

AUTOREFERAT

dr Jolanta Mierzejewska

Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków

Wydział Chemiczny

Politechnika Warszawska

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych w języku
polskim - Załącznik nr 2

Warszawa, 2018

1. *Imię i Nazwisko:*

Jolanta Mierzejewska

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

Stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii, nadany uchwałą Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie w dn. 24 czerwca 2008 r; temat rozprawy doktorskiej: „Functional analysis of ParB protein of *Pseudomonas aeruginosa*”; promotor w przewodzie doktorskim: Prof. dr hab. Grażyna Jagura-Burdzy

Dyplom magistra biologii w zakresie mikrobiologii, nadany przez Uniwersytet Warszawski Wydział Biologii w Warszawie w dn. 28 czerwca 2002 r.; tytuł pracy magisterskiej: „Analiza funkcjonalna wybranych regionów plazmidu CTX-M3”; kierujący pracą: Prof. dr hab. Mirosława Włodarczyk

3. *Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych:*

09.2011–obecnie, adiunkt (pracownik naukowo-dydaktyczny), Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków (do końca 2017 r. był to Zakład Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych w Instytucie Biotechnologii), Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

09.2011–09.2012, wizytujący badacz realizujący zadania w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) N301693740, Zakład Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN (IBB PAN)

07.2008–02.2011, asystent, Zakład Biochemii Drobnoustrojów IBB PAN (urlop macierzyński i wychowawczy w okresach: 07.2009–12.2009 i 02.2010–08.2010)

10.2002–06.2008, doktorant, Zakład Biochemii Drobnoustrojów IBB PAN (dwa razy urlop macierzyński w okresach: 09.2003–01.2004 i 01.2007–06.2007)

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

4.1 Tytuł osiągnięcia:

„Mikrobiologiczna produkcja 2-fenyletanolu: poszukiwanie nowych szczepów drożdży, opracowanie warunków prowadzenia bioprocesu i wydzielania produktu końcowego”

4.2 Publikacje wchodzące w skład szczególnego osiągnięcia (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

[P1] Mierzejewska J*, Tymoszevska A, Chreptowicz K, Krol K. **2017**. Mating of 2 Laboratory *Saccharomyces cerevisiae* Strains Resulted in Enhanced Production of 2-Phenylethanol by Biotransformation of L-Phenylalanine. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 27:81–90 (IF₂₀₁₇ - **1,462**; 5-year IF₂₀₁₇ - **1,718**; MNiSW** - **25** pkt.)

[P2] Okuniewska P, Domańska-Żelazna U, Pobudkowska A, **Mierzejewska J. 2016**. Production of 2-phenylethanol (PEA) by yeast with ionic liquids in situ extraction. *Chemik* 70:491–496 (IF₂₀₁₆ - **0**; 5-year IF₂₀₁₆ - **0**; MNiSW** - **8** pkt.)

[P3] Okuniewska P, Domańska U, Więckowski M, **Mierzejewska J. 2017**. Recovery of 2-phenylethanol from aqueous solutions of biosynthesis using ionic liquids. *Separation and Purification Technology* 188:530–538 (IF₂₀₁₇ - **3,927**; 5-year IF₂₀₁₇ - **4,202**; MNiSW₂₀₁₆** - **40** pkt.)

[P4] Chreptowicz K, Wielechowska M, Głowczyk-Zubek J, Rybak E, **Mierzejewska J***. **2016**. Production of natural 2-phenylethanol: from biotransformation to purified product. *Food and Bioproducts Processing* 100:275–281 (IF₂₀₁₆ - **1,97**; 5-year IF₂₀₁₆ - **2,966**; MNiSW** - **35** pkt.)

[P5] Chreptowicz K, **Mierzejewska J***. **2018**. Enhanced bioproduction of 2-phenylethanol in a biphasic system with rapeseed oil. *New Biotechnology* 42:56–61 (IF₂₀₁₇ - **3,733**; 5-year IF₂₀₁₇ - **3,454**; MNiSW** - **30** pkt.)

[P6] Chreptowicz K, Sternicka MK, Kowalska PD, **Mierzejewska J***. 2018. Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in organic waste-based media. *Letters in Applied Microbiology* 66:153–160 (IF₂₀₁₇ - **1,471**; 5-year IF₂₀₁₇ - **1,848**; MNiSW** - 25 pkt.)

[P7] **Mierzejewska J***, Dąbkowska K, Chreptowicz K, Sokołowska A. 2018. Hydrolyzed corn stover as a promising feedstock for 2-phenylethanol production by non-conventional yeast. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* doi: 10.1002/jctb.5823 (IF₂₀₁₇ - **2,587**; 5-year IF₂₀₁₇ - **2,734**; MNiSW** - **30** pkt.)

*autor korespondujący; ** punktacja według ujednoliconego wykazu załączonego do komunikatu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) z dnia 26.01.2017 r.

Sumaryczne wskaźniki bibliometryczne dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia to: IF_{2016/2017} = **15,15**; 5-year IF_{2016/2017} = **16,922**; MNiSW = **193** pkt.

4.3 Omówienie celu naukowego w/w prac naukowych i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Wprowadzenie

Substancje aromatyzujące i zapachowe są powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym i kosmetycznym, gdyż konsumenci kierują się pozytywnymi doznaniem węchowymi w trakcie zakupów. Wśród tych substancji jest 2-fenyletanol (2-PE), alkohol który w zależności od stężenia ma charakterystyczny różany lub miodowo-kwiatowy zapach i jest częstym składnikiem różnych kompozycji zapachowych lub aromatyzujących. Oprócz pożądanych właściwości aromatyzujących 2-fenyletanol wykazuje działanie przeciwgrzybicze i przeciwbakteryjne, więc potencjalnie stanowi alternatywę dla tradycyjnych konserwantów w formulacjach kosmetycznych (Fraud *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2011). Związek ten jest głównie otrzymywany na drodze syntezy chemicznej i tylko niewielka część tego związku pochodzi z surowców naturalnych, głównie płatków róż (Carlquist *et al.*, 2015, Kovacheva *et al.*, 2010). Spowodowane jest to przede wszystkim wysokimi kosztami pozyskiwania 2-PE z naturalnych źródeł. Jednak rośnie zapotrzebowanie na aromaty pochodzenia naturalnego, gdyż zarówno w Unii Europejskiej jak i Stanach Zjednoczonych nie można do żywności dodawać sztucznych aromatów i powinny być one tylko pochodzenia naturalnego. Ponadto systematycznie ograniczane jest dodawanie sztucznych zapachów również do kosmetyków. Co oczywiście jest zgodne z oczekiwaniem konsumentów, którzy

obecnie więcej wagi przykładają do składu zarówno spożywanych przez nich produktów jak i kosmetyków, które aplikują na swoją skórę. Coraz chętniej klienci krajów rozwiniętych sięgają po produkty pochodzenia naturalnego, pomimo że są droższe od tych nieoznaczonych „BIO”. W Unii Europejskiej aktualnie obowiązującym dokumentem, definiującym te zagadnienia jest Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1334/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie środków aromatyzujących i niektórych składników żywności o właściwościach aromatyzujących do użycia w środkach spożywczych. W rozporządzeniu tym pod terminem „aromat naturalny” rozumie się „(...) substancję aromatyczną, otrzymaną w wyniku odpowiednich procesów fizycznych, enzymatycznych lub mikrobiologicznych z materiałów pochodzenia roślinnego, zwierzęcego lub mikrobiologicznego (...)”.

Cel prezentowanego osiągnięcia naukowego

Celem prezentowanego osiągnięcia naukowego było opracowanie mikrobiologicznej produkcji 2-PE, który podzieliłam na 3 główne zadania badawcze:

- 1) selekcję drożdży wydajnie produkujących 2-PE,
- 2) opracowanie warunków hodowli produkcyjnej,
- 3) wydzielenie i oczyszczenie 2-PE z cieczy pohodowlanej.

Wszystkie powyższe zadania należało tak zrealizować, aby końcowy produkt miał statut „produktu naturalnego” i mógł być stosowany docelowo w przemyśle kosmetycznym lub spożywczym.

Omówienie osiągniętych wyników i możliwości ich wykorzystania

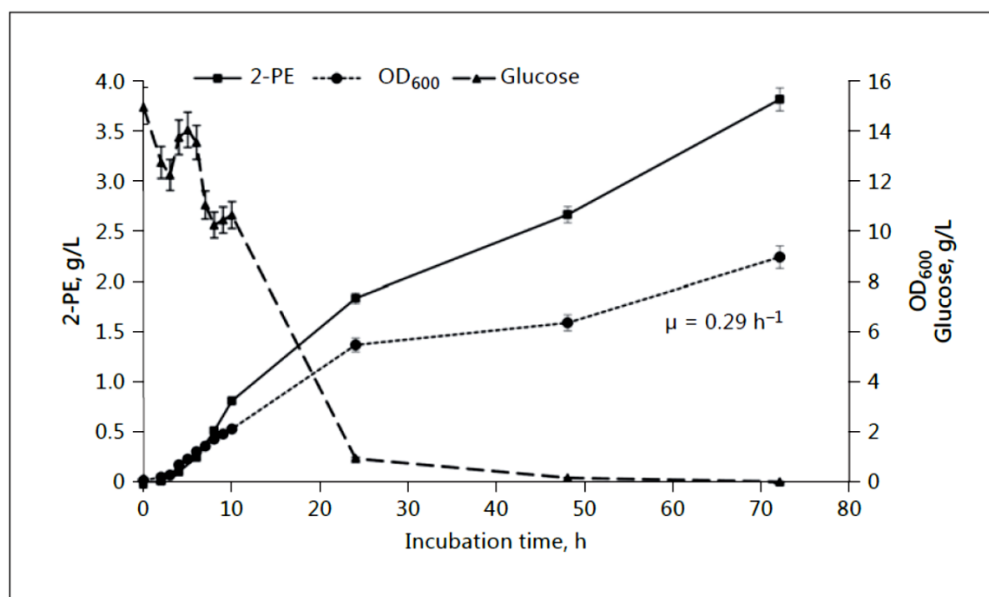
Pierwszym etapem realizacji zaplanowanego przeze mnie projektu była selekcja szczepów *Saccharomyces cerevisiae* produkujących znaczące ilości 2-fenyloetanolu. Wybrałam ten gatunek drożdży, ponieważ były doniesienia, że szczepy z tego gatunku produkują najwięcej 2-PE (Stark *et al.*, 2002; Etschmann *et al.*, 2003). Analizując dane literaturowe założyłam, że dobrym producentem będzie szczep, z którym będzie można osiągnąć stężenie 2-PE w cieczy pohodowlanej > 2 g/L. Ponieważ wyższe stężenie 2-PE jest już toksyczne dla drożdży i trudno będzie je uzyskać w tradycyjnych jednofazowych hodowlach okresowych (Etschmann *et al.*, 2003). Drożdże mogą produkować 2-PE na drodze syntezy *de novo* lub poprzez transformację substratu, L-fenyloalaniny (L-Phe), obecnego w pożywce. Dodając L-Phe do hodowli i równocześnie ograniczając ilość związków azotu można uzyskać

zdecydowanie wyższą wydajność produkcji 2-PE niż w syntezie *de novo* (Fabre *et al.*, 1998). Dlatego należy działać conajmniej dwutorowo, aby uzyskać jak najwyższą produkcję. Po pierwsze kluczowym jest wyselekcjonowanie drożdży produkujących znaczące ilości 2-PE i wykazujących wysoką odporność na rosnące toksyczne stężenie 2-PE. Po drugie istotnym jest opracowanie optymalnych warunków hodowli, począwszy od składu pożywki, poprzez temperaturę i natlenienie, a skończywszy na czasie hodowli. Najczęściej opracowanie bioprocessu z wykorzystaniem mikroorganizmów rozpoczyna się od optymalizacji tzw. hodowli okresowej (ang. *batch culture*), czyli takiej która trwa ściśle określony czas (zwykle kilka lub kilkanaście dni), ma stałą objętość hodowli i nie wprowadza się do niej kolejnych porcji pożywki lub pojedynczych substratów. Dopiero po optymalizacji warunków hodowli okresowej podejmuje się dalsze próby zwiększenia wydajności produkcji poprzez zastosowanie np. hodowli ciągłej, czyli takiej z dozowaniem substratów i odbiorem cieczy pohodowlanej w trakcie bioprocessu, albo hodowli z których odbiera się toksyczny dla komórek produkt.

W publikacji [P1] przetestowałam wspólnie ze studentką Aleksandrą Mularską (w ramach jej pracy inżynierskiej, której byłam kierownikiem) pięć laboratoryjnych szczepów drożdży *S. cerevisiae* pod kątem produkcji 2-PE zarówno na drodze syntezy *de novo* w pożywce YPD (Sherman, 2002) jak i konwersji L-Phe obecnej w pożywkach NEO, 2 i 3 (Eshkol *et al.*, 2009; Etschmann *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2000). Cztery szczepy: MB159-4D, MJ15-9C, AB1-4A i AT12-1C pochodziły z kolekcji Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, z którym współpracowałam przy innych projektach, a jeden – JM1-4D został skonstruowany przeze mnie. Wszystkie szczepy wykazywały zróżnicowany poziom produkcji 2-PE zarówno *de novo* (0,08–0,19 g/L) jak i na drodze biotransformacji L-Phe (0,08–1,02 g/L). Najwyższe stężenie 2-PE uzyskano w 72-h hodowli okresowej szczepu AB1-4A. Zaobserwowano także, że szczep JM1-4D, w którym inaktywacja genu *MAF1* spowodowała zintensyfikowanie produkcji etanolu (Mierzejewska i Chreptowicz, 2016) wykazuje także zmniejszoną produkcję 2-PE w porównaniu ze szczepem wyjściowym MB159-4d. Wynik ten potwierdził wcześniejsze doniesienia, że fermentacja etanolowa obniża wydajność produkcji 2-PE oraz zwiększa jego toksyczność (Stark *et al.*, 2002). Oznacza to, że należy tak optymalizować warunki hodowli i zawartość cukrów w pożywce, aby drożdże na możliwie najniższym poziomie przeprowadzały fermentację etanolową i produkowały więcej 2-PE. Badania te zostały częściowo finansowane z kierowanego przeze mnie projektu FNP POMOST/2012-6/8.

Uzyskane wydajności produkcji 2-PE w hodowlach laboratoryjnych szczepów nie były zadowalające, a ponieważ szczepy przemysłowe drożdży najczęściej są diploidalne

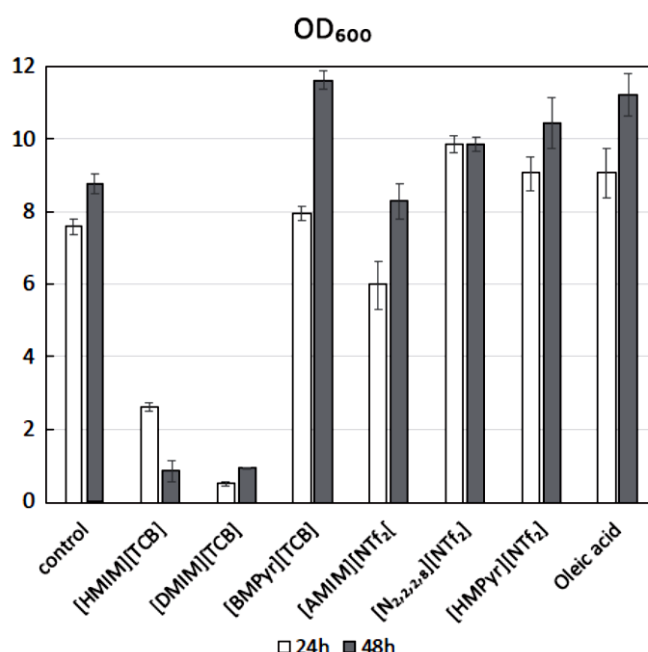
lub poliploidalne (Yamada *et al.*, 2010), to spośród testowanych szczepów wybrałam dwa - AT12-1C (ade) i AB1-4A (his), które poddano spontanicznej hybrydyzacji. Szczepy te były pojedynczymi auktotrofami, więc po połączeniu doszło do komplementacji i uzyskano prototroficznego diploida AM1-d (ADE HIS). Diploidalność tego szczepu została zweryfikowana przez doktoranta Kamila Króla z zespołu dr hab. Adrianny Skoniecznej (IBB PAN) poprzez zastosowanie cytometrii przepływowej (FACS, ang. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Szczep *S. cerevisiae* AM1-d w pożywce 3 zawierającej 9 g L-Phe/L wyprodukował 3,83 g 2-PE/L. Porównując tę wartość ze stężeniami 2-PE w hodowlach rodzicielskich szczepów haploidalnych AB1-4A i AT12-1C osiągnięto odpowiednio 3- i 5-krotny wzrost produkcji. Oprócz zwiększonej produkcji 2-PE szczep AM1-d wykazał się także większą odpornością na rosnące toksyczne stężenie 2-PE w pożywce, co może bezpośrednio przekładać się na wyższą produktywność tego szczepu. Po otrzymaniu szczepu AM1-d przetestowano kilka pożywek, tak aby uzyskać maksymalną wydajność biotransformacji substratu L-Phe. Najlepszą wydajność, 104%, osiągnięto na pożywce 8 zawierającej 5 g L-Phe/L w 72-h hodowli okresowej wstrząsanej w temperaturze 30°C prowadzonej w 300-mL kolbach Erlenmeyera z wąską szyjką (Ryc. 1). To, że wydajność biotransformacji L-Phe do 2-PE była nieco ponad 100%, może wynikać z tego, że część 2-PE powstała najprawdopodobniej na drodze syntezy *de novo*. Nasze badania przedstawione w publikacji [P1] pokazały, że stosując naturalną zdolność drożdży do diploidyzacji można uzyskać wydajnego producenta 2-PE oraz udało nam się opracować warunki hodowli okresowej pozwalające na uzyskanie maksymalnej wydajności biotransformacji. Ponadto produktywność tego bioproduktu, 53,19 mg 2-PE/L/h, była znacząco lepsza od innych opublikowanych dla drożdży, np. 24,62 mg 2-PE/L/h przy wydajności biotransformacji L-Phe do 2-PE 65% (Kim *et al.*, 2014). Nowość naszych badań potwierdza fakt, że uzyskałyśmy ochronę patentową (**patent PL 226680 B1**) zarówno na szczep AM1-d, który zdeponowałam w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych IBPRS, jak i na pożywkę produkcyjną 8 o składzie: 15 g/L glukoza, 8 g/L sacharoza, 5 g/L L-Phe, 0,5 g/L MgSO₄, 1,7 g/L Yeast Nitrogen Base (YNB) bez aminokwasów i (NH₄)₂SO₄, pH 4,6).



Ryc. 1 Monitorowanie wzrostu hodowli (OD_{600}), zużycia glukozy (Glucose, g/L) i produkcji 2-PE (g/L) w 72-h wstrząsanej hodowli okresowej *S. cerevisiae* AM1-d w pożywce 8 (Fig. 4 z publikacji [P1]).

Osiągnięte stężenie 2-PE (3,83 g/L) w hodowli szczepu AM1-d jest toksyczne dla drożdży i aby zwiększyć wydajność produkcji należałoby np. usuwać produkt z hodowli stosując ISPR (skrót od ang. *In Situ Product Removal*). W Zakładzie Chemii Fizycznej, na Wydziale Chemicznym PW od kilku lat zespół prof. dr hab. Urszuli Domańskiej-Żelaznej bada między innymi możliwość wykorzystania cieczy jonowych i mieszanin eutektycznych do ekstrakcji różnych związków organicznych z roztworów wodnych w tym 2-PE. Dlatego zawiązałam współpracę z Prof. Domańską-Żelazną i wspólnie z doktorantką Patrycją Okuniewską, której byłam promotorem pomocniczym, przeprowadziłyśmy okresowe hodowle dwufazowe z wybranymi cieczami jonowymi. Wyniki tych badań zostały opisane w dwóch publikacjach [P2] i [P3]. Hodowle były prowadzone w układzie: 12 mL faza wodna (pożywka zaszczerpiona drożdżami) i 3 mL faza organiczna (ciecz jonowa). Zaplanowałam do tych badań pożywkę 4 o składzie: 10 g/L glukoza, 10 g/L sacharoza, 6 g/L L-Phe, 4 g/L KH_2PO_4 , 0,4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L ekstrakt drożdżowy. Pożywka ta różni się od pożywki 8 głównie tym, że zawierała więcej L-Phe oraz ekstrakt drożdżowy zamiast YNB. Założyłam, że w hodowli z ekstrakcją *in situ* drożdże wyprodukują więcej 2-PE niż w hodowli bez ekstrakcji, stąd dodałam więcej substratu - L-Phe. Najwyższą wydajność produkcji 2-PE uzyskano w hodowli z cieczą jonową [HMPyr][NTf2], a mianowicie w cieczy jonowej było 16,46 g 2-PE/L, a w fazie wodnej 0,5 g 2-PE/L po 48 h hodowli w pożywce 4 zawierającej 6 g L-Phe. Czyli w trakcie bioprodukcji produkowany przez drożdże 2-PE niemal całkowicie ulegał ekstrakcji do fazy cieczy jonowej oraz osiągnięto 110% wydajności biotransformacji L-Phe do 2-PE. Wartość powyżej 100%

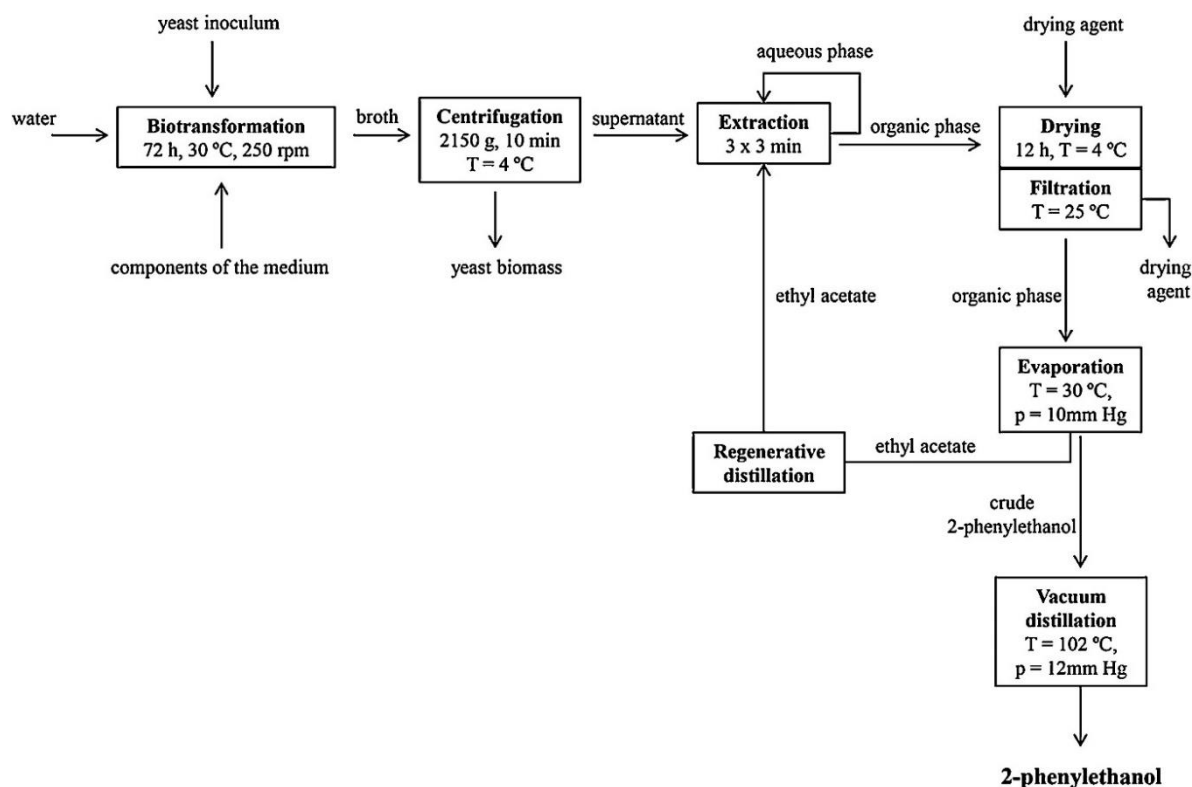
może być najprawdopodobniej efektem syntezy 2-PE *de novo* przez drożdże. W publikacji [P3] przedstawiliśmy również możliwość wydzielenia 2-PE z cieczy jonowej poprzez zastosowanie destylacji, re-ekstrakcji lub krystalizacji. Uzyskane wyniki są obiecujące jednak wymagają dalszych badań i optymalizacji. Należy także przebadać ciecz jonową [HMPyr][NTf2] pod kątem toksyczności i zagrożenia dla środowiska naturalnego, aby mieć pewność, że można ją stosować w produkcji naturalnego 2-PE. Chociaż jest duże prawdopodobieństwo, że są bezpiecznymi ekstrahentami i nie powinny zaburzać statutu „naturalnego” 2-PE, ponieważ nie zaobserwowaliśmy toksycznego efektu obecności większości przetestowanych przez nas cieczy jonowych, w tym [HMPyr][NTf2], dla komórek drożdży (Ryc. 2).



Ryc. 2 Monitorowanie wzrostu hodowli *S. cerevisiae* AM1-d w pożywce 4 (control) lub układzie dwufazowym – pożywka 4 i faza organiczna (ciecz jonowa lub kwas oleinowy - jako dodatkowa kontrola) poprzez mierzenie OD600 po 24 i 48 h bioprocessu (**Fig. 1** z publikacji [P3]).

Równocześnie z prowadzonymi badaniami ze szczepem AM1-d rozpoczęłam poszukiwanie nowych drożdży wydajnie produkujących 2-PE w próbkach spontanicznie fermentowanych produktów spożywczych. Udało mi się wyizolować z fermentowanego mleka drożdże *S. cerevisiae* JM2014, które wyprodukowały 3,65 g 2-PE/L w 72-h hodowli okresowej we wstrząsanych 100-mL kolbkach w pożywce 8 w temperaturze 30°C. Wspólnie z doktorantką Karoliną Chreptowicz, której byłam promotorem pomocniczym, scharakteryzowałyśmy ten szczep, oznaczając m. in. właściwą prędkość wzrostu μ na pożywkach zawierających różne źródła węgla (glukozę, sacharozę, etanol i glicerol) w dwóch temperaturach 30°C i 37°C. Z racji tej, że JM2014 wykazywał podobne tempo wzrostu w obydwu testowanych

temperaturach, sprawdziliśmy również wydajność produkcji 2-PE w 37°C. Wydajność produkcji była blisko 50% niższa w podwyższonej temperaturze, ale i tak w pożywce 8 udało się uzyskać wysokie stężenie 2,02 g 2-PE/L. To, że szczep JM2014 utrzymuje zdolność do produkcji w podwyższonej temperaturze może mieć istotne znaczenie w produkcji przemysłowej, gdyż w dużych hodowlach często rozłożenie temperatury w bioreaktorach jest nierównomierne. Następnie podjęliśmy udaną próbę powiększenia skali produkcji 2-PE z hodowli wstrząsanych w kolbkach do 4-L hodowli w 6,2-L bioreaktorze, w których osiągnęliśmy niemal identyczne stężenie 2-PE (3,60 g/L). Wyniki tych badań zostały przedstawione w publikacji **[P4]**. Prowadząc 4-L hodowle produkcyjne w bioreaktorze miałyśmy wystarczająco dużo cieczy pohodowlanej, aby podjąć próby wydzielenia z niej i oczyszczenia 2-PE. Przy wsparciu merytorycznym dr inż. Moniki Wielechowskiej i dr inż. Joanny Główniczek-Zubek z naszej Katedry udało się opracować procedurę wydzielenia i oczyszczania 2-PE z cieczy pohodowlanej. Zostało to opisane w publikacji **[P4]** i co ważne było to pierwsze naukowe doniesienie pokazujące kompletną technologię produkcji 2-PE, od bioproduktu do produktu o czystości >98% (wg. analizy chromatografią gazową, GC) (Ryc. 3). Do wydzielenia 2-PE z cieczy pohodowlanej zastosowano ekstrakcję octanem etylu, a do oczyszczenia produktu destylację próżniową. W ten sposób uzyskany 2-PE jest produktem naturalnym, gdyż wykorzystano do tego celu metody fizyczne (ekstrakcję i destylację) oraz wybrano octan etylu posiadający status GRAS (skrót od ang. *Generally Recognized As Safe*), który jest dozwolonym dodatkiem do żywności. Opracowany sposób produkcji naturalnego 2-PE zgłosiliśmy do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej i uzyskał on ochronę patentową (**PL 227208 B1**).



Ryc. 3 Schemat mikrobiologicznej produkcji 2-PE oraz wydzielania i oczyszczania z cieczy pochodzącej produktu (**Fig. 3** z publikacji **[P4]**).

Wyprodukowany przez nas 2-PE został następnie przetestowany przez Pollenę Aroma, z którą zawiązałam współpracę i pozytywnie zaopiniowany jako aromat różany. Ponadto firma kosmetyczną SENKARA (<https://senkara.pl/>) wykorzystała nasz produkt w formulacji peelingu do ciała (Peeling Czeko Scrub). Szacunkowy koszt produkcji 2-PE przy użyciu naszej technologii to ok. 2,25 \$ za 1 g 2-PE i niestety jest za wysoki, aby móc ją komercjalizować. Dlatego postanowiłam spróbować obniżyć te koszty, poprzez zwiększenie wydajności produkcji stosując hodowle z ISPR i wykorzystanie pożywki na bazie odpadów przemysłu rolno-spożywczego.

Z racji tej, że trwają dyskusje związane z wątpliwościami wokół tego, czy ciecze jonowe mogą być stosowane w ekstrakcji produktów naturalnych i czy są bezpieczne dla środowiska, postanowiłam przetestować jeszcze hodowlę dwufazową z inną fazą organiczną. Analizując dostępne dane literaturowe zauważyłam, że kwas oleinowy uznawany jako bezpieczny (GRAS) związek, który może być dodatkiem do żywności lub kosmetyków był z powodzeniem wykorzystywany do ekstrakcji 2-PE z hodowli produkcyjnych drożdży (Stark *et al.*, 2002; Lu and Zhang, 2008). Również w trakcie prowadzenia naszych badań opisanych w publikacjach **[P2]** i **[P3]** dotyczących dwufazowych hodowli szczepu AM1-d w obecności cieczy jonowych,

kontrolnie hodowałyśmy drożdże w układzie dwufazowym z kwasem oleinowym. Na podstawie tych badań dowiedziałyśmy się, że już 20% stężenie kwasu oleinowego jest wystarczające do wyekstrahowania większości 2-PE wyprodukowanego przez nasze drożdże. Analizując skład i ceny olejów roślinnych, które często są wykorzystywane w przemyśle spożywczym lub kosmetycznym doszłam do wniosku, że olej rzepakowy mógłby być wykorzystany do ekstrakcji 2-PE z hodowli *in situ*, gdyż zawiera ok. 60% kwasu oleinowego i jest najtańszy. Dlatego, wspólnie z doktorantką Karoliną Chreptowicz przetestowałyśmy hodowle dwufazowe z 30% i 50% zawartością oleju rzepakowego dla obydwu naszych szczepów *S. cerevisiae*, AM1-d i JM2014. Równocześnie prowadziłyśmy kontrolnie hodowle z kwasem oleinowym (20, 30 i 40%). Wyniki przedstawiłyśmy w publikacji [P5]. Najwyższe wydajności produkcji 2-PE osiągnięto ze szczepem JM2014, które wyniosły odpowiednio 8,25 g 2-PE/L hodowli z 30% kwasem oleinowym i 8,92 g 2-PE/L hodowli z 50% olejem rzepakowym. Większość wyprodukowanego przez drożdże 2-PE przechodziła do fazy organicznej, w której otrzymano końcowe stężenia 2-PE 30,87, 25,69 i 16,39 g/L odpowiednio w hodowlach JM2014 z 20, 30 i 40% kwasem oleinowym, oraz 16,90 i 20,14 g/L w hodowlach z 30% i 50% olejem rzepakowym. Natomiast w fazie wodnej stężenie 2-PE było 1,24, 0,78 i 0,51 g/L w hodowlach JM2014 z 20, 30 i 40% kwasem oleinowym, oraz 2,01 i 0,94 g/L w hodowlach z 30% i 50% olejem rzepakowym. Stosując ISPR z 50% olejem rzepakowym w porównaniu z hodowlą bez dodatku fazy organicznej udało się nam ponad dwukrotnie zwiększyć produkcyjność z 54,03 do 123,89 mg 2-PE/L/h. Powyższe wyniki uzyskano w hodowlach wstrząsanych w kolbach. Kolejnym naszym celem było przeprowadzenie hodowli dwufazowej szczepu JM2014 z 50% olejem rzepakowym w skali 4,5-L bioreaktora. W tej hodowli osiągnięto końcowe stężenie 2-PE 9,79 g/L i produkcyjność 135,97 mg 2-PE/L/h, czyli o 10% więcej niż w przypadku hodowli okresowej w kolbie. Tak, więc nasze badania pokazały, że olej rzepakowy może być z powodzeniem wykorzystany do ekstrakcji 2-PE *in situ*. Z fazy organicznej (oleju rzepakowego) udało się wyekstrahować 2-PE stosując acetonitryl. Jednak rozpuszczalnik ten nie posiada status GRAS i zaburza status produktu naturalnego 2-PE. W tej sytuacji doktorantka K. Chreptowicz podjęła liczne próby znalezienia odpowiedniego ekstrahenta, który mógłby być zastosowany do wydzielenia z oleju rzepakowego 2-PE. Niestety próby te zakończyły się niepowodzeniem. Jednocześnie przeprowadziłam analizy składu popularnych receptur kosmetycznych (serum, krem, balsam itp.) i zauważyłam, że wykorzystywane są w nich oleje roślinne bogate w kwasy OMEGA 3, 6 i 9. Jako, że olej rzepakowy bogaty jest w te kwasy, to uznałam, że nie ma potrzeby wydzielania 2-PE po fermentacji z oleju rzepakowego, ponieważ ten olej mógłby być bezpośrednio

wykorzystany jako surowiec w produkcji kosmetyków. W związku z tym, stosując opracowaną przez nas metodę hodowli dwufazowej można uzyskać dwa końcowe produkty (Ryc. 4), a mianowicie olej rzepakowy zawierający ok. 16,90–20,14 g 2-PE/L oraz ok. 1 g/L czystego 2-PE, który można wyekstrahować z fazy wodnej stosując metodę opisaną w publikacji [P4]. Opracowany sposób prowadzenia bioprocesu zgłosiliśmy jako wynalazek do Urzędu Patentowego (**P.418306**). Wynalazek ten został nagrodzony srebrnym medalem na Międzynarodowej Warszawskiej Wystawie Wynalazków IWIS 2018.

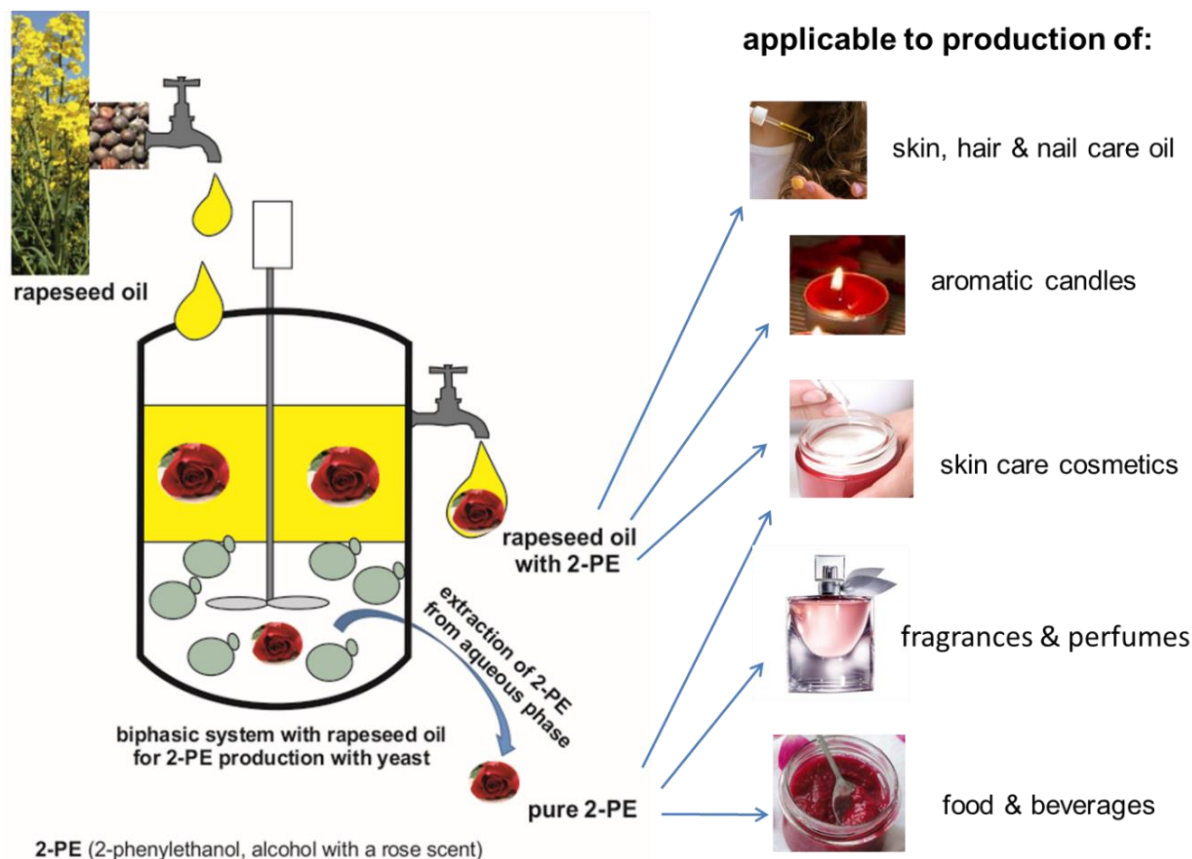


Fig. 4. Mikrobiologiczna produkcja 2-PE w dwufazowej hodowli z olejem rzepakowym. Fazę organiczną (olej rzepakowy zawierający ok. 16,90–20,14 g 2-PE/L) oraz 2-PE wyekstrahowany z fazy wodnej można wykorzystać w przemyśle kosmetycznym i spożywczym (zmodyfikowany **Graphical abstract** z publikacji [P5])

Fazę organiczną po bioprocesie, czyli olej rzepakowy z 2-PE nazwałam Biofermentem i zgłosiłam do organizacji The Personal Care Products Council z wnioskiem o nadanie numeru INCI (skrót od ang. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*), gdyż każdy składnik kosmetyku powinien posiadać taki numer. Bioferment przeszedł pomyślnie testy mikrobiologiczne i dermatologiczne wymagane dla produktów kosmetycznych w certyfikowanych laboratoriach firmy JARS Sp. z o.o. oraz został wykorzystany przez firmę

SENKARA w dwóch formulacjach kosmetycznych - serum antyoksydacyjnym Big City Life i serum do twarzy na noc Sleep Tight. Bioferment może być stosowany w kosmetykach jako emolient, o właściwościach odżywczych, regenerujących i nawilżających, jak i konserwujących, jeśli będzie stosowany w stężeniach 20–50%. Badania te zostały sfinansowane z kierowanych przeze mnie prac przedwdrożeniowych projektu „Aromat różany” w ramach Inkubator Innowacyjności + (MNiSW).

Ostatnim celem badań związanych z opracowaniem mikrobiologicznej produkcji naturalnego 2-PE było przetestowanie serii pożywek bazujących na odpadach przemysłu rolno - spożywczego. Drożdże są chemoorganotrofami, oznacza to, że jako źródło węgla i energii wykorzystują związki organiczne, najczęściej cukry (np. glukozę, sacharozę, galaktozę), alkohole (np. etylowy, glicerol) lub kwasy (np. kwas octowy, mlekowy). Przemysł rolno-spożywczy generuje duże ilości odpadów bogatych w związki organiczne, w tym te łatwo przyswajalne przez większość drożdży jak i takie, np. ksylozę, czy laktozę, które mogą być metabolizowane tylko przez nieliczne gatunki drożdży, np. *Pichia stipitis* (Yablochkova *et al.*, 2003), czy *Kluyveromyces marxianus*, (Carvalho-Silva and Spencer-Martins, 1990). Ponieważ odpady organiczne są dużym obciążeniem dla środowiska, to powinny one być odpowiednio zagospodarowane. Dlatego też często są wykorzystywane jako substraty w bioprocessach z drożdżami, np. w produkcji bioetanolu II generacji (Aditiyaab *et al.*, 2016). Dzięki temu można po pierwsze zmniejszyć ilość odpadów jak i obniżyć koszty produkcji wybranych metabolitów. W związku z tym, postanowiłam sprawdzić, czy możliwe jest wykorzystanie odpadów z przemysłu rolno-przemysłowego do mikrobiologicznej produkcji 2-PE. Aby to zrobić musiałam najpierw wyizolować większą liczbę szczepów drożdży z próbek środowiskowych, które byłyby zdolne do wzrostu na wybranych odpadach i produkcji 2-PE. Na te badania pozyskałam fundusze z konkursu SONATA 11 NCN (projekt 2016/21/D/NZ9/01605). Wybrałam do badań następujące substraty do pożywek: serwatkę, produkty uboczne obróbki buraków cukrowych - melasę, odciek i sok gęsty, oraz hydrolizaty słomy kukurydzianej. W pierwszej kolejności razem ze studentkami wyselekcjonowałyśmy 28 szczepów drożdży wyizolowanych z próbek roślinnych i żywności spontanicznie fermentowanej, które były w stanie rosnąć na pożywkach zawierających serwatkę (Tab. 1).

Tab. 1 Wzrost wyizolowanych szczepów na pożywce minimalnej (YNB, skrót od ang. *Yeast Nitrogen Base*) z dodatkiem 2% (w/v) pojedynczego źródła węgla (glukozy – gluc., ksylozy – xyl., galatozy – galact., maltozy – malt., sacharozy – suc., glicerolu – glycer.), pożywce serwatkowej (3% w/v) bez dodatków (W) lub z dodatkiem glukozy (WG), oraz na standardowej pożywce YPD w podwyższonej temperaturze (37 i 42°C); (Table 2 z publikacji [P6])

Strain	YNB gluc.	YNB xyl.	YNB galact.	YNB malt.	YNB lact.	YNB suc.	YNB glycer.	W	WG	37°C	42°C
<i>Aureobasidium pullulans</i>											
WUT33	+	+	w	+	w	–	w	–	+	–	–
<i>Barnettozyma californica</i>											
WUT11	+	–	+	+	–	+	+	w	+	–	–
<i>Candida tropicalis</i>											
WUT5	+	+	–	+	–	+	w	w	+	+	+
<i>Clavispora lusitanae</i>											
WUT17	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
WUT20	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>											
WUT19	+	–	–	–	–	+	–	–	+	w	–
WUT29	+	–	–	–	–	+	–	–	+	+	–
<i>Hanseniaspora uvarum</i>											
WUT16	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–
WUT31	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>											
WUT8	+	+	+	+	–	+	+	w	+	–	–
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>											
WUT25	+	+	+	+	–	+	+	w	+	+	+
<i>Metschnikowia sp.</i>											
WUT12	+	–	+	+	–	+	+	w	+	–	–
WUT14	+	–	+	+	–	+	+	w	+	–	–
WUT26	+	–	+	+	–	+	+	–	+	w	–
<i>Meyerozyma caribbica</i>											
WUT28	+	+	+	+	w	+	+	w	+	+	w
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>											
WUT22	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	w
<i>Pichia barkeri</i>											
WUT27	+	+	+	+	w	+	+	w	+	+	–
WUT21	+	–	+	+	–	+	+	w	+	+	–
<i>Pichia kluyveri</i>											
WUT2	+	–	+	+	–	+	+	w	+	+	–
<i>Pichia fermentans</i>											
WUT32	+	–	+	+	–	–	+	–	+	–	–
WUT36	+	+	+	+	–	+	+	w	+	+	–
<i>Pichia kudriavzevii</i>											
WUT7	+	–	+	+	–	+	+	w	+	+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>											
WUT10	+	+	+	+	–	+	+	w	+	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>											
JM2014	+	–	+	+	–	+	w	w	+	+	–
WUT4	+	–	–	+	–	+	–	–	+	–	–
WUT34	+	–	+	+	–	+	+	w	+	w	–
WUT35	+	–	+	+	–	+	+	w	+	–	–
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>											
WUT9	+	–	+	+	–	+	+	w	+	–	–

– brak wzrostu; + wzrost; w słaby wzrost

Następnie testowaliśmy te szczepy na zdolność do produkcji 2-PE na pożywce 8 [P1] oraz na pożywce WGP zawierającej 3% serwatki, 2% glukozy i 0,5% L-Phe. W 72-h hodowlach okresowych ponad 2 g 2-PE/L wyprodukowało 10 szczepów w pożywce 8 i 4 szczepy w pożywce WGP. Drożdże te zostały następnie przypisane na podstawie sekwencjonowania rDNA regionów w genomie do następujących gatunków: *Aureobasidium*

pullulans, *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia sp.*, *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia fermentans* i *S. cerevisiae*. O ile ten ostatni gatunek jest już całkiem dobrze zbadany pod kątem produkcji 2-PE, to o pozostałych są tylko pojedyncze doniesienia naukowe (np. Chung *et al.*, 2000). Następnie postanowiłam zastąpić glukozę w pożywce WGP produktami ubocznymi z obróbki buraków cukrowych, więc opracowałam trzy kolejne pożywki WMP, WJP i WSP do produkcji 2-PE zawierające odpowiednio melasę, sok gęsty i odciek. Na tych pożywkach razem ze studentkami przetestowałyśmy trzy szczepy *S. cerevisiae* i jeden szczep *P. fermentans*. W przypadku drożdży *S. cerevisiae* z dwoma szczepami, JM2014 i WUT35, uzyskano stężenie 2-PE w hodowlach w zakresie 2,22–3,28 g/l, a z trzecim, WUT34, 1,48–1,75 g/l. Natomiast szczep *P. fermentans* WUT36 nie rósł w tych pożywkach. Wyniki powyższych badań nad możliwością wykorzystania pożywek bazujących na serwatce i produktach ubocznych obróbki buraków cukrowniczych do mikrobiologicznej produkcji 2-PE zostały przedstawione w publikacji [P6]. Było to pierwsze doniesienie pokazujące tak wysoką wydajność produkcji 2-PE na powyższych pożywkach bazujących na odpadach z przemysłu spożywczego. Ponadto, doktorantce Karolinie Chreptowicz udało się z całkowitą wydajnością 74% wydzielić i oczyścić 2-PE (98,84% wg analizy GC) z podłoża serwatkowego stosując nieco zmodyfikowaną procedurę z [P4] (wyniki te nie zostały opublikowane).

Kolejnym alternatywnym źródłem węgla i energii dla drożdży, który postanowiłam przetestować w produkcji 2-PE były hydrolizaty słomy kukurydzianej. W tym celu zawiązałam współpracę z dr inż. Katarzyną Dąbkowską z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej, która od kilku lat opracowuje warunki obróbki i hydrolizy różnego rodzaju odpadów lignocelulozowych, m.in. słomy kukurydzianej i rzepakowej (Dąbkowska *et al.*, 2017; Kuglarz *et al.*, 2018). Dr Dąbkowska przygotowała wspólnie z naszą dyplomantką A. Sokołowską (w ramach pracy inżynierskiej) serię hydrolizatów słomy kukurydzianej, które następnie wykorzystaliśmy jako bazę do pożywek produkcyjnych. Do bioprodukcji wybrałam dwa szczepy, *P. fermentans* WUT36 i *M. chrysoperlae* WUT25 spośród tych 28 opisanych w [P6], zdolne do wykorzystywania ksylozy jako źródło węgla oraz produkowania 2-PE w pożywce 8 (odpowiednio 1,62 i 1,45 g/L) i w pożywce WGP (2,35 i 1,51 g/L; [P6]). Najpierw do otrzymanych hydrolizatów lignocelulozowych, bogatych w glukozę (8–25 g/L) i ksylozę (5–10 g/L), dodałam tylko L-Phe (5 g/L), aby sprawdzić, czy wybrane drożdże będą na nich rosły i produkowały 2-PE. Okazało się, że zarówno wzrost i produkcja były na bardzo niskim poziomie. Dlatego postanowiłam dodatkowo wzbogacić hydrolizaty

ekstraktem drożdżowym (4 g/L), który jest m.in. źródłem azotu i witamin dla drożdży. W ten sposób uzyskałam dwie pożywki produkcyjne H01 i H04, w których testowane drożdże rosły i produkowały 2-PE. Zarówno w pożywce H01 jak i H04 szczep WUT36 produkował więcej 2-PE (2,97 i 2,23 g/L) niż WUT25 (1,00 i 1,11 g/L) w 100-mL kolbach wstrząsanych. Porównując te wyniki z danymi opublikowanymi w [P6] widać, że szczep *P. fermentans* WUT36 w pożywce bazującej na hydrolizacie lignocelulozowym produkuje więcej 2-PE niż w pożywce 8 i pożywce WGP. Natomiast w przypadku szczepu *M. chrysoperlae* WUT25 uzyskane stężenia 2-PE w pożywkach H01 i H04 są ponad 50% niższe niż w pożywkach 8 i WGP. Oprócz tego, że szczep WUT36 wyprodukował więcej 2-PE na hydrolizatach niż WUT25, to również lepiej rósł, co było widoczne w wartościach OD600. Na koniec bioprodukcji, czyli po 72 h, we wszystkich hodowlach nie było już glukozy i ksylozy. Oznacza to, że obydwa drożdże zużyły dostępne cukry w pożywkach. Równocześnie z testowaniem bioprodukcji 2-PE na hydrolizatach słomy kukurydzianej zbadalam także poziom tolerancji obydwu szczepów na rosnące stężenie 2-PE. Uzyskane wyniki pokazują, że szczep WUT36 cechuje się większą tolerancją niż WUT25, co może tłumaczyć, dlaczego z WUT36 udało się uzyskać wyższe stężenie 2-PE w hodowlach produkcyjnych. Kolejnym celem jaki wyznaczyłam, było wydzielenie i oczyszczenie 2-PE z cieczy pohodowlanej. Do tego celu przeprowadziłam 10-krotnie większe hodowle produkcyjne w pożywce H01 z jednym szczepem, *P. fermentans*, w 1000-mL kolbach wstrząsanych. Po 72 h hodowli uzyskano końcowe stężenie 2-PE 3,66 g/L, czyli ok. 20% wyższe niż w 100-mL kolbkach. Następnie doktorantka K. Chreptowicz wydzieliła i oczyściła 2-PE (97,27%; GC) z cieczy pohodowlanej z wydajnością 63,2% stosując metodę opisaną w publikacji [P4]. Zarówno sposób przygotowania hydrolizatów słomy kukurydzianej jak i proces bioprodukcji 2-PE przy użyciu szczepów *P. fermentans* WUT36 i *M. chrysoperlae* WUT25 oraz oczyszczanie 2-PE z cieczy pohodowlanej przedstawiliśmy w publikacji [P7]. Warto tutaj nadmienić, że było to pierwsze doniesienie naukowe pokazujące możliwość wykorzystania hydrolizatów lignocelulozowych do bioprodukcji 2-PE.

Podsumowując, najważniejszymi osiągnięciami powyższych badań było:

- wyselekcjonowanie i scharakteryzowanie nowo wyizolowanych 13 szczepów drożdży przypisanych do 8 gatunków, które produkują ponad 2 g 2-PE/L w 72-h hodowli okresowej;
- zaprojektowanie serii pożywek produkcyjnych, w tym bazujących na odpadach przemysłu rolno-spożywczego;

- ustalenie warunków okresowych hodowli produkcyjnych w skali hodowli wstrząsanych w kolbach jak i w skali 4,5-L i 6-L bioreaktorów;
- wyselekcjonowanie cieczy jonowych, które mogą być stosowane w ekstrakcji *in situ* 2-PE produkowanego przez drożdże;
- użycie oleju rzepakowego do ekstrakcji 2-fenyletanolu *in situ* w hodowlach dwufazowych;
- opracowanie sposobu wydzielania i oczyszczania 2-fenyletanolu z cieczy pohodowlanej;
- oraz wykorzystanie uzyskanych dwóch produktów, czystego 2-PE i biofermentu (oleju zawierającego ok. 16,90–20,14 g 2-PE/L) w formułacjach kosmetycznych przez firmę SENKARA.

Rezultatem opisanego powyżej osiągnięcia naukowego są **dwa patenty i jedno zgłoszenie patentowe**.

- **PL 226680 B1; Mierzejewska J (osoba zgłaszająca)** i Mularska A Szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* AM1-d, zastosowanie szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* AM1-d do produkcji 2-fenyletanolu oraz zastosowanie podłoża do produkcji 2-fenyletanolu przez szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* AM1-d; data zgłoszenia: 09.05.2014; data przyznania: 17.02.2017.
- **PL 227208 B1; Chreptowicz K, Wielechowska M., Głowczyk-Zubek J i Mierzejewska J (osoba zgłaszająca)**. Sposób wytwarzania naturalnego 2-fenyletanolu; data zgłoszenia: 01.07.2015; data przyznania: 09.06.2017.
- **P.418306; Chreptowicz K, Mierzejewska J (osoba zgłaszająca)**. Sposób wytwarzania 2-fenyletanolu; data zgłoszenia: 11.08.2016

Dodatkowo w trakcie powiększania skali produkcji 2-PE z hodowli w kolbkach do hodowli w bioreaktorze zawiązałam współpracę dr hab. inż. Patrycją Ciosek-Skibińską, która była zainteresowana przetestowaniem na naszym bioprocesie nowych metod analitycznych. Opracowując dowolny process biotechnologiczny trzeba kontrolować wiele parametrów, np. przyrost biomasy mikroorganizmów, natlenienie, pH, stężenie wybranych składników pożywki itp. Dlatego intensywnie są opracowywane nowe narzędzia analityczne, które mogłyby ułatwić monitorowanie powyższych parametrów bioprocessu (Clements-Chittich and Bayer, 2006). Również na Wydziale Chemicznym PW prowadzone są w tym zakresie badania przez grupę badawczą Dr. Ciosek-Skibińską (obecnie w Katedrze Biotechnologii Medycznej). Współpraca z Dr P. Ciosek-Skibińską zaowocowała dwoma poniższymi

publikacjami, które nie weszły w skład osiągnięcia.

- Zabada J M, Chreptowicz K, **Mierzejewska J**, Ciosek P. 2017. Two-dimensional fluorescence as soft sensor in the monitoring of biotransformation performed by yeast. *Biotechnology Progress* 33: 299–307.
- Zabada J M, Ufnalska I, Chreptowicz K, **Mierzejewska J**, Wróblewski W, Ciosek P. 2017. Performance of hybrid electronic tongue and HPLC coupled with chemometric analysis for the monitoring of yeast biotransformation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 167: 69–77.

Bibliografia:

Aditya HB, Mahlia TMI, Chongb Hadi Nur WT, Sebayang AH. 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66:631-653.

Carlquist M, Gibson B, Karagul Yuceer Y, Paraskevopoulou A, Sandell M, Angelov AI, Gotcheva V, Angelov AD, Etschmann M, de Billerbeck GM, Lidén G. 2015. Process engineering for bioflavour production with metabolically active yeasts - a mini-review. *Yeast* 32:123–143.

Carvalho-Silva M, Spencer-Martins I. 1990. Modes of lactose uptake in the yeast species *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 57:77-81.

Chung H Jr, Lee SL, Chou CC. 2000. Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as affected by some medium components. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90:142–147.

Clements F, Bayer K. 2006. Improvement of bioprocess monitoring development of novel concepts. *Microbial Cell Factories* 5:19–30.

Dąbkowska K, Mech M, Kopeć K, Pilarek M. 2017. Enzymatic activity of some industrially-applied cellulolytic enzyme preparations. *Ecological Chemistry and Engineering S* 24:9-18.

Eshkol N, Sendovski M, Bahalul M, Katz-Ezov T, Kashi Y, Fishman A. 2009. Production of 2-phenylethanol from L -phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Applied Microbiology* 106:534–542.

Etschmann MMW, Sell D, Schrader J. 2003. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnology Letters* 25:531–536.

Etschmann MMW, Sell D, Schrader J. 2004 Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 29:187–193.

Fabre CE, Blanc PJ, Goma G 1998. Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Progress* 14:270–274.

Fraud S, Rees EL, Mahenthiralingam E, Russell AD, Maillard J-Y. 2003. Aromatic alcohols and their effect on Gram-negative bacteria, cocci and mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:1435–1436.

Kim B, Cho BR, Hahn JS. 2014. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway. *Biotechnology and Bioengineering* 111:115–124.

Kovachev, N, Rusanov K, Atanasov I. 2010. Industrial cultivation of oil bearing rose and rose oil production in Bulgaria during 21st century, directions and challenges. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 24:1793–1798.

Kuglarz M, Alvarado-Morales M, Dąbkowska K, Angelidaki I. 2018. Integrated production of cellulosic bioethanol and succinic acid from rapeseed straw after dilute-acid pretreatment. *Bioresource Technology* 265:191–199.

- Mierzejewska J, Chreptowicz K. 2016. Lack of Maf1 enhances pyruvate kinase activity and fermentative metabolism while influencing lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 590:93–100.
- Liu P, Cheng Y, Meng Yang, Liu Y, Chen K, Long C, Deng X. 2014. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC Microbiology* 14:242.
- Lu J, Zhang W.G. 2008. Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by bioconversion in biphasic system. *Chemical Industry and Engineering Progress* 27:417–420.
- Stark D, Münch T, Sonnleitner B, Marison IW, von Stockar U. 2002. Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress* 18: 514–523.
- Yamada R, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. 2010. Gene copy number and polyploidy on products formation in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88:849–857.
- Yablochkova EN, Bolotnikova OI, Mikhailova NP, Nemova NN, Ginak AI. 2003. Specific Features of Fermentation of D-Xylose and D-Glucose by Xylose-Assimilating Yeasts. *Applied Biochemistry and Microbiology* 39:265.
- Zhu YJ, Zhou HT, Hu YH, Tang JY, Su MX, Guo YJ, Chen QX, Liu B. 2011. Antityrosinase and antimicrobial activities of 2-phenylethanol, 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylacetic acid. *Food Chemistry* 124:298–302.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

5.1 Badanie funkcji białek partycyjnych ParA i ParB w *Pseudomonas aeruginosa*

Do roku 2012 kontynuowałam współpracę z prof. dr hab. Grażyną Jagurą-Burdzy i rozpoczęte w trakcie mojego doktoratu badania nad białkami ParA i ParB zaangażowanymi w aktywny rozdział chromosomów do komórek potomnych Gram-ujemnej bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteria ta jest oportunistycznym patogenem, szczególnie niebezpiecznym dla osób po zabiegach chirurgicznych jak i chorych na mukowiscydozę. *P. aeruginosa* po za infekowaniem organizmu jest trudna do wyleczenia, gdyż wykształciła wiele mechanizmów obronnych. W związku z tym ważne jest badanie biologii tej bakterii, w tym poznanie mechanizmów rozdziału chromosomów w trakcie podziałów komórkowych, ponieważ szersza wiedza w tym zakresie może pomóc w przyszłości w projektowaniu nowych leków skutecznie zwalczających infekcje wywołane przez tę bakterię. W ramach swoich badań przeprowadziłam m.in. szczegółową analizę funkcjonalną poszczególnych domen w białku ParB. Wykazałam, że białka ParA i ParB mają istotny udział nie tylko w rozdzielaniu chromosomów do komórek potomnych, ale także w *quorum sensing* i w ruchliwości komórek. Te aktywności komórek *P. aeruginosa* są bardzo istotne w trakcie zasiedlania organizmu ludzkiego jak i w wytwarzaniu biofilmu, który chroni bakterie przed odpowiedzią układu immunologicznego jak i działaniem antybiotyków. Wyniki tych badań były podstawą mojej rozprawy doktorskiej wyróżnionej przez Radę Naukową IBB PAN jako najlepszej pracy

doktorskiej obronionej w roku 2008 oraz zostały przedstawione w pięciu poniższych publikacjach w czasopismach z bazy JRC.

- Bartosik AA, Lasocki K, **Mierzejewska J**, Thomas CM, Jagura-Burdzy G. 2004. ParB of *Pseudomonas aeruginosa*: interactions with its partner ParA, its target parS and specific effects on bacterial growth. *Journal of Bacteriology* 186:6983–6998.
- Lasocki K., Bartosik AA, **Mierzejewska J**, Thomas CM, Jagura-Burdzy G. 2007. Deletion of the parA (soj) homologue in *Pseudomonas aeruginosa* causes ParB instability and affects growth rate, chromosome segregation, and motility. *Journal of Bacteriology* 189:5762–72.
- Bartosik AA, **Mierzejewska J**, Thomas CM, Jagura-Burdzy G. 2009. ParB deficiency in *Pseudomonas aeruginosa* destabilises the partner protein ParA and affects a variety of physiological parameters. *Microbiology* 155:1080–1092.
- **Mierzejewska J**, Bartosik AA, Macioszek M, Plochocka D, Thomas CM, Jagura-Burdzy G. 2012. Identification of C-terminal hydrophobic residues important for dimerization and all known functions of ParB of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 158:1183–1195.
- **Mierzejewska J**, Jagura-Burdzy G. 2012. Prokaryotic ParA-ParB-parS system links bacterial chromosomes segregation with the cell cycle. *Plasmid* 67:1–14.

5.2 Powiązanie metabolizmu glukozy z aktywnością polimerazy III RNA w komórkach *S. cerevisiae*

W 2011 roku zawiązałam współpracę z prof. dr hab. Magdaleną Bogutą i dołączyłam do kierowanego przez nią zespołu realizującego projekt badawczy NCN N301693740 w IBB PAN. Zespół Prof. Boguty od ponad dwudziestu lat prowadzi intensywne badania nad poznaniem mechanizmów kontrolujących aktywność transkrypcyjną Polimerazy III RNA (Pol III) w komórkach *S. cerevisiae*. Ponieważ, komórki nowotworowe wykazują m.in. zwiększoną aktywność Pol III, to warto poszerzyć wiedzę na temat działania tego kompleksu białkowego (White and Sharrocks, 2010). W grupie Prof. Boguty odkryto, że białko Maf1 jest negatywnym regulatorem Pol III (Boguta *et al.*, 1997). Kolejne ich badania pokazały, że inaktywacja *MAF1* wpływa na osłabienie metabolizmu oksydacyjnego uwidaczniający się spowolnionym wzrostem drożdży na pożywce z glicerolem (Cieśla *et al.*, 2007). Pracując w laboratorium Prof. Boguty zaobserwowałam, że białko Fba1 oddziałuje z podjednostką C160 Pol III. Fba1 to białko, które jako enzym aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu katalizuje reakcję rozszczepienia heksozy do dwóch trioz w szlaku glikolizy jak i odwrotną reakcję, czyli kondensację trioz do heksozy w szlaku glukoneogenezy. Była to kolejna wskazówka, że aktywność Pol III może być w nieznany sposób sprzężona z metabolizmem glukozy. Oprócz

zwiększonej aktywności transkrypcyjnej komórki nowotworowe często wykazują także tzw. efekt Warburga, czyli zintensyfikowaną glikolizę. Realizując już własny projekt badawczy finansowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej (POMOST/2012-6/8) wspólnie ze studentką Karoliną Chreptowicz zaobserwowałyśmy, że inaktywacja *MAF1* w drożdżach powoduje zwiększoną aktywność kinazy pirogronianowej Pyk1 kodowanej przez *CDC19* oraz wpływa na intensyfikację fermentacji etanolowej. Ponadto, brak białka Maf1 zaburza także metabolizm lipidów. Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w dwóch publikacjach.

- Cieśla M, **Mierzejewska J**, Adamczyk A, Ostlund Farrants A-K, Boguta M. 2014. Fructose bisphosphate aldolase is involved in the control of RNA polymerase III-directed transcription. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1843:1103–1110.
- **Mierzejewska J** (autor korespondujący), Chreptowicz K. 2016. Lack of Maf1 enhances pyruvate kinase activity and fermentative metabolism while influencing lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 590:93–100.

Zwiększona aktywność fermentacyjna w szczepie laboratoryjnym *S. cerevisiae* JM1-4d (*maf1*) może być też interesującą obserwacją z punktu widzenia biotechnologicznego. A mianowicie wydaje mi się ciekawym sprawdzenie, czy inaktywacja *MAF1* w przemysłowym szczepie *S. cerevisiae* wykorzystywanym do produkcji etanolu również spowoduje intensyfikację fermentacji etanolowej. Dlatego, obecnie kontynuuję badania na szczepie przemysłowym *S. cerevisiae* Ethanol Red, w którym dr Małgorzata Cieśla z zespołu Prof. Boguty zinaktywowała gen *MAF1*. Wstępne wyniki pokazują ten sam efekt braku aktywnego białka Maf1 co w komórkach szczepu laboratoryjnego. Oznacza to, że dogłębne zbadanie powiązań między aktywnością Pol III a metabolizmem glukozy na modelowych komórkach eukariotycznych - *S. cerevisiae*, może nie tylko przybliżyć nas do poznania mechanizmów rozwoju chorób nowotworowych, ale także do zwiększenia wydajności biotechnologicznej produkcji etanolu.

Bibliografia

Boguta M, Czerska K, Zoładek T. Mutation in a new gene *MAF1* affects tRNA suppressor efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1997 Feb 7;185(2):291–296.

Cieśla M, Towpik J, Graczyk D, Oficjalska-Pham D, Harismendy O, Suleau A, Balicki K, Conesa C, Lefebvre O, Boguta M. 2007. Maf1 is involved in coupling carbon metabolism to RNA polymerase III transcription. *Molecular and Cellular Biology* 27:7693–702.

White RJ, Sharrocks AD. 2010. Coordinated control of the gene expression machinery. *Trends in Genetics* 26:214–220.

5.3 Poszukiwanie nowych substancji o działaniu przeciwgrzybiczym i przeciwbakteryjnym

Coraz bardziej rozprzestrzeniająca się antybiotykooporność mikroorganizmów patogennych motywuje naukowców do poszukiwania nowych środków leczniczych lub substancji hamujących rozwój tych drobnoustrojów. Również na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej prowadzone są badania w tym zakresie, w których od roku 2013 biorę udział. Współpracuję z chemikami, m. in. dr inż. Edytą Łukowską-Chojnacką i prof. dr hab. inż. Kamilem Wojciechowskim, którzy produkują nowe związki i polimery o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Moim zadaniem jest prowadzenie badań biologicznych w celu wyselekcjonowania substancji, które wykazują pożądaną aktywność. Wykorzystuję do tego zarówno standardowe metody mikrobiologiczne (metodę seryjnych dwukrotnych rozcieńczeń i dyfuzyjno-krażkową) jak i procedury przeze mnie opracowane. Oprócz wykonywania eksperymentów biorę udział w ich opisanii, analizie i dyskusji. Dotychczas udało się nam wyselekcjonować serię pochodnych tetrazolu, które wykazują obiecującą aktywność przeciwgrzybiczą oraz polimerów hamujących wzrost bakterii i grzybów. Wyniki zostały opisane w trzech poniższych publikacjach.

- Łukowska-Chojnacka E, **Mierzejewska J.** 2014. Enzymatic hydrolysis of esters containing a tetrazole ring. *Chirality* 26:811–816.
- Łukowska-Chojnacka E, **Mierzejewska J**, Milner-Krawczyk M., Bondaryk M, Staniszevska M. 2016. Synthesis of novel tetrazole derivatives and evaluation of their antifungal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 24: 6058–6065.
- Wojciechowski K, Kaczorowski M, **Mierzejewska J**, Parzuchowski P. 2018. Antimicrobial dispersions and films of positively charged styrene-acrylate copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 172:532–540.

W tym roku, tj. 2018, rozpoczęłam także współpracę z dr hab. Maciejem Mazurem, prof. UW (Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii) w ramach Interdyscyplinarnych studiów doktoranckich TRI-BIO-CHEM „Od chemii do bioinnowacji dla lepszego życia” realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego. Celem naszej współpracy jest otrzymanie nowych hydrożeli lub nanocząsteczek, które mogły być wykorzystane jako nośniki leków, m. in. antybiotyków.

5.4 Stworzenie kolekcji WUT szczepów drożdży o szerokim potencjale biotechnologicznym

W ramach kierowanego przeze mnie projektu pt. „Poszukiwanie nowych szczepów drożdży zdolnych do produkcji naturalnych aromatów, barwników i polimerów” finansowanego przez NCN (2016/21/D/NZ9/01605) od roku 2017 tworzę wspólnie z doktorantką Karoliną Chreptowicz i studentami kierunku Biotechnologia na Wydziale Chemicznym PW kolekcję drożdży wyizolowanych z materiału roślinnego i spontanicznie fermentowanej żywności. Kolekcji nadałam sygnaturę WUT od skrótu ang. *Warsaw University of Technology*. Obecnie posiadamy w kolekcji ok. 200 szczepów, które charakteryzujemy i badamy ich potencjał biotechnologiczny. Wśród tych szczepów zidentyfikowaliśmy 20 szczepów produkujących barwniki karotenoidowe. W celu szerszego zanalizowania tych barwników rozpoczęłam współpracę naukową z Prof. Milanem Čertikiem (*Institute of Biotechnology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava*), który jest wysokiej klasy specjalistą m. in. w obszarze drożdży produkujących karotenoidy.

W kolekcji WUT wyselekcjonowaliśmy również szczepy drożdży, które produkują wydajnie etanol oraz są w stanie fermentować hydrolizaty lignocelulozowe. W związku z tym, obecnie wspólnie z dr inż. Katarzyną Dąbkowską (z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Przemysłowej PW) prowadzimy badania nad opracowaniem sposobu równoczesnej obróbki odpadów lignocelulozowych i produkcji etanolu z wykorzystaniem naszych drożdży.

Kolejne drożdże, które udało się nam wyselekcjonować, produkują egzopolisacharydy (EPS). Dotychczas w skali przemysłowej przy użyciu grzybów mikroskopowych, tzw. czarnych drożdży *Aureobasidium pullulans*, produkowany jest jeden EPS - pullulan. Polimer ten wykorzystywany jest głównie jako powłoki tabletek i kapsulek suplementów diety. Planuję wspólnie z Prof. Maciejem Mazurem (UW) wykorzystać EPSy produkowane przez drożdże z kolekcji WUT jako nośniki leków.

Podsumowanie opublikowanych osiągnięć naukowo-badawczych

Rodzaj publikacji	(I) Przed uzyskaniem stopnia doktora			(II) Po uzyskaniu stopnia doktora			(I) + (II)		
	liczba	IF*	Punkty MNiSW**	liczba	IF*	Punkty MNiSW**	liczba	IF*	Punkty MNiSW**
Prace oryginalne w czasopismach z bazy JCR	3	10,221	80	17	47,585	520	20	57,806	600
Prace oryginalne w pozostałych czasopismach	0	-	0	1	0	8	1	-	8
Prace przeglądowe w czasopismach z bazy JCR	0	0	0	1	1,530	20	1	1,530	20
Monografie i rozdziały w książkach	0	-	0	1		4	1		4
Przyznane patenty	0	-	0	3	-	75	3		75
Zgłoszenia patentowe	0	-	0	1	-	2	1		2
Łącznie	3	10,221	80	24	49,115	629	27	59,336	709

* Impact Factor wg roku publikacji, a w przypadku publikacji z roku 2018 podano aktualny za rok 2017

** punktacja według ujednoliconego wykazu załączonego do komunikatu MNiSW z dnia 26.01.2017 r.

Dane bibliometryczne według Web of Science v.5.30, JCR z dnia 4.11.2018:

- Cytaty: **220** (bez autocytowań),
- Indeks Hirscha: **8**

4.11.2018
