

**dr Urszula Pankiewicz**

adiunkt

Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

## **AUTOREFERAT**

### **Załącznik II**

Lublin 2014

## AUTOREFERAT

### 1. Imię i nazwisko: Urszula Pankiewicz

### 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- mgr chemii UMCS w Lublinie, specjalność ochrona środowiska, 11 maja 1994 r.
- dr nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia – analiza żywności, 22 czerwca 2005 r.

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

- **01.02.1996 r. – 01.10.2005 r. – asystent naukowo-dydaktyczny** w Zakładzie Oceny Jakości Żywności Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie)
- **od 01.10.2005 r.– adiunkt** w Katedrze Analizy i Oceny Jakości Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

### 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.):

#### a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięcie pod tytułem: „Bioakumulacja wybranych jonów metali w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*, w warunkach traktowania hodowli pulsacyjnym polem elektrycznym (PEF)” tworzy jednotematyczny cykl 6 publikacji z lat 2008-2014

#### b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:

- P.1. Urszula PANKIEWICZ, Jerzy JAMROZ, Accumulation of selenium and catalase activity changes in the cells of *Saccharomyces cerevisiae* on pulsed electric field (PEF) treatment.**  
Annals of Microbiology, 58, 2, 239-243,2008.  
(IF<sub>2008</sub> = 0.466, MNiSW=13 pkt.)
- P.2. Urszula PANKIEWICZ, Jerzy JAMROZ, Accumulation of selenium and changes in the activity of inulinase and catalase in the cells of *Kluyveromyces marxianus* on pulsed electric field treatment**  
Journal of Microbiology and Biotechnology, 20(7), 1101-1106, 2010.  
(IF<sub>2010</sub> = 1.22, MNiSW=27 pkt.)
- P.3. Urszula PANKIEWICZ, Jerzy JAMROZ, Effect of pulsed electric fields upon accumulation of magnesium in *Saccharomyces cerevisiae***  
European Food Research and Technology, 231, 663-668, 2010.  
(IF<sub>2010</sub> = 1.585, MNiSW=32 pkt.)

**P.4. Urszula PANKIEWICZ, Jerzy JAMROZ, Effect of pulsed electric fields upon accumulation of zinc in *Saccharomyces cerevisiae* Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(6), 646-651, 2011. (IF<sub>2011</sub> = 1.3, MNiSW=27 pkt.)**

**P.5. Urszula PANKIEWICZ, Jerzy JAMROZ, Application of pulsed electric field for enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* cells with calcium ions. Italian Journal of Food Sciences 4, 394-402, 2013. (IF<sub>5-Year</sub> = 0.465\*, MNiSW=15 pkt.)**

**P.6. Urszula PANKIEWICZ, Monika Sujka, Marzena Włodarczyk-Stasiak, Artur Mazurek, Jerzy Jamroz, Effect of pulse electric fields (PEF) on accumulation of magnesium and zinc ions in *Saccharomyces cerevisiae* cells. Food Chemistry 157, 125-131, 2014. (IF<sub>5-Year</sub> = 4.072\*, MNiSW=40 pkt \*\*.)**

\* ze względu na brak danych dotyczących współczynnika wpływu (*impact factor, IF*) zgodnie z rokiem opublikowania, podano jego średnią wartość za ostatnie 5 lat

\*\* wg Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 17 grudnia 2013 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznanych za publikacje w tych czasopismach

Sumaryczny *impact factor* publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: **9.108**

Suma punktów za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego według wykazu czasopism naukowych MNiSW: **154\***

Wkład Wnioskodawcy w wyżej wymienione publikacje generalnie obejmuje: udział w tworzeniu koncepcji przeprowadzenia badań, zebranie literatury, wykonanie doświadczeń, analizę, opracowanie i dyskusję wyników, napisanie manuskryptów, pełnienie roli autora korespondencyjnego.

Oświadczenia współautora prac, określające jego indywidualny wkład w powstanie publikacji – **Załącznik 6**

**c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

## Wprowadzenie i cel naukowy

Wraz z rozwojem dietetyki i nauk o żywieniu coraz więcej uwagi zwraca się na poprawne zbilansowanie składników diety, w tym biopierwiastków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Jony magnezu, cynku, wapnia, seleniu jako koenzymy, regulują metabolizm komórkowy. W ostatnich latach coraz częściej stwierdza się objawy niedoboru tych pierwiastków, co zwraca uwagę na drożdże, które mogą być źródłem nie tylko cennego w diecie białka, lecz także deficytowych biopierwiastków. Drożdże wiążą ze środowiska jony metali, a następnie trwale włączają je w struktury komórkowe. W ten sposób może dochodzić do powstawania trwałych kompleksów z białkami określanymi jako biopleksy lub metalobiałka (Liu i wsp. 2002). Dotychczasowe badania wykazały, że takie formy połączenia jonów pierwiastków z białkami są lepiej przyswajalne przez organizm człowieka niż preparaty mineralne (De Nicola, Walker 2009). Wzbogacona w  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  oraz  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  (jednocześnie) biomasa komórkowa drożdży, staje się alternatywą wobec suplementacji farmakologicznej stosowanej w niedoborze tych kationów. Biopierwiastki podawane w postaci metalobiałek są lepiej przyswajalne przez organizm w porównaniu z preparatami farmaceutycznymi przygotowanymi na bazie organicznych lub nieorganicznych soli tych pierwiastków. Produkty spożywcze otrzymane z udziałem drożdży wzbogaconych w wyżej wymienione pierwiastki (lub preparaty drożdżowe) mogłyby stanowić w przyszłości dodatkowe ich źródło w diecie (Cha, Cho 2009, Vinopal i wsp. 2007).

Można wyróżnić kilka mechanizmów poboru i akumulacji jonów metali przez drobnoustroje. Występują zjawiska niespecyficznego akumulacji jonów metali na powierzchni komórek mikroorganizmów. Akumulacje może powodować sorpcja jonów i wiązania przez polimery ściany komórkowej, zewnątrzkomórkowych otoczek i śluzów drobnoustrojowych. Powszechnie występuje specyficzny transport aktywny niektórych jonów do komórek drobnoustrojów, na przykład sodu, potasu, magnezu i manganu. W szczególnych przypadkach może następować biosynteza i wydzielanie przez komórkę związków chelatujących i jonoforów, które umożliwiają pobór określonego jonu. Akumulacja jonów metali przez drobnoustroje wykorzystująca wspomniane mechanizmy jest przedmiotem badań wielu naukowców. W celu zwiększenia akumulacji wybranych jonów metali w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* w swoich badaniach wykorzystałam elektroporację (Stehlik-Tomas i wsp. 2004).

Traktowanie komórki pulsacyjnym polem elektrycznym (PEF) to tak zwana elektroporacja (elektroperforacja), która polega na działaniu na komórki zmiennym polem elektrycznym. W komórce poddanej działaniu PEF, indukowane napięcie transmembranowe przyczynia się do formowania porów w membranie i prowadzi do wzrostu jej przepuszczalności. Według modelu Zimmermanna (1986) pod wpływem pola elektrycznego na zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni błony komórkowej indukowane są ładunki o przeciwnych znakach. Gdy potencjał transmembranowy osiąga wartość krytyczną, wówczas wzajemne przyciąganie ładunków prowadzi do formowania dużej liczby porów w błonie komórkowej. Przepuszczalność błony może wzrosnąć do takiego poziomu, że możliwe jest wniknięcie do komórki pozakomórkowych cząsteczek, np. DNA lub jonów metali. Po ustaniu działania pola elektrycznego następuje uszczelnienie porów i komórki zachowują obce cząsteczki lub jony.

Błona komórkowa traci ciągłość, gdy potencjał błonowy w wyniku przyłożonego napięcia przekroczy 0,5-1,0 V. Proces elektroporacji może być odwracalny, jeśli nastąpi ponowne zasklepienie porów. Stopień odwracalności zależy od natężenia i czasu ekspozycji zewnętrznego pola. Proces jest odwracalny, gdy impulsy elektryczne trwają od mikro- do milisekund o natężeniu pola 1-20 kV/cm. Pory otwierają się w czasie kilku mikrosekund, a szybkość zamykania zależy od temperatury i wynosi od kilku sekund w 37°C do kilkunastu minut w 4°C (Torrgerosa i wsp. 2006). Gdy wartości natężenia pola elektrycznego znacznie przekroczą wartość krytyczną, wówczas powstanie porów może stać się zjawiskiem nieodwracalnym, prowadzącym do zniszczenia komórki. Dlatego istotne jest, aby elektroporacja jak najmniej uszkadzała komórkę i nie zakłócała podstawowych procesów fizjologicznych.

Elektroporacja stanowi łatwą, nietoksyczną i tanią metodę wprowadzania jonów metali i makrocząsteczek do komórek. Polega ona na wytworzeniu w błonie plazmatycznej na tyle dużych porów, aby badane cząsteczki mogły wniknąć do cytoplazmy, a jednocześnie na tyle małych, aby po pewnym czasie było możliwe ich zasklepienie, w sposób charakterystyczny dla danego typu komórek. Elektroporacji mogą być poddawane zarówno komórki zwierzęce, jak i roślinne (Aronsson i wsp. 2005). PEF najczęściej wykorzystuje się do wprowadzania do komórek fragmentów DNA, histonów (m.cz. 20 kDa), owoalbumin (m. cz. 45 kDa), immunoglobulin G (m.cz. 150 kDa), katalazy (m. cz. 240 kDa), ferrytyny (m. cz. 445 kDa), a także cząsteczek o średnicy koloidalnego złota (o średnicy 5-20 nm) i lateksu (o średnicy 0,1µm). Istnieje także możliwość perforacji komórek wchodzących w skład narządów, np. po elektroporacji

wysepek Langerhansa trzustki szczura obserwowano zwiększone wydzielanie insuliny (Fiedurek i wsp.2000).

W genetyce, elektroprację stosuje się do wprowadzania do komórek kwasów nukleinowych. Stanowi ona alternatywę dla wektorów wirusowych i metod chemicznych stosowanych dotychczas w modyfikacjach genetycznych. Zaletą elektroporacji jest to, że nie wprowadza się do środowiska dodatkowych substancji, które mogłyby w niepożądany sposób oddziaływać z komórką.

Przepuszczalność błony komórkowej jest uzależniona od:

- rodzaju i rozmiarów komórki
- natężenia pola elektrycznego
- czasu impulsu
- szerokości pulsu
- czasu ekspozycji pola (elektroporacji)
- okresu hodowli, po którym nastąpi ekspozycja PEF na biomasę komórek chemicznego składu pożywki (siły jonowej).

W ostatnich latach moje badania skoncentrowane są głównie na wpływie pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulację wybranych jonów metali w komórkach *S. cerevisiae*. Do 2005 roku, w badaniach wykorzystywałam elektroporator firmy JOUAN, St. Herblain, France (PS10 cell electropulsator) wypożyczony z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS w Lublinie. Od 2006, prace badawcze prowadzę przy wykorzystaniu elektroporatora ECM 830; BTX Harvard Apparatus (USA), będącego na stanie Katedry Analizy i Oceny Jakości Żywności. Początki pracy na nowym aparacie nie były łatwe. W komórkach poddanych elektroporacji nie stwierdziłam zwiększonej akumulacji jonów w porównaniu do hodowli kontrolnych (nie traktowanych PEF). Po serii badań wykazałam duże spadki napięcia podczas elektroporacji. Elektroporator nie spełniał założonego celu badań. Po wielu przeprowadzonych doświadczeniach stwierdziłam iż przyczyną spadku napięcia jest zbyt duża powierzchnia elektrody. Oryginalna elektroda, w którą został wyposażony aparat okazała się nie przydatna do prowadzonych badań. Producent elektroporatora nie podjął się opracowania i wykonania nowej elektrody. Przeprowadzenie licznych doświadczeń, związanych z badaniem zmian napięcia w funkcji siły jonowej środowiska, pozwoliło na opracowanie i wykonanie nowej elektrody. Wyposażenie aparatu w elektrodę o właściwej charakterystyce umożliwiło kontynuowanie badań.

Jako główny wykonawca w projekcie badawczym N N312 689840 pt.: „Wpływ pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulację jonów  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  oraz  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$

(jednocześnie) w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*” w latach 2011-2014 realizowałam prace badawcze i wnikliwe studia literaturowe nad wpływem pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulację jonów metali w komórkach drożdży. Uzyskane rezultaty opublikowałam w cyklu prac (P.1.-P.6.), który uważam za swoje największe osiągnięcie w dotychczasowej działalności naukowej i przedkładałam jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Komórki *S. cerevisiae* (GRAS) mogą w diecie stanowić uzupełniające źródło deficytowych biopierwiastków i witamin. Akumulowanie jonów metali w komórkach z wykorzystaniem PEF stanowi istotę badań.

Podjęcie tematu uzasadnia brak opracowań zarówno krajowych jak i zagranicznych dotyczących wpływu pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulację wybranych jonów w komórkach drożdży. Dane literaturowe dotyczą głównie przeżywalności mikroorganizmów lub zmiany aktywności enzymów pod wpływem PEF, głównie w żywności o konsystencji płynów (Karolczuk i wsp. 2006).

W oparciu o przeprowadzone badania oraz analizę teoretyczną sformułowałam następujący temat pracy habilitacyjnej: „Bioakumulacja wybranych jonów metali w komórkach *S. cerevisiae*, w warunkach traktowania hodowli PEF”.

W celu uzyskania maksymalnej akumulacji jonów metali w komórkach zrealizowałam następujące zadania badawcze:

1. Elektroporację błon komórek *S. cerevisiae* przy wzrastających stężeniach wybranych jonów metali
2. Optymalizację parametrów PEF (natężenia, szerokości pulsu, czasu ekspozycji oraz traktowania hodowli komórek polem w różnych fazach wzrostu)
3. Krotność ekspozycji PEF i sposobu dawkowania danej soli podczas hodowli
4. Zmiany żywotności komórek oraz wydajności biomasy, po traktowaniu hodowli PEF przy wzrastających stężeniach jonów metali
5. Określenie lokalizacji kationów metali w komórce, (które może przyczynić się do poszerzenia obszaru wiedzy nad mechanizmem bioakumulacji w warunkach elektroporacji błon komórek drożdży)
6. Wpływ PEF i nagromadzonego selenu na aktywność inulinazy oraz katalazy w *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces marxianus*.

**1.** Akumulacja kationów metali w komórkach *S. cerevisiae* zależy od stężenia poszczególnych jonów w pożywce, oraz od ich biodostępności. W badaniach wykazałam

wpływ stężenia jonów  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  oraz pary jonów  $Zn^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  w pożywce na ich akumulację w komórkach *S. cerevisiae*, zarówno w hodowlach kontrolnych (bez PEF) jak i z PEF. Wzrost stężenia  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ , w całym zakresie stosowanych stężeń od 10 do 1000  $\mu\text{g/ml}$  pożywki, w hodowlach kontrolnych, nie wpłynął znacząco na ich akumulację w komórkach. W hodowlach traktowanych PEF odnotowano istotny statystycznie wpływ wzrastających stężeń tych jonów w pożywce na wzrost ich akumulacji w komórkach (**P3**, **P5**). W przypadku  $Zn^{2+}$ , początkowo ze wzrostem stężenia w pożywce jego akumulacja w komórkach rosła, a powyżej 100  $\mu\text{g/ml}$  pożywki obniżała się i to zarówno w hodowlach traktowanych PEF jak i bez PEF (**P4**).

W przypadku  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  w całym zakresie stosowanych stężeń od 10 do 1000  $\mu\text{g/ml}$  pożywki stwierdzono wyższą akumulację jonów w komórkach traktowanych PEF w porównaniu do hodowli kontrolnych. Przy ustalonym optymalnym stężeniu, 100  $\mu\text{g/ml}$  pożywki, dla wszystkich badanych jonów stwierdzono wyższą akumulację w porównaniu do hodowli kontrolnych; w przypadku  $Ca^{2+}$  6-krotną,  $Zn^{2+}$  1.5-krotną, a  $Mg^{2+}$  2-krotną. Przy optymalnym stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  pożywki, akumulacja magnezu wyniosła 4 mg/g s.s. co stanowi 40%  $Mg^{2+}$  dodanego do pożywki (40%  $Mg^{2+}$ ), cynku 13,29 mg/g s.s. (63%  $Zn^{2+}$ ), wapnia 3 mg/g s.s. (30%  $Ca^{2+}$ ) (**P3**, **P4**, **P5**).

Wyniki z kolejnych doświadczeń wskazują na istotny wpływ stężenia pary jonów, magnezu i cynku w pożywce, na ich akumulację w komórkach drożdży. Przy kilku kombinacjach stężeń jonów, odnotowano względnie duże nagromadzenie jednego z jonów, przy czym akumulacja drugiego była wówczas dwu, a nawet kilkakrotnie niższa od maksymalnej. W hodowlach traktowanych PEF, uzyskano wówczas wysoką akumulację  $Mg^{2+}$ , 2.32 mg/g s.s. oraz  $Zn^{2+}$ , 7.24 mg/g s.s. przy optymalnych stężeniach 100  $\mu\text{g}$   $Mg^{2+}/\text{ml}$  oraz 150  $\mu\text{g}$   $Zn^{2+}/\text{ml}$  pożywki (**P6**).

2. Wykazano, że **natężenie pola elektrycznego** od 0.1 do 1.0 kV/cm, nie wpływa istotnie statystycznie na akumulację jonów w komórkach, kształtuje się na podobnym poziomie jak w hodowli kontrolnej. Dopiero istotne statystycznie zmiany akumulacji badanych jonów odnotowano w zakresie wyższych natężeń pola elektrycznego, od 2.0 do 6.0 kV/cm. Przy optymalnym natężeniu pola, 5.0 kV/cm, stwierdzono maksymalną akumulację w komórkach, która była 2-krotnie wyższa ( $Mg^{2+}$ , para  $Zn^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ ) oraz 3-krotnie wyższa ( $Ca^{2+}$ ) w porównaniu do hodowli kontrolnej (**P3**, **P5**, **P6**). Przy natężeniu pola 3.0 kV/cm stwierdzono maksymalną akumulację  $Zn^{2+}$ , która była blisko 2-krotnie wyższa w porównaniu do hodowli kontrolnej (**P4**). Natężenie pola, powyżej 3.0 kV/cm w przypadku  $Zn^{2+}$  oraz powyżej 5.0 kV/cm w przypadku  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  i pary jonów  $Zn^{2+}$



i  $Mg^{2+}$ , powodowało istotny statystycznie spadek nagromadzenia jonów w komórkach lub nie powodowało istotnych statystycznie zmian w akumulacji jak w przypadku pary jonów (**P3-P6**).

Wykazano istotny wpływ **szerokości pulsu** PEF na akumulację badanych jonów w komórkach. Zastosowano szerokość pulsu w zakresie od 10 do 150  $\mu s$ . Za optymalne szerokości pulsu przyjęto 10 i 20  $\mu s$ , przy których uzyskano maksymalną akumulację badanych jonów w komórkach drożdży. Przy szerokości pulsu 10  $\mu s$  uzyskano maksymalną akumulację  $Zn^{2+}$  (15 mg/g s.m.), była ona ponad dwukrotnie wyższa w porównaniu do hodowli nie traktowanej PEF (**P4**). Najwyższą akumulację uzyskano przy szerokości pulsu 20  $\mu s$  i wyniosła ona odpowiednio 4 mg/g s.m. ( $Mg^{2+}$ ), 2.5 mg/g s.m. ( $Ca^{2+}$ ) oraz 11.42 i 2.89 mg/g s.m. (pary jonów  $Zn^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ ), (**P3, P5, P6**). W przypadku  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  akumulacja była odpowiednio 2 i 5 -krotnie wyższa w porównaniu do hodowli nie poddanej działaniu PEF (**P3, P5**). Wyższe od optymalnych wartości szerokości pulsu powodowały istotny statystycznie spadek akumulacji w przypadku wszystkich badanych jonów w komórkach (**P3-P6**). W przypadku  $Ca^{2+}$  odnotowano ponad dwukrotny spadek akumulacji (**P5**).

W licznych doświadczeniach udowodniono, że istotnym parametrem wpływającym na akumulację jonów w komórkach jest **czas ekspozycji** biomasy komórek drożdży traktowanych PEF w czasie 5, 10, 15, 20 i 25 minut. Już po 5 i 10 minutowej ekspozycji akumulacja jonów była wyższa w porównaniu do hodowli kontrolnej, ale niższa istotnie statystycznie od optymalnego czasu wyznaczonego dla danego jonu (**P3-P6**). Za optymalną ekspozycję PEF przyjęto 15 i 20 minut, przy której uzyskano największe nagromadzenie badanych jonów w komórkach. Po 15 minutowej ekspozycji PEF, uzyskałam maksymalną akumulację  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  oraz pary jonów  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ ; zaś po 20 minutowej maksymalną akumulację  $Ca^{2+}$ . Ekspozycja 20 i 25 -minutowa spowodowała istotny statystycznie spadek akumulacji w przypadku wszystkich badanych jonów z wyjątkiem  $Mg^{2+}$  gdzie wydłużenie czasu ekspozycji PEF nie wpłynęło ani na wzrost ani na spadek akumulacji tych jonów w komórkach (**P3-P6**).

Wyniki z przeprowadzonych badań wykazały istotny wpływ **okresu** hodowli, po którym traktowano PEF biomasę komórek drożdży. Hodowle, od ich rozpoczęcia traktowano PEF po 8, 12, 16, 20 i 24 godzinach. Najbardziej podatną na ekspozycję PEF okazała się 20 godzinna hodowla, ponieważ w komórkach wykazałam najwyższe nagromadzenie badanych jonów (**P3-P6**). W przypadku cynku, ok. 15.5 mg/g s.s., było o ok. 72% lub 57 % wyższe w stosunku do hodowli traktowanych PEF po 8 lub 24 h namnażania

komórek, **(P4)**, dla magnezu, ok. 4 mg/g s.s., wyższe o ok. 34 % lub 23 % **(P3)**, w przypadku wapnia, 3 mg/g s.s. wyższe o 150 % i 8 % **(P5)**. Maksymalne nagromadzenie  $Zn^{2+}$ , 11.41 mg/g s.s. oraz  $Mg^{2+}$ , 2.85 mg/g s.s., stwierdzono po traktowaniu PEF 20 godzinnej hodowli. Odnotowano ok. 30 % wyższą zawartość cynku w stosunku do hodowli traktowanych PEF po 8 lub 24 h namnażania. Nie wykazano istotnie statystycznego wzrostu akumulacji magnezu w komórkach, po różnych okresach traktowania hodowli PEF **(P6)**.

W komórkach z hodowli traktowanych PEF po 8, 12, 16 h wzrostu i rozwoju akumulacja jonów była niższa, natomiast po 24h hodowli nastąpił istotny statystycznie spadek w porównaniu do hodowli traktowanej PEF po 20 h hodowli.

**3.** W kolejnym zadaniu badawczym, traktowałam czterokrotnie PEF hodowle drożdży po 8, 12, 16, 20 h od jej rozpoczęcia. Chciałam wykazać jaki wpływ na akumulację jonów w komórkach może mieć wielokrotna ekspozycja PEF biomasy drożdży w różnych okresach wzrostu i rozwoju. Hodowle prowadzono przy zoptymalizowanych wcześniej parametrach PEF oraz optymalnym stężeniu badanych jonów w pożywce. W przypadku jonów ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) i pary jonów ( $Zn^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ ) nie stwierdzono wpływu wielokrotnego działania PEF na wyższą akumulację tych jonów w komórkach, a nawet była ona niższa o 47% ( $Zn^{2+}$ ) i 125% ( $Ca^{2+}$ ) w porównaniu do akumulacji gdzie hodowle jednokrotnie traktowano PEF **(P4, P5)**. Akumulacja pary jonów  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  była 2.5 i 3.5 krotnie niższa w porównaniu do maksymalnej akumulacji uzyskanej po jednokrotnym traktowaniu PEF hodowli **(P6)**. Tylko w przypadku  $Mg^{2+}$ , stwierdzono o 5% wyższą akumulację w komórkach, po poddaniu hodowli 4-krotnej elektroporacji w porównaniu do biomasy komórek jednokrotnie traktowanych PEF **(P3)**.

Sposób wprowadzania określonej dawki soli (dawkowanie) do pożywki wydawał się istotny ze względu na wzrost siły jonowej środowiska czy też zmiany ciśnienia osmotycznego. Przy zoptymalizowanych parametrach PEF oraz optymalnym stężeniu badanych jonów w pożywce prowadzono hodowle, do których całkowitą dawkę soli dodawano w czterech porcjach, kolejno po 8, 12, 16 i 20 h hodowli. Dawkowanie soli nie wpłynęło na wzrost akumulacji badanych jonów w komórkach. Odnotowano niższą akumulację odpowiednio o 30 % ( $Mg^{2+}$ ) i 57 % ( $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) w porównaniu do hodowli, do której wprowadzono całą dawkę tych jonów przed jej rozpoczęciem **(P3-P5)**. Dodatek do pożywki całej dawki pary jonów magnezu i cynku w czterech porcjach, spowodował spadek akumulacji odpowiednio o 22 i 74 % (w porównaniu do hodowli, do której dodano całą dawkę przed jej rozpoczęciem) **(P6)**.

4. W kolejnych doświadczeniach wykazano zmiany żywotności komórek drożdży w warunkach stresu jak wzrost stężenia jonów metali (10 – 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) czy też różny zakres natężenia pola (1-6 kV/cm) i szerokości pulsu (10-150  $\mu\text{s}$ ).

Wykazano znacznie mniejszy wpływ wzrastającego stężenia jonów  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  w pożywce na wzrost liczby martwych komórek w porównaniu z jonami  $\text{Zn}^{2+}$  (**P3-P5**).

Przy optymalnym stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$  (100  $\mu\text{g/ml}$  pożywki) i  $\text{Mg}^{2+}$  (100  $\mu\text{g/ml}$  pożywki) udział martwych komórek wyniósł odpowiednio 17 i 10 %. Dalszy wzrost stężenia tych jonów, w pożywce do 1000  $\mu\text{g/ml}$  powodował podwojenie liczby martwych komórek do ok. 35% (**P3, P5**). Wzrastające stężenie jonów  $\text{Zn}^{2+}$  w pożywce wykazało istotny wpływ na żywotność komórek. Przy stężeniu optymalnym 100  $\mu\text{gZn}^{2+}/\text{ml}$  pożywki liczba martwych komórek była na poziomie 15 %. Dalszy wzrost stężenia cynku w pożywce do 1000  $\mu\text{g/ml}$  spowodował gwałtowny wzrost liczby martwych komórek sięgający 78% (**P4**).

W przypadku pary jonów  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , stwierdzono znacznie mniejszy wpływ magnezu na żywotność komórek w porównaniu z cynkiem. Wzrastające stężenie magnezu od 20 do 500  $\mu\text{g/ml}$  pożywki (przy stałym stężeniu cynku 100  $\mu\text{g/ml}$  pożywki) spowodowało wzrost liczby martwych komórek o 52% (odpowiednio z 19 do 29%). Wykazano istotny wpływ wzrastającego stężenia cynku w pożywce (przy stałym stężeniu magnezu 100  $\mu\text{g/ml}$  pożywki) na wzrost liczby martwych komórek. W zakresie stężeń od 20 do 100  $\mu\text{g Zn}^{2+}/\text{ml}$  pożywki, ilość martwych komórek wzrosła trzykrotnie z 6% do 18%. Przy stężeniach powyżej 150  $\mu\text{gZn}^{2+}/\text{ml}$  pożywki, ilość martwych komórek przekroczyła 50% osiągając 68% przy stężeniu 500  $\mu\text{gZn}^{2+}/\text{ml}$  pożywki. Przy stężeniu optymalnym (100  $\mu\text{g Mg}^{2+}/\text{ml}$  i 150  $\mu\text{g Zn}^{2+}/\text{ml}$  pożywki), w warunkach maksymalnej akumulacji obu jonów udział martwych komórek po hodowli wyniósł 33% (**P6**).

Zmiany natężenia pola oraz szerokości pulsu wykazały istotny wpływ na żywotność komórek w przypadku wszystkich badanych jonów. W celu wykazania wpływu natężenia pola przeprowadzono badania w zakresie od 1.0 do 6.0 kV/cm. Wzrost natężenia pola od 2.0 do 5.0 kV/cm powodował podwojenie liczby martwych komórek w przypadku  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$ . Przy natężeniu pola 5.0 kV/cm, liczba martwych komórek wyniosła 12, 17 i 24%, odpowiednio dla  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  (**P3-P5**). W przypadku pary jonów  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  przy natężeniu pola 5.0 kV/cm udział martwych komórek w hodowli wyniósł 46% i był o ok. 20 % wyższy od tego przy natężeniu 2.0 kV/cm (**P6**). W celu wykazania wpływu szerokości pulsu na żywotność komórek przeprowadzono badania w zakresie od 10 do 150  $\mu\text{s}$ . Stwierdzono, iż ze wzrostem szerokości pulsu wzrasta liczba martwych komórek w przypadku wszystkich badanych jonów. Przy szerokości pulsu 20  $\mu\text{s}$

odnotowano 10, 15 i 17 % udział martwych komórek odpowiednio dla hodowli z  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ . Wzrost szerokości pulsu do 125  $\mu s$  powodował podwojenie liczby martwych komórek w przypadku  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  oraz 4-krotny wzrost w przypadku  $Zn^{2+}$  (**P3-P5**). W przypadku pary jonów  $Zn^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  wzrost szerokości pulsu od 10 do 40  $\mu s$ , (przy natężeniu pola 4.0 kV/cm), powodował 2.5-krotny wzrost liczby martwych komórek. Przy optymalnych warunkach akumulacji dla obu jonów, szerokości pulsu 20  $\mu s$  i natężeniu pola 5.0 kV/cm, udział martwych komórek wyniósł 55% (**P6**).

We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach badano zmiany biomasy drożdży po przeprowadzonej hodowli. W hodowlach drożdży wzbogacanych w  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  nie stwierdzono wpływu stężenia tych jonów w pożywce, ani poszczególnych parametrów PEF na zmiany biomasy, która utrzymywała się na poziomie ok. 1 g s.m./100ml (**P3, P5**). Wykazano natomiast istotny wpływ stężenia cynku w pożywce na zmiany biomasy. Stężenie do 100  $\mu g/ml$  pożywki, nie wpłynęło istotnie na zmiany przyrostu biomasy, która utrzymywała się w zakresie 0.8 -0.9 g s.m./100 ml. Znaczący spadek biomasy, nawet 5-krotny, odnotowano w zakresie stężeń od 200 do 1000  $\mu gZn^{2+}/ml$  pożywki, wyniosła ona odpowiednio 0.35 oraz 0.15 g s.m. /100ml. W hodowlach wzbogacanych w  $Zn^{2+}$  nie stwierdzono wpływu stosowanych parametrów PEF na zmiany biomasy drożdży (**P4**). W przypadku pary jonów wzrastające stężenie  $Zn^{2+}$  w pożywce (10-500  $\mu g/ml$ ) przy stałym stężeniu  $Mg^{2+}$  (100  $\mu g/ml$  pożywki) wpłynęło na niewielki 10 % spadek biomasy drożdży, zaś wzrastające stężenie  $Mg^{2+}$  w pożywce (10-500  $\mu g/ml$ ) przy stałym stężeniu  $Zn^{2+}$  (100  $\mu g/ml$  pożywki) wpłynęło na 15% wzrost biomasy (**P6**).

5. Jakościową i ilościową analizę oraz mapowanie jonów metali przeprowadzono z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tecnai G2 20 X-TWIN firmy Fei Company wyposażonego w spektrometr rentgenowski EDX z detektorem typu Si (Li) o spektralnej zdolności rozdzielczej  $\leq 136$  eV. Dane literaturowe wskazują na nieliczne dotychczasowe badania, wykorzystujące nową technikę TEM-EDX do mapowania jonów m. in.  $Pb^{2+}$  i  $K^{+}$  w komórkach *Rhodotorula glutinis* (Haeng i Kim 2003), srebra w komórkach *Escherichia coli* (Yamanaka i wsp. 2005), oraz do oznaczania stosunku Mn/P w komórkach *Cladosporium cladosporioides* (Shao i Sun 2007).

W przeprowadzonych badaniach na podstawie map rozmieszczenia pierwiastków w komórkach z hodowli kontrolnej K1 (nie traktowanej PEF i bez dodatku jonów  $Zn^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  do pożywki) nie dostrzeżono nagromadzenia jonów ( $Zn^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ ) w organellach komórkowych co oznacza, że są one rozmieszczone równomiernie w całej komórce.

W hodowli kontrolnej K2 (do której dodawano  $Zn^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  do pożywki i nie traktowano PEF), nagromadzenie tych jonów w obrębie ściany komórkowej jest słabo widoczne, ale zauważalne. Ilościowe oznaczenie obu jonów w K1 i K2 nie było możliwe, ponieważ ich zawartości występują poniżej granicy oznaczalności. W komórkach pochodzących z hodowli traktowanej PEF przy zoptymalizowanych parametrach pola oraz stężeniach jonów w pożywce, stwierdzono wyraźnie dużo większe nagromadzenie  $Zn^{2+}$  w organellach komórkowych, w porównaniu z  $Mg^{2+}$ . Natomiast w ścianie komórkowej nagromadziło się więcej  $Mg^{2+}$  w porównaniu z  $Zn^{2+}$ . Badając skład ilościowy tych pierwiastków wewnątrz komórki, stwierdzono 3-krotnie większe stężenie magnezu oraz 6-krotnie większe stężenie cynku w porównaniu do nagromadzenia w ścianie komórkowej (P6).

6. Podczas badań nad akumulacją selenu w komórkach *Kluyveromyces marxianus* i *Saccharomyces cerevisiae*, zwróciłam uwagę na produkcję inulinazy i katalazy. *K. marxianus* jest znanym producentem inulinazy, którą wydziela głównie zewnątrzkomórkowo. Na skalę przemysłową inulinazę wykorzystuje się do produkcji syropów wysokofruktozowych i fruktooligosacharydów (Kaur i wsp. 1992).

*S. cerevisiae* są atrakcyjnym źródłem katalazy. Izolowanie enzymu, z biomasy drożdży lub z organizmów zwierzęcych i jego oczyszczanie jest bardzo kosztowne. Wykorzystywanie wyizolowanej katalazy nie jest praktyczne, ze względu na szybką inaktywację przez  $H_2O_2$ . Dlatego, jako źródło katalazy wykorzystuje się całe komórki. Wielu autorów wskazuje na silny wpływ selenu na aktywność enzymów, m.in. katalazy, peroksydazy glutationowej (Rotruck i wsp. 1973). Nowak i wsp. (2004) wykazali wpływ selenu na aktywność hydrolaz, jak alkaliczna fosfataza,  $\beta$ -glukozydaza. Inni autorzy badali wpływ pola elektrycznego na zmiany aktywności niektórych enzymów. Pole o wysokim natężeniu powoduje zazwyczaj częściową lub całkowitą inaktywację enzymów (Yang et al., 2004a, 2004b; Zhong et al., 2007). Z drugiej strony słabe pole elektryczne może wpływać na zwiększenie aktywności enzymatycznej (Ohshima et al. 2007).

Wydawało się celowym podjęcie badań mających na celu wykazanie wpływu nagromadzonego selenu w komórkach drożdży na aktywność inulinazy oraz katalazy. Do udowodnienia tych hipotez, prowadzono hodowle drożdży *K. marxianus* i *S. cerevisiae* w warunkach działania PEF i źródła selenu.

Zastosowane parametry pulsacyjnego pola elektrycznego wpłynęły na wzrost aktywności inulinazy produkowanej przez *K. marxianus*. W hodowlach traktowanych PEF niezależnie od stężenia selenu aktywności inulinazy zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowej były wyższe w porównaniu do hodowli nie poddanych działaniu PEF. Odnotowano znaczący

wpływ stężenia selenu w pożywce na aktywność inulinazy zarówno w hodowlach traktowanych PEF jak i kontrolnych. W hodowlach traktowanych PEF, niezależnie od stężenia selenu, zaobserwowano około dwukrotnie wyższą aktywność inulinazy wewnątrzkomórkowej w stosunku do inulinazy zewnątrzkomórkowej. W hodowlach kontrolnych, aktywność inulinazy zewnątrzkomórkowej była wyższa od aktywności inulinazy wewnątrzkomórkowej (**P2**).

W hodowlach *S. cerevisiae* zastosowanie pulsacyjnego pola elektrycznego nie wpłynęło na zmiany aktywności katalazy. Jedynym czynnikiem determinującym aktywność tego enzymu było stężenie selenu. W całym zakresie stężeń selenu (od 1 µg/ml do 7 µg/ml) w pożywce, wykazano wyższą aktywność katalazy zewnątrzkomórkowej w porównaniu do wewnątrzkomórkowej (**P1**).

Przedstawiony cykl prac stanowiący osiągnięcie jest zbiorem publikacji dokumentującym wpływ pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulację różnych jonów w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*. Podjęcie tematu badań uzasadniał brak opracowań, w dostępnych źródłach informacji naukowej, dotyczących wpływu pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulację wybranych jonów w komórkach drobnoustrojów.

Większość dostępnych w literaturze prac dotyczy głównie przeżywalności mikroorganizmów lub zmian aktywności enzymów pod wpływem PEF (Korolczuk i wsp. 2006). Ponadto, w literaturze naukowej dostępne są jedynie informacje dotyczące bioakumulacji różnych jonów, bez udziału PEF (Gniewosz i wsp. 2006, Tuszyński i Pasternakiewicz 2000).

W cyklu prac, które przedkładam jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

- ✓ wykorzystano nowy elektroporator, wyposażony w nowoczesną elektrodę,
- ✓ wykazano wpływ PEF na zmiany aktywności enzymów produkowanych przez *K. marxianus* i *S. cerevisiae*,
- ✓ wykazano, że optymalizacja poszczególnych parametrów PEF oraz stężenia jonów w pożywce wpłynęła na zwiększoną 2- krotnie akumulację jonów magnezu i cynku oraz 3.5-krotnie  $\text{Ca}^{+2}$  w komórkach. W przypadku pary jonów akumulacja magnezu wzrosła 1.5-krotnie, a cynku 2- krotnie, w stosunku do hodowli kontrolnych,
- ✓ udokumentowano wpływ natężenia pola elektrycznego oraz szerokości pulsu na żywotność komórek i zmiany biomasy drożdży.

Za najważniejsze osiągnięcie w moim dorobku naukowym uważam prace nad akumulacją pary jonów  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  (jednocześnie), w której udokumentowano wpływ parametrów PEF oraz szerokiego zakresu stężenia tych jonów w pożywce na ich nagromadzenie w komórkach. W pracach tych wykorzystano udoskonalony elektroporator, wyposażony w nowoczesną elektrodę co stworzyło nowe możliwości dla przeprowadzenia szerokiego zakresu badań. Ważnym elementem innowacyjnym jest przeprowadzenie jakościowej i ilościowej charakterystyki nagromadzonych jonów  $Zn^{2+}$  w protoplaście komórki i  $Mg^{2+}$  głównie w ścianie komórkowej z wykorzystaniem nowoczesnej techniki TEM-EDX. Bezpośrednie mapowanie jonów w komórce było możliwe przy wykorzystaniu mikroskopu elektronowego wyposażonego w spektrometr rentgenowski EDX o rozdzielczości poniżej 136 eV. Akumulacja jonów w różnych przestrzeniach komórki mogła wynikać z różnego mechanizmu transportu tych jonów do wnętrza komórki oraz różnego powinowactwa tych jonów do składników cytoplazmy i błony komórkowej.

#### **Literatura:**

1. Aronsson K., Rönner U., Borch E. 2005. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 19-32.
2. Cha J.Y., Cho Y.S. 2009. Determination of optimal conditions for zinc hyperaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae* FF-10. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52, 227-233.
3. Cho D.H., Kim E.Y. 2003. Characterization of  $Pb^{2+}$  biosorption from aqueous solution by *Rhodotorula glutinis*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25, 271-277.
4. De Nicola R., Walker G.M. 2009. Accumulation and cellular distribution of zinc by brewing yeast. *Enzyme Microb. Tech.* 44, 2010-2016.
5. Fiedurek J., Skowronek M., Jamroz J. 2000. Structural changes in biological systems induced by pulsatory electric field. *Post. Nauk Rol.* 6, 41-55.
6. Gniewosz M., Błażej S., Roman J., Duszkiewicz-Reinhard W. 2006. A study on *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* cell wall capacity for binding magnesium. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 49-54.

7. Kaur N., Kaur M., Gupta A.K., Rangil S. 1992. Properties of beta-fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxysporum* grown on an aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. J. Chem. Technol. Biotechnol. 53, 279-284.
8. Korolczuk J., Mc Keag J.R., Fernandez J.C., Baron F., Grosset N., Jeantet R. 2006. Effect of pulsed electric field processing parameters on *Salmonella enteritidis* inactivation. J. Food Eng. 75,1, 11-20.
9. Liu G.J., Martin D.K., Gardner R.C., Ryan P.R. 2002. Large Mg<sup>2+</sup> - dependent currents are associated with the increased expression of ALR1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Lett. 213, 231-237.
10. Nowak J., Kaklewski K., Ligocki M. 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymem activity in soil and in plants. Soil. Biol. Biochem. 36, 1553-1558.
11. Ohshima T., Tamura T., Sato M. 2007. Influence of pulsed electric field on various enzyme activities. J. Electrostat. 65, 156-161.
12. Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G., Hoekstra W.G. 1973. Selenium : biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science (Washington, D.C.). 179, 588-590.
13. Shao Z., Sun F. 2007. Intracellular sequestration of manganese and phosphorus in a metal-resistant fungus *Cladosporium cladosporioides* from deep-sea sediment. Extremophiles 11, 435-443.
14. Stehlik-Tomas V., Zetic V.G., Stanzer D., Grba S., Vahcic N. 2004. Zinc, Copper and Manganese Enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Food Technol. Biotech. 42, 115-120.
15. Torregrosa F., Esteve M.D., Frigola A., Cortes C. 2006. Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange-carrot juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice. J. Food Eng. 73, 339-345.
16. Tuszyński T., Pasternakiewicz A. 2000. Bioaccumulation of metal ions by yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Pol. J. Food Nutr. Sci. 4,31-39.
17. Vinopal S., Ruml T., Kotrba P. 2007. Biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> by cell surface-engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Int. Biodeter. Biodegr. 60, 96-102.
18. Yamanaka M., Hara K., Kudo J. 2005. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering Transmission Elektron Microscopy and proteomic analysis. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7589-7593.



19. Yang R.J., Li S.Q., Zhang Q.H. 2004a. Effects of pulsed electric fields on the activity and structure of pepsin. *J. Agr. Food Chem.* 52, 7400-7406.
20. Yang R.J., Li S.Q., Zhang Q.H. 2004b. Effects of pulsed electric fields on the activity of enzymes in aqueous solution. *J. Food Science* 69, 241-248.
21. Zhong K., Wu J., Wang Z., Chen F., Liao X., Hu X., Zhang Z. 2007. Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chem.* 100, 115-123.
22. Zimmermann U. 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 105, 175-256.

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

Działalność naukową rozpoczęłam w 1996 roku na Wydziale Rolniczym (obecnie Wydział Agrobiotechnologii) Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie). W początkowym okresie mojej aktywności naukowej problematyka badawcza dotyczyła modyfikacji procedury oznaczania zawartości selenocysteiny i selenometioniny w drożdżach selenowych.

Istnienie w patologii człowieka wielu stanów chorobowych przebiegających przy obniżonym stężeniu selenu, wskazuje na konieczność przeciwdziałania niedoborowi tego pierwiastka. Problem suplementacji selenu w pokarmach powinien należeć do najważniejszych działań prozdrowotnych (Rayman 2000). Selen stosuje się w preparatach doustnych w postaci seleninu sodu, selenometioniny oraz drożdży selenowych. Wykazano, że selen związany w formie organicznej jest łatwiej i bezpieczniej przyswajany przez organizm człowieka niż selen z połączeń nieorganicznych (Hammel i wsp. 1997). Jednym ze źródeł organicznych związków selenu są aminokwasy tego pierwiastka, m.in. selenocysteina, selenometionina, zawarte w białku drożdży selenowych, hodowanych na pożywkach ubogich w związki siarki, a wzbogacanych dodatkami nieorganicznych soli selenu (Edens 1996).

Przed doktoratem podjęłam badania mające na celu udoskonalenie metody oznaczania zawartości selenometioniny w drożdżach selenowych, opracowanej wcześniej przez Quayana i wsp. (1989). Modyfikacja metody polegała na wykorzystaniu do rozdzielania chromatograficznego kolumny kapilarnej oraz wprowadzeniu do analizowanej próby standardu wewnętrznego – estru metyloвого kwasu undekanowego. Do standardu

selenometioniny lub próby liofilizowanych drożdży selenowych, zawierających standard wewnętrzny, dodawano bromocyjan rozpuszczony w roztworze HCl. Powstały z selenometioniny drożdżowej – metyloselenocyjan ekstrahowano chloroformem. Odmierzoną próbkę ekstraktu chloroformowego wstrzykiwano do dozownika chromatografu gazowego. Stężenie selenometioniny określano w oparciu o stosunki ilościowe wyliczone z powierzchni pików metyloselenocyjanu otrzymanych ze znanych ilości standardów selenometioniny oraz powierzchni pików odpowiadającego jednostce masy dodawanego standardu wewnętrznego (**A1**). Nowa procedura analityczna umożliwia uzyskiwanie wyników charakteryzujących się wyższą dokładnością i wyższą precyzją w porównaniu z metodą opracowaną przez Quayana i wsp. (1989).

Celem kolejnych badań przed doktoratem (**A2**) była adaptacja i usprawnienie metody oznaczania zawartości selenocysteiny w drożdżach selenowych, opracowanej wcześniej przez Jonesa i wsp. (1979) dla niektórych oksydoreduktaz. Modyfikacja metody polegała na wykorzystaniu do rozdzielania chromatograficznego konwencjonalnego analizatora aminokwasów oraz na wprowadzeniu do badanej próby standardu wewnętrznego – norleucyny. Do standardu selenocystyny lub próby liofilizowanych drożdży selenowych zawierających standard wewnętrzny dodawano borowodurek potasu i merkaptoetanol w celu redukcji selenocystyny do selenocysteiny. Następnie próbkę traktowano kwasem jodoctowym dla sprzęgnięcia z selenocysteiną w wyniku czego otrzymywano karboksymetyloselenocysteinę nie ulegającą rozkładowi w czasie hydrolizy białka drożdży. Uzyskany kompleks poddawano oczyszczeniu chromatograficznemu z nadmiaru odczynników reakcyjnych na kolumnach z kationitem i anionitem. Oczyszczoną próbkę hydrolizowano, odparowywano do sucha a pozostałość rozpuszczano w buforze cytrynianowym (pH 2.2). Aminokwasy z uzyskanej mieszaniny poddawano rozdzielaniu metodą chromatografii jonowymiennej w analizatorze aminokwasów i oznaczaniu spektrofotometrycznemu powstałych kompleksów z ninhydriną. Zebrane frakcje eluatu po przejściu przez reaktor analizatora poddawano analizie na zawartość selenu techniką bezpłomieniową, ET-AAS. Nowa procedura analityczna pozwala na całkowite oddzielenie oznaczanego składnika od pozostałych aminokwasów umożliwiając następnie jego pomiar ilościowy, a zastosowanie wzorca wewnętrznego poprawia precyzję uzyskiwanych wyników (**A2**). Doświadczenia badawcze i zdobyta wiedza teoretyczna były inspiracją do wyboru przeze mnie problematyki dysertacji doktorskiej. Na podstawie przeglądu literatury sprecyzowano cel rozprawy doktorskiej, którym było wykazanie

wpływu pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulację selenu w komórkach różnych rodzajów drożdży. Założono większą akumulację selenu w komórkach drożdży pod wpływem PEF. Do udowodnienia tych hipotez, prowadzono hodowle drożdży: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* oraz *Rhodotorula rubra* w warunkach działania PEF i źródła selenu. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* 11 B<sub>1</sub> pochodziły z drożdżowni przy ulicy Kunickiego w Lublinie, *Kluyveromyces marxianus* (K-1) oraz *Rhodotorula rubra* z kolekcji Katedry Technologii Przemysłu Rolno – Spożywczego i Przechowalnictwa Akademii Rolniczej w Lublinie. W pierwszym etapie badań prowadzono optymalizację składu podłoża i pH pożywki (A12). Przeprowadzone badania dowiodły, że spośród dwóch przebadanych źródeł węgla, glukozy i sacharozy, wchodzących w skład pożywki zastosowanie glukozy wpłynęło na wyższą akumulację selenu. Wyniki badań wskazują na znaczący wpływ stężenia składników pożywki na wzrost akumulacji selenu w komórkach. Wyjątek stanowi źródło azotu i oraz siarki, których optymalizacja nie wpłynęła na wzrost akumulacji selenu w drożdżach. Optymalizacja źródła potasu oraz magnezu jako kolejnych składników pożywki wpłynęła na ponad 60% wzrost akumulacji selenu. Zoptymalizowanie składu pożywki, źródła węgla, potasu, magnezu i siarki, wpłynęło na ponad 80% wzrost akumulacji selenu. Optymalizacja czasu hodowli i wartości pH wpłynęła na około 78% wzrost akumulacji selenu w stosunku do hodowli, która była prowadzona przy zoptymalizowanym składzie pożywki. W kolejnym zadaniu badawczym wykazano wpływ stężenia selenu w pożywce na jego akumulację w komórkach. Ustalenie optymalnego stężenia selenu w pożywce przyczyniło się do wzrostu jego akumulacji o około 15% (A12). Po zoptymalizowaniu parametrów hodowli przystąpiono do elektroporacji biomasy komórek w celu zwiększenia akumulacji selenu. Elektroporacji komórek drożdży dokonywano za pomocą elektroporatora firmy JOUAN, St. Herblain, France (PS10 cell electropulsator). W przypadku wszystkich badanych rodzajów drożdży przyjęto następujące parametry PEF: napięcie 1500V, częstotliwość pola 1Hz oraz czas pulsu 1 ms. Elektroporację prowadzono przy zoptymalizowanym wcześniej pH 5, 36 h hodowli i przy stężeniu selenu, 4 µg /ml pożywki. Optymalizowano okres hodowli po którym traktowano PEF komórki, czas ekspozycji PEF oraz stężenie selenu w pożywce. Stwierdzono zależność akumulacji selenu w komórkach od okresu hodowli, po którym traktowano je PEF. Maksymalne nagromadzenie selenu w *S. cerevisiae* odnotowano po traktowaniu PEF 20 godzinnej hodowli i było ono o około 50% wyższe w stosunku do hodowli bez użycia PEF (A12). Natomiast po traktowaniu PEF 16 godzinnych hodowli, uzyskano maksymalną akumulację

selenu w *K. marxianus* oraz *R. rubra*. Była ona odpowiednio o ok. 33% i ok. 50% wyższa w stosunku do hodowli kontrolnych bez PEF (A10, A11). Czas działania PEF na biomase badanych drożdży znacząco wpływa na akumulację selenu w komórkach. Optymalny czas ekspozycji PEF dla różnych rodzajów drożdży jest zróżnicowany i tak dla *S. cerevisiae* wynosi 15 minut, *K. marxianus*, 3 minuty zaś *R. rubra* 10 minut. Stwierdzono zależność akumulacji selenu w komórkach różnych rodzajów drożdży od jego stężenia w podłożu hodowlanym. Optymalne stężenie selenu w pożywce dla *S. cerevisiae* to 4 µg/ml, dla *R. rubra* 15 µg/ml, a dla *K. marxianus* 14 µg/ml (A10, A11, A12).

Drożdże selenowe zawierały 50% selenu w formie selenometioniny oraz znaczne ilości selenocysteiny (Korhola i wsp. 1986; Pehrson 1993). Według Wolfa i wsp. (2001) około 73 % selenu ogólnego stanowi selenometionina, natomiast Gilon i wsp. (1996) wykazali, że 42% selenu ogólnego występuje w formie selenometioniny natomiast 35 % jako selenocysteina.

Wydawało się celowym podjęcie badań, które miały na celu wykazanie wpływu PEF na zawartość selenocysteiny w *S. cerevisiae*. Drożdże selenowe pochodziły z hodowli, którą przeprowadzono w zoptymalizowanych warunkach: z dodatkiem selenu 4 µg/ml pożywki i traktowaną 15-minutowym PEF po 20 h hodowli od jej rozpoczęcia.

Wyniki badań, wskazują na znaczący wpływ PEF na akumulację selenu w *S. cerevisiae*. Hodowle traktowane PEF zawierały w biomacie drożdży 3-krotnie więcej selenocysteiny (79,5 µg/g s.s.) w porównaniu do hodowli kontrolnej (30,2 µg/g s.s.). Selenocysteina stanowi 15 % selenu ogólnego, w biomacie traktowanej PEF, natomiast w komórkach z kontroli 9 %. W warunkach działania PEF, komórki drożdży akumulują około 37,4 µg/g s.s. selenu (w porównaniu do hodowli kontrolnej bez PEF, 13,8 µg/g s.s.) (A13).

W celu potwierdzenia wpływu PEF na *S. cerevisiae*, wykonano zdjęcia elektroporowanych komórek za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego i transmisyjnego. Badania elektronomikroskopowe potwierdzają elektroporację błon komórkowych po traktowaniu PEF hodowli. Na zdjęciach komórek elektroporowanych zaobserwowano liczne pory czego nie stwierdzono na zdjęciu hodowli kontrolnej nie traktowanej PEF (A12).

Równoległe z badaniami dotyczącymi elektroporacji komórek drożdży prowadziłam prace nad oceną właściwości fizykochemicznych i organoleptycznych mieszanin alkoholu etylowego z sokiem i olejkami eterycznymi (A16).

Wrażenia smakowe w głównej mierze wpływają na akceptację i preferencję konsumentką żywności i napojów (Szczesniak 1990). Lepkość, gęstość i napięcie powierzchniowe są istotnymi parametrami reologicznymi ciekłych produktów żywnościowych, które istotnie wpływają na takie procesy jak filtracja, klarowanie itp. Parametry te są również ważnymi cechami jakościowymi, które wpływają na odczucia organoleptyczne tych produktów i modyfikują inne wrażenia w tym słodkość, gorycz, słoność, cierpkość czy smakowitość (Yanniotis et al 2007).

Alkohol etylowy jest półproduktem do zestawienia różnych rodzajów wódek w tym smakowych. W ostatnich latach zainteresowanie wśród konsumentów wódkami smakowymi wyraźnie wzrosło. Dla przykładu w roku 2008 „Finlandia Vodka” odnotowała ponad 30% wzrost sprzedaży wódek smakowych. Wódki smakowe produkuje się z wyciągów ziół i destylatów roślinnych, owoców, soków owocowych oraz olejków eterycznych.

Prowadziłam badania nad zależnością gęstości i lepkości odczuwalnej od gęstości i lepkości fizycznej dla wodnych roztworów etanolu (EOH) oraz dla roztworów alkoholu etylowego z sokiem gruszkowym (przy stężeniach etanolu): 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 %.

Pomiar odczuwalnej gęstości i lepkości wykonał panel, który był uprzednio przeszkolony wg procedury opracowanej przez Pickeringa i wsp. (1998). Odczuwalna gęstość została zdefiniowana jako uczucie „ciężkości” stałej objętości badanej próbki w jamie ustnej, natomiast odczuwalną lepkość określono na podstawie badania przepływu stałej objętości próbki od policzka do policzka. Panel zapoznał się z przykładami próbek o różnych gęstościach i lepkościach (gęstość: mleko skondensowane, woda destylowana; lepkość: sok pomidorowy, woda destylowana).

Szkolenie obejmowało zapoznanie panelu z 15 centymetrową skalą do nadawania wartości liczbowych odczuwalnej gęstości i lepkości. Skale te wykonano na podstawie roztworów wzorcowych: wody destylowanej, oraz roztworów karboksymetylocelulozy, 0.3g/l i 2 g/l . Biorąc pod uwagę zależność statystyczną zmiennych losowych, stwierdzono bardzo wysoką korelację pomiędzy fizycznymi, a odczuwalnymi gęstościami i lepkościami. Można wnioskować, że 10-osobowy panel potrafił z bardzo dużą dokładnością dokonać pomiarów gęstości badanych roztworów za pomocą narządów zmysłów. Dodatek soku gruszkowego przyczynił się do wzrostu czułości pomiarów organoleptycznych lepkości badanych roztworów **(A16)**.

W moim dorobku naukowym znajduje się praca dotycząca zmiany zawartości kwasu dehydro-L-askorbinowego w stosunku do całkowitej zawartości witaminy C w wybranych owocach i warzywach (A14).

Określono zmiany całkowitej zawartości witaminy C, kwasu L-askorbinowego i kwasu dehydro-L-askorbinowego w wybranych owocach (banan, cytryna) i warzywach (brokuł, kalafior, ogórek, pomidor, natka pietruszki) podczas przechowywania w 20°C aż do nieprzydatności do spożycia. Wykazano obniżanie całkowitej zawartości witaminy C i kwasu L-askorbinowego oraz podwyższanie zawartości kwasu dehydro-L-askorbinowego. Największą retencją witaminy C cechują się produkty o wysokiej kwasowości takie jak cytryna i pomidor. Wykazano wzrost udziału kwasu dehydro-L-askorbinowego w całkowitej zawartości witaminy C. W pierwszym dniu przechowywania udział ten był większy od 10% tylko w brokule, ogórku i bananie, zaś w ostatnim był większy od 40% w bananie i ogórku, pomiędzy 20 a 40% w natce pietruszki i brokule, mniejszy od 20% w pomidorze, kalafiorze, i cytrynie. W celu otrzymania poprawnych wyników oznaczania zawartości witaminy C w owocach i warzywach zastosowane metody muszą uwzględniać zawartość kwasu dehydro-L-askorbinowego.

Uczestniczyłam w badaniach nad wpływem warunków ekstruzji (temperatura i obroty ślimaka) na porowatość ekstrudatów skrobiowo-białkowych wyznaczoną metodą niskotemperaturowej adsorpcji/desorpcji azotu. Niskotemperaturowa adsorpcja/desorpcja azotu jest metodą dobrze opisującą powierzchnię właściwą i porowatość ekstrudowanych mieszanek skrobiowo-białkowych w zakresie mezoporów. Ekstruzja kształtuje nowe struktury produktów, zróżnicowane pod względem właściwości sorpcyjnych w porównaniu do materiału wyjściowego. Dobór optymalnych obrotów ślimaka i profilu temperaturowego, pozwala na otrzymanie ekstrudatu o wysokiej porowatości (SBJH, DBJH i VBJH) i ekspansji (EX). Łagodne warunki temperaturowe i optymalne obroty ślimaka wpływają na rozwinięcie i jednorodność powierzchni właściwej ekstrudatów, dla większości analizowanych próbek (A17).

Kolejna praca z mojego dorobku naukowego dotyczy monitoringu zawartości rtęci w wybranych produktach mleczarskich z regionów południowo-wschodniej Polski.

Na zawartość rtęci przebadalam 48 produktów mleczarskich wyprodukowanych przez Okręgowe Spółdzielnie Mleczarskie (OSM) zlokalizowane w południowych i południowo-wschodnich regionach Polski. Rtęć oznaczałam techniką bezpłomieniową ET-AAS w analizatorze rtęci AMA. W handlowych asortymentach zawartość rtęci nie przekracza

dopuszczalnego limitu, który w mleku wynosi 10 µg/kg. Najmniejsze stężenie rtęci stwierdziłam w kefirach, 0.01 µg/kg produktu, natomiast największe w maśle, 0.79 µg/kg. Wykazałam, że analizowane produkty nie stanowią zagrożenia dla konsumentów, ponieważ zawartość rtęci nie przekracza wartości granicznej wg obowiązujących zaleceń FAO/WHO oraz nie dają jakichkolwiek niepokojących przesłanek o ewentualnym skażeniu terenów naturalnych czy rolniczych tym toksycznym pierwiastkiem (A15).

Obecnie moje zainteresowania naukowe koncentrują się wokół problematyki wpływu PEF na akumulację wybranych jonów oraz par jonów w komórkach drożdży. Rezultaty badań przeprowadzonych w tym obszarze opublikowałam w postaci cyklu prac stanowiących podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

#### **Literatura:**

1. Edens F.W. 1996. Organic selenium: From feathers to muscle integrity to drip loss. Five years onward: No more selenite! In: Proc. Alltech's 12th Annual Symposium. Biotechnol. In the Feed Industry, Lyons (Eds.), pp. 165-173.
2. Gilon N., Potin-Gautier M., Astruc M. 1996. Optimization of the determination of inorganic and organic selenium species using high-performance liquid chromatography – electrothermal atomic absorption spectrometry. J. Chromatogr. A. 750, 327-334.
3. Hammel Ch., Kyriakopoulos A., Rösick U., Benhe D. 1997. Identification of selenocysteine and selenomethionine in protein hydrolysates by high-performance liquid chromatography of their o-phthaldialdehyde derivatives. Analyst 122, 1359-1363.
4. Jones J.B., Dilworth G.L., Stadtman T.C. 1979. Occurrence of selenocysteine in the selenium- dependent formate dehydrogenase of *Methanococcus vannielii*. Arch. Biochem. Biophys. 195, 255-260.
5. Korhola M., Vainio A., Edelmann K. 1986. Selenium yeast. Ann. Clin. Res. 18, 65-68.
6. Pehrson B.G. 1993. Selenium in nutrition with special reference to the biopotency of organic and inorganic selenium compounds. In: Proc. Alltech's 9th Annual Symposium. T.P. Lyons (Ed.) Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY, 171-175.

7. Pickering G., Heatherbell D., Barnes D., Vanhanen L.P. 1998. The effect of ethanol concentration on the temporal perception of viscosity and density in white wine. *Am. J. Enol. Viticult.* 49, 306-318.
8. Quyang Z., Wu J., Xie L.Q. 1989. A method for the indirect determination of trace bound selenomethionine in plants and some biological materials. *Anal. Biochem.* 178, 77-81.
9. Rayman M.P. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet* 356, 233-241.
10. Szczesniak A.S. 1990. Psychorheology and texture as factors controlling the consumer acceptance of food. *Cereal Food World*, 35, 1201-1205.
11. Wolf W.R., Zainal H., Yager B. 2001. Selenomethionine content of candidate reference materials. *Fresenius J. Anal. Chem.* 370, 286–290.
12. Yanniotis S., Kotseridis G., Orfanidou A., Petraki A. 2007. Effect of ethanol, dry extract and glycerol on the viscosity of wine. *J. Food Eng.* 81, 399-403.

## 6. Podsumowanie dorobku naukowego

Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych zawiera Załącznik 5.

Mój dorobek publikacyjny przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 3 oryginalne prace twórcze oraz udział w 3 krajowych konferencjach naukowych, podczas których wygłosiłam 1 referat i zaprezentowałam 2 doniesienia.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora opublikowałam 14 oryginalnych prac twórczych, 97,77% stanowią prace znajdujące się w bazie Journal Citation Reports. Wzięłam udział w 2 konferencjach naukowych, w jednej międzynarodowej i krajowej. Na międzynarodowej wygłosiłam referat i zaprezentowałam doniesienie, na krajowej zaprezentowałam doniesienie.

### 6.1. Wskaźniki dokonań naukowych

- Sumaryczny *impact factor* publikacji naukowych, według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania: **18.542**
- Suma punktów: **331** w tym za publikacje przed doktoratem **17** po doktoracie **314** (zgodnie z rokiem opublikowania)
- Udział punktów za publikacje w czasopiśmie znajdujących się w bazie JCR po doktoracie: **97.77%**
- Indeks Hirscha publikacji według Web of Science (WoS): **2**



- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (na dzień 24. 04. 2014): 10  
(bez autocytowań 7)

Jestem głównym wykonawcą w projekcie badawczym (od maja 2011 – do maja 2014) własnym MNiSW (nr N N312 689840). Za działalność naukową byłam trzykrotnie wyróżniana nagrodą JM Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (2008, 2009, 2011).

## 6.2. Zestawienie czasopism, w których opublikowano prace naukowe

Czasopismo	Punkty MNiSW*	Liczba prac		Impact Factor IF	Suma punktów
		Przed doktoratem	Po doktoracie		
<b>Czasopisma znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JRC)</b>					
Food Chemistry	40	-	1	4.072 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>
Food Hydrocolloids	40	-	1	3.525 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>
European Food Research and Technology	32	-	1	1.585	32
Journal of Microbiology and Biotechnology	27	-	3	2.06+1.3 +1.22	81
Journal of Food Biochemistry	27	-	1	0.8	27
Acta Scientiarum Polonorum, Holtorum Cultus	20	-	1	0.691	20
Czech Journal of Food Sciences	20	-	1	0.858 <sup>a</sup>	20
Italian Journal of Food Sciences	15	-	1	0.465 <sup>a</sup>	15
Annals of Microbiology	13	-	1	0.466	13
Journal of Basic Microbiology	13	-	1	1.0	13
International Agrophysics	6	-	1	0.5	6

<b>Publikacje naukowe w czasopismach wymienionych w części B wykazu czasopism naukowych MNiSW</b>					
Ecological Chemistry and Engineering	7	-	1		7
Pol. J. Food Nutr. Sci.	6	2	-		12
Annales UMCS	5	1	-		5
<b>Komunikaty naukowe na konferencje międzynarodowe</b>			<b>2</b>		
<b>Komunikaty naukowe na konferencje krajowe</b>		<b>3</b>	<b>1</b>		
<b>RAZEM</b>		<b>6</b>	<b>17</b>	<b>18.542</b>	<b>331</b>

\* liczba punktów przyznanych za publikacje zgodnie z rokiem opublikowania

<sup>a</sup> ze względu na brak danych dotyczących współczynnika wpływu (*impact factor*, IF) zgodnie z rokiem opublikowania, podano jego średnią wartość za ostatnie 5 lat

<sup>b</sup> wg Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 17 grudnia 2013 r w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznanych za publikacje w tych czasopismach

Lublin 15.04.2014

*U. Parkianin*