

**Dr Anna Misiewicz**

**Autoreferat**

**Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego**

**w Warszawie**

**Warszawa, 14.01.2016**

**Spis treści**

1. Dane personalne.....	2
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.....	2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki.....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4.2. Syntetyczne omówienie monografii naukowej .....	4
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych .....	14

## 1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Anna Małgorzata Misiewicz

Miejsce pracy: Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

## 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

- 1981 r.                    magister, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,  
  
                                  tytuł pracy magisterskiej: „Występowanie porostów jako naturalnych  
                                  wskaźników zanieczyszczenia powietrza w wybranych rejonach  
                                  Warszawy”
- 2002 r.                    doktor nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, Wydział  
                                  Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,  
  
                                  praca doktorska pt. „Badania nad zastosowaniem nowoczesnych metod w  
                                  prowadzeniu kolekcji kultur”  
  
                                  promotor: doc. dr hab. Jerzy Czuba

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

13.04.2006 – obecnie

Stanowisko: ADIUNKT, Kierownik Zakładu Mikrobiologii, kurator Kolekcji Drobnoustrojów Przemysłowych, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie im. prof. Wacława Dąbrowskiego

1.02.2005 – 12.04.2006

Stanowisko: ADIUNKT, p.o. kierownik Zakładu Mikrobiologii Technicznej i Biochemii, IBPRS

1.04.2003 – 31.01.2005

Stanowisko: ADIUNKT, kierownik Pracowni Mikrobiologii Technicznej w Zakładzie Mikrobiologii Technicznej i Biochemii

1.01.1998 - 31.03.2003

Stanowisko: ASYSTENT, kierownik Pracowni Mikrobiologii Technicznej w Zakładzie Mikrobiologii Technicznej i Biochemii

1.04.1994 – 31.12.1997

Stanowisko: ASYSTENT, Zakład Mikrobiologii Technicznej,

1.09.1981 - 31.03.1994

Stanowisko: TECHNOLOG, Zakład Mikrobiologii Technicznej

4.05.1981 - 31.08.1981

Stanowisko: STAŻYSTA, Instytut Przemysłu Fermentacyjnego, Zakład Mikrobiologii Technicznej

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

Moim osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz. 595 ze zm.) jest monografia habilitacyjna.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Genetyczne podstawy zmienności przemysłowej szczepów drożdży piwowarskich *Saccharomyces cerevisiae*”

Rozprawa naukowa ISBN 978-83-933341-4-8, 1-152, Wydawnictwo Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie, 2013.

Recenzenci: prof. dr hab. Małgorzata Gniewosz, Kierownik Katedry Biotechnologii Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, prof. dr hab. Maria Wojtatowicz, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Wrocławski

4.2. Syntetyczne mówienie monografii naukowej

WPROWADZENIE

Drożdże są jednokomórkowymi mikroorganizmami, należącymi do różnych grup taksonomicznych. Znanych jest ponad 700 gatunków drożdży, najszerzej i najdawniej użytkowane są przez człowieka drożdże z grupy *Saccharomyces sensu stricto*. Molekularne dowody archeologiczne na wytwarzanie fermentowanych napoi datuje się na 7000 lat p.n.e., choć proces fermentacji cukrów z udziałem drożdży został naukowo udowodniony dopiero w 1860 r. Ich zdolność do przekształcania cukru do etanolu z wytworzeniem dwutlenku (ditlenku) węgla podczas fermentacji używana jest w procesach biotechnologicznych przy produkcji wina, piwa i sake. Te zadziwiające cechy, przynoszące znaczne korzyści ekonomiczne, traktowane jako naturalne właściwości drożdży, mimo ciągłych badań wciąż nie są do końca wyjaśnione. Niezwykła plastyczność, a także stabilność cech genotypowych i fenotypowych szczepów winiarskich, piwowarskich i piekarskich jest wciąż badana. Niewątpliwie związana jest ze specyficzną strukturą molekularną tych drożdży. Natura poliploidalna, zdolność do wymiany materiału genetycznego, wysoka zmienność genomowa drożdży *Saccharomyces sensu stricto* ułatwia adaptację do różnych nisz, w tym przemysłowych.

Drożdże piwowskie są jednokomórkowymi grzybami (*Fungi*), należącymi do klasy workowców (*Ascomycetes*), rodziny *Endomycetaceae*, rodzaju *Saccharomyces*, grupy *Saccharomyces cerevisiae* sensu stricto. Gatunki należące do tej grupy są bardzo blisko spokrewnione, wprowadzone jest pojęcie gatunki „siostrzane”.

Drożdże *Saccharomyces* sp., jako organizmy jednokomórkowe o krótkim okresie generacji, wynoszącym od kilku do kilkunastu godzin, a jednocześnie funkcjonalnie porównywalne do organizmów wyższych, są doskonałym modelem do badań struktury i funkcji komórki. Tradycyjne metody wykrywania, identyfikacji i charakterystyki drożdży, opierające się na kryteriach biochemicznych, morfologicznych i fizjologicznych, są czasochłonne i mogą dawać niepełne lub fałszywe wyniki. Szczególnie trudne jest fenotypowe odróżnienie drożdży piwowskich, należących do rodzaju *Saccharomyces*, od innych niepiwowskich drożdży z *Saccharomyces* sp. Technologiczne określenie „drożdże piwowskie” oznacza zróżnicowaną grupę drożdży, zdolnych do fermentacji cukrów, głównie maltozy, do alkoholu i dwutlenku (ditlenku) węgla. W zależności od rodzaju prowadzonej fermentacji piwowskiej, szczepy drożdży dzieli się na drożdże fermentacji dolnej (*lager*) i drożdże fermentacji górnej (*ale*). Drożdże *lager* i *ale* różnią się zdolnościami do fermentacji cukrów. Drożdże *lager* nie fermentują melibiozy, w przeciwieństwie do drożdży *ale*, które wytwarzają zewnątrzkomórkowy enzym melibiazę (alfa-galaktozydaza) i są zdolne do fermentacji melibiozy. Drożdże *ale* charakteryzują się wzrostem w 37°C, w przeciwieństwie do drożdży *lager*, które rosną lepiej w niższych temperaturach. Drożdże *ale* były klasyfikowane jako *S. cerevisiae*, podczas gdy drożdże *lager* znane są pod różnymi nazwami, takimi jak *S. carlsbergensis*, *S. uvarum*, *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*. Mimo bliskiego pokrewieństwa, rozwój technik molekularnych ujawnił wiele genetycznych różnic między szczepami *ale* i *lager*.

Wśród technologicznie pożądanых cech drożdży piwowskich zasadnicze znaczenie mają dwa atrybuty. Pierwszym jest zdolność do wydajnego wykorzystania maltozy podczas fermentacji, drugim – skłonność do flokulacji w określonym momencie fermentacji. Obie te zalety są zdefiniowane genetycznie. Geny odpowiedzialne za wykorzystanie maltozy – geny *MAL* i za zdolność do flokulacji – geny *FLO* należą do rodzin multigenowych i zlokalizowane są w regionach subtelomerowych. Rodziny genów subtelomerowych ewoluują szybciej niż geny położone bliżej centromeru. Regiony subtelomerowe częściej są miejscami duplikacji genu, co potwierdza unikalną rolę subtelomerów jako znaczących miejsc w ewolucji i zmianach innowacyjnych budowy i funkcji genomu. Te regiony są bogate w powtórzenia i charakteryzują

się wysokim poziomem rekombinacji, prowadząc do szybkich zmian genów i ekspansji rodzin genowych.

Produktem fermentacji brzezki słodowej przy udziale piwowarskich drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jest piwo. Piwo jest niskoalkoholowym napojem, charakteryzującym się wysoką stabilnością biologiczną. Trwałość piwa wynika z odpowiedniej zawartości alkoholu etylowego (0,5-10 % wag.), obecności składników goryczkowych chmielu (od 17 do 55 ppm izo- $\alpha$ -kwasów), znacznego stężenia dwutlenku (ditlenku) węgla (około 0,5%), niskiego pH (3,8-4,7) i niskiego poziomu tlenu (<0,1 ppm) oraz niewielkiej zawartości cukrów, tj. glukozy, maltozy i maltotriozy. Do wykorzystania maltozy i maltotriozy wymagany jest aktywny transport cukrów przez błonę komórkową i następnie ich hydroliza przy udziale cytoplazmatycznych glikozydaz (maltaz). Wczesne badania nad wykorzystaniem maltozy przez komórki drożdży ujawniły, że maltoza i maltotrioza są transportowane przez różne permeazy, podczas gdy wewnątrzkomórkowe maltazy są zdolne do hydrolizy obu cukrów. Genetyczna i biochemiczna analiza fermentacji maltozy przez drożdże ujawniła grupę pięciu odrębnych, związanych z telomerami *loci MAL*: *MAL1* na chromosomie VII, *MAL2* na chromosomie III, *MAL3* na chromosomie II, *MAL4* na chromosomie XI i *MAL6* na chromosomie VIII. Liczba i podobieństwo *loci MAL* jest zależne od szczepu. Wykorzystanie maltozy w gatunkach grupy *Saccharomyces cerevisiae* sensu stricto zależy od trzech sąsiadujących genów: *MAL63* (koduje aktywator) oraz rozbieżnie transkrybowanych genów *MAL61* i *MAL62*, kodujących odpowiednio permeazę i maltazę. *MAL63* należy do rodziny białek regulatorowych typu „palca cynkowego” genów. Wiele *loci* genów odpowiedzialnych za typowe cechy drożdży *lager*, np. za wykorzystanie maltotriozy może być zwielokrotnione przez rearanżacje chromosomowe.

Drugim po maltozie ważnym czynnikiem, charakteryzującym drożdże piwowarskie jest zdolność do flokulacji. Jest ona z pewnością jednym z bardziej intrygujących i istotnych procesów. Stopień złożoności procesu flokulacji i jego charakter są ściśle związane ze szczepem. Znanych jest wiele czynników wpływających na flokulację. Są nimi: skład brzezki słodowej, w tym stężenie cukrów, zawartość tlenu (napowietrzanie), temperatura fermentacji, pH, ciśnienie osmotyczne i stężenie etanolu. Czynniki te są nazywane czynnikami stresowymi. W szerokich badaniach nad budową wyciszonych i aktywnych regionów chromatyny udowodniono, że wpływ epigenetycznej regulacji ekspresji genów *FLO* wynika z oddziaływań stresowych. Kompleksowa odpowiedź drożdży zawiera „wyczuwanie” stresu, transdukcję sygnału, transkrypcję i translację, akumulację czynników ochronnych i aktywację funkcji naprawczych.

Wydajność tych procesów u określonego szczepu definiuje jego technologiczną przydatność. Flokulację zalicza się do takich odpowiedzi stresowych. Jej intensywność może być badana poprzez określenie wielkości wytworzonego RNA w reakcji odwrotnej transkryptazy z zastosowaniem techniki real-time PCR.

Zróżnicowane działanie etanolu na wywołanie flokulacji spowodowane jest prawdopodobnie niszczeniem powierzchniowych struktur ściany komórkowej drożdży, w której znajdują się flokuliny i jednoczesną indukcją genów *FLO* za pośrednictwem licznych, odpowiedzialnych za szok termiczny elementów *STRE* (stress response element), które występują w regionach promotorowych genów *FLO*.

Większość współcześnie stosowanych metod mierzenia flokulacji jest oparta na sedymentacyjnym teście Helma. Zwykle szczepy o fenotypie Flo1 wykazują najwyższą zdolność flokulacji, wynoszącą od 90 do 100%, podczas gdy przemysłowe szczepy (NewFlo) cechują się zdolnością do flokulacji w zakresie od 40 do 90% przy końcu fermentacji. Zwykle, nieflokulujące szczepy wykazują zdolność do flokulacji na poziomie od 0 do 15%.

Drożdże sklasyfikowano w dwie odrębne grupy w zależności od rodzaju cukru hamującego ich flokulację i wyróżniono fenotyp NewFlo- flokulacja hamowana jest przez mannozę, glukozę, maltozę i sacharozę, ale nie galaktozę oraz typ Flo1, w którym flokulacja jest hamowana przez mannozę, ale nie glukozę, maltozę, sacharozę ani galaktozę. Te dwa odrębne fenotypy są prawdopodobnie uwarunkowane przez dwa różne typy białek lektynopodobnych, a zatem przez dwa różne typy genów.

Pierwszy zsekwencjonowany genom laboratoryjnego szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* S288C zawierał 5 genów *FLO*, cztery *FLO1*, jeden *FLO5*, jeden *FLO9* i jeden *FLO10*, zlokalizowanych w okolicy telomerów chromosomów oraz jeden *FLO11*, nie zlokalizowany przy centromerze, ani przy telomerze. Geny *FLO* kodują białka lektynopodobne, znane jako adhezyny, zymolektyny lub flokuliny. Dominujący gen *FLO1* usytuowany jest na samym końcu prawego ramienia chromosomu I. Flo1p jest białkiem ściany komórkowej odpowiedzialnym za flokulację komórek typu Flo1 i jego obecność jest bezpośrednio powiązana ze stopniem flokulacji. Gen *FLO5* jest na chromosomie VIII a dominujący gen *FLO9* na chromosomie I. Gen *FLO10* jest zlokalizowany na XI chromosomie. Gen *FLO8* jest transkrypcyjnym aktywatorem *FLO1* i *FLO11* i jest podstawowy dla ich ekspresji.

Przemysłowe drożdże z rodzaju *Saccharomyces* są diploidami, poliploidami lub aneuploidami. U drożdży piwowarskich odnaleziono trzydzieści sześć różnych typów chromosomów, w tym



osiem chromosomów z translokacjami między sub-genomami i między otwartymi ramkami odczytu genów ortologicznych. Genom drożdży piwowarskich *lager S. carlsbergensis*, obecnie nazywany *S. pastorianus*, częściowy allotetraploid, prawdopodobnie powstał w wyniku międzygatunkowej hybrydyzacji między *S. cerevisiae* i *S. bayanus* (*S. eubayanus*), a *S. monacensis* (syn. *S. pastorianus*), przy czym wiadomo po analizie profili białkowych, że *S. monacensis* jest własną hybrydą. Dodatkowo, występujące rearanżacje chromosomowe wygenerowały strukturę mozaikową, co zapewne pozwala drożdżom adaptować się do wieloczynnikowych i zmiennych warunków procesu fermentacji. Takie scalenie i wymiana materiału genetycznego w grupie *Saccharomyces* sensu stricto może być dowodem na ewolucyjną adaptację drożdży do unikalnych warunków środowiska przemysłowego (niszy). Stosowanie drożdży przez człowieka w procesach przemysłowych prowadziło do selekcji wyspecjalizowanych szczepów, wykazują one specyficzne cechy fenotypowo-technologiczne. Budowa genomowa tych drożdży zmieniła się pod wpływem różnych zdarzeń - stresów technologicznych poprzez rearanżacje chromosomalne, zmienną liczbę kopii genów, introgresje oraz polimorfizm sekwencji lub nukleotydów. Polimorfizm oznacza występowanie różnic w DNA. Jednym z najbardziej rozpowszechnionych rodzajów mutacji są tzw. mutacje punktowe, polegające na zamianie jednego nukleotydu na inny, insercji (wstawieniu) lub delecji (wypadnięciu) jednego lub kilku nukleotydów. Występowanie różnorodnych alleli tego samego genu w konsekwencji może prowadzić do różnic w budowie i działaniu białka kodowanego przez ten gen, a zmiany w sekwencjach niekodujących prowadzą do zmiany ekspresji białek. Porównawcza identyfikacja polimorfizmu sekwencji nukleotydowych jest podstawową metodą w badaniu genetycznych różnic szczepów, także w wyjaśnieniu historii ewolucyjnej gatunków. W większości badań z ostatnich lat, sekwencje nukleotydowe szczepów drożdży porównywano jedynie z sekwencjami pierwszego sekwencjonowanego w 1996r. organizmu eukariotycznego, jakim jest referencyjny szczep laboratoryjny S288c, przez wiele lat jedyny zsekwencjonowany przedstawiciel gatunku *S. cerevisiae*. Od niedawna nastąpił gwałtowny wzrost sekwencjonowania innych szczepów *S. cerevisiae*, rozszerzając wiedzę zarówno na poziomie SNP (Single Nucleotide Polymorphism) i zmienności strukturalnej, ujawniając nieznane kilobazy dodatkowych sekwencji obecnych w szczepach przemysłowych.

CEL GŁÓWNY: poznanie i ocena genetycznych podstaw zmienności przemysłowych szczepów drożdży piwowarskich *Saccharomyces cerevisiae*.

Cele szczegółowe:

- analiza porównawcza populacji szczepów piwowarskich,
- określenie stopnia polimorfizmu sekwencji nukleotydowych multigenowych, subteleromowych rodzin genów *FLO* i *MAL*, a także jego wpływ na prognozowaną sekwencję aminokwasów,
- określenie poziomu ekspresji genów *FLO* i *MAL*,
- ocena wielkości zmian w badanych szczepach jako zmiany mikroewolucyjne, umożliwiające adaptację drożdży do nowych nisz środowiskowych.

Zakres pracy obejmuje charakterystykę morfologiczną, fizjologiczną i technologiczną przemysłowych szczepów drożdży, ocenę polimorfizmu sekwencji nukleotydowych rodzin genów *FLO* i *MAL* oraz prognozowanej zmienności aminokwasowej.

#### METODYKA BADAŃ

Analizie poddano 24 szczepy drożdży, w tym 10 szczepów piwowarskich fermentacji dolnej, 10 szczepów piwowarskich fermentacji górnej, 2 wzorcowe szczepy drożdży winiarskich i 2 wzorcowe szczepy drożdży z gatunku *Torula casei* i *Geotrichum fermentans* (*Trichosporon fermentans*), zdeponowane w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych. Po przeprowadzonej fermentacji alkoholowej oceniono podstawowe cechy młodego piwa: zawartość alkoholu, zawartość maltotetraozy, maltotriozy, maltozy i glukozy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz zawartość produktów ubocznych fermentacji. W podłożach stymulujących flokulację stosowano podłoże YPG, zmieniając stężenia glukozy oraz zastępując glukozę dodatkiem maltozy, fruktozy, etanolu i chlorkiem wapnia w różnych stężeniach. Budowę morfologiczną drożdży określano na podstawie badań z użyciem mikroskopu optycznego, elektronowego skaningowego i transmisyjnego. Zdolności asymilacyjne drożdży badano stosując testy API 32C AUX (Biomerieux), zdolności fermentacyjne drożdży badano w podłożu z 2% (w/v) źródłem cukru (celobioza, galaktoza, glukoza, laktoza, maltoza, rafinoza, sacharoza, skrobia, trehaloza) z roztworem bromofenolowym w rurkach Durhama. Określano czas i intensywność zafermentowania cukrów. Stopień integralności wyizolowanego kwasu nukleinowego oceniano w trakcie elektroforezy w 0,7% żelu agarozowym. Wyizolowane DNA stosowano następnie w reakcji łańcuchowej polimerazy:

w badaniu domeny D1/D2 i powielaniu genów *FLO* i *MAL*. Reakcję amplifikacji wykonano w aparacie Perkin Elmer 2400 oraz Thermo Px2. Po przeprowadzonej klasycznej reakcji PCR, w której wykazano obecność genów *FLO* i *MAL*, przeprowadzono analizę MSSCP (multitemperature single-strand conformational polymorphism - wielotemperaturowy polimorfizm jednoniciowych konformacji DNA), w wyniku której, po analizie elektroforogramów, wyselekcjonowano amplikony genów *FLO* i *MAL* do sekwencjonowania. Rozdział elektroforetyczny przebiegał w aparacie DNA Pointer firmy Kucharczyk TE z zasilaczem Apelex 1006P wg opracowanych doświadczalnie schematów. Barwienie żelu przeprowadzone było z użyciem zestawu Silver Stain (Kucharczyk T.E.) i przebiegało zgodnie z protokołem. W reakcji real-time PCR stosowano jako gen referencyjny gen TDH2. Do analizy wyników stosowano wiele programów komputerowych. Sekwencje drożdżowe pobierano z bazy Gen Bank *Saccharomyces* Genome Database, Stanford University.

#### WYNIKI

Zarówno wielkość, jak i kształt komórek w obrazie mikroskopu optycznego, transmisyjnego i skaningowego były typowe dla gatunku. Większość szczepów zachowała cechy biochemiczne typowe dla grupy *Saccharomyces sensu stricto*. Na dwadzieścia charakteryzowanych szczepów tylko jeden szczep nie asymilował galaktozy, zaś osiem szczepów – sacharozy. Zmienne wyniki uzyskano, badając asymilację trehalozy, palatynozy, melezytozy i mannitolu.

Wszystkie szczepy drożdży fermentowały sacharozę i glukozę, choć w pojedynczych przypadkach nie obserwowano fermentacji galaktozy (KKP 189), maltozy (KKP 169) i rafinozy (KKP 192). Różna była intensywność i szybkość zafermentowania cukrów. Ocena tych właściwości jest niezbędna w selekcji szczepów drożdży przeznaczonych do szybkich procesów fermentacyjnych.

W pracy wykorzystano parę primerów z domeny D1/D2 i amplifikowano fragment specyficzny u szczepów *Saccharomyces sensu stricto*. Druga para primerów została zaprojektowana na zakonserwowane sekwencje charakterystyczne dla rodzaju *Saccharomyces*. Startery te wykorzystano w analizach multiplex PCR, generowały one prążek o wielkości ok. 900 pz. Zastosowanie tego prostego i szybkiego testu molekularnego pozwoliło na potwierdzenie zdolności fermentacyjnych szczepów drożdży, wykazanych uprzednio w podstawowych testach fermentacyjnych.

Sprawdzono też przebieg fermentacji piwowarskiej, badając zużycie maltozy i maltotriozy oraz stężenie wytworzonego alkoholu. W badanych próbkach piwa rzeczywisty stopień odfermentowania wynosił od 54,7% (w przypadku piwa uzyskanego po fermentacji z udziałem szczepu KKP 212) do 85,7% (KKP 189). Wyniki te były szczepowo zależne.

Zebrane dane wskazują, że okres przechowywania drożdży nie wpływał na czas trwania fermentacji głównej, który wahał się od 7,5 do 10,5 dnia.

Stwierdzono zadowalające wyniki odfermentowania pozornego piwa przez badane szczepy drożdży. Po pięćdziesięcioletnim okresie przechowywania występujące zmiany nie przekraczały 20%. Stwierdzono więc wysoką stabilność tej cechy u większości badanych szczepów.

Aby zbadać wszechstronnie zdolności do flokulacji szczepów drożdży, zastosowano liczne i zróżnicowane źródła cukru. Były to cukry proste w stężeniu od 2 do 7,5%, a także podłoża przemysłowe, tj. brzezki o gęstości 8° i 12°Błg. Za wysoką zdolność do flokulacji uznano poziom 80%, zdolności flokulacyjne mieszczące się w przedziale 20–80% określono jako średnie, a zdolność do flokulacji poniżej 20% oceniono jako niską. Stopień flokulacji szczepu KKP 199 w bogatym podłożu, jakim jest bulion brzezkowy, był wysoki i wynosił 88,8%, a w 12°Błg brzezce wynosił 87,6%. Wysoki stopień flokulacji szczep ten wykazywał także w brzezce 8°Błg. W tych samych podłożach flokulacja szczepu KKP 171 była niska i wynosiła mniej niż 20%. Analiza ekspresji genu *FLO1* wykazała korelację z tymi danymi. Wysoki poziom flokulacji szczepu KKP 199 korelował z wysokim poziomem ekspresji genu *FLO1*, oznaczonym metodą PCR real-time.

W badaniach nad ekspresją genu *FLO1* wykazano, że szczepami wysokiej ekspresji są szczepy KKP 199 i KKP 222, o średniej ekspresji KKP 219, KKP 192 i KKP 211, zaś niższej – KKP 217 i KKP 172. Uzyskane wyniki korelują z ich zdolnościami do flokulacji w podłożach przemysłowych.

Na możliwość prognozowania zdolności flokulacyjnej szczepów wskazano w analizie ekspresji genów *FLO* z zastosowaniem metody real-time PCR. Zależność wykryta między ekspresją genu *FLO1* a właściwościami technologicznymi potwierdza możliwość prognozowania tych właściwości za pomocą metod molekularnych, które pozwalają na szybką i ekonomicznie atrakcyjną selekcję szczepów przemysłowych.

W pracy wykorzystano metodę MSSCP do wstępnej selekcji szczepów drożdży. Uzyskano zróżnicowane produkty amplifikacji. Wyniki analizy MSSCP pozwoliły zidentyfikować szczepy różniące się sekwencjami nukleotydów zarówno w genach *FLO*, jak i *MAL*. Zróżnicowanie

międzyszczepowe było znacząco wyższe wśród amplikonów genów *FLO* niż w amplikonach genów *MAL*. Dzięki zastosowaniu zmodyfikowanej techniki SSCP, jaką jest MSSCP, możliwe było uzyskanie interesujących wyników dotyczących występowania mutacji punktowych lub polimorfizmów w obrębie genów *FLO* i *MAL* we wszystkich badanych szczepach drożdży piwowarskich *S. cerevisiae*. Analiza wyników rozdziału produktów reakcji amplifikacji genów w żelach poliakrylamidowych wykazała obecność różnych profili elektroforetycznych w obrębie poszczególnych fragmentów, które wskazują, że szczepy te charakteryzują się występowaniem znaczących różnic genetycznych.

W analizie sekwencji zastosowano metodę progresywnego dopasowania wielosekwencyjnego, używaną do wyznaczenia dopasowania dla rodzin sekwencji spokrewnionych ewolucyjnie.

Ze względu na liczbę zmian w genie *FLO1* wydzielono dwie grupy drożdży. Do pierwszej należały szczepy KKP 171, KKP 199, KKP 218 i KKP 223, w których znaleziono od czterech do siedmiu substytucji w badanym zakresie genu *FLO1*, do drugiej – szczepy KKP 172, KKP 183, KKP 201, KKP 219, KKP 222 i KKP 225, w których zmienność substytucji była na poziomie od trzydziestu dwóch do siedemdziesięciu ośmiu. Większość zmian zlokalizowano w tych samych miejscach genu *FLO1*, najczęściej w przedziale od 150 do 300 nukleotydów i od 350 do 550 nukleotydów. W badanych genach szczepu KKP 171 na sześć zmian, pięć to tranzycje, a jedna transwersja, a szczepu KKP 172 na siedemdziesiąt sześć substytucji, czterdzieści stanowią tranzycje, a trzydzieści sześć transwersje. W trakcie analizy zmian aminokwasów spowodowanych polimorfizmem oceniono wpływ tylko zmian w pozycjach niesynonimicznych, tzn. pierwszej i drugiej. Zmienność nukleotydów w pozycji trzeciej kodonu była bardzo wysoka, jednak nie ma ona tak znaczącego wpływu na zmiany aminokwasów.

Różnice w budowie genów *FLO* i *MAL* mogą skutkować wytwarzaniem różnych produktów białkowych odpowiedzialnych za procesy flokulacji i degradacji cukrów, a tym samym za międzyszczepową różnorodność cech biotechnologicznych. W procesie fałdowania białek istotną rolę pełni efekt hydrofobowy. Stąd prognozowane zamiany aminokwasów o różnych właściwościach hydrofobowych mają znaczący wpływ na natywną strukturę białek, który stwierdzono w niniejszej pracy.

Polimorfizm sekwencji DNA znacząco wpływa na zróżnicowanie fenotypowe drożdży i potwierdza hipotezę, że przyczynia się to do naturalnych mikroewolucyjnych zmian i różnicowania między gatunkami. Zróżnicowanie szczepowe objawia się także zróżnicowaną ekspresją genów. W obecnej pracy względną ekspresję genów liczą metodą podwójnej delty,

jako gen normalizujący zastosowano gen metabolizmu podstawowego *TDH2*, o wysokiej i stałej ekspresji.

Stwierdzono, że fenotypowa różnorodność szczepów drożdży piwowarskich z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* w zakresie asymilacji i fermentacji cukrów oraz wyników uzyskanych po fermentacji alkoholowej była bardzo wysoka.

## WNIOSKI

Osiągnięto główny cel pracy poprzez realizację celów szczegółowych.

Za najbardziej istotne osiągnięcia rozprawy uważam:

- Potwierdzenie specyficzności szczepów charakteryzujących się wysokim polimorfizmem DNA obserwowanym w genach funkcjonalnych. Zmiany są specyficzne szczepowo i są wynikiem presji selekcyjnej w warunkach przemysłowych. Polimorfizm zmienia profile fenotypowe oraz stanowi „milczące” wyciszone geny o nieznannej funkcji. Z tej budowy wynika zdolność do adaptacji i plastyczność genomu.
- Stwierdzenie dodatniej korelacji między ekspresją genu *FLO1* a zdolnością szczepów do flokulacji w podłożach przemysłowych. Umożliwia to prognozowanie zdolności flokulacyjnej z wykorzystaniem metody molekularnej, która pozwala na szybką i ekonomicznie atrakcyjną selekcję szczepów przemysłowych.
- Zidentyfikowanie „aktywnych miejsc” w genie *FLO1*. Zmiany nukleotydowe, a następnie aminokwasowe, u różnych szczepów występowały w tych samych miejscach aktywnych sekwencji, z częstością od 15% do 100%. Miejsca te są bardziej podatne na zmiany rekombinacyjne, które powodują postępującą ewolucję wśród szczepów przemysłowych.
- Ze względu na liczbę zmian w genie *FLO1* wydzielenie dwóch grup drożdży. Do pierwszej należały szczepy fermentacji górnej KKP 199, KKP 218 i KKP 223 i dolnej KKP 171, w których znaleziono od czterech do siedmiu substytucji w badanym zakresie genu *FLO1*, do drugiej szczepy KKP 219, KKP 222 i KKP 225 (górnej fermentacji) i KKP 172, KKP 183, KKP 201 (dolnej fermentacji), w których zmienność substytucji była na poziomie od 32 do 78. Oznacza to dużą zróżnicowaną zmienność w stosunku do genu *FLO1* szczepu *S. cerevisiae* S288c, a także różną podatność na zmiany wywoływane przez środowisko. Może też wynikać z różnego pochodzenia geograficznego tych dwóch grup drożdży. Drugą grupę drożdży charakteryzuje wysoka plastyczność genomu, czyli niższa stabilność szczepowa.

- Wykazanie w badaniach polimorfizmu przemysłowych szczepów drożdży, który może być odzwierciedleniem „udomowienia” i adaptatywnej ewolucji, rozszerzającej możliwości zastosowania szczepów w procesach technologicznych.
- Wykazanie w danych eksperymentalnych zmienności eukariotycznych elementów subtelomerowych wspomagających szybką adaptację do nowych środowisk poprzez promowanie rekombinacji genowej prowadzonej przez funkcjonalnie zróżnicowane epigenetyczne allele.

### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pracę naukowo-badawczą rozpoczęłam w Instytucie Przemysłu Fermentacyjnego w maju 1981 r., w Zakładzie Mikrobiologii Technicznej i Biochemii, kierowanym przez prof. dr hab. Olę Ilnicką-Olejniczak. Początkowo brałam udział w selekcji i izolacji grzybów niższych przydatnych do wzbogacania krajowych surowców skrobiowych w białko (prace statutowe IBPRS). Po urlopie wychowawczym podjęłam prace badawcze w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych. Rozpoczęłam je od badań stabilności cech biotechnologicznych drożdży winiarskich i piwowarskich, nie przeczuwając, że problematyka ta stanie się wiodącą w mojej pracy zawodowej. Interesowałam się jednocześnie metodami i technikami przechowywania drobnoustrojów, zapewniającymi niezmienną stan mikroorganizmu. W 1989 r. uczestniczyłam w tygodniowym kursie, finansowanym przez United Nations Development Programme, a organizowanym przez National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Department of Microbiology and Biotechnology, University of Horticulture and Food Industry w Budapeszcie, zatytułowanym „Role and service of culture collection in biotechnology”, bezpośrednio związanym z tematyką pracy naukowej w zakresie identyfikacji mikroorganizmów i metod ich przechowywania w kolekcjach kultur. Cztery lata później przebywałam tam na miesięcznym stypendium związanym z wprowadzaniem m.in. technik molekularnych, np. PCR, do charakterystyki drożdży przemysłowych, które to techniki zastosowałam i rozwinęłam po powrocie do jednostki macierzystej. W konsekwencji, w IBPRS rozpoczęłam badania nad charakterystyką drobnoustrojów przemysłowych wybranymi metodami biologii molekularnej (PCR, RAPD, RFLP).

W latach 1989–1990 pracowałam także nad opracowaniem założeń projektowych bazy danych kolekcji kultur drobnoustrojów przemysłowych. W 1995 roku wzięłam udział w tygodniowym



kursie międzynarodowym, organizowanym przez Microbial Strain Data Network, którego celem był opis bazy Microbial Strain Data Network i projektowanie aktualnych baz danych.

Uczestniczyłam ponadto w wielu szkoleniach dotyczących bezpośrednio mojej tematyki badawczej (np. 1996 r., Olsztyn: Zastosowanie mikroskopii w badaniach żywności, organizowane przez PAN), a następnie w kolejnych, związanych z wprowadzaniem technik molekularnych (1996 r., Gdańsk: Kurs biologii molekularnej, Metody diagnostyczne oparte na analizie DNA (PCR), Klonowanie DNA i inne techniki rekombinacyjne, organizowane przez Katedrę Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej; 1997 r., Gdańsk: Klonowanie DNA i inne techniki rekombinacyjne, organizowane przez Katedrę Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej).

W latach 2000–2002 brałam udział w projekcie (5 P06G 046 19: Otrzymanie transformanta *Rhizopus cohnii* – nadproducenta lipazy N N312 346537), którego celem było otrzymanie produktów fuzji grzyba strzępkowego *Rhizopus cohnii* o zwiększonej zdolności do biosyntezy lipazy w porównaniu ze szczepem wyjściowym.

W 1999 r. rozpoczęłam projekt promotorski „Badania nad stabilnością cech genetycznych drożdży piwowskich techniką PCR” (promotorski 5 P06G 040 13). Wyniki badań wraz z koncepcją bazy danych przedstawiłam w pracy doktorskiej pt. „Badania nad wykorzystaniem nowoczesnych metod w prowadzeniu kolekcji kultur” na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie, na Wydziale Nauki o Żywności, którą obroniłam z wyróżnieniem w grudniu 2002 r. Rozpoczęte przed uzyskaniem stopnia doktora prace nad unikalnymi szczepami przemysłowej fermentacji octowej kontynuowałam we współpracy z dr Janją Trcek w ramach dwustronnej umowy międzyrządowej. Badania nad bakteriami octowymi zaowocowały grantem celowym (2008) „Opracowanie i wdrożenie sposobu wytwarzania octu cydrowego (jabłkowego)” projekt celowy, IBPRS, umowa 6 ZR7) i wdrożeniem (FINAKO).

Coroczne spotkania europejskich kuratorów kolekcji, w których brałam udział od 1992 r., zaowocowały zorganizowaniem w Krakowie w dniach 23-25 września 2002 r. międzynarodowej konferencji – XXI Annual Meeting European Culture Collections Organisation. Byłam współorganizatorem tego spotkania, w którym wzięli udział przedstawiciele 23 kolekcji europejskich reprezentujących 15 krajów, w tym: Wielką Brytanię, Francję, Portugalię, Hiszpanię, Szwajcarię, Finlandię, Belgię, Holandię, Łotwę, Węgry, Czechy i Polskę, przedstawiając dorobek swoich kolekcji i plany wejścia do programów unijnych.

W grudniu 2004 r. uczestniczyłam w szkoleniu (program BIOREMAT – Access to the Large Scale Facility, Practice of Internationally Deposit Authority, Quality Management System) (zał. III Z25)



dotyczącym wprowadzania systemu jakości w kolekcji. Szkolenie odbyło się w Brunshwiku, w kolekcji Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, mającej certyfikat ISO 9000.

W 2008 r. wzięłam udział, jako ekspert na zaproszenie OECD, w posiedzeniu roboczym tej organizacji w Japonii, w Tsukubie, opiniując dokument formułujący zasady przechowywania drobnoustrojów w kolekcjach.

Do moich osiągnięć międzynarodowych zaliczam:

- dwustronną współpracę międzynarodową na podstawie umowy międzyrządowej polsko-japońskiej „Collecting of Industrial Microorganisms” (Kolekcjonowanie mikroorganizmów przemysłowych) – The Institute of Physical and Chemical Research, Japan Collection of Microorganisms (RIKEN) Tokio
- dwustronną współpracę międzynarodową ze Słowenią, na podstawie umowy międzyrządowej, „Analysis of the bacterial population in industrial vinegar production by flow cytometry and PCR” (naliza populacji bakterii w trakcie wytwarzania octu z zastosowaniem cytometrii przepływowej i PCR), w latach 2002–2003 prowadzoną z Uniwersytetem w Ljublanie i firmą Limnos.
- uczestniczenie w projekcie European Biological Resource Center Network - V Program Ramowy UE w latach 2003–2004 z innymi kolekcjami europejskimi
- uczestniczenie w Krajowej Sieci Informacji o Bioróżnorodności z Memorandum of Understanding z Global Biodiversity Information Facility w latach 2005–2015,
- uczestniczenie w projekcie Microbial Resource Research Infrastructure VII Program Ramowy 2012-2016

Moje zainteresowania naukowo-badawcze w całym przebiegu pracy zawodowej były związane z naukowymi aspektami zastosowania mikroorganizmów przemysłowych (drożdże, bakterie, grzyby strzępkowe), także w kontekście utrzymania stabilności cech szczepów, deponowanych w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych. Były to zarówno szczepy stosowane w procesach biotechnologicznych, jak i będące zakażeniami.

W trakcie całej pracy naukowej dążyłam do praktycznego wykorzystania wyników prowadzonych badań, dlatego też oprócz publikacji naukowych ważnym rezultatem mojej pracy badawczej jest uzyskanie patentów i opracowanie kolejnych wniosków patentowych.

Tematykę moich prac badawczych można podzielić na następujące grupy:

- Dobór i doskonalenie szczepów mikroorganizmów w zakresie zwiększenia wydajności enzymów celulolitycznych, amylolitycznych, lipolitycznych,
- Zachowanie cech biotechnologicznych mikroorganizmów z wykorzystaniem różnych metod przechowywania,
- Założenia projektowe i budowa bazy danych mikroorganizmów przemysłowych. Zarządzanie informacjami o szczepach,
- Identyfikacja i charakterystyka mikroorganizmów o zastosowaniu przemysłowym, ze szczególnym uwzględnieniem drożdży winiarskich i piwowarskich oraz bakterii fermentacji mlekowej i octowej, z wykorzystaniem metod klasycznych i molekularnych,
- Wprowadzanie systemu jakości i zarządzanie Kolekcją Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych zgodnie ze standardami OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), WFCC (World Federation for Culture Collection) i ECCO (European Culture Collection Organization),
- Wykorzystanie nowoczesnych metod molekularnych do identyfikacji bakterii patogennych (*Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*), z elementami walidacji i szacowania niepewności do zastosowania w badaniach żywności,
- Zastosowanie metod molekularnych do identyfikacji grzybów strzępkowych i genów mikotoksynotwórczych,
- Różnicowanie drożdży przemysłowych na podstawie budowy genów istotnych technologicznie (geny *FLO*, *MAL*, *FOL*, *SSU1*).
- Zagadnienia związane z mikrobiologią ogólną

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- 31 publikacji naukowych, w tym 17 prac oryginalnych, 14 prac przeglądowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach zagranicznych i krajowych,
- 1 rozdział w monografii zagranicznej,
- 8 rozdziałów w monografiach,
  - 103 doniesienia konferencyjne – 44 krajowe, w tym 15 referatów, i 44 międzynarodowe, w tym 4 referaty,
  - 4 patenty krajowe,

- 2 zgłoszenia patentowe krajowe i 8 zagranicznych,
- 8 sprawozdań z projektów badawczych i celowych,
- udział jako kierownik w 4 projektach patentowych POIG, w 1 jako uczestnik,
- monografię habilitacyjną,
- 49 sprawozdań z prac statutowych – projektów badawczych.

Ponadto byłam promotorem 12 obronionych prac magisterskich (w tym 4 z wyróżnieniem). Prowadziłam 3 własne projekty badawcze i 1 celowy, a uczestniczyłam w 7 projektach badawczych. Jestem autorem ponad 200 sprawozdań z badań wykonanych dla przemysłu i instytucji naukowo-badawczych (do wglądu w Instytucie). W większości wymienionych prac jestem pierwszym autorem, drugim lub ostatnim, jako kierownik zespołu. Uczestniczyłam w czterech projektach międzynarodowych, w dwóch z nich byłam koordynatorem polskiej części projektu.

#### Osiągnięcia uzyskane przed uzyskaniem stopnia doktora

##### Dobór i doskonalenie szczepów mikroorganizmów w zakresie zwiększenia wydajności enzymów celulolitycznych, lipolitycznych i amylolitycznych

W pierwszych latach pracy zajmowałam się doбором grzybów niższych do procesów biosyntezy niektórych enzymów litycznych (zał. 5 M5, M8). Brałam też udział w selekcji i izolacji grzybów niższych, przydatnych do wzbogacania krajowych surowców skrobiowych w białko. Wykorzystywane były szczepy izolowane zarówno ze środowisk naturalnych, jak i pochodzące z kolekcji (zał. 5, M2, M3). Po urlopie wychowawczym podjęłam prace nad biosyntezą celulaz (zespół dr hab. Czajkowskiej, zał. 5 M8, zał. III R1) i opracowaniem metod mutagenizacji szczepów grzybów niższych, należących do gatunku *Aspergillus awamori*, nadprodukujących glukoamylazę (zał. 5 M4, M6, M7). W latach 2000–2002 brałam udział w projekcie badawczym „Otrzymanie transformanta *Rhizopus cohnii* – nadproducenta lipazy” (zał. 5 J7), którego celem było otrzymanie produktów fuzji grzyba strzępkowego *Rhizopus cohnii* o zwiększonej zdolności do biosyntezy lipazy w porównaniu ze szczepem wyjściowym. W wyniku przeprowadzonych 44 procesów fuzji protoplastów 9 mutantów auksotroficznych szczepu Rh.c./1 otrzymano 19 produktów fuzji, charakteryzujących się większą zdolnością biosyntezy lipazy w hodowli w podłożu ciekłym niż szczepy rodzicielskie (zał. 5 A1, P8, P9).

Wyniki dalszych prac nad doskonaleniem cech drobnoustrojów zawarłam, jako współautor, w publikacji dotyczącej próby otrzymania produktów fuzji drożdży gorzelniczych o udoskonalonych cechach biotechnologicznych, tzn. charakteryzujących się podwyższoną zdolnością do biosyntezy glukoamylazy (zał. 5, D19). Doskonalenie szczepów drożdży gorzelniczych dotyczy głównie bardziej efektywnego wykorzystania tańszych surowców i zwiększenia produktywności procesu, dlatego też prace prowadzone były w kierunku konstrukcji szczepu zdolnego do rozkładu i wykorzystania zarówno surowców skrobiowych, jak i lignocelulozowych. W badaniach wykorzystano szczepy drożdży gorzelniczych KKP 561, KKP 669 i KKP 511 oraz szczepy drożdży amylolitycznych KKP 552 i KKP 553, pochodzących z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych IBPRS. Uzyskane szczepy auktotroficzne poddano procesowi elektrofuzji, po uprzednim zoptymalizowaniu jej parametrów. W efekcie przeprowadzonej fuzji protoplastów auktotroficznych szczepów *As4pro-* i *S.di./2-1 arg-* oraz *D2 leu-* i *S.di/2-1 arg* otrzymano dwa transformanty I-7-43 i III-5-11, wytwarzające odpowiednio 16,2 i 14,7% alkoholu po 72 godzinach fermentacji, czyli więcej niż szczepy rodzicielskie, oraz sześć o podwyższonej aktywności glukoamylazy powyżej 0,5JGA/cm<sup>3</sup>. Szczep I-7-43 po próbach mikrotechnicznych wszedł do produkcji, został sprawdzony w skali przemysłowej w gorzelnii rolniczej i pozwolił na oszczędności w procesie produkcyjnym – sięgając 50% zalecanej przez producenta dawki enzymu scukrzającego. Otrzymany fuzant został następnie sprawdzony w skali przemysłowej w gorzelnii rolniczej przy produkcji spirytusu i przez lata, jako preparat w formie suszonej, sprzedawany był gorzelniom polskim (zał. 5 W10).

Doskonalenie kolejnego szczepu dotyczyło drożdży piwowarskich (zał. II M25). Uzyskano 233 produkty fuzji szczepów *S. cerevisiae* i *S. diastaticus*, w których – wykorzystując szybką metodę selekcji wysokoaktywnych szczepów – oznaczono aktywność glukoamylazy i stwierdzono, iż z otrzymanych produktów fuzji 34 charakteryzowało się podwyższoną zdolnością do biosyntezy glukoamylazy. Trzy najlepsze produkty fuzji o symbolach 8/6, 11/2 i 12/6 wytwarzały od 5,56 do 5,85% alkoholu w młodym piwie, wpływały na dobre odfermentowanie końcowe brzeczki, wynoszące 1,2<sup>o</sup> Blg, i dobre odfermentowanie pozorne młodego piwa (91,09–91,75%). Uzyskano nowy szczep drożdży piwowarskich (zał. 5 D20, P7, R10, R13), którego właściwości zastrzeżono w patencie (zał. 5 B1).

**Zachowanie cech biotechnologicznych mikroorganizmów z wykorzystaniem różnych metod przechowywania**

Swoje badania w Instytucie rozpoczęłam od próby zdrożdżowania serwatki przy udziale drożdży z rodzaju *Candida* (zał. 5, M1). Ta pierwsza praca z drożdżami wpłynęła na rozwinięcie moich zainteresowań profilami biotechnologicznymi drożdży, ich właściwą identyfikacją i charakterystyką. W latach 1987–1990 opracowałam charakterystykę cech biotechnologicznych wielu szczepów drożdży winiarskich i piwowarskich *Saccharomyces cerevisiae*. Charakterystyka ta obejmowała cechy istotne technologicznie, takie jak: zawartość alkoholu, szybkość fermentacji itd. Badałam także stabilność tych cech po różnym okresie przechowywania. Wyniki prac przedstawiłam na konferencjach naukowych w formie posterów i referatów (zał. 5 D12, D13, D14, L6, M9, M10, M11, M16, P1, P6, P10, R3, R8, R9, R10, R12, R28).

W pracy nad przechowywaniem mikroorganizmów przemysłowych zasadnicze jest zastosowanie takiej metody przechowywania, która w maksymalny sposób zapewnia zachowanie niezmienionych zdolności biotechnologicznych (stabilność szczepu), a także jest prosta i wygodna w stosowaniu, przy zmniejszonym do minimum niebezpieczeństwie zakażeń. Opracowałam zminiaturyzowaną metodę przechowywania mezofilnych drożdży winiarskich. Podczas badań sprawdziłam wpływ wieku drożdży (24-, 48-, i 72-godzinne – odpowiednio faza namnażania, wzrostu logarytmicznego i spoczynkowa) oraz rodzaj ośrodka ochronnego (5 i 10% glicerol) na przeżywalność drożdży i jakość młodego wina wytworzonego z ich udziałem. Stwierdziłam, że zarówno po jedno-, jak i sześciomiesięcznym okresie przechowywania badane drożdże charakteryzowały się dobrą przeżywalnością przy stosowaniu obu ośrodków ochronnych. Stwierdziłam też, że istotnym czynnikiem jest wiek kultury drożdży. Najniższy okres generacji zanotowano dla drożdży 24-godzinnych w 10% glicerolu. Najwyższy ubytek CO<sub>2</sub> zanotowano w przypadku drożdży 24-godzinnych, niezależnie od ośrodka. Najwyższą przeżywalność drożdży zamrożonych w późnej fazie stacjonarnej, czyli w 48 godzinie wzrostu w 10% glicerolu, a najlepszą żywotność drożdży zamrożonych w fazie wzrostu logarytmicznego, czyli po 24 godzinach wzrostu w tym samym ośrodku ochronnym (zał. 5 D10, D12). Stężenie alkoholu po 30-dniowej fermentacji wynosiło od 10,61% do 12,45%, przy wartości kontrolnej 1,87%. Ilość wydzielonego dwutlenku węgla plasowała się na poziomie od 26,33 do 21,22g, przy próbie kontrolnej 25,12 g (zał. 5 P6, R3).

Sprawdziłam także wpływ procesu liofilizacji na przeżywalność i żywotność drożdży i bakterii fermentacji mlekowej. Zliofilizowane szczepy drożdży i bakterii charakteryzowały się bezpośrednio po liofilizacji dobrą, choć zróżnicowaną przeżywalnością. Stopień przeżywalności

wahał się w przypadku drożdży winiarskich od 0,71 (Syrena) do 78,4% (Porzeczką), drożdży piwowarskich od 0,013% (SKI) do 4,85% (*S. uvarum* 308) (zał. 5 P1). Sprawdziłam przeżywalność drożdży gorzelnicznych zliofilizowanych we wcześniejszych latach, która wynosiła od 2,21% w przypadku szczepu C<sub>176</sub> do 59,17% - szczep O<sub>11</sub>. Dobra żywotność (dobry wzrost po 24 godzinach hodowli) wykazywały bakterie fermentacji mlekowej i bakterie lizynotwórcze (zał. 5 M18, M19, M21, R6, R7).

Sprawdziłam także stabilność cech biotechnologicznych szczepów drożdży przechowywanych od 50 lat, tj. odfermentowanie pozorne, zawartość etanolu i inne cechy. Przebrałam łącznie 130 szczepów, w tym 63 przeznaczonych do produkcji win białych, 47 do produkcji win czerwonych, 8 ras drożdży krioofilnych (wina białe i czerwone), 4 rasy drożdży sulfitowych oraz 8 szczepów przeznaczonych do produkcji miódów pitnych. Wykazałam, że stosowanie właściwych metod przechowywania powoduje, że cechy biotechnologiczne utrzymują się na wysokim poziomie (zał. 5 D17, M9, M10, M11, M16, M20, M22). Badane szczepy drożdży charakteryzowały się zarówno wysoką energią fermentacji, jak i zdolnością do wytwarzania alkoholu (zał. 5 D10, D13, P6, R3, , R12).

Jednym z aspektów aplikacyjnych tej tematyki było opracowanie technologii suszenia namnożonej biomasy drożdży i wytworzenia aktywnych suszonych preparatów drożdżowych. Istotnym czynnikiem było zbadanie wpływu suszenia na jakość wytwarzanych preparatów drożdżowych. Kilkuletnie badania nad charakterystyką szczepów winiarskich, potwierdzające ich cechy aplikacyjne, oraz brak na rynku polskim preparatów drożdży suszonych zaowocowały rozpoczęciem projektu celowego, którego byłam wykonawcą (zał. III W5). W projekcie opracowano założenia techniczno-technologiczne dla skompletowania prototypowej linii produkcyjnej suszonych aktywnych drożdży winiarskich rasy Tokay, Malaga, Steinberg, Burgund i Johannisberg w celu produkcji suszonych preparatów winiarskich. Zajmowałam się czystością mikrobiologiczną, żywotnością i stabilnością drożdży (zał.5, D10, D12, D13, D14, D17, P6, P10). Dobrze scharakteryzowane szczepy drożdży winiarskich o wysokim odfermentowaniu alkoholu udostępniono zakładom przemysłowym, odbiorcom indywidualnym i uczelniom do prac badawczo-rozwojowych (zał. 5, W6, W7, W11, W14).

**Założenia projektowe i budowa bazy danych mikroorganizmów przemysłowych. Zarządzanie informacjami o szczepach**

W 1989 r. rozpoczęłam prace nad projektowaniem struktury i budową bazy danych, zawierającej wszystkie potrzebne informacje dotyczące szczepów przechowywanych w Kolekcji (zał. 5, M12, M13, M14, M15, M16). Utworzono bazę danych zawierającą wszechstronne informacje o szczepach gromadzonych w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych. Bazę zaprojektowano w taki sposób, aby była „przyjazna” dla użytkownika, co oznacza, że zarówno sposób wprowadzania danych, jak i ich wyszukiwania jest jak najmniej skomplikowany. Z uwagi na charakter i zastosowane deponowanych szczepów istotna była możliwość wpisywania danych biotechnologicznych. Struktura bazy nie była formą zamkniętą i w miarę potrzeb mogła być zmieniana. Podział bazy na sześć części ułatwiał wprowadzenie danych tematycznych o szczepach, surowcach, produktach, metodach, Umieszczono też tezauryusy zawierające informacje o testach szkodliwości, wrażliwości, metabolizmie, bibliografii (zał. 5, M14, M15). Tworzona baza danych zawierała głównie dane technologiczne, dotyczące mikroorganizmów z kolekcji IBPRS. Baza danych wzbogacona była o możliwości importu, scalania i raportowania. W programie przewidziano kilka tematycznych kart (synonim, nazwy, kolekcje, badacze, testy, substraty, produkty, procesy itd.). Była to oryginalna pierwsza tego typu baza mikroorganizmów w Polsce (zał. 5 D11, L5, P2, P3, P4, P5, R2, R4, R5, R11).

Jako główny wykonawca projektu „Badania nad zastosowaniem cyfrowej analizy obrazu w pracach kolekcji kultur” (zał. 5 J5) prowadziłam prace digitalizacyjne z udziałem zestawu komora-mikroskop-komputer. Do istniejącej bazy wprowadziłam uaktualnione dane o cechach biotechnologicznych i fizjologicznych szczepów najczęściej zamawianych przez przemysł i odbiorców indywidualnych oraz obrazy mikroskopowe kontrolowanych mikroorganizmów, w postaci plików graficznych powiązanych z odpowiednimi szczepami (zał. 5, M 17). Utworzono stronę internetową kolekcji kultur, na której zamieszczono podstawowe informacje o dostępnych szczepach.

Projekt promotorski „Badania nad stabilnością cech genetycznych drożdży piwowarskich techniką PCR” (zał. 5 J6) realizowany pod kierunkiem prof. dr hab. Olgi Ilnickiej-Olejniczak, poprzedzony był pracą statutową (zał. 5 M23). Do badań wybrałam szczepy drożdży piwowarskich fermentacji dolnej i górnej. Szczepy te scharakteryzowałam pod kątem cech biotechnologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem cech takich jak ilość wytworzonego alkoholu, zawartość ekstraktu, czas trwania fermentacji głównej. Badałam także żywotność drożdży, poprzez określenie okresu generacji i współczynnika właściwej szybkości wzrostu. Wszystkie szczepy charakteryzowały się wysokimi wskaźnikami biotechnologicznymi, widoczne

było jednak zróżnicowanie międzyszczepowe. Zróżnicowanie molekularne zbadalam, stosując startery na przerywnikowe regiony międzygenowe ITS1-ITS4 (zał.5 M27). Wyniki badań wraz z koncepcją bazy danych przedstawiłam w pracy doktorskiej pt. „Badania nad wykorzystaniem nowoczesnych metod w prowadzeniu kolekcji kultur”.

#### Osiągnięcia uzyskane po uzyskaniu stopnia doktora

Rozpoczęte przed uzyskaniem stopnia doktora prace nad unikalnymi szczepami przemysłowej fermentacji octowej (zał. II M26) kontynuowałam w ramach projektu „Ocena populacji bakterii w przemysłowej produkcji octu z zastosowaniem cytometrii przepływowej i PCR” (Analysis the of the bacterial population in industrial vinegar production by flow cytometry and PCR) z dr Janją Trcek w ramach dwustronnej umowy międzyrządowej (zał. 5 W2) z firmą Limnos i Uniwersytetem w Ljubljanie.

#### Identyfikacja i charakterystyka mikroorganizmów o zastosowaniu przemysłowym ze szczególnym uwzględnieniem bakterii fermentacji octowej i oraz drożdży winiarskich i piwowarskich z wykorzystaniem metod klasycznych i molekularnych

Bakterie fermentacji octowej są naturalnie odporne na kwas octowy w niewielkich stężeniach. Odporność na ekstremalnie wysokie stężenia kwasu octowego wykazywało niewiele szczepów w świecie. Takimi zdolnościami charakteryzowały się szczepy bakterii octowych, wytwarzające do 10% kwasu octowego, wyizolowane z bioreaktorów przemysłowych i stosowane uprzednio w kilku projektach celowych. Celem projektu prowadzonego w trakcie współpracy ze Słowenią była identyfikacja bakterii kwasu octowego czynnych w produkcji octu, ocena genetycznych różnic pomiędzy acetofilnymi i acetotolerancyjnymi szczepami kwasu octowego, przy zastosowaniu metod opartych na technice PCR oraz porównanie populacji bakterii w bioreaktorach, eksploatowanych w Słowenii i w Polsce, przy użyciu techniki PCR i hybrydyzacji *in situ* w kombinacji z cytometrią przepływową. Przeprowadziliśmy identyfikację molekularną przemysłowych bakterii octowych, przystosowanych do wysokiej sumy pożywek, czyli zaadaptowanych do wysokich stężeń octu i alkoholu. Odkryliśmy, że jeden ze szczepów przemysłowych, uprzednio zaliczany do gatunku *Acetobacter pasteurianus*, w wyniku przeprowadzonej charakterystyki regionu 16S-23S rDNA oraz parcjalnego sekwencjonowania genu 16S rRNA, został sklasyfikowany na nowo, do wydzielonego w ostatnich latach rodzaju *Gluconoacetobacter* i zidentyfikowany jako *Gluconoacetobacter europaeus*. Wynikiem tej



współpracy były także doniesienia plakatowe (zał. 5 P12, P13), artykuł (zał. 5 A2) i rozdział w monografii zagranicznej (zał. 5 D1).

Badania nad bakteriami octowymi kontynuowałam jako kierownik w projekcie celowym „Opracowanie i wdrożenie sposobu wytwarzania octu cydrowego (jabłkowego)” i wdrożeniu (zał. 5 W3). W ramach tego projektu celowego, jako współautor, opracowałam i wdrożyłam sposób wytwarzania octu cydrowego (jabłkowego), charakteryzujący się tym, że fermentacja octowa prowadzona była metodą ciągłą w warunkach hodowli wgłębnej. Zarówno produkt, jak i technologia miały charakter innowacyjny. Proces otrzymywania octu cydrowego podzielono na dwa etapy: fermentację alkoholową w celu otrzymania odpowiedniego cydru oraz fermentację octową cydru. Do fermentacji alkoholowej użyto szczepów drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae*, przeprowadzono ją w warunkach hodowli stacjonarnej, periodycznej, przy szybkości rozcieńczania od 0,10 do 0,13 h<sup>-1</sup>, uzyskując produktywność kwasu octowego odpowiednio od 5 do 7 g(lxh) (zał. 5 R32, R35). Na podstawie badań przeprowadzonych w skali mikrotechnicznej opracowano wytyczne do prowadzenia fermentacji w skali przemysłowej. Wynikiem projektu celowego był uzyskany patent krajowy (B6) oraz zgłoszenie patentowe zagraniczne (PCT/EP2013/056793, US14/388, 472, 28.03.2013) w ramach projektu POIG (zał. 5 O5). Wynalazek uzyskał Brązowy Medal na Targach ARCA w Zagrzebiu i Złoty Medal na targach International Warsaw Invention Show w Warszawie (zał. 5 C1, K1, K2).

Uczestniczyłam także w badaniach nad wytwarzaniem preparatów suszonych, aktywnych drożdży piwowskich do otrzymywania wysokiej jakości piwa (zał. 5 D25, R 29).

Równolegle pracowałam nad metodami różnicowania szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Powstały prace przeglądowe (zał. 5 D3, D18, D22), w których omówiłam systematykę drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* oraz metody ich identyfikacji, z uwzględnieniem cyfrowej analizy obrazu, biochemicznych testów identyfikacyjnych, a także fenotypowego „odcisku palca”. Z uwagi na częstą niejednoznaczność tradycyjnych metod identyfikacji drobnoustrojów, coraz szerzej wykorzystywane są w tym celu metody biologii molekularnej (zał.5 D4, D23, P15, R19).

Prowadziłam badania nad charakterystyką molekularną drożdży winiarskich z zastosowaniem metody RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA). Przedstawiłam wyniki zmienności międzyszczepowej obserwowanej po reakcji RAPD, ze starterami OPB-12, OPD-04, OPA-11, OPA-17, Dekamer. Zastosowanie metody RAPD, której celem była amplifikacja regionów

o największej liczbie powtórzeń, wykazało dużą zmienność w obrębie genomu drożdży fermentacji górnej i dolnej. Obserwowałam heterogenność wśród szczepów *S. cerevisiae*, uzyskaną techniką RAPD, zależną od stosowanych starterów (zał. 5 D27).

W doniesieniach plakatowych przedstawiłam wyniki prac realizowanych w ramach projektów badawczych – prac statutowych IBPRS, dotyczących identyfikacji wybranych szczepów drożdży winiarskich i piwowarskich, przechowywanych w kolekcji IBPRS (zał. 5 P15). Badaniom poddano geny kodujące cząsteczki rybosomalnych RNA oraz rozdzielające je sekwencje międzygenowe ITS. W pierwszym etapie prac analizowałam sekwencje ITS1 i ITS2 oraz 5,8S rRNA wybranych szczepów drożdży, następnie rozszerzono analizowany fragment o sekwencje genu 18S rRNA. Amplikowany produkt o wielkości ok. 1400 pz poddano trawieniu restrykcyjnemu, a następnie rozdzielano elektroforetycznie na żelu w obecności wzorca masy (zał. 5 D27, P15).

Kolejnym obiektem badawczym były bakterie fermentacji mlekowej (zał. 5 M31, P11, R6, R7, R9, D38). Bakterie fermentacji mlekowej, ze względu na status bakterii bezpiecznych dla ludzi i zwierząt, są grupą mikroorganizmów o stale wzrastającym znaczeniu w biotechnologii. Selekcja czystych kultur bakterii daje możliwość wykorzystania ich w preparatach probiotycznych, korzystnie wpływających na równowagę mikroflory bakteryjnej przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. Najważniejszymi właściwościami drobnoustrojów probiotycznych, możliwymi do sprawdzenia w warunkach laboratoryjnych, są szybki ich wzrost, wysoka wydajność biosyntezy kwasu mlekowego, tolerancja na niskie pH środowiska i obecność soli żółciowych, właściwości antagonistyczne wobec drobnoustrojów patogennych i wskaźnikowych oraz skuteczne hamowanie ich wzrostu. Izolowałam je z różnych grup zwierząt: kurczaków (zał. 5 D24), świń (zał. 5 R15, R16, R24) i naturalnie fermentujących produktów takich jak zsiadłe mleko, kapusta kiszona i ogórki kiszone oraz z produktów niefermentowanych. Na podstawie testów morfologicznych oraz biochemicznych wyizolowane szczepy zakwalifikowano do gatunków *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* i *Bifidobacterium adolescentis*. Drobnoustroje te wykazywały znaczną tolerancję na niskie pH oraz obecność w środowisku soli żółciowych. Wytwarzane przez nie metabolity skutecznie hamowały wzrost testowanych mikroorganizmów patogennych. Cechy te wskazywały na możliwość ich wykorzystania w produkcji preparatów probiotycznych (zał. 5 R17). Wyniki prac dotyczących bakterii mlekowych zamieściłam w publikacjach (zał. 5 D24).

Metodami molekularnymi wykonano reidentyfikację bakterii fermentacji mlekowej, izolowanych z różnych źródeł (zał. 5, P11, R16, R24). Przeprowadzona analiza sekwencyjna genu

16S rRNA w większości przypadków potwierdziła wstępną identyfikację do gatunku badanych szczepów.

Wśród bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z przewodu pokarmowego trzody chlewnej, charakteryzujących się dużym stopniem namnożenia, niskim samorzutnym pH i wysoką kwasowością w przeliczeniu na kwas mlekowy, oraz wzrostem w temperaturach 15, 30, 37 i 45°C wyizolowane te, które wykorzystane zostały później w granicy celowym (zał. 5 W4). Były też przedmiotem patentu (zał. B3).

Badania nad identyfikacją i charakterystyką bakterii mlekowych kontynuowałam w projekcie międzynarodowym w Programie Ramowym UE „Doskonalenie technologii czterech napojów fermentowanych otrzymywanych w krajach Europy Wschodniej” – FERBEV (zał. 5, O3). Ekspresję genów dehydrogenazy mleczanowej, jako wielkość wytworzonego mRNA przez bakterie fermentacji mlekowej oceniałam, jako główny wykonawca, w projekcie badawczym N N312 573140 „Opracowanie funkcjonalnego napoju zbożowo-owocowego zawierającego L-mleczany, selekcyjonowane kultury bakterii fermentacji mlekowej i immobilizowanych jelitowych bakterii probiotycznych” (zał. 5 J8). Celem naukowym projektu było opracowanie sensorycznie akceptowanego napoju, opartego na fermentacji matrycy zbożowo-owocowej, zawierającej prebiotyki, przez kulturę LAB, której populacja w produkcie ukwaszania jest wzbogacona kulturą jelitowych bakterii probiotycznych. Wersje eksperymentalne matrycy owsiano-bananowej testowano poprzez proces fermentacji, po szczepieniu jej monokulturą z kolekcji IBPRS (zał. 5 O8).

Kolejna praca, związana z fermentacyjnymi zdolnościami bakterii mlekowych, polegała na przefermentowaniu, w warunkach laboratoryjnych, pyłku kwiatowego z udziałem bakterii LAB. Pozyskiwanie pierzgi, znajdującej się w plastrach w ulu, w warunkach naturalnych jest procesem bardzo pracochłonnym, dlatego podjęto próbę opracowania metody otrzymywania pierzgi poza środowiskiem pszczelego ula. Otrzymano produkt zawierający podwyższoną ilość kwasu mlekowego (ok. 2,5%) o smaku, zapachu oraz konsystencji identycznej jak pierzga pszczela (zał. 5 M39, M49, O6, P31, P35, zgłoszenie patentowe krajowe i międzynarodowe P.406622 z 20.11.13, PCT/PL 2014/050061 z 29.09.14).

W 2013 r. byłam współautorem pracy statutowej IBPRS o produkcji zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych przez bakterie *Lactobacillus* sp. Wyniki badań przedstawiono na XXIII Ogólnopolskim Sympozjum Bromatologicznym (zał. 5 R43).

### Wprowadzanie systemu jakości i zarządzanie Kolekcją Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych zgodnie ze standardami OECD, WFCC i ECCO

Zarówno przemysł biotechnologiczny, jak i ośrodki naukowe związane z biotechnologią oczekują wysokiej jakości materiału biologicznego, tzn. bakterii, drożdży, grzybów strzępkowych, linii komórkowych z przeznaczeniem do badań i zastosowań biotechnologicznych. Mikroorganizmy takie są deponowane w kolekcjach kultur (zał. 5 P4, P5, R28), a informacje o nich są udostępniane poprzez wydawane katalogi kolekcji.

W Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, działającej od 1957 r. w Zakładzie Mikrobiologii Technicznej i Biochemii IBPRS, deponowane i przechowywane są szczepy drożdży winiarskich, piwowarskich, gorzelnicznych, piekarskich i paszowych, bakterie fermentacji mlekowej, octowej, dekstranotwórcze, grzyby strzępkowe, wytwarzające między innymi enzymy proteolityczne, lipolityczne, pektynolityczne, celulozylityczne, glukoamylazę i inne ([www.ibprs.pl/KKP](http://www.ibprs.pl/KKP)). Kolekcja należy do European Culture Collection Organization i World Federation Culture Collection od 1992 r. Moje prace, od początku związane z obszarem działań kolekcji, prowadziły do podniesienia jej znaczenia i możliwości (zał.5 J9 a-p).

Z mojej inicjatywy kolekcja uzyskała status Międzynarodowego Organu Depozytowego, nadany przez World Intellectual Property Organization (WIPO) ([www.wipo.org](http://www.wipo.org)) w 2000 r. Niedługo potem wzięłam udział w projekcie European Biological Resource Centre Network (Sieć Centrów Europejskich Zasobów Biologicznych) w V Programie Ramowym UE. Sieć ta powstała w odpowiedzi na inicjatywę Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (Organization for Economic Co-operation and Development, OECD), która dotyczyła utworzenia Centrów Zasobów Biologicznych (Biological Resource Center), czyli nowoczesnych kolekcji kultur mikroorganizmów, immanentnej części infrastruktury biotechnologicznej, stosujących zaawansowane techniki i technologie identyfikacji i przechowywania drobnoustrojów, także te informatyczne. Sieć EBRCN umożliwiła współpracę między kolekcjami i pozwoliła rozwinąć ją w szeroką inicjatywę europejską. Centra pracują bowiem zgodnie z międzynarodowymi normami jakości. W V Ramowym Programie Unii Europejskiej uczestniczyło 15 kolekcji z krajów europejskich (zał. 5, O1). Grupa robocza OECD, w której pracach wzięłam udział (zał. 5 N6), sprawy dotyczące Centrów rozważała w trzech aspektach: akredytacji i kryteriów jakości, współpracy międzynarodowej i tzw. harmonizacji, czyli zagadnień prawnych, prawa własności intelektualnej, etyki i zapewnienia długoterminowego finansowania.

Uzyskanie uprawnień Międzynarodowego Organu Depozytowego przez Kolekcję Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, jako 1 z 20 w świecie, pozwoliło na przyjmowanie do depozytu patentowego mikroorganizmów podlegających procedurze patentowej.

O jakości „produktu” dostępnego w kolekcjach, czyli mikroorganizmu o określonych wymaganych cechach, utrzymanych podczas wieloletniego przechowywania z zastosowaniem odpowiedniej metody, decyduje kilka czynników. Pierwszym z nich jest jakość prowadzenia kolekcji, zgodna z międzynarodowymi standardami, jakość i dostępność katalogu kolekcji, a także ujednoczenie sposobu informowania (zał. 5 D21).

Z prowadzeniem przeze mnie kolekcji wiązało się ponadto wdrażanie do niej systemu jakości (zał. 5 L1, L7) – kolekcji stała się źródłem wysokiej jakości scharakteryzowanych szczepów związanych z biotechnologią i zastosowaniem biotechnologicznym (zał. 5 D5).

Zgodnie z zobowiązaniami, wynikającymi z Regulaminu Kolekcji, dotyczącymi udostępniania szczepów, przygotowałam i scharakteryzowałam szczepy „dydaktyczne” (zał. 5 M41), wykorzystywane w trakcie ćwiczeń biotechnologicznych na uczelniach o kierunkach rolniczych i biotechnologicznych.

Zasoby kolekcji stanowią bogate źródło sprawdzonego materiału genetycznego przydatnego w procesach aplikacyjnych w rolnictwie (zał. 5 R28, R34).

Wynikiem prac związanych z prowadzeniem kolekcji kultur było wydanie dwóch monografii. W jednej z nich pt. „Kolekcja Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych” zawarłam podstawowe informacje o zasadach deponowania mikroorganizmów, także część katalogową (zasoby kolekcji IBPRS, której jestem kuratorem) (zał. 5 D6, D7, D8). Informacje katalogowe zawarłam w rozdziale „Bakterie, drożdże, grzyby strzępkowe w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych” (zał. 5, D9). Zasady identyfikacji mikroorganizmów przedstawiłam w rozdziałach (zał. 5 D3 i D4) monografii „Identyfikacja, przechowywanie i bazy danych mikroorganizmów”.

Na zaproszenie prezydenta ECCO dr Dainy Eze oraz organizatorów Kongresu, prof. Jean-Claude Piffarettiego – przewodniczącego Komitetu Programowego i prof. Jacques’a Schrenzela – przewodniczącego Komitetu Organizacyjnego, wygłosiłam referat dotyczący działalności Kolekcji IBPRS pt. „Identified and well-characterized industrial microorganisms from the public collection – an important potential for biotechnology” na IV Kongresie Mikrobiologów w Genewie, w ramach Special Event, organizowanego przez European Culture Collection

Organisation na temat „Biological Resource Centres: a multi-service for life sciences and biotechnology” (zał. 5 L2).

Wejście do Krajowej Sieci Informacji o Bioróżnorodności (KSIB) (zał. 5, O2) umożliwiło współpracę między różnymi polskimi i zagranicznymi jednostkami naukowymi, których wspólnym celem było przechowywanie różnych elementów bioróżnorodności. Zapisane dane w formacie ABCD przekazałam koordynatorowi projektu – Uniwersytetowi Warszawskiemu. W trakcie uczestnictwa w sieci KSIB dane dotyczące 600 szczepów (rodzaj, gatunek, numer KKP, nazwa zwyczajowa, pożywka do wzrostu, temperatura wzrostu, przynależność do grupy biobezpieczeństwa, zastosowanie) zostały zweryfikowane i uzupełnione. Dane wyeksportowano do programów Excel i Acces. Skonfigurowano połączenie sieciowe, zainstalowano programy Apache, Python, BioCase. Podłączono bazę do Intranetu (Wydział Biologii). Dane zostały przesłane do Węzła Narodowego sieci KSIB i dołączone do sieci światowej Global Biodiversity Information Facility jako Collection of Industrial Microorganisms (212.87.9.194.) (zał. 5 D26, R23.). W czasie trwania spotkań Rady KSIB przedstawiałam rolę kolekcji i jej zasoby.

Kolejnym etapem prac związanych z kolekcją jest udział w projekcie Microbial Resource Research Infrastructure, aktualnie realizowanym w ramach VII Programu Ramowego (zał. 5, O4, L3, P41). Prowadzone są wstępne prace akredytacyjne kolekcji. W sierpniu 2014 r. na Polską Mapę Drogową Infrastruktury Badawczej, w wyniku dwuetapowej procedury recenzyjnej, wszedł projekt SECURE, dotyczący m.in. wprowadzenia standardów jakości w kolekcji i deponowania informacji bioinformatycznych (zał. 5 J1). Jestem koordynatorem tego projektu.

#### **Wykorzystanie nowoczesnych metod molekularnych do identyfikacji bakterii patogennych (*Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*) z elementami walidacji i szacowania niepewności do zastosowania w badaniach żywności**

W 2010 r. rozpoczęłam prace nad wykrywaniem patogenów żywności z wykorzystaniem metod molekularnych (zał. 5 M33, M34). Działanie te wiązały się bezpośrednio z formalną organizacją Pracowni Analiz Mikrobiologicznych w Zakładzie Mikrobiologii, którym kieruję. Prawidłowe wykrycie mikroorganizmów metodami klasycznymi i molekularnymi potwierdziłam w systematycznych, corocznych badaniach międzylaboratoryjnych.

Wiele aktów prawnych, m.in. Rozporządzenie Komisji nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych, zobowiązuje do wykonywania badań

na obecność bakterii *Listeria monocytogenes*. Tradycyjne metody zarówno izolacji, jak i identyfikacji bakterii *Listeria monocytogenes* są czasochłonne i niepewne, zwłaszcza przy izolacji termicznie niszczonej bakterii, czy też w trakcie procesów przemysłowych uszkadzających strukturę komórki bakteryjnej. Znajomość sekwencji genów, których produkty białkowe warunkują proces inwazji patogenu i są włączane w trakcie rozwoju zakażenia, umożliwia opracowanie nowych, niekonwencjonalnych metod, pozwalających na szybkie i skuteczne wykrywanie mikroorganizmów w żywności i innych próbkach np. środowiskowych. W pracy przeglądowej (zał. II D28) przedstawiłam charakterystykę bakterii z gatunku *Listeria monocytogenes*. Opracowałam, jako współautor, metodę identyfikacji *L. monocytogenes* z zastosowaniem techniki duplex PCR. Wykorzystaliśmy startery dla genu *iap* – kodującego największe białko zewnątrzkomórkowe p60, którego ok. 660-nukleotydowy fragment końca 3' jest specyficzny dla *L. monocytogenes*. Drugą parę primerów zaprojektowano na ok. 750-nukleotydowy fragment genu *hly*, genu wirulencji, kodującego listeriolizynę, czynnik infekcyjny niezbędny w procesie inwazji wewnątrzkomórkowej *L. monocytogenes*. Jako matryce zastosowano DNA wyizolowane metodą fenolową z bakteryjnych hodowli płynnych oraz bezpośrednio kolonię bakteryjną wyrosłą na podłożu agarowym. Do walidacji metody wykorzystaliśmy szczepy z kolekcji IBPRS, kolekcji Instytutu Pasteura i Czech Collection of Microorganisms oraz szczepy z próbek środowiskowych. W celu potwierdzenia specyficzności zastosowanych starterów dla *L. monocytogenes* przeprowadzono szereg reakcji z wykorzystaniem gatunków z rodzaju *Listeria* (*L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. grayi*., *L. welchmieri*, *L. seelighieri*, *L. murayi* oraz wielu różnych szczepów z gatunku *L. monocytogenes*). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że opracowana metoda identyfikacji *L. monocytogenes* może zostać wykorzystana do wykrywania patogenów bezpośrednio z kolonii na podłożu stałym (zał. 5 P14, P17, P22, R18, R20, R22).

W celu zwalidowania alternatywnej metody wykrywania *Listeria monocytogenes*, przeprowadziłam 91 reakcji PCR, włączając 57 szczepów odniesienia i 34 bakterie z próbek żywności. Precyzję metody określiłam na 96,6%, specyficzność na 100% i czułość na 94,3%. Badania biegłości QMS potwierdziły prawidłowe wyniki. W wyniku tych prac przygotowałam, jako współautor, zgłoszenie patentowe i w 2010 r. otrzymałam patent krajowy (Zestaw starterów oligonukleotydowych i sposób wykrywania *Listeria monocytogenes* (zał. 5 B2).



Do wykrywania bakterii *Listeria monocytogenes* zastosowałam też metodę real-time PCR (zał. 5 M44). Jako współautor, zajmowałam się również modelowaniem wzrostu tej bakterii na różnych matrycach roślinnych (zał. 5 A8).

Opracowałam i sprawdziłam procedurę wykrywania bakterii *Salmonella* sp. w reakcji real-time PCR. Stosowałam różne matryce żywnościowe, m.in. mleko, mąkę, preparaty drożdży suszonych oraz różne poziomy zakażenia (zał. 5 M44). Wszystkie szczepy *Salmonella* sp. zostały zidentyfikowane i wykryte w zakażonej żywności zarówno klasycznym PCR, jak i Real-Time PCR. Wynik badania potwierdzono poprzez przeprowadzenie klasycznych analiz mikrobiologicznych, zgodnie z polskimi normami. W trakcie pracy sprawdzano możliwość skrócenia etapu przednamnażania, tak aby maksymalnie skrócić czas analizy. Stwierdziłam wysoką czułość i skuteczność metody real-time PCR, mimo pracy na tzw. „trudnej” matrycy, jaką jest próbka żywności zakażonej bakteriami (zał. 5 D33). Przydatność metody wykrycia bakterii *Salmonella* potwierdziłam w testach klasycznych (PN-EN ISO 6579:2003) i zweryfikowałam w badaniach biegłości. Podczas walidacji zastosowałam 37 szczepów odniesienia, m.in. *Klebsiella* sp., *Citrobacter freundii*, *Esherichia coli* i *Bacillus* sp. Nowo zaprojektowane startery będą przydatne w identyfikacji bakterii z próbek żywnościowych (zał. 5, D33). Na temat identyfikacji metod wykrywania salmonelli wygłosiłam referat podczas sesji Komitetu Nauk o Żywności, która odbyła się w lipcu 2013 r. w Krakowie (zał. 5 L14) oraz przygotowałam jako współautor publikacje (zał. 5 D34, D36, P25) i doniesienia (zał. 5 P25).

#### Zastosowanie metod molekularnych do identyfikacji grzybów strzępkowych i genów mikotoksynotwórczych

Wczesne wykrycie patogenów fuzaryjnych, z wykorzystaniem technik molekularnych, może ograniczać straty zbóż powodowane przez grzyby (zał. 5 A3, L11, L13, P28, P32, P33, P36, P38, R38). Zbadałam występowanie grzybów z rodzaju *Fusarium* na ziarnach pszenicy (współpraca z Zakładem Przetwórstwa Zbóż i Piekarstwa, IBPRS), opracowałam, jako współautor, metodę izolacji i ponownego namnażania grzybni *in vitro* (zał. 5 M37). Materiałem badawczym były izolaty grzybów pleśniowych wyizolowane z ziarna pszenicy. Przynależność do rodzaju *Fusarium* została określona metodami klasycznymi. W celu potwierdzenia tego oznaczenia amplifikowano regiony specyficzne z zastosowaniem starterów P58SL i P28SL (zał. 5 P27) Umożliwiło to prawidłową identyfikację gatunkową grzybów zasiedlających zboża, jednakże



w niektórych przypadkach (dwa szczepy *Trichoderma viride*) wykazano niespecyficzność starterów (zał. 5 D29).

Kolejnym etapem było sprawdzenie, czy istnieje korelacja między wykryciem obecności genów odpowiedzialnych za kodowanie wytwarzania mikotoksyn DON (deoksynivalenol) lub ZEA (zearalenon), poprzez przeprowadzenie reakcji PCR ze starterami HA TriF i HA TriR oraz M\_Tri7F i M\_Tri7R lub PKS4F i PKS4R oraz PKS 13F i PKS 13R, a rzeczywistym wytwarzaniem tych mikotoksyn. Po zbadaniu rzeczywistego stężenia DON i ZEA w hodowlach modelowych okazało się, że DON został wytworzony przez 4 izolaty, a ZEA przez 8 (zał. III, R40). Zmienne wyniki skłoniły do rozszerzenia prac i wprowadzenia techniki ekspresji genów. W pracy tej porównano wytwarzanie mikotoksyn przez grzyby z rodzaju *Fusarium* z obecnością genów odpowiedzialnych za ich wytwarzanie (prognozowanie), której wyniki przedstawiłam w doniesieniach posterowych (zał. 5 P28, R38, R44).

Kontynuowałam badania nad grzybami z rodzaju *Fusarium* w projekcie badawczym „Charakterystyka molekularna mikotoksynotwórczych izolatów *Fusarium* sp. z ziarna zbóż i jego przetworów” (zał. 5 J3). Wśród 112 wyselekcjonowanych szczepów z rodzaju *Fusarium*, u 50% wykryto obecność genu *Tri5*, u 37% szczepów grzybów fuzaryjnych zidentyfikowano gen *PKS4*. Spośród 69 badanych szczepów *Fusarium* sp. u 48 uzyskano produkty amplifikacji ze starterami HA\_Tri5/R o wielkości 260pz, co świadczyło, iż dane szczepy wykazują zdolność do syntezy trichotecenów z grupy B (zał. 5 R30).

Opracowano metodę molekularnego rozróżnienia szczepów *Fusarium* przy użyciu 2 par starterów projektowanych, z wykorzystaniem sekwencji genów kodujących wytwarzanie ZEA i DON. Zdolność do wytwarzania mikotoksyn sprawdzono z wykorzystaniem metody PCR Real-time. Oceniano też potencjalne zdolności mikotoksynotwórcze przez identyfikację obecności genu *Tri5*, odpowiedzialnego za tworzenie trichotecenów, oraz genu *PKS4*, niezbędnego w syntezie zearalenonu. Stosowano specyficzne startery c01F i Fc01R, Fg 16NF i Fg16NR, Fp82F i Fp82R i zidentyfikowano *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* i *Fusarium poae*.

Wyniki prac przedstawiono w formie komunikatów na konferencjach oraz w publikacjach (zał. 5 A7, P39, R40).

Zasady analizy filogenetycznej, rutynowo wykorzystywanej w naszych pracach, przedstawiłam, jako współautor, w publikacji o zastosowaniu dendrogramów niebinarnych (zał. 5 D35).

### Różnicowanie drożdży przemysłowych na podstawie budowy genów istotnych technologicznie (geny *FLO*, *MAL*, *FOL*, *SSU1*)

Od 2004 roku zajmowałam się poszukiwaniem zależności między cechami biotechnologicznymi mikroorganizmów a budową molekularną w grupie drożdży przemysłowych (flokulacja, drożdże siarkowe, osmoofilność). Badałam zmienność genów w kontekście polimorfizmu genów drożdżowych (zał. 5 A5, M42, R42).

Niektóre doniesienia plakatowe poświęciłam tematyce zmienności cech flokulacji i gospodarki cukrami w odniesieniu do zużycia maltozy (zał. 5 L9, L10 zał. III P16, P19, P20, P 21, P23, P24, P26, P27, P29, P31, P37, P44, R21, R22, R31, R39).

Prace te zaowocowały podsumowaniem o adaptacji i ewolucji wśród drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (zał. 5 L15) oraz wykładem na zaproszenie przewodniczącej Komitetu Organizacyjnego prof. E Gospodarek o możliwej oportunistycznej roli drożdży *Saccharomyces cerevisiae* związanej z transferem genów i zdolnościami adhezyjnymi z patogennością (zał.5 L16).

W latach 2007–2009 zajmowałam się genami związanymi ze szlakiem syntezy kwasu foliowego (Zał. 5 M35). Badałam, jako współautor, zmienność genów *DFR*, *FOL2* i *FOL3*, odpowiedzialnych za syntezę kwasu foliowego. W kontekście analizy sekwencji polimorficznych pod kątem zmiany sekwencji aminokwasowej wykorzystałam zarówno technikę PCR, jak i MSSCP, które pozwoliły na wyszukanie zmiennych części w genach odpowiedzialnych za biosyntezę z kwasu foliowego. W badaniach stwierdzono różnice w sekwencji genów kodujących enzymy uczestniczące w biosyntezie kwasu foliowego u drożdży piwowskich i piekarskich. Na ich podstawie wybrane zostały fragmenty genów, które następnie zsekwencjonowano i poddano analizie porównawczej. Badania pozwoliły na wyodrębnienie stabilnych genetycznie szczepów, które mogą w przyszłości zostać wykorzystane do produkcji żywności wzbogaconej w kwas foliowy (zał.5 A6, D31, L12, M34, P18, P20, P24, P26, P30, R25, R27, R33, R36).

Wpływ siarkowania moszczu na zmiany w genomie drożdży winiarskich przedstawiłam w doniesieniach konferencyjnych (zał. 5 P30, P34, P42).

Praca statutowa IBPRS (zał. 5 M40) zaowocowała zgłoszeniem patentowym krajowym i zagranicznymi, dotyczącym drożdży „miodowych” w ramach projektu patentowego POIG (zał. 5 O7).

**Różne zagadnienia związane z mikrobiologią ogólną**

Wśród najnowszych rodzajów środków dezynfekcyjnych od niedawna na rynku dostępne są nanokoloidy. Nowością jest zastosowanie niejonowych nanokoloidów. W ramach pracy statutowej IBPRS (zał. 5, M36) stwierdziłam, że działanie niejonowych nanokoloidów złota, srebra i miedzi nawet w niewielkich stężeniach, wynoszących 10 ppm, działa bakteriobójczo. Całkowite zahamowanie wzrostu bakterii *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* sp. zachodzi po 24 godzinach. Najsilniejsze działanie bakteriobójcze zaobserwowano w przypadku roztworu koloidalnego srebra o stężeniu 50 ppm, a nieznacznie słabsze działanie wykazywały roztwory koloidalne złota oraz miedzi w tym samym stężeniu (zał. 5 D30, R37).

Na konferencji w Krynicy Morskiej, zorganizowanej przez Zakład Przetwórstwa Zbóż i Piekarstwa IBPRS, wygłosiłam referat o zanieczyszczeniach mikrobiologicznych w surowcach i produktach zbożowych (zał. 5 L8)

Byłam także współautorem prac o wytwarzaniu lizyny (zał. 5 M30, R26), inulinazy (zał. 5 M38, R41) i transglutaminazy (zał. 5 A4, D39, L4, P40, P43), wytwarzaniu liofilizowanych preparatów drobnoustrojów jako standardów do badań międzylaboratoryjnych (zał. 5 M32), niepewności pomiaru w mikrobiologii żywności (zał. 5 D37). Współpracowałam również przy organizacji laboratorium GMO w IBPRS (zał. 5 M29, R14).



