich wykonane, w większości przypadków nie powiodły się – szczepy nie rosły na skosach. W rezultacie otrzymano tylko dwa stabilne szczepy nadprodukujące astaksantynę w porównaniu ze szczepem rodzicielskim: 9BE i 10BE.

Biorąc pod uwagę stabilność izolatów oraz poziom produkcji astaksantyny, do dalszych etapów badań nad wpływem składu podłoża i natężenia oświetlenia na parametry wzrostu i produkcję astaksantyny wybrano cztery szczepy: 10BE, 13B, 26UV i 34B. U wyselekcjonowanych szczepów komórkowa wydajność barwnika wynosiła 0,34-0,39 g/kg s.s., a objętościowa - 1,69-2,42 mg astaksantyny/L (Tab. 1a). A zatem nadprodukcja barwnika u wymienionych mutantów w odniesieniu do szczepu rodzicielskiego wynosiła 80-100% w przeliczeniu na suchą substancję komórkową i 80-200% w przeliczeniu na jednostkę objętości hodowli (1L). Wyniki te nie odbiegają od danych literaturowych. W efekcie mutacji jednokrotnych, z udziałem jednego mutagenu, a więc takich, jakie przeprowadzono w doświadczeniach własnych, najczęściej uzyskuje się mutanty produkujące 50-200% więcej astaksantyny niż szczep rodzicielski. Warto jednak nadmienić, że w literaturze naukowej spotykane są znaczące różnice w wartościach liczbowych wydajności astaksantyny w obrębie tych samych szczepów *X. dendrorhous* i ich mutantów, hodowanych w tych samych warunkach. Wynikają one z zastosowanej metody oznaczania karotenoidów.

W badaniach własnych do ilościowych oznaczeń karotenoidów i astaksantyny zastosowano metodę HPLC, podczas gdy w badaniach naukowych często oznaczenia te wykonuje się spektrofotometrycznie w oparciu o wartość molowego współczynnika absorpcji 1 600 zaproponowaną przez Jonhsona i Lewisa w 1979 roku [Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* 115, 173-183, 1979] dla 1% (w/v) roztworu astaksantyny w acetonie w 1 cm kuwecie. W niektórych pracach stosowana jest również wartość 2 100, którą wyznaczono na podstawie pomiaru absorbancji standardu astaksantyny syntetycznej firmy Hoffman-La Roche. Według pomiarów własnych, wartość molowego współczynnika absorpcji dla 1% roztworu astaksantyny w heksanie frakcja z nafty, który stosowano jako rozpuszczalnik karotenoidów, wynosi 3 100. A zatem w niektórych przypadkach, porównując wyniki literaturowe z własnymi, należy te ostatnie pomnożyć przez wartość 3 100/1 600 (1,94) lub 3 100/2 100 (1,5), co wynika z różnic we współczynnikach absorpcji stosowanych rozpuszczalników. Stąd poziom koncentracji astaksantyny w komórkach mutantów otrzymanych w badaniach własnych po uwzględnieniu np. wartości (1,94) wynosi 0,55-0,76 g/kg. s.s.(Tab. 1a).

**Publikacja:** Stachowiak B. (2013): Efficiency of selected mutagens in generating *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains hyperproducing astaxanthin. *Polish Journal of Microbiology*, 62, (1), 67-72.

Tabela 1a. Wzrost i produkcja karotenoidów przez *X. dendrorhous* DSM 5626 i wyselekcjonowane mutanty w hodowlach na podłożu YM i przy natężeniu oświetlenia 600 lx

	DSM 5626	10BE	13B	26UV	34B
Sucha substancja [g/L]	4,95	3,57	3,80	3,60	4,43
Karotenoidy [mg/L]:					
- ogółem	1,03	1,34	1,57	1,36	1,62
- astaksantyna	0,93/1,83*	1,26/2,43*	1,49/2,89*	1,29/2,52*	1,51/2,92*
Karotenoidy [g/kg s.s.]:					
- ogółem	0,21	0,37	0,41	0,38	0,37
- astaksantyna	0,19/0,37*	0,35/0,68*	0,39/0,76*	0,36/0,70*	0,34/0,66*
Astaksantyna [%]	92	94	95	95	93

Tabela 1b. Wzrost i produkcja karotenoidów przez *X. dendrorhous* DSM 5626 i wyselekcjonowane do dalszych badań mutanty w hodowlach na podłożu M i przy natężeniu oświetlenia 600 lx

	DSM 5626	10BE	13B	26UV	34B
Sucha substancja [g/L]	5,57	5,23	5,33	4,97	5,2
Karotenoidy [mg/L]:					
- ogółem	2,05	2,48	2,25	1,79	2,55
- astaksantyna	1,51/2,93*	2,42/4,69*	2,09/4,05*	1,69/3,28*	2,30/4,46*
Karotenoidy [g/kg s.s.]:					
- ogółem	0,37	0,47	0,42	0,36	0,49
- astaksantyna	0,27/0,52*	0,46/0,89*	0,39/0,76*	0,34/0,66*	0,44/0,85*
Astaksantyna [%]	73	98	93	94	90

\*wynik po uwzględnieniu współczynnika (1,94). W powyższej tabeli wykorzystano wybrane wyniki z następujących publikacji:

**Stachowiak B.** (2013): Efficiency of selected mutagens in generating *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains hyperproducing astaxanthin. Polish Journal of Microbiology, 62, (1), 67-72 (Tab. 1a) oraz

**Stachowiak B.** (2012): Astaxanthin synthesis by yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its mutants on media based on plant extracts. Indian Journal of Microbiology, 52, (4), 654-659 (Tab. 1b).

## Ad. (2)

### Wpływ składu podłoża hodowlanego przygotowanego na bazie wyciągów roślinnych na wzrost i syntezę astaksantyny przez *X. dendrorhous* i wyselekcjonowane mutanty

**Materiał i metodyka:** W tym etapie pracy oceniono wzrost i wydajność produkcji astaksantyny przez drożdże *Xanthophyllomyces dendrorhous* DSM 5626 (szczep rodzicielski - kontrola) i wyselekcjonowane szczepy-mutanty: 10BE, 13B, 26UV i 34B (Tab. 1a) w hodowlach na podłożach testowych, przygotowanych na bazie wyciągów roślinnych: ziemniaczanym (PDA), marchwiowym (M) i rozcieńczonej brzeczce ze słodu jęczmiennego (B). Rośliny, z których przygotowano wyciągi są powszechnie uprawiane w Polsce.

**Wyniki:** Spośród podłoży testowych, podłoże M najbardziej sprzyjało produkcji karotenoidów przez badane szczepy drożdży. W hodowlach na tym podłożu uzyskano najwyższą objętościową i komórkową wydajność astaksantyny dla czterech spośród pięciu badanych szczepów drożdży: rodzicielskiego oraz 10BE, 13B i 34B. Najwięcej astaksantyny produkowały 10BE i 34B, odpowiednio 2,42 mg/L i 0,46 g/kg s.s. oraz 2,30 mg/L i 0,44 g/kg s.s. W hodowlach na tym podłożu dla wszystkich szczepów odnotowano również najwyższy udział astaksantyny wśród ogółu produkowanych przez nie karotenoidów.

Wydajność biomasy w hodowlach na podłożu M nie różniła się istotnie pomiędzy badanymi szczepami i pozostawała na poziomie około 5 g s.s./L. Nie stwierdzono również istotnych różnic wartości współczynnika  $Y_{X/S}$  pomiędzy szczepami (pozostawały na poziomie 0,34-0,38).

Należy zaznaczyć, że najwyższy plon biomasy komórkowej w przypadku wszystkich szczepów drożdży odnotowano w hodowlach na podłożu B. Jednocześnie w hodowlach tych odnotowano najniższe współczynniki  $Y_{X/S}$  i bardzo niską komórkową wydajność astaksantyny. W efekcie również objętościowa wydajność barwnika dla większości badanych szczepów była bardzo niska.

Niskie wartości współczynników  $Y_{X/S}$  należy wiązać prawdopodobnie z obecnością w podłożu B bardziej złożonych substratów węglowodanowych w porównaniu z podłożem M i PDA.

W podłożu B maltoza, maltotrioza i dekstryny stanowiły aż 85% wśród ogółu oznaczonych węglowodanów. W podłożu tym obecna była również glukoza i fruktoza. Łączna zawartość cukrów wynosiła 60 g/L. Po zakończeniu hodowli, w przypadku wszystkich badanych szczepów drożdży, stwierdzono brak zużycia fruktozy oraz niemal całkowite zużycie maltozy (92-98%). Poziom wykorzystania maltotriozy i dekstryn zależało od szczepu i wynosiło 26-72%. W hodowlach wszystkich drożdży odnotowano wzrost zawartości glukozy. Ten zaskakujący fakt wskazuje, że podczas asymilacji glukozy, która jest priorytetowym źródłem węgla dla badanych drożdży, ma prawdopodobnie miejsce hydroliza maltozy i maltotriozy do glukozy lub, że cukry te są degradowane przed asymilacją glukozy. Przypuszczalnie proces ten wymaga dodatkowego nakładu energii metabolicznej.

Podłoża M i PDA zawierały przede wszystkim glukozę oraz niewielką ilość fruktozy. W podłożu M stwierdzono ponadto obecność sacharozy. Łączna zawartość cukrów w podłożu M wynosiła 15 g/L, a w podłożu PDA -12,5 g/L. Cukry te zostały całkowicie wykorzystane przez wszystkie badane szczepy drożdży podczas hodowli.

Z kolei czynnikiem ograniczającym syntezę karotenoidów, w tym astaksantyny w hodowlach na podłożu B, u wszystkich badanych szczepów drożdży jest prawdopodobnie wysoka koncentracja cukrów w podłożu B. *X. dendrorhous* są Crabtree (+) - zahamowanie metabolizmu tlenowego ma miejsce przy 5% stężeniu glukozy w podłożu hodowlanym (stężenie cukrów w podłożu B było na poziomie 6%). Dane literaturowe wskazują, że wysokie stężenie cukrów ogranicza komórkową wydajność astaksantyny. Kluczową rolę w procesie syntezy tego barwnika odgrywa tlen. W warunkach wzrostu ciśnienia osmotycznego utrudniony zostaje transport komórkowy, w tym również transport tlenu do wnętrza komórki.

Podsumowując, podłoże marchwiowe najlepiej spośród testowanych, stymulowało syntezę astaksantyny przez badane drożdże. Na podłożu tym odnotowano również dobry wzrost zarówno szczepu rodzicielskiego, jak i jego mutantów. W tym kontekście, podłoże marchwiowe okazało się również bardziej korzystne dla badanych szczepów drożdży niż standardowo stosowane do hodowli *X. dendrorhous* podłoże YM. W hodowlach na podłożu

marchwiowym uzyskano wyższy niż na podłożu YM, plon biomasy w przypadku wszystkich drożdży - dla szczepu rodzicielskiego o 12%, dla mutantów w na poziomie 17-46%. Było to bezpośrednio związane ze wzrostem objętościowej wydajności astaksantyny o 30 do ponad 90% w zależności od szczepu (Tab. 1a i 1b). Podłoże M może zawierać prekursorzy syntezy astaksantyny. Zostało ono przygotowane na bazie wyciągu marchwiowego (marchew był gotowana przez 1h). Do produktów termicznej degradacji karotenoidów należą: cis-izomery, epoksydy czy związki o skróconym łańcuchu, tzw. apokarotenoidy. W pewnych przypadkach mogą to być związki lotne. Niektóre z nich są słabo rozpuszczalne w wodzie (np. apokarotenoidy), mogą penetrować do komórki i stymulować syntezę barwnika. Do prekursorów syntezy karotenoidów należy kwas mewalonowy i izoprenoidy. Obecność tych związków w podłożu hodowlanym stymuluje produkcję astaksantyny. Dane literaturowe wskazują, że podobną rolę pełnią karotenoidy występujące na wcześniejszych etapach szlaku syntezy tego barwnika. Z drugiej strony pozostałe składniki obecne w ekstrakcie marchwiowym mogą zwyczajnie wpływać na dobrą kondycję komórek drożdży i w ten sposób intensyfikować ich aktywność metaboliczną. Marchew obok karotenoidów (gł.  $\beta$ - i  $\alpha$ -karotenu) , jest również źródłem witamin: B1, B2, C i PP i soli mineralnych, głównie potasu, wapnia, fosforu, magnezu.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty, można rekomendować podłoże M jako korzystne dla wzrostu i syntezy astaksantyny u badanych szczepów drożdży. Należy również zaznaczyć, że jest to podłoże tańsze w porównaniu z podłożem YM.

**Publikacja:** Stachowiak B. (2012): Astaxanthin synthesis by yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its mutants on media based on plant extracts. Indian Journal of Microbiology, 52, (4), 654-659.

### **Ad.(3)**

#### **Wpływ oświetlenia na wzrost i syntezę astaksantyny przez *X. dendrorhous* i wyselekcjonowane mutanty**

**Materiał i metodyka:** Przeprowadzono hodowle *Xanthophyllomyces dendrorhous* DSM 5626 i wyselekcjonowanych szczepów-mutantów: 26UV, 10BE, 13B, 34B przy natężeniu oświetlenia w zakresie 0 - 5 000 lx. Drożdże hodowano na kontrolnym podłożu YM i podłożu M. Po zakończeniu hodowli kontrolowano w/w parametry. Zebrane dane wykorzystano do konstrukcji modeli regresji w postaci funkcji wielomianowych opisujących wpływ intensywności naświetlania na kontrolowane parametry hodowli. Wyznaczone modele poddano weryfikacji eksperymentalnej.

**Wyniki:** Natężenie światła miało istotny wpływ na wzrost i produkcję astaksantyny u *X. dendrorhous* 5626, jak i jego mutantów bez względu na skład podłoża wzrostowego ( $p>0,05$ ).

W hodowlach na podłożu YM prowadzonych przy 0 - 600 lx, dla wszystkich badanych szczepów drożdży, wydajność biomasy oraz objętościowa i komórkowa wydajność astaksantyny wzrastała wraz ze wzrostem natężenia oświetlenia. Wzrost natężenia oświetlenia powyżej 600 lx prowadził do obniżenia się wartości tych parametrów. Natężenie

oświetlenia 5 000 lx silnie hamowało wzrost badanych drożdży i syntezę barwnika, a dla szczepu rodzicielskiego oraz 10BE, 13B i 26UV, okazało się letalne.

W hodowlach na podłożu M najlepszy wzrost badanych szczepów drożdży odnotowano przy natężeniu oświetlenia 600 - 2 000 lx. Podobnie jak w przypadku podłoża YM, natężenie oświetlenia 5 000 lx okazało się letalne dla większości szczepów: rodzicielskiego oraz 10BE i 13B.

W hodowlach mutantów koncentracja astaksantyny w komórkach drożdży i jej wydajność objętościowa, początkowo zwiększały się wraz ze wzrostem natężenia oświetlenia, osiągając maksymalny poziom przy 600 lub 1 000 lx, w zależności od szczepu. Silniejsze oświetlenie hamowało karotenogenezę w hodowlach wszystkich badanych drożdży. Najwyższą wydajność komórkową (0,44 - 0,46 g/kg s.s) i objętościową (2,3 - 2,4 mg/L) astaksantyny odnotowano dla mutantów 10BE i 34B (hodowle przy 600 lx) oraz 26UV (hodowla przy 1 000 lx).

Natężenie oświetlenia w zakresie 300 - 1 000 lx nie miało istotnego wpływu na komórkową koncentrację astaksantyny u szczepu rodzicielskiego. Wynosiła ona około 0,30 g/kg s.s. Najwyższą wydajność objętościową astaksantyny dla szczepu rodzicielskiego uzyskano w hodowlach prowadzonych przy oświetleniu 600 i 1 000 lx – 1,51 mg/L.

W kolejnym etapie, zebrane dane poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem metod regresji. Biorąc pod uwagę skład podłoża, dla każdego szczepu, wyznaczono równania w postaci wielomianu I, II lub III stopnia opisujące, w jaki sposób zmieniają się badane parametry hodowli w zależności od zastosowanego natężenia oświetlenia. Najwyższe współczynniki  $R^2$  (0,899 - 0,999) uzyskano w przypadku równań opisujących zmiany objętościowej wydajności karotenoidów i astaksantyny. Na podstawie modeli regresji określono optymalne wartości natężenia oświetlenia, przy których objętościowa wydajność astaksantyny, będzie najwyższa. W przypadku podłoża YM pozostawały one w zakresie 670 – 718 lx. W przypadku podłoża M – 660 - 1 000 lx. Wyniki analizy statystycznej wskazują, że po uwzględnieniu optymalnych wartości natężenia oświetlenia, komórkowa i objętościowa wydajność astaksantyny może się poprawić o około 5 - 15% w zależności od szczepu i podłoża. Wyniki te zostały zweryfikowane eksperymentalnie.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że wzrost badanych drożdży i karotenogeneza, w tym produkcja astaksantyny u *X. dendrhous* DSM 5626 i jego mutantów podlega fotoregulacji, a natężenie oświetlenia jest istotnym czynnikiem, którego nie wolno pominąć dobierając parametry hodowli tych drożdży. Otrzymane wyniki wskazują, że badane szczepy drożdży, bez względu na skład podłoża, najlepiej rosną i produkują astaksantynę w hodowlach przy natężeniu oświetlenia w zakresie 600 - 1 000 lx. Próba poprawy wydajności astaksantyny poprzez doprecyzowanie wartości natężenia oświetlenia na drodze statystycznej, indywidualnie dla każdego szczepu i z uwzględnieniem składu podłoża, nie przyniosła spektakularnego efektu. Zatem zakres 600 - 1 000 lx można rekomendować jako najbardziej korzystny dla wzrostu i syntezy astaksantyny u badanych szczepów drożdży.

Należy również podkreślić, że w hodowlach przeprowadzonych w tym zakresie oświetlenia, skład podłoża miał największy wpływ na produkcję astaksantyny przez szczep rodzicielski i jego mutanty.

**Publikacje:**

**Stachowiak B.** (2013): Effect of illumination intensities on astaxanthin synthesis by *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its mutants. *Food Science and Biotechnology*, 22, (4), 1033-1038.

**Stachowiak B.** (2014): Astaxanthin synthesis by *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its mutants on carrot extract medium under different illumination intensity. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50, (5), 471-476.

### **4.3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

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

- (1) biologicznej ochrony roślin,
- (2) mikrobiologicznej syntezy karotenoidów,
- (3) oceny prebiotycznego potencjału polisacharydów pozyskiwanych z grzybów wielkoowocnikowych (*Macromycetes*).

#### **Ad.(1).**

Początek mojej kariery naukowej związany jest z Katedrą Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności UP w Poznaniu, gdzie bezpośrednio po studiach (od 1996 r.), pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Krystyny Trojanowskiej, realizowałam pracę doktorską pt. „Charakterystyka właściwości fungistatycznych kompostów łubinowych”. Badania prowadziłam w ramach projektu 5 P06B 013.14 „Biologiczna ocena właściwości fungistatycznych kompostów otrzymanych z wysokoalkaloidowych łubinów” finansowanego przez KBN. Ich nadrzędnym celem było opracowanie metody otrzymywania preparatu opartego na kompostowanej słomie łubinów gorzkich skutecznego w zwalczaniu grzybowych fitopatogenów. Badania, które przeprowadziłam w tamtym czasie oraz otrzymane wyniki, wpisane były mocno w obszar biologicznej ochrony roślin. Do dzisiaj, jest on przedmiotem moich zainteresowań naukowych. Badania, które prowadzę w dziedzinie biologicznej ochrony roślin są związane z otrzymywaniem naturalnych preparatów (biopreparatów) o aktywności przeciwgrzybiczej, będących alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin. Skupiają się one na izolacji szczepów o aktywności przeciwgrzybiczej ze środowisk naturalnych (gleba, komposty itp.), oceną spektrum ich przeciwgrzybiczej aktywności, charakterystyką mechanizmów tej aktywności oraz oceną biologicznego oddziaływania izolatów w porównaniu z komercyjnymi fungicydami.

Przedmiotem badań mojej pracy doktorskiej były komposty przygotowane ze słomy łubinów gorzkich, które zawierają alkaloidy chinolizydynowe. Wybór materiału badawczego nie był przypadkowy. Alkaloidom chinolizydynowym przypisuje się rolę „naturalnej broni chemicznej”, którą dysponuje roślina przeciwko drobnoustrojom chorobotwórczym,

fitofagom, a także konkurencyjnym gatunkom roślin. Dodatkową wskazówką były prace wskazujące, że ekstrakty alkaloidów z nasion łubinów gorzkich, pozyskane w procesie ich odgorycznia na cele paszowe, mają właściwości fungistatyczne. Przyjęto zatem hipotezę, że słoma łubinów gorzkich (wysokoalkaloidowych) może stanowić materiał do produkcji preparatów przeciwwgrzybiczych. Hipotezę tę potwierdzono doświadczalnie.

Efektom przeprowadzonych badań było opracowanie, w skali laboratoryjnej, preparatu skutecznego w zwalczaniu grzybowych fitopatogenów z rodzajów: *Fusarium*, *Trichothecium*, *Phoma*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Botrytis*. Skład preparatu oparty był na kompoście przygotowanym z mieszanki słomy łubinowej odmiany Mirela i kory bukowej z 5% dodatkiem ekstraktu z nasion łubinu gorzkiego. Nasilniejsze oddziaływanie fungistatyczne kompost ten wykazywał po termofilnej fazie kompostowania. W celu intensyfikacji fungistatycznego oddziaływania, kompost należało regularnie szczepić hodowlą biologicznie aktywnych laseczek *B. coagulans* (nr 6) po fazie termofilnej procesu kompostowania.

Część wyników powyższych badań opublikowano w następujących pracach: A.2.1, A.2.3., A.3.2., B.1.5., B.1.6., B.1.11. Mechanizmy związane z biologiczną aktywnością kompostów opisano w artykule przeglądowym B.2.1.

Podczas realizacji pracy doktorskiej miałam również okazję rozwinąć warsztat badawczy związany z izolacją mikroflory kompostowej, jej identyfikacją gatunkową oraz z oceną antagonistycznego oddziaływania izolatów kompostowych. Przeprowadziłam identyfikację gatunkową ponad 30-stu szczepów z rodzaju *Bacillus* wyizolowanych z biologicznie aktywnych kompostów łubinowych, a także weryfikowałam ich fungistatyczną aktywność różnymi metodami (A.2.2.). Prowadziłam również prace związane z intensyfikacją fungistatycznego oddziaływania wyizolowanych laseczek *Bacillus* poprzez dobór odpowiedniego składu podłoża wzrostowego (A.1.2.). Przeprowadziłam też wstępne badania nad wyjaśnieniem mechanizmu fungistatycznego oddziaływania szczepu *B. coagulans* (nr 6), który najsilniej spośród badanych izolatów hamował rozwój grzybowych fitopatogenów w hodowlach płytkowych. Stwierdziłam, że szczep ten wydziela zewnątrzkomórkowo biologicznie aktywny związek o charakterze glikoproteiny. Badania w tym zakresie prowadziłam we współpracy z Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Podczas realizacji doktoratu, brałam również udział w badaniach nad możliwością wykorzystania pomiaru zawartości komórkowego ATP metodą bioluminescencji do kontroli przebiegu kompostowania i oceny zmian liczebności mikroflory podczas kompostowania (B.1.1.). Wskazały one jednoznacznie, że monitorowanie zmian poziomu ATP podczas kompostowania może być wykorzystane jedynie do kontroli prawidłowości przebiegu procesu kompostowania (kontroli występowania poszczególnych faz kompostowania). Nie znaleziono natomiast żadnej korelacji pomiędzy zmianami liczebności mikroorganizmów w kompostach a poziomem ATP w kompostach.

Bezpośrednio po obronie doktoratu podjęłam pracę w Instytucie Technologii Żywności w Zakładzie Fermentacji i Biosyntezy na stanowisku adiunkta, gdzie kontynuowałam rozpoczęte w pracy doktorskiej badania związane z fungistatyczną aktywnością szczepu *B. coagulans* (nr 6). Początkowo dotyczyły one wyjaśnienia mechanizmu fungistatycznej aktywności tego szczepu (kontynuacja współpracy z Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu). Otrzymane wyniki wykazały, że *B. coagulans* (nr 6) wydziela zewnątrzkomórkowo trzy glikoproteiny o masie cząsteczkowej 41, 45 i 65 kDa odpowiedzialne za hamowanie wzrostu grzybowych fitopatogenów (B.1.4.).

Szczep *B. coagulans* (nr 6) wykorzystany został również w prowadzonych wspólnie z Panią prof. dr hab. Katarzyną Czaczyk badaniach, nad weryfikacją metod oznaczania aktywności fungistatycznej. Na podstawie otrzymanych wyników, jako referencyjną, zaproponowaliśmy metodę opartą na pomiarze poziomu syntetyzowanego ergosterolu, który jest podstawowym steroidem w błonach komórkowych grzybów strzępkowych (ergosterol jest wykorzystywany jako wskaźnik liczebności grzybów w różnych środowiskach: w glebie, systemach wodnych, żywności i paszach) (B.1.2.). Zaproponowaną metodę wykorzystaliśmy następnie w badaniach nad skutecznością hamowania wzrostu siedmiu fitopatogenów grzybowych przez *B. coagulans* (nr 6) we współhodowlach w zależności od czasu trwania tego rodzaju hodowli (B.1.3.).

Jednym z kierunków badawczych związanych ze szczepem *B. coagulans* (nr 6) był dobór taniego podłoża wzrostowego intensyfikującego lub gwarantującego stabilną aktywność fungistatyczną, ponieważ w hodowlach na stałym i płynnym bulionie odżywczym, szczep ten tracił tę cechę. W związku z powyższym, badałam możliwość wykorzystania produktów ubocznych i odpadów przemysłu rolno-spożywczego (wywaru, odbiałzonego ścieku ziemniaczanego, serwatki, itp.) jako podłoży wzrostowych dla *B. coagulans* (nr 6). W hodowlach prowadzonych na wywarze i odbiałczonym ścieku ziemniaczanym odnotowano dobry wzrost, a także wysoką aktywność fungistatyczną *B. coagulans* (nr 6), co stwarza możliwość ich racjonalnego zagospodarowania oraz obniżenia kosztów pozyskiwania biopreparatów skutecznych w biologicznym zwalczaniu patogenów roślinnych (B.1.10).

Porównywałam również fungistatyczne oddziaływanie szczepu *B. coagulans* (nr 6) z oddziaływaniem powszechnie stosowanych fungicydów. Wyniki tych badań okazały się bardzo obiecujące (B.1.13.). Fungistatyczna aktywność *B. coagulans* (nr 6) wobec *T. roseum*, *S. sclerotiorum* i *F. culmorum* była taka sama jak Topsinu, Funabenu, Ridomilu, Ronilanu. Szczep ten silniej niż Previcur hamował rozwój *R. solani* oraz w/w patogenów.

Spektrum aktywności przeciwgrzybiczej *B. coagulans* (nr 6) – hodowli i pozbawionych komórek supernatantów – przedstawiono w pracy B.1.15.

Obok prac dotyczących fungistatycznego oddziaływania *B. coagulans* (nr 6), zajmowałam się również izolacją szczepów o aktywności przeciwgrzybiczej z kompostów polowych



przygotowanych na bazie odpadów rolno-spożywczych (słomy zbóż, wywaru, osadu ściekowego, odpadów z przemysłu tłuszczowego). Badałam też fungistatyczną aktywność kompostów przygotowanych z dodatkiem brykietów tytoniowych. W ramach tych badań współpracowałam z Instytutem Inżynierii Rolniczej UP w Poznaniu, a także podjęłam współpracę wewnątrzzakładową. Współpraca ta zaowocowała kilkoma publikacjami naukowymi: B.1.12., B.1.17., B.1.19., B.3.2.

## **Ad. (2)**

Od 2005 roku rozpoczęłam intensywne badania związane z syntezą astaksantyny przez drożdże *Xanthophyllomyces dendrorhous* DSM 5626. Jednak pierwszym problemem, jaki musiałam rozwiązać było opracowanie metody izolacji karotenoidów z komórek drożdżowych. Część doświadczeń w tym zakresie przedstawiłam w pracy B.1.7. Następnie przeprowadziłam badania rozpoznawcze nad wpływem składu podłoża oraz oświetlenia na wzrost i karotenogenezę u tych drożdży (B.1.8., B.1.14., B.3.1.). Wyniki badań były inspiracją do zagłębienia się w tę tematykę. W latach 2006-2009 realizowałam projekt badawczy 2 P06T 024 30 pt. „Pozyskiwanie mutantów drożdży *Phaffia rhodozyma* zdolnych do nadprodukcji astaksantyny oraz ocena właściwości przeciwutleniających uzyskanych barwników karotenoidowych” finansowany przez MNiSW. Byłam kierownikiem tego projektu. Część otrzymanych wyników badań przedstawiłam w czterech z pięciu publikacji naukowych będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego (pkt. 4.1.).

Wyniki uzyskane podczas realizacji projektu przedstawiłam też w pracach B.1.18., B.1.21. i B.1.27. Praca B.1.18. dotyczyła oceny potencjału przeciwutleniającego ekstraktów karotenoidowych z komórek mutantów drożdży *X. dendrorhous* DSM 5626, których głównym składnikiem była astaksantyna. Badania realizowałam wspólnie z dr hab. Anną Gramzą-Michałowską z Katedry Żywienia Człowieka UP w Poznaniu. Potencjał przeciwutleniający badany był w układach tłuszczu zemulgowanego, tłuszczu w masie oraz zawierających wolne rodniki. Otrzymane wyniki wykazały, że aktywność przeciwutleniająca badanych ekstraktów jest różna w zależności od przyjętego układu badawczego, tzn. jest zdecydowanie wyższa w układach zemulgowanego kwasu linolowego, czego nie potwierdzono w układzie tłuszczu w masie (olej roślinny). Analiza aktywności przeciworodnikowej wykazała umiarkowaną zdolność zmiatania rodników DPPH i ABTS.

Kontynuując tę tematykę badawczą, wspólnie z Panią dr hab. Anną Gramzą-Michałowską przeprowadziłyśmy ocenę potencjału przeciwutleniającego ekstraktu karotenoidów z komórek drożdży *Rhodotorula* sp. w emulsji kwasu linolenowego (B.1.16.).

Opublikowane prace z zakresu mikrobiologicznej syntezy karotenoidów przyczyniły się niewątpliwie do nawiązania przeze mnie współpracy z Instytutem Biologii Uniwersytetu Narodowego im. V.N. Karazina w Charkowie (Research Institute of Biology V.N. Karazin Kharkiv, National University, Ukraina). W 2013 byłam opiekunem 2-miesięcznego stażu naukowego Pani Julii Jelczyszczewy, doktorantki z tej jednostki badawczej. Wspólnie

przewodzą badania nad intensyfikacją produkcji barwników karotenoidowych u drożdży *Rhodospiridium diobovatum*. W chwili obecnej przygotowujemy publikację na ten temat.

### Ad. (3)

Od 2011 roku prowadzone przeze mnie prace badawcze koncentrują się głównie wokół realizacji projektu NCN 2583/B/2011/40 pt. „Ocena biologicznego oddziaływania wybranych grzybów wielkoowocnikowych na mikroflorę probiotyczną”, którego jestem kierownikiem. Przedmiotem badań jest 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 (B.2.3.). Badania dotyczące projektu realizuję 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 przebiega dwutorowo. Prowadzone są 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 mikro płytkowy czytnik absorbancji. W badaniach wykorzystano 14 kultur probiotycznych, w tym 6 popularnych preparatów komercyjnych: Lacid, 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 bocznika ostrygowatego, z twardziaka jadalnego i pieczarki dwuzarodnikowej. Spektakularny efekt odnotowano dla bocznika.

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

Drugim nurtem badawczym jest charakterystyka składu i struktury grzybowych glukanów wykazujących prebiotyczny charakter. Podstawowym problemem w realizacji tych badań okazała się konieczność oczyszczenia/odbiałczenia RFP (bez strat ilościowych i bez destrukcji

struktury polisacharydów). W kolejnym etapie przeprowadzono hydrolizę odbiałzonej 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 prezentowałam jedynie w formie prac i komunikatów konferencyjnych (B.5.2., B.6.23., B.6.32., B.6.33, B.6.34). Po zakończeniu badań będą przedmiotem publikacji.

#### **4.4. Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego:**

Mój całkowity dorobek naukowy wg punktacji MNiSW wynosi 384 punkty (w tym 75 stanowi podstawę wniosku habilitacyjnego). Sumaryczny Impact Factor (IF) dla opublikowanych przeze mnie prac wynosi 8,038. Liczba cytowań wg bazy Web of Science – 32, Index Hirscha – 3.

Dotychczas opublikowałam 96 prac, z czego 79 po uzyskaniu stopnia doktora. Na mój dorobek składa się:

- 30 (28 po doktoracie) oryginalnych prac twórczych (w tym 9 z IF, pozostałe znajdują się w wykazie czasopism punktowanych - część B, opublikowanym w Komunikacie MNiSW z dnia 17.12.2013 ),
- 3 artykuły przeglądowe (1 z IF),
- rozdziały: w monografiach - 6 i w podręcznikach akademickich - 4 (w recenzowanym wydawnictwie zbiorowym pod nr ISBN),
- 4 prace opublikowane w całości w materiałach konferencyjnych,
- 44 komunikaty konferencyjne (w tym 17 na konferencjach o zasięgu międzynarodowym),
- 3 ekspertyzy,
- 2 opracowania z realizacji projektów badawczych.

Uczestniczyłam w 12 międzynarodowych i 24 krajowych konferencjach i sympozjach naukowych, na których wygłosiłam 4 referaty.

*Barbara Stachowiak*

Poznań, dnia 17.09.2014 r.