

1. Imię i nazwisko: Anna Sip**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

- 1999 – stopień doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia człowieka, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza w Poznaniu (obecnie Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu); tytuł pracy doktorskiej: „Produkcja diwercyny przez bakterie *Carnobacterium divergens* AS7”, promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Grajek.
- 1994 – tytuł magistra inżyniera technologii żywności i żywienia, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza w Poznaniu; tytuł pracy magisterskiej: „Badania nad wpływem enzymów proteolitycznych i warunków obróbki technologicznej na zawartość barwników oraz właściwości filtracyjne soku z buraków ćwikłowych”, promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Grajek.

3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- od 2000 do chwili obecnej – Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, adiunkt
- 1996-2000 – Akademia Rolnicza w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, asystent
- 1994-1996 – Akademia Rolnicza w Poznaniu, Stacjonarne Studium Doktoranckie, Wydział Rolniczy, specjalizacja biotechnologia, doktorant

3.A. Praca naukowo-badawcza: przebieg, główne kierunki i najważniejsze osiągnięcia

Pracę naukowo-badawczą rozpocząłam już w trakcie studiów na Wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu. Pierwsze badania, w których uczestniczyłam dotyczyły enzymatycznego rozkładu biopolimerów białkowych w soku z buraków ćwikłowych. Ich wyniki były podstawą mojej pracy magisterskiej pt. „Badania nad wpływem enzymów proteolitycznych i warunków obróbki technologicznej na zawartość barwników oraz właściwości filtracyjne soku z buraków ćwikłowych”. Pracę tą wykonałam w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Włodzimierza Grąjka i obroniłam 28 czerwca 1994 roku. W październiku 1994 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w zakresie biotechnologii na Wydziale Rolniczym Akademii Rolniczej w Poznaniu (obecnie Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu). Dwa lata później zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu (obecnie Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu). W tym czasie aktywnie uczestniczyłam w badaniach nad biosyntezą bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej (LAB). Badania te prowadziłam we współpracy z INRA (Rennes, Francja) w ramach programu COPERNICUS. Ich rezultaty przedstawiłam w rozprawie doktorskiej pt. “Produkcja diwercyny przez bakterie *Carnobacterium divergens* AS7” (promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Grajek), którą obroniłam z wyróżnieniem 17 grudnia 1999 roku. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, a następnie awansie na stanowisko adiunkta (marzec 2000 roku), zaangażowałam się w badania

nad optymalizacją produkcji diwercyny oraz biomasy bakterii *C. divergens* AS7, a także w prace nad ekspresją bakteriocyn w układach heterologicznych. Równolegle badałam efektywność działania bakteriocyn oraz bakteriocynogennych LAB w żywności oraz oceniałam ich wpływ na ekosystem jelitowy i dobrostan ryb słodkowodnych i drobiu. Aktywnie uczestniczyłam też w opracowywaniu na bazie LAB i ich metabolitów biopreparatów niszczących drobnoustroje chorobotwórcze przenoszone drogą pokarmową, tworzeniu opakowań aktywnych i środków dezynfekcyjnych, a także w badaniach nad produkcją probiotyków, kultur starterowych i ochronnych. Następnie swoje zainteresowania naukowe skoncentrowałam na poszukiwaniu LAB zdolnych do antagonistycznego oddziaływania na drobnoustroje chorobotwórcze dla człowieka i zwierząt hodowlanych. W trakcie analizy aktywności przeciwdrobnoustrojowej LAB zasiedlających różne środowiska szczególną uwagę zwróciłam na bakterie obecne w serach regionalnych wytwarzanych na terenie Karpat. Badania dotyczące ich aktywności w stosunku do bakterii z rodzaju *Listeria* stały się wiodącym tematem mojej pracy badawczej. Najważniejsze ich wyniki zostały opublikowane w rozprawie naukowej, którą zgłosiłam jako główne osiągnięcie do postępowania habilitacyjnego. Rozprawa ta jest jak dotąd jedynym źródłem informacji na temat udziału bakteriocynogennych LAB w zabezpieczaniu serów podhalańskich produkowanych gospodarczo przed rozwojem *Listeria* spp. Zawiera ona również pełną charakterystykę nowych listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa oraz wskazuje możliwości ich praktycznego wykorzystania. Badania nad potencjałem przeciwlisteryjnym LAB rozszerzyły jednocześnie moje zainteresowania naukowe o zagadnienia związane z występowaniem chorobotwórczych bakterii *L. monocytogenes* w żywności oraz ich opornością na działanie czynników środowiskowych. W okresie ostatnich dwóch lat włączyłam się także w badania nad biosyntezami mikrobiologicznymi, a zwłaszcza w prace dotyczące biotechnologicznej konwersji glicerolu do 1,3-propanodiolu oraz badania nad powiększaniem skali biosyntezy 2,3-butanodiolu.

Mój dorobek publikacyjny, poza rozprawą doktorską i monografią będącą podstawą postępowania habilitacyjnego, obejmuje łącznie 163 pozycje, w tym: 33 prace oryginalne, 22 prace przeglądowe, 6 rozdziałów w książkach i podręcznikach akademickich (w tym 3 o zasięgu międzynarodowym), 17 referatów (w tym 4 opublikowane w całości w materiałach konferencyjnych), 77 komunikatów naukowych (27 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych i 50 na konferencjach krajowych, w tym 12 opublikowanych w całości w materiałach konferencyjnych), 1 patent krajowy, 6 zgłoszeń patentowych, w tym 1 międzynarodowe oraz ponad 100 niepublikowanych opracowań, ekspertyz i sprawozdań z badań wykonanych dla przemysłu i instytucji naukowo-badawczych. W większości wymienionych prac jestem pierwszym autorem.

W trakcie całej pracy naukowej dążyłam do praktycznego wykorzystania wyników prowadzonych badań dlatego też, oprócz publikacji naukowych, ważnym rezultatem mojej pracy badawczej jest opracowanie składu i technologii wytwarzania:

- biopreparatów do zwalczania bakterii chorobotwórczych, głównie z rodzaju *Listeria* w żywności i paszach,
- kultur starterowych zapewniających lepszą ochronę żywności przed rozwojem niepożądanych drobnoustrojów,
- środków dezynfekcyjnych,

- preparatów probiotycznych dla ryb słodkowodnych, mięczaków i skorupiaków,
- dodatku paszowego dla drobiu grzebiącego, pływającego i ptaków ozdobnych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych,
- foli z funkcją przeciwdrobnoustrojową.

Aktywnymi składnikami wszystkich wymienionych preparatów są szczepy LAB lub ich metabolity, scharakteryzowane przeze mnie w trakcie pracy naukowo-badawczej. Preparaty te są podstawą zgłoszeń patentowych. Jeden z nich został już uznany za wynalazek i uzyskał pełną ochronę patentową, a kolejny został wdrożony do praktyki przemysłowej. Aktualnie trwa też procedura rejestracji probiotyku dla ryb słodkowodnych opracowanego z moim udziałem na terenie UE i Azji. Moja praca naukowo-badawcza przyczyniła się ponadto do utworzenia w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu unikalnej kolekcji mikroorganizmów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. W skład tej kolekcji wchodzi ponad 5 tysięcy wyizolowanych i zidentyfikowanych przeze mnie szczepów bakteryjnych.

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

A. Tytuł osiągnięcia będącego podstawą postępowania habilitacyjnego, rok wydania, nazwa wydawnictwa

Sip A. (2012). **Potencjał przeciwlisteryjny bakterii fermentacji mlekowej występujących w serach regionalnych wytwarzanych w okręgu tatrzańskim**. Rozprawa naukowa 442: 1-125, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Recenzenci: prof. dr hab. Maria Bielecka i prof. dr hab. Łucja Łaniewska-Trokenheim

Badania będące podstawą wskazanej pracy stanowią podsumowanie moich wieloletnich badań nad mikroflorą produktów regionalnych oraz jej aktywnością przeciwlisterijną i zostały częściowo wykonane w ramach grantu MNiSW nr N N312 204435.

B. Omówienie celu naukowego wskazanego osiągnięcia, otrzymanych wyników wraz z przedstawieniem ich ewentualnego wykorzystania

Bakterie *Listeria monocytogenes* są jednymi z bardziej niebezpiecznych drobnoustrojów chorobotwórczych przenoszonych drogą pokarmową. Ze względu na oporność na działanie wielu czynników fizykochemicznych oraz olbrzymie możliwości adaptacyjne często występują w żywności. Na zanieczyszczenia nimi są szczególnie narażone sery z mleka niepasteryzowanego wytwarzane metodami tradycyjnymi. Do produktów tego typu należą m.in. sery regionalne produkowane na terenie Karpat takie, jak oscypek, gołka, bundz i bryndza. Mimo, że ryzyko zanieczyszczenia wymienionych serów bakteriami z rodzaju *Listeria* jest wysokie, praktyka pokazuje, że produkty te nie stanowią zagrożenia dla zdrowia człowieka. Dlatego postanowiłam wyjaśnić ten fenomen i zidentyfikować czynniki zabezpieczające sery przed rozwojem *Listeria*. Jako przedmiot badań wybrałam sery produkowane gospodarczo w okręgu tatrzańskim. Ponieważ sery te powstają w wyniku

spontanicznych fermentacji, w których bierze udział wiele różnych mikroorganizmów pochodzących zarówno z mleka, jak i otoczenia produkcyjnego, założyłam, że wśród nich mogą być drobnoustroje niszczące *Listeria*. W celu sprawdzenia słuszności tej hipotezy oceniłam potencjał przeciwlisteryjny ich natywnej mikrobioty. Za jego wyznacznik przyjąłam zdolność syntezy bakteriocyn klasy IIa, gdyż spośród wszystkich metabolitów LAB to właśnie te związki wykazują największą aktywność w stosunku do *Listeria*. Badania zmierzające wyjaśnienia roli bakteriocynopozytywnych LAB w ochronie serów podhalańskich przed rozwojem bakterii z rodzaju *Listeria* obejmowały:

1. analizę występowania bakterii z rodzaju *Listeria* w środowisku produkcyjnym oraz w serach w trakcie ich wytwarzania,
2. ocenę stanu higieny produkcji i bezpieczeństwa mikrobiologicznego gotowych serów,
3. analizę metagenomową mikrobioty serów regionalnych pod kątem obecności genów kodujących przeciwlisteryjne bakteriocyny klasy IIa oraz LAB będących ich producentami,
4. izolację i identyfikację LAB z serów o potwierdzonym potencjale przeciwlisteryjnym,
5. określenie zdolności wyizolowanych szczepów LAB do biosyntezy bakteriocyn, przeciwlisteryjnych oraz próbę wyjaśnienia ich roli w ochronie serów przed rozwojem *Listeria*,
6. charakterystykę najbardziej aktywnych bakteriocyn oraz ocenę możliwości ich zastosowania do zabezpieczania mleka przed rozwojem bakterii *Listeria*.

Dodatkowym bodźcem do podjęcia powyższych badań była chęć poznania mikrobioty oryginalnych i bardzo złożonych pod względem biologicznym środowisk, jakimi są sery regionalne.

Pracę rozpoczęłam od określenia źródeł oraz stopnia zanieczyszczenia serów regionalnych bakteriami *Listeria* (zadanie 1). W tym celu ich otoczenie produkcyjne oraz cały proces wytwarzania przebadalam w kierunku obecności bakterii z rodzaju *Listeria* oraz gatunków *L. monocytogenes*, *L. innocua* i *L. ivanovii*. Ustaliłam, że niska higiena produkcji jest przyczyną powszechnego występowania bakterii *Listeria*, w tym chorobotwórczych *L. monocytogenes* w bacówkach oraz na naczyniach i sprzętach używanych do wyrobu serów podhalańskich. Wykazałam, że do zanieczyszczeń tymi bakteriami dochodzi w wielu etapach procesu wytwarzania serów, a głównym ich źródłem są płótna filtracyjne do cedzenia mleka i odcedzania serwatki. Dostrzegłam jednak, że niezależnie od warunków sanitarno-higienicznych towarzyszących produkcji badanych serów, chorobotwórcze *L. monocytogenes* giną w trakcie dojrzewania i w żadnym z gotowych serów nie występują już ich żywe komórki. Ponadto stwierdziłam, że mimo prymitywnych warunków produkcji i niskich standardów higieny bacówek, sery wytwarzane w okręgu tatrzańskim nie budzą żadnych zastrzeżeń natury mikrobiologicznej (spełniają wszystkie wymagania mikrobiologiczne stawiane serom z mleka surowego zawarte w zaleceniach Komisji Europejskiej 04/24/EC; zadanie 2). Ustaliłam też, że w zakresie higieny i bezpieczeństwa sanitarno-epidemiologicznego ich jakość jest wyraźnie wyższa od jakości podobnych serów wytwarzanych w innych krajach. Dane te były dla mnie punktem wyjścia do dalszych badań, gdyż wskazywały na udział w dojrzewaniu serów mikroorganizmów o wysokiej aktywności

przeciwdrobnoustrojowej, w tym przeciwlisteryjnej. Sugerowały one jednocześnie, że mikroorganizmy te są specyficzne dla miejsca wytwarzania badanych serów.

Ponieważ ważnymi czynnikami przeciwlisteryjnymi są bakteriocyny klasy IIa w kolejnym etapie pracy (zadanie 3) oceniłam potencjał genetyczny mikrobioty badanych serów w syntezie tej klasy bakteriocyn. W tym celu przeanalizowałam ich meta-DNA w kierunku obecności fragmentów genów kodujących przeciwlisteryjne bakteriocyny klasy IIa. Skrining meta-DNA przeprowadziłam metodą PCR stosując startery zaprojektowane przez nasz zespół badawczy i zgłoszone do Urzędu Patentowego RP jako wynalazek. Startery te, są jak dotąd jedynym narzędziem molekularnym umożliwiającymi wykrycie fragmentów genów bakteriocyn klasy IIa zarówno znanych, jak i jeszcze nieopisanych w literaturze. Przeprowadzona z ich użyciem analiza była podstawą wstępnej oceny potencjału przeciwlisteryjnego mikroorganizmów obecnych w serach. Równoległe w obrębie meta-DNA mikrobioty serów poszukiwałam sekwencji charakterystycznych dla potencjalnie bakteriocynogennych rodzajów LAB. Ustaliłam, że wszystkie sery regionalne wytwarzane w okręgu tatrzańskim są źródłem LAB o potencjalnej zdolności syntezy bakteriocyn klasy IIa. Określiłam też jakie rodzaje LAB w każdym z badanych rodzajów serów mogą być producentami tej klasy bakteriocyn. Wyniki te stanowiły mocną podstawę do kontynuacji badań nad aktywnością przeciwlisterijną LAB oraz jej wpływem na bezpieczeństwo mikrobiologiczne serów. Wykorzystałam je również w planowaniu prac izolacyjnych i związanych z nimi dalszych badań, poprzez co wyraźnie zwiększyłam ich efektywność.

Z badanych serów wyizolowałam łącznie 807 szczepów LAB. Szczepy te zidentyfikowałam metodą PCR-RFLP i sekwencjonowania ampikonów 16S rDNA (zadanie 4), a następnie przebadalam na poziomie zarówno fenotypowym, jak i genotypowym pod kątem zdolności syntezy bakteriocyn przeciwlisteryjnych (zadanie 5). Na podstawie wyników tych badań ustaliłam, że skład mikrobioty serów podhalańskich jest unikalny. Wykazałam, że znaczny udział mają w nim LAB zdolne do syntezy bakteriocyn aktywnych w stosunku do *Listeria*, przede wszystkim klasy IIa. Udokumentowałam, że obecność szczepów LAB o takich uzdolnieniach jest charakterystyczna dla wszystkich serów podhalańskich, a najbogatszym ich źródłem są oscypki. Dostrzegłam jednak, że zaledwie 62% szczepów bakteriocynogennych syntezuje aktywne bakteriocyny. Odkrycie to dowodzi, że potencjał przeciwlisteryjny LAB jest wyższy od stwierdzanego w testach aktywności i wskazuje na konieczność prowadzenia dalszych badań nad ekspresją wykrytych genów i hydrolizą enzymatyczną bakteriocyn. Badając związek pomiędzy aktywnością LAB, a występowaniem *Listeria* stwierdziłam, że synteza bakteriocyn klasy IIa wyraźnie zwiększa skuteczność przeciwlisteryjnego działania LAB i w konsekwencji tego jest ważnym elementem ochrony wszystkich serów podhalańskich przed rozwojem *Listeria*. Ponadto, dokładnie scharakteryzowałam poszczególne gatunki LAB obecne w każdym z badanych serów, pod względem ich zdolności do syntezy bakteriocyn oraz wskazałam, które z nich odgrywają kluczową rolę w zabezpieczeniu tych produktów przed rozwojem *Listeria*. Badania przeprowadzone w ramach zadania 4 i 5 doprowadziły też do odkrycia nowych szczepów LAB zdolnych do syntezy bakteriocyn klasy IIa należących do gatunków: *Enterococcus durans*, *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus casei* i *Leuconostoc citreum*. Ostatecznie pozwoliły one również na utworzenie kolekcji drobnoustrojów o potencjale przeciwlisterijnym.

W ostatnim etapie pracy dokładnie scharakteryzowałam bakteriocyny najbardziej aktywne w stosunku do *Listeria* (zadanie 6). Ich producentami były szczepy *Lc. garvieae* AS 6/4/4 i *Lb. casei* AS 4/4/23, naturalnie występujące w oscypkach i gołkach. Ustaliłam, że szczepy te syntezują jednocześnie, odpowiednio dwie i trzy, nieznane dotąd bakteriocyny klasy IIa o masie cząsteczkowej poniżej 3 kDa i szerokim zakresie bakteriobójczej aktywności. Jak dotąd szczepy LAB o takich uzdolnieniach nie zostały wykryte w żadnym innym produkcie mlecznym. Stwierdziłam też, że bakteriocyny *Lc. garvieae* AS 6/4/4 i *Lb. casei* AS 4/4/23 silnie ograniczają liczebność *L. monocytogenes* w mleku. Tym samym potwierdziłam ich udział w eliminacji *Listeria* z serów oraz wskazałam na możliwość ich praktycznego zastosowanie w przemyśle mleczarskim.

Wyniki badań nad potencjałem przeciwlisteryjnym LAB charakterystycznych dla serów regionalnych przedstawione w rozprawie naukowej mojego autorstwa, oprócz aspektów poznawczych, mają również charakter aplikacyjny. Wyizolowane i scharakteryzowane w pracy LAB o potencjale przeciwlisteryjnym w przyszłości mogą zostać wykorzystane do opracowania wielu kultur starterowych o szczególnych właściwościach ochronnych, a także biopreparatów przeznaczonych do zwalczania *Listeria*. Wyniki moich badań mogą zatem przyczynić się do opracowania nowych systemów zabezpieczania produktów żywnościowych przed rozwojem *Listeria* i w konsekwencji tego wyraźnie poprawić ich bezpieczeństwo mikrobiologiczne. Mogą one także być podstawą do opracowania nowych metod diagnostycznych umożliwiających monitorowanie jakości mikrobiologicznej badanych serów regionalnych. Wartość praktyczną mają także przedstawione w pracy dane na temat stanu mikrobiologicznego serów pochodzących z okręgu tatrzańskiego. Można je z powodzeniem wykorzystać do promowania tych serów jako żywności naturalnej i w pełni bezpiecznej.

Za najważniejsze osiągnięcia wskazanej rozprawy naukowej uważam:

- wykazanie, że sery podhalańskie wytwarzane metodami gospodarskimi w warunkach o niskim standardzie higieny są produktami bezpiecznymi z mikrobiologicznego punktu widzenia,
- ustalenie, że ważnymi komponentami ich natywnej mikrobioty są LAB zdolne do syntezy bakteriocyn przeciwlisteryjnych, wśród których dominującą grupę stanowią bakteriocyny klasy IIa,
- wykazanie, że licznie reprezentowane w badanych serach LAB o antagonistycznej aktywności względem *Listeria* odgrywają kluczową rolę w zabezpieczaniu tych produktów przed rozwojem *Listeria*,
- odkrycie nowych szczepów LAB zdolnych do syntezy bakteriocyn przeciwlisteryjnych,
- udokumentowanie, że sery wytwarzane metodami gospodarczymi w okręgu tatrzańskim są unikalnym źródłem LAB będących producentami jednocześnie kilku bakteriocyn klasy IIa,
- scharakteryzowanie nowych bakteriocyn klasy IIa oraz potwierdzenie ich udziału w eliminowaniu *Listeria* z serów rejonu tatrzańskiego,
- utworzenie unikalnej kolekcji LAB o potencjale przeciwlisteryjnym oraz wskazanie kierunków jej praktycznego zastosowania.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

A. Osiągnięcia uzyskane przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie studiów brałam udział w badaniach dotyczących mikrobiologicznej denitryfikacji soku z buraków ćwikłowych. Zajmowałam się opracowaniem metody jego wstępnej obróbki, a następnie sterylizacji na zimno przez mikrofiltrację. Najważniejsze wyniki tych badań zostały przedstawione w mojej pracy magisterskiej, a także opublikowane (zał.6: 1.A.3, 6.B.1). Po rozpoczęciu studiów doktoranckich podjęłam nową tematykę badawczą związaną biosyntezą bakteriocyn. Tematyką tą zainteresował mnie prof. dr hab. W. Grajek (kierownik Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu), który już wtedy dostrzegł ogromny potencjał tych związków i zachęcił mnie do rozpoczęcia badań w tym kierunku. Było to jednocześnie doskonałą okazją do nawiązania współpracy z zagranicznymi jednostkami naukowymi (zał.8: pkt.5), a to z kolei zaowocowało moim udziałem w projekcie pt. „Concentrated starter and bacteriocin production” realizowanym w ramach programu COPERNICUS (zał.4: pkt. 6B). Moje badania koncentrowały się na biosyntezie diwercyny, nowoodkrytej bakteriocyny bakterii *Carnobacterium divergens*. Bakteriocyna ta z uwagi na unikalny zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz atrakcyjne właściwości technologiczne od początku wydawała się interesującym obiektem badań, zwłaszcza w kontekście możliwości wykorzystania w utrwalaniu żywności (zał.6: 5.B.1, 5.B.5, 6.A.2). Praktyczne zastosowanie diwercyny limitowała jednak niska efektywność biosyntezy. Podjęłam więc badania mające na celu jej intensyfikację. Ustaliłam jakie czynniki środowiskowe determinują ten proces i wykorzystałam te dane do zoptymalizowania warunków hodowli bakterii *C. divergens*, a następnie do wskazania najkorzystniejszej metody otrzymywania ich bakteriocyny. Przełomowym momentem w pracach nad biosyntezą diwercyny było wyizolowanie przeze mnie lepszych i bardziej stabilnych genetycznie szczepów *C. divergens* produkujących diwercynę. Szczepy te stały się obiektem mojego dalszego zainteresowania i kolejnych badań. W trakcie nich oceniłam możliwość stymulowania biosyntezy diwercyny poprzez wprowadzenie do środowiska hodowlanego bakterii wrażliwych na jej działanie oraz dokonywanie szokowych zmian temperatury, pH i aktywności wody. Ustaliłam też, że warunkiem zwiększenia wydajności produkcji diwercyny jest ograniczenie jej adsorpcji do komórek producentów oraz agregacji w środowisku hodowlanym. Poprzez dodatek detergentów do pożywki hodowlanej oraz utrzymywanie stężenia komórek na poziomie niższym niż 3,2 g s.m./l, a także kontrolowane obniżanie pH i aktywności wody, wyraźnie ograniczyłam te niekorzystne zjawiska. Dodatkowo prowadziłam też badania nad zwiększeniem odzysku diwercyny z odcieku pofermentacyjnego oraz biomasy *C. divergens*. Badania nad biosyntezą diwercyny były podstawą mojej rozprawy doktorskiej. Główne ich rezultaty zostały ponadto przedstawione w sześciu pracach oryginalnych (zał.6.: 1.A.1, 1.A.2, 1.A.4, 1.A.5, 1.A.6, 1.A.7), spośród których dwie ukazały się już pozyskaniu przeze mnie stopnia doktora oraz dwóch rozdziałach w monografii pt. „Food Biotechnology” wydanej przez Elsevier Science (zał.6: 3.A.1, 3.A.2). Zaprezentowałam je również na pięciu konferencjach naukowych (zał.8: pkt.2) w formie siedmiu wystąpień ustnych (zał.6: 5.A.1-5.A.4, 5.B.2-5.B.4; dwóch po doktoracie) i 14 posterów (zał.6: 6.A.1, 6.B.2-6.B.4, 6.B.29-33,

6.B.35-39). Ponadto w tym okresie przygotowałam obszerną pracę przeglądową poświęconą produkcji bakteriocyn przez LAB (zał.6: 2.A.1).

Przed doktoratem uczestniczyłam też w pracach związanych z biosyntezą kwasu mlekowego według innowacyjnej technologii opartej na zastosowaniu kultur o wysokiej koncentracji komórek bakteryjnych, co osiągnano przez użycie bioreaktora membranowego (zał.6: 6.B.28) oraz w badaniach dotyczących wpływu szoku osmotycznego na fizjologię i aktywność metaboliczną LAB, a także na ich odporność termiczną w trakcie suszenia (zał.6: 6.B.34). Badania te idealnie wpisywały się w nurt moich głównych zainteresowań naukowych, których przedmiotem były i pozostają do chwili obecnej, bakterie fermentacji mlekowej.

B. Osiągnięcia uzyskane po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora kontynuowałam badania nad biosyntezą diwercyny dążąc do zwiększenia jej skali i w konsekwencji tego do opracowania technologii jej przemysłowej produkcji. Znaczną część tych badań wykonałam w ramach projektu pt. „Produkcja preparatów biologicznych do zwalczania bakterii *Listeria monocytogenes* dla przemysłu spożywczego i probiotyków dla ryb” (projekt PBZ-MIN-007/P04/2003, zał.4: pkt. 6B). Powiększenie skali produkcji diwercyny nie było łatwym zadaniem. Wiązało się ono bowiem z koniecznością rozwiązania wielu problemów natury zarówno mikrobiologicznej, głównie związanych z niską stabilnością syntezy diwercyny, jak i inżynierskiej. W tak złożone badania zaangażował się cały interdyscyplinarny zespół, którego w tych badaniach byłam liderem. Nasze badania doprowadziły ostatecznie do opracowania technologii jednoczesnej produkcji wysokoaktywnych preparatów diwercyny oraz silnie skoncentrowanej kultury *C. divergens*. Technologia ta obejmowała fermentację ciągłą z recyrkulacją komórek w bioreaktorach o pojemności do 1500 dm³, separację bakteriocyny metodą ultrafiltracji lub ekstrakcji w układzie dwufazowym oraz jej utrwalanie metodą suszenia lub zamrażania. Zastosowane w niej oryginalne rozwiązania pozwoliły na zwiększenie początkowej wydajności biosyntezy diwercyny o ponad 10 tysięcy razy i umożliwiły otrzymanie preparatu, który pod względem aktywności przeciwlisteryjnej przewyższał wszystkie znane dotąd bakteriocyny. Opracowana technologia jest przedmiotem dwóch zgłoszeń patentowych (zał.6: 4.B.1, 4.B.2). Badania dotyczące biosyntezy diwercyny są jednocześnie pierwszymi tak kompleksowymi badaniami nad bakteriocynami przeprowadzonymi w naszym kraju. O ich zakresie świadczą m.in. opublikowane przez nas prace naukowe (zał.6: 1.A.9, 1.A.12, 1.A.13, 1.A.15-1.A.17, 5.B.6, 6.B.13, 6.B.14, 6.B.53). Kolejnym ważnym krokiem do poprawienia efektywności produkcji diwercyny było otrzymanie rekombinowanych genetycznie szczepów zdolnych do jej syntezy (zał.6: 5.B.10, 6.B.15, 6.B.60). Aktualnie uczestniczę w badaniu ich stabilności genetycznej oraz ocenie przydatności technologicznej.

Doświadczenie zdobyte w trakcie prac nad biosyntezą diwercyny oraz biomasy bakterii *C. divergens* pozwoliło mi na aktywne włączenie się w realizację kolejnych projektów badawczych, w których jestem odpowiedzialna za badanie wpływu bakteriocyn *Oenococcus oeni* na stabilność mikrobiologiczną i jakość win wytwarzanych w chłodnych rejonach winiarskich oraz za opracowanie metody hodowli i separacji drobnoustrojów probiotycznych aktywnych w stosunku do *Clostridium perfringens* (zał.4: pkt. 6A i B).

Badania nad biosyntezą diwercyny były też punktem wyjścia do rozpoczęcia prac nad jej praktycznym wykorzystaniem. Początkowo całą swoją uwagę skoncentrowałam na badaniu możliwości zastosowania diwercyny w bioutrwalaniu żywności. Badania te wykonywałam w ramach dwóch projektów badawczych, których byłam kierownikiem (zał.4: pkt. 6A). W ich rezultacie ustaliłam, że diwercyna może być wykorzystywana do zabezpieczania niskotłuszczowych produktów mlecznych, mięsa oraz wędlin, a także plastrów łososi wędzonych na zimno i surówek warzywnych przed rozwojem chorobotwórczych *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *Cl. tyrobutyricum*. Wykazałam też, że stosowanie tej bakteriocyyny pozwala na obniżenie ilości chemicznych konserwantów dodawanych do żywności i w konsekwencji tego poprawia jej bezpieczeństwo zdrowotne. Ponadto określiłam czynniki warunkujące skuteczność jej przeciwdrobnoustrojowego działania w żywności (zał.6: 1.A.8, 1.A.10, 1.A.11, 6.A.6, 6.B.6-6.B.9, 6.B.41, 6.B.47, 6.B.49-6.B.52, 6.B.54, 6.B.56, 6.B.57, 6.B.59). Dodatkowo w celu poprawienia jej stabilności oraz ułatwienia aplikacji do żywności wprowadziłam ją do materiałów opakowaniowych. Oprócz wskazanych powyżej prac oryginalnych i doniesień konferencyjnych, efektem mojego zainteresowania zagadnieniami związanymi z wykorzystaniem bakteriocyn LAB jako dodatków do żywności oraz składników opakowań aktywnych było przygotowanie pięciu prac przeglądowych (zał.6: 2.A.3, 2.A.5, 2.A.9, 2.B.1, 2.B.3), opracowanie dwóch rozdziałów monografii dotyczącej bakterii fermentacji mlekowej (zał.6: 3.B.2, 3.B.3) oraz wygłoszenie czterech referatów na konferencjach naukowych (zał.6: 5.B.5-5.B.8). Moje zainteresowanie opakowaniami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym zaowocowało ponadto rozpoczęciem współpracy z Centralnym Ośrodkiem Badawczo-Rozwojowym Opakowań w Warszawie. Wyniki naszych badań nad opakowaniami z dodatkiem bakteriocyn zostały opublikowane (zał.6: 1.A.20, 1.A.24), a opracowane w ich rezultacie folie są przedmiotem patentu, którego jestem współautorem (zał.6: 4.A.1). Ponadto w tym okresie przygotowałam trzy artykuły przeglądowe, w których przedstawiłam aktualny stan wiedzy na temat opakowań o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (zał.6: 2.A.6, 2.A.8, 2.A.12).

Równocześnie szukałam innych możliwości wykorzystania potencjału diwercyny. Ponieważ bakteriocyyna ta wykazuje aktywność w stosunku do drobnoustrojów pojawiających się w żywności w najczęściej efekcie wtórnych zanieczyszczeń, oceniłam jej przydatność do celów dezynfekcyjnych. Na podstawie wyników wieloletnich testów prowadzonych w zakładach przemysłu spożywczego stwierdziłam, że roztwory diwercyny o aktywności co najmniej 200 AU/cm³ niszczą nawet grube biofilmy *Listeria* spp., nie wywierając przy tym negatywnego wpływu na środowisko naturalne oraz nie inicjując powstawania opornych na jej działanie form bakterii. Zbadałam też interakcje zachodzące pomiędzy diwercyną, a innymi dezynfektantami (zał.6: 5.B.9). Wyniki te wykorzystałam do opracowania nowych środków dezynfekcyjnych o podwyższonej aktywności w stosunku do *Listeria* spp. Ustaliłam, że mogą być one bezpiecznie stosowane we wszystkich branżach przemysłu spożywczego do dezynfekcji zarówno pomieszczeń produkcyjnych, magazynowych jak i urządzeń technologicznych. Środki dezynfekcyjne opracowane z wykorzystaniem diwercyny są przedmiotem zgłoszenia patentowego (zał.6: 4.B.3). Obecnie przygotowujemy dokumentację niezbędną do ich zarejestrowania.

Nawiązanie współpracy z Katedrą Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu i uzyskanie finansowania na realizację projektu pt.

„Bakteriocyny – innowacyjne suplementy diet dla drobiu” (zał.4: pkt. 6A) umożliwiło rozpoczęcie badań nad wykorzystaniem diwercyny w żywieniu drobiu. Z uwagi na konieczność znalezienia dodatków paszowych alternatywnych w stosunku antybiotykowych stymulatorów wzrostu, wycofanych z użycia w krajach UE, ten kierunek badań w chwili obecnej wydaje się szczególnie atrakcyjny (zał.6: 2.B.5, 2.B.6). W ramach przeprowadzonych do tej pory eksperymentów określono wpływ różnych form preparatów diwercyny na aktywność endogennej mikroflory układu pokarmowego kurcząt rzeźnych oraz wyniki ich odchowu. Rezultaty tych badań zostały przedstawione w czterech pracach oryginalnych (zał.6: 1.A.26, 1.A.30, 1.A.31, 1.A.33) oraz dziewięciu komunikatach naukowych (zał.6: 6.B.16, 6.B.17, 6.B.19-6.B.22, 6.B.26, 6.B.27, 6.B.65). Ich owocem są też zgłoszenia patentowe (zał.6: 4.B.4, 4.C.1). Ponieważ wyniki dotychczasowych badań nad wykorzystaniem diwercyny jako dodatku paszowego o działaniu przeciwdrobnoustrojowym są obiecujące, zwłaszcza w odniesieniu do kurcząt zainfekowanych *Clostridium perfringens*, planujemy ich rozszerzenie także o inne scharakteryzowane przeze mnie bakteriocyny.

Równoległe prowadziłam badania nad aktywnością bakterii *C. divergens* w żywności oraz w przewodzie pokarmowym ryb słodkowodnych. Ustaliłam, że bakterie te mogą być stosowane jako samodzielne kultury ochronne do zabezpieczania sałatek warzywnych i surowego mięsa. Udokumentowałam, że w produktach tych wyraźnie ograniczają wzrost *Listeria* spp., nie zmieniając przy tym ich właściwości organoleptycznych. Ponieważ *C. divergens* nie działają antagonistycznie na LAB z rodzajów *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus* oraz rozwijają się w ich obecności, wykazałam, że można je stosować także jako dodatek do wielu komercyjnych kultur starterowych. Dowiodłam, że kultury o składzie uzupełnionym odpowiednim dodatkiem bakteriocynogennych szczepów *C. divergens* gwarantują otrzymywanie produktów fermentowanych o takich samych właściwościach organoleptycznych, jak w przypadku stosowania tradycyjnych starterów. Dzięki aktywności *C. divergens* produkty te są jednak znacznie lepiej chronione przed bakteriami chorobotwórczymi, zwłaszcza z rodzaju *Listeria* (zał.6: 1.A.11, 6.A.6, 6.B.11, 6.B.50, 6.B.56, 6.B.59). Skład i sposób produkcji kultur starterowych i ochronnych o takim działaniu jest przedmiotem zgłoszeń patentowych (zał.6: 4.B.1, 4.B.3). W kolejnych badaniach prowadzonych we współpracy z Katedrą Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, w ramach dwóch projektów badawczych, których byłam pomysłodawcą (zał.4: pkt. 6B) ustaliłam, że bakteriocynogenne szczepy bakterii z rodzaju *Carnobacterium* są także atrakcyjnymi probiotykami dla ryb słodkowodnych, zwłaszcza karpia. Odkryłam, że działają one antagonistycznie na chorobotwórcze dla ryb bakterie *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* i *Edwardsiella tarda*. Testy wzrostowe z udziałem narybku karpia przeprowadzone w warunkach pełnej kontroli parametrów fizykochemicznych wody wykazały ponadto, że stosowanie wyselekcjonowanych szczepów bakterii *Carnobacterium*, jako dodatków paszowych, zwiększa przeżywalność narybku oraz wpływa pozytywnie na końcowe rezultaty jego podchowu, tj. między innymi zwiększa dzienne przyrosty masy ciała o prawie 20%, poprawia współczynnik wydajności wzrostowej białka paszowego oraz obniża współczynnik pokarmowy paszy. Ustaliłam, że odnotowane korzyści są skutkiem kolonizacji jelit przez bakterie z rodzaju *Carnobacterium* oraz działania ich przeciwdrobnoustrojowych metabolitów, w tym bakteriocyn. Efektem omówionych badań są trzy publikacje (zał.6:

1.A.14, 6.A.7, 6.A.8), dwa komunikaty na konferencjach międzynarodowych (zał.6: 6.B.10, 6.B.12), zgłoszenie patentowe (zał.6: 4.B.5) oraz sprzedaż licencji na produkcję i wykorzystanie w skali międzynarodowej preparatów probiotycznych według tego zgłoszenia. Aktualnie trwa też uruchamianie linii do produkcji powyższych preparatów (zał.6: 4.D.1).

Współpraca z Katedrą Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury umożliwiła mi ponadto rozpoczęcie skringingu LAB wchodzących w skład ekosystemu jelitowego różnych gatunków ryb słodkowodnych w kierunku wykrycia szczepów działających antagonistycznie na patogenne dla ryb bakterie z rodzaju *Aeromonas*, *Edwardisiella*, *Pseudomonas* i *Vibrio* (zał.6: 6.B.58). Szczepy LAB o silnej aktywności w stosunku *A. hydrophila*, *A. salmonicida* i *V. anguillarum* wykorzystywałam do skomponowania nowych preparatów probiotycznych. Aktualnie badamy ich wpływ na odporność na infekcje bakteryjne troci wędrowniej i jesiotra.

Moje zainteresowania badawcze dotyczą również probiotyków dla ludzi. W ramach tej tematyki oceniałam właściwości probiotyczne różnych szczepów LAB (dane niepublikowane). Oceny tej dokonywałam w warunkach *in-vitro* w oparciu o wyniki oznaczeń ich aktywności w stosunku do patogenów jelitowych, tj. *Listeria* i *Salmonella*, odporności na niskie pH i sole żółciowe oraz adhezji do komórek ludzkich enterocytów (lub nabłonka jelitowego). Uczestniczyłam też w badaniach dotyczących prebiotyków (zał. 6: 1.A.19, 5.B.11, 6.B.62, 6.B.64). W związku tymi badaniami przeprowadziłam obszerne studia literaturowe. Zebrane w ich efekcie informacje na temat działania probiotyków i prebiotyków przedstawiłam w pracy przeglądowej (zał.6: 2.A.2) oraz w jednym z rozdziałów książki pt. „Functional food product development” wydanej przez Wiley-Blackwell (zał.6:3.A.3). Moje zainteresowanie właściwościami prozdrowotnymi drobnoustrojów pozwoliło mi też na włączenie się w realizację projektu dotyczącego żywności bioaktywnej (zał.4: pkt.6B).

Ponadto przez cały okres pracy naukowej badałam aktywność antagonistyczną mikroorganizmów występujących w różnych produktach żywnościowych w stosunku do chorobotwórczych dla człowieka bakterii z rodzajów *Campylobacter*, *Clostridium*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* i *Yersinia*. Z uwagi na prowadzone równoległe badania nad diwerzyną, w sposób szczególny interesowałam się aktywnością LAB wobec *Listeria* spp., a zwłaszcza ich zdolnością do syntezy bakteriocyn klasy IIa (zał.6: 6.B.61). Dlatego też uporządkowałam wiedzę na temat tych związków (zał.6: 2.A.10, 2.A.11), a następnie zaczęłam poszukiwać nowych ich producentów. Wyniki przeprowadzonych przez mnie prac skringingowych sugerowały, że ich źródłem mogą sery regionalne wytwarzane na terenie Karpat (zał.6: 1.A.22, 1.A.23). Postanowiłam więc dokładnie przebadać je w tym kierunku.

W trakcie wykonywania badań związanych z pracą habilitacyjną, dostrzegłam potrzebę opracowania nowych narzędzi do skringingu bakteriocynogennych LAB (zał.6: 2.A.7). W ramach projektu pt. „Metagenomowa analiza mikroflory fermentowanych produktów regionalnych pod kątem obecności i ekspresji genów bakteriocyn listeriobójczych” uczestniczyłam w opracowywaniu oligonukleotydowych sond molekularnych oraz starterów do detekcji genów kodujących listeriobójcze bakteriocyny klasy IIa, a następnie w pracach weryfikujących ich przydatność (zał.6: 1.A.29). Wyniki pierwszych badań przeprowadzonych z użyciem zaprojektowanych przez nas starterów zostały opisane w 3 pracach oryginalnych (zał.6: 1.A.21, 1.A.28, 1.A.32). Zdobytą w ich konsekwencji wiedzę wykorzystywałam ponadto do zaplanowania kolejnych badań, które szczegółowo omówiłam w rozprawie naukowej zgłoszonej jako przedmiot postępowania habilitacyjnego.

Od początku pracy naukowo-badawczej ważnym obiektem mojego zainteresowania są także bakterie *Listeria* spp. Świadczą o tym zarówno dane przedstawione w rozprawie naukowej wskazanej przeze mnie za najważniejsze osiągnięcie, ale także w innych pracach (zał.6: 2.A.4, 2.A.13-2.A.16, 2.B.2, 2.B.4). We wszystkich z nich silnie podkreślałam ekspansywność tych bakterii oraz zwracałam uwagę na konieczność opracowania skutecznych metod usuwania ich z żywności. Z tą myślą podejmowałam też badania nad przeciwlisteryjnymi bakteriocynami LAB. Dzięki w ten sposób ukierunkowanym pracom badawczym zdobyłam duże doświadczenie w zakresie fizjologii i biotechnologicznego wykorzystania bakterii fermentacji mlekowej, a szczególnie wytwarzanych przez nie bakteriocyn. Z uwagi na nadal jeszcze nie wyeksploatowany potencjał bakteriocyn, planuję kontynuowanie badań nad wykorzystaniem tych związków. Ponadto zamierzam dokładnie zidentyfikować pozostałe bakteriocyny przeciwlisteryjne wykryte w ramach dotychczasowej pracy, a następnie zoptymalizować warunki ich syntezy.

Moje zainteresowania badawcze nie ograniczają się jednak tylko do zagadnień związanych z biosyntezą i wykorzystaniem bakteriocyn. Dotyczą one też innych aspektów mikrobiologii przemysłowej, a w szczególności produkcji bioetanolu oraz alkoholi polihydroksylowanych (tzw. zielonych chemikaliów). W ramach tej tematyki uczestniczyłam w badaniach, których celem było opracowanie technologii przerobu wycierki ziemniaczanej na bioetanol (zał.6: 1.A.25, 6.B.69). Aktualnie jestem natomiast członkiem dwóch zespołów badawczych zajmujących się odpowiednio, mikrobiologiczną konwersją materiałów odpadowych bogatych w skrobię i celulozę do 2,3-butanodiolu oraz produkcją 1,3-propanodiolu z glicerolu, powstającego przy produkcji estrów etylowanych (zał. 4: pkt. 6B, zał. 6: 6.B.66).

Anna Sip