

Autoreferat

w języku polskim

dotyczący działalności naukowo-badawczej

dr Izabela Krzemińska

*Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego
Polska Akademia Nauk*

Lublin, 2019

1. Imię i nazwisko

Izabela Krzemińska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne

- **magister biologii, specjalizacja mikrobiologia:** czerwiec 2000 r. Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Tytuł pracy magisterskiej: „Analiza pozycji taksonomicznej mikrosymbiontów *Ulex europeus* (kolcolist zachodni)”

pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Małek

- **doktor nauk rolniczych w zakresie agronomii i agrofizyki:** kwiecień 2011 r., Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, studia doktoranckie

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wybrane właściwości gleb wytworzonych z piasków i ich przestrzenna zmienność w skali pola”

Promotor: prof. dr hab. Zofia Sokołowska

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

2001-2010	Gimnazjum nr 7 w Lublinie, nauczyciel
2004-2009	Studia doktoranckie, Instytut Agrofizyki, Polskiej Akademii Nauk w Lublinie
2009-2010	Wykonawca w projekcie promotorskim, Instytut Agrofizyki, Polskiej Akademii Nauk w Lublinie
Luty 2011 – obecnie	Instytut Agrofizyki, Polskiej Akademii Nauk w Lublinie
• 2011 -2012	Pracownik inżynieryjno-techniczny
• maj 2013- obecnie	Adiunkt

- styczeń 2019 – obecnie Opiekun Laboratorium Nowych Technologii Pozyskiwania Energii Odnawialnej oraz Biomasy
- styczeń 2019 – obecnie Kierownik zadania badawczego nr 7 w ramach działalności statutowej „Badanie metabolitów mikroglonów i procesu fermentacji metanowej”

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/artystycznego

Moim osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl pięciu oryginalnych publikacji naukowych powiązanych tematycznie oraz ujętych pod wspólnym tytułem:

„Określenie warunków produkcji i właściwości biomasy zielenic (Chlorophyta) w kontekście jej wykorzystania do celów energetycznych”.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

H1. Krzemińska I., Pawlik-Skowrońska B., Trzcinska M., Tys J. 2014. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2014, 37, 4 , 735-741.

IF₂₀₁₄ =1,997 IF_{5 letni} =2,028 25 pkt MNiSW

H2. Piasecka A., Krzemińska I., Tys J. Physical methods of microalgal biomass pretreatment. International Agrophysics. 2014, 28, 341-348.

IF₂₀₁₄ =1,117 IF_{5 letni} =1,034 25 pkt MNiSW

H3. Krzemińska I., Piasecka A., Nosalewicz A., Simionato D., Wawrzykowski J. 2015. Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities. *Bioresource Technology* 196, 72-77.

IF₂₀₁₅= 4,917 IF_{5 letni}= 5,744 45 pkt MNiSW

H4. Krzemińska I., Oleszek M. 2016. Glucose supplementation-induced changes in the *Auxenochlorella protothecoides* fatty acid composition suitable for biodiesel production. *Bioresource Technology* 218, 1294–1297.

IF₂₀₁₆= 5,651 IF_{5 letni}= 6,102 45 pkt MNiSW

H5. Magierek E., Krzemińska I., Tys J. 2017. Stimulatory effect of indole-3-acetic acid and continuous illumination on the growth of *Parachlorella kessleri*. *International Agrophysics* 31, 4, 483-489.

IF₂₀₁₇=1,242 IF_{5 letni}= 1,267 25 pkt MNiSW

Wkład wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w Załączniku 4, natomiast oświadczenia współautorów w Załączniku 7.

Sumaryczny *impact factor* prac stanowiących najważniejsze osiągnięcie w dorobku naukowym według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: **14,924 punkty MNiSW =165**

C) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

W latach 2013 – 2019 realizowałam prace badawcze i wnikliwe studia literaturowe dotyczące warunków produkcji biomasy zielenic i właściwości biomasy w kontekście wykorzystania jej do celów energetycznych. Uzyskane rezultaty opublikowałam w postaci cyklu prac powiązanych tematycznie (H1-H5), które uważam za swoje największe osiągnięcie

w dotychczasowej działalności naukowej i przedkładam jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Wprowadzenie

Wzrastające zapotrzebowanie na energię i wynikające z tego podstawowe problemy światowe takie jak kryzys środowiskowy i energetyczny powodują zwiększone zainteresowanie odnawialnymi źródłami energii. Szerokie zainteresowanie budzi pozyskiwanie energii na drodze przetwarzania biomasy. W ostatnich latach dynamicznie rozwijają się badania dotyczące wykorzystywania alternatywnych źródeł energii jakim może być biomasa jednokomórkowych glonów (mikroglonów). Zainteresowanie tematyką wykorzystywania biomasy glonów pod kątem energetycznym stale wzrasta o czym świadczy coraz większa liczba publikacji w bazie Web of Science. Jednokomórkowe, fotosyntetyzujące glony ze względu na zdolność do szybkiej proliferacji oraz produkcji cennych wewnątrzkomórkowych metabolitów m.in. lipidów, kwasów tłuszczowych, białek i węglowodanów postrzegane są jako organizmy o dużym potencjale biotechnologicznym i energetycznym. Biomasa komórkowa glonów budzi zainteresowanie ze względu na możliwość jej zastosowania w przemyśle chemicznym, kosmetycznym, medycynie, rolnictwie jak również w energetycznym: przemyśle paliwowym (Singh i Gu 2010). Wykorzystanie biomasy komórkowej glonów do celów energetycznych niesie za sobą wiele korzyści wynikających między innymi: z obniżenia stężenia ditlenku węgla wykorzystywanego przez te mikroorganizmy oraz eliminacji problemu konkurencyjności roślin uprawianych na cele konsumpcyjne i energetyczne (Mata i in 2010). Ze względu na zdolność do syntezy znacznych ilości triacylogliceroli biomasa jednokomórkowych glonów jest jednym z najbardziej obiecujących substratów do procesów produkcji biodiesla. Ze względu na zdolność do gromadzenia w swoich komórkach znacznych ilości lipidów i szybkie tempo wzrostu w porównaniu z innymi grupami taksonomicznymi, największy potencjał do produkcji biodiesla wśród glonów wykazują zielenice (Hu et al. 2008).

Tłuszcze (lipidy) stanowią istotny materiał zapasowy glonów. W zależności od gatunku lub szczepu zielenice charakteryzują się zróżnicowaną zawartością lipidów. Średnia zawartość lipidów w komórce w optymalnych warunkach wzrostu wynosi 25.5 % suchej masy (Hu et al. 2008). Ze względu na różne funkcje fizjologiczne lipidów ich skład i zawartość w komórkach glonów zmienia się w zależności od warunków środowiskowych. W niekorzystnych warunkach środowiskowych metabolizm kwasów tłuszczowych zielenic ulega zmianie w kierunku biosyntezy i gromadzenia lipidów głównie w postaci triacylogliceroli. W warunkach tych

następuje znaczne zwiększenie zawartości lipidów w komórkach kosztem spowolnienia podziałów komórkowych (Řezanka i in. 2010). Optymalne warunki do rozmnażania i rozwoju komórek mikroglonów nie sprzyjają jednak akumulacji lipidów (Hu i in. 2008). W celach aplikacyjnych pożądane jest uzyskanie stanu równowagi pomiędzy szybkim tempem wzrostu a uzyskaniem wysokiej zawartości cennych metabolitów komórkowych. Ze względu na duży potencjał energetyczny i biotechnologiczny zielenic poszukiwane są sposoby zwiększające produktywność ich biomasy.

Na produktywność biomasy zielenic i na jej skład biochemiczny wpływ ma wiele czynników fizycznych i chemicznych m.in. natężenie światła, fotoperiod, dostępność ditlenku węgla oraz związków odżywczych w tym związków organicznych, a także substancji stymulujących wzrost komórek. Czynniki te decydują o tempie i przebiegu procesów metabolicznych i reprodukcyjnych. Określenie warunków, które umożliwiają pozyskiwanie biomasy o pożądanym składzie biochemicznym ze względu na zróżnicowanie zielenic w odniesieniu do ich wymagań pokarmowych, świetlnych i warunków wzrostu jest ważnym zagadnieniem. W celu wykorzystania tych organizmów do produkcji biopaliw konieczne jest więc szczegółowe rozpoznanie w jaki sposób różne czynniki wpływają na produktywność biomasy (Sforza i in., 2012).

Wspólnym celem naukowym badań stanowiących moje osiągnięcie naukowe było scharakteryzowanie wpływu wybranych czynników fizycznych i chemicznych na produktywność i właściwości biomasy zielenic pod kątem jej energetycznego zastosowania. Analizowano wpływ następujących czynników:

- oświetlenia ciągłego i fotoperiodu (praca H1)
 - metody ekstrakcji na odzysk lipidów z biomasy (H2)
 - światła o różnym natężeniu: 35, 130 i 420 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (praca H3)
 - wpływu suplementacji podłoża hodowlanego egzogennym źródłem węgla –glukozą (H4)
 - wpływu suplementacji podłoża hodowlanego egzogennym kwasem indolilo-3-octowego (IAA) w warunkach zastosowania fotoperiodu i oświetlenia ciągłego (H5)
- Oddziaływanie wyżej wymienionych czynników określano w odniesieniu do:
- zmian w kinetyce wzrostu: analiza krzywych wzrostu hodowli stacjonarnych, określenie specyficznego tempa wzrostu, czasu podwojenia i produktywności biomasy zielenic (prace H1-H5)
 - określenie wpływu na aktywność fotosyntetyczną (praca H3)
 - zmian w zawartości lipidów w biomacie (praca H2, H3, H4)
 - zmian w profilu kwasów tłuszczowych (praca H2, H3, H4)

Do badań wybrano kilka gatunków glonów z gromady zielenic: *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus obliquus*, *Neochloris conjuncta*, *Neochloris terrestris*, *Neochloris texensis* (praca H1), *Chlorella protothecoides* (syn. *Auxenochlorella protothecoides*) (praca H2, H3, H4), *Parachlorella kessleri* (praca H5), których cechy fizjologiczne takie jak: tempo wzrostu czy zawartość metabolitów wskazują, że mogą charakteryzować się wysokim potencjałem produkcyjnym i znaleźć zastosowanie aplikacyjne (Fernandes i in., 2013; Mata i in., 2010).

Omówienie wyników badań

Ocena wpływu fotoperiodu i oświetlenia ciągłego na tempo wzrostu i produktywność biomasy wybranych gatunków zielenic.

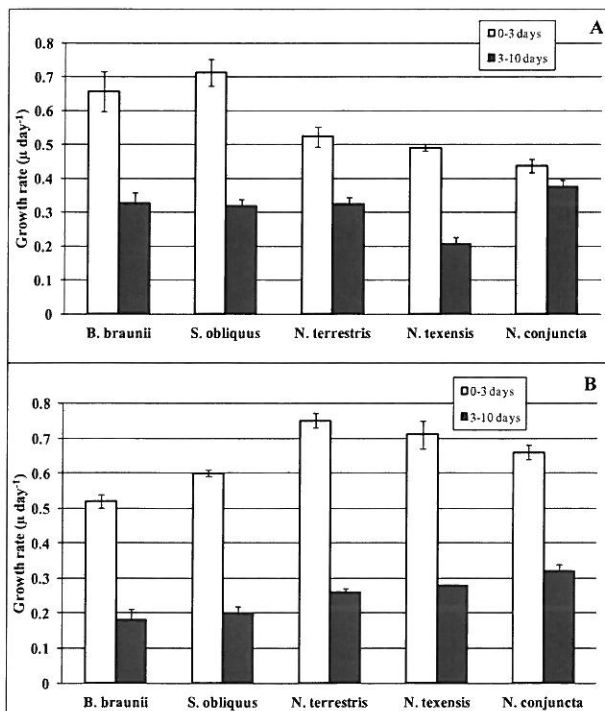
Jednym z głównych czynników mający wpływ na przebieg procesów fizjologicznych i biochemicznych mikroglonów jest energia świetlna. Ilość światła i jego jakość warunkuje ilość dostępnej energii niezbędnej do procesu fotosyntezy. Istotny jest również stosunek czasu dostępności światła fotosyntetycznie czynnego / do ciemności, który wpływa na wzrost glonów i produkcję biomasy. W naturalnym środowisku intensywność światła podlega ciągłym zmianom a reżim świetlny nie jest ciągły. Zastosowanie fotoperiodu jest istotne również z punktu widzenia ekonomicznego, zwłaszcza gdy wzrost glonów odbywa się z wykorzystaniem sztucznych źródeł światła. Poszczególne gatunki zielenic różnią się zarówno wymaganiami świetlnymi, cyklami życiowymi oraz sposobami rozmnażania. Stąd celem badań przedstawionych w publikacji **H1** była ocena wpływu zastosowania oświetlenia ciągłego i fotoperiodu (12 godzin światła:12 godzin ciemności; 12h L:12h D) na tempo wzrostu i przyrost biomasy 5 gatunków jednokomórkowych zielenic: *Botryococcus braunii* (SAG), *Scenedesmus obliquus* (SAG), *Neochloris conjuncta* (SAG), *Neochloris terrestris* (UTEX), *Neochloris texensis* (SAG) przy stałym natężeniu światła. Wyniki badań zaprezentowane w publikacji **H1** po raz pierwszy przedstawiają wpływ wyżej wymienionych czynników na tempo wzrostu i produktywność biomasy 3 gatunków jednokomórkowymi zielenic z rodzaju *Neochloris*. Jak dotąd obiektem badań był jeden gatunek *N. oleoabundans* (Murry i in., 2011).

Analizowane kultury glonów, hodowane w tych samych warunkach różniły się przebiegiem procesu wzrostu co przejawiało się w różnicach w produktywności biomasy i zmianach tempa wzrostu. W pracy **H1** wykazano że w warunkach ciągłego oświetlenia specyficzne tempo wzrostu *B. braunii* i *S. obliquus* w pierwszej fazie (0-3 dzień) było wyższe niż badanych szczepów *Neochloris* spp. (Rys 1 A). Porównanie wzrostu mikroglonów z gatunku *Neochloris* w drugiej fazie wzrostu (3-10) wskazuje, że zastosowanie oświetlenia

ciągłego zwiększyło tempo wzrostu *Neochloris terrestris* i *Neochloris conjuncta* a zmniejszyło *Neochloris texensis*. Zastosowanie krótszego okresu oświetlenia (12h L: 12h D) prowadziło do zwiększenia tempa wzrostu badanych gatunków *Neochloris* (Rys 1B). W pierwszej fazie (0-3 dzień) tempo wzrostu wszystkich badanych gatunków *Neochloris* było wyższe niż tempo wzrostu *B. braunii* i *S. obliquus*. W drugiej fazie (3-10 dzień) zastosowany fotoperiod 12h L:12h D również zwiększał tempo wzrostu *Neochloris* w porównaniu z tempem wzrostu pozostałych dwóch badanych gatunków glonów. Zastosowanie bardziej energooszczędnego (pod względem ekonomicznym) cyklu światła 12h L:12h D spowodowało, że przeciętne tempo wzrostu *B. braunii* i *S. obliquus* było niższe niż tempo wzrostu 3 badanych gatunków *Neochloris*.

Porównując wszystkie badane gatunki, pod kątem czasu podwojenia biomasy w warunkach oświetlenia ciągłego stwierdzono najkrótszy czas podwojenia biomasy dla *B. braunii* (18.7 h) a w cyklu świetlnym 12h L:12h D dla *N. conjuncta* (17.6 h). Dla gatunków: *B. braunii*, *S. obliquus* oraz *N. texensis* krótszy czas podwojenia biomasy stwierdzono w warunkach hodowli w warunkach oświetlenia ciągłego. Natomiast dla *N. conjuncta* i *N. terrestris* krótszy czas podwojenia biomasy stwierdzono w warunkach zastosowania fotoperiodu 12 h L :12 h D.

Rys 1. Specyficzne tempo wzrostu zielenic w dwóch fazach (0-3dzień i 3-10 dzień) w warunkach A) oświetlenia ciągłego B) fotoperiodu: (12 h L:12 h D)



Wyniki przedstawione w pracy **H1** wskazują, że zastosowany reżim świetlny miał znaczny wpływ także na produktywność biomasy analizowanych mikroglonów (Tab 1). W warunkach ciągłego oświetlenia największą produktywność biomasy stwierdzono dla *B. braunii* ($0.155 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) i *S. obliquus* ($0.150 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$). W warunkach 12h L:12h D produktywność biomasy trzech gatunków *Neochloris* była nawet 2-3-krotnie większa ($0.114 - 0.125 \text{ g L}^{-1} \text{ dzień}^{-1}$) niż *B. braunii* i *S. obliquus* ($0.034 \text{ g L}^{-1} \text{ dzień}^{-1}$ i $0.050 \text{ g L}^{-1} \text{ dzień}^{-1}$, odpowiednio).

Tabela 1. Produktywność biomasy ($\text{g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) dla gatunków rosnących w różnych warunkach oświetlenia: 24 godziny światła (24h) oraz 12 godzin światła:12 godzin ciemności (12 h L: 12h D).

Nazwa gatunku	Warunki świetlne	
	24h	12h L:12h D
<i>B. braunii</i>	0.155 (± 0.014)	0.034 (± 0.011)
<i>S. obliquus</i>	0.150 (± 0.006)	0.050 (± 0.006)
<i>N. conjuncta</i>	0.098 (± 0.011)	0.125 (± 0.023)
<i>N. terrestris</i>	0.089 (± 0.008)	0.117 (± 0.012)
<i>N. texensis</i>	0.037 (± 0.004)	0.114 (± 0.017)

Badania przedstawione w pracy **H1** wykazały, że na produktywność biomasy i tempo wzrostu badanych gatunków zielenic wpływ miał zastosowany reżim świetlny a także indywidualne cechy gatunkowe. Na podstawie uzyskanych wyników badane gatunki można sklasyfikować na dwie grupy: rosnące efektywniej w warunkach oświetlenia ciągłego (*B. braunii* i *S. obliquus*) oraz rosnące efektywniej w warunkach fotoperiodu 12h L:12h D (3 gatunki *Neochloris*). Analizowane gatunki różnią się sposobem rozmnażania: *B. braunii* i *S. obliquus* rozmnażają się przez autospory, podczas gdy gatunki z *Neochloris* rozmnażają się przez aplanospory lub ruchliwe zoospory uwalniane z komórek w ciemności. Osiągnięciem publikacji **H1** było, także wykazanie, że zielenice z rodzaju *Neochloris*, zbadane po raz pierwszy w publikacji **H1**, ze względu na wysoką produktywność biomasy w warunkach fotoperiodu (bardziej energooszczędnych warunków pod względem ekonomicznym), stanowią obiecujące obiekty badań biotechnologicznych.

Ocena wpływu metody ekstrakcji lipidów na odzysk lipidów z biomasy i profil kwasów tłuszczowych *Chlorella protothecoides*.

Możliwość i warunki uzyskania lipidów z biomasy glonów są jednym z istotnych problemów związanych z jej wykorzystaniem do celów aplikacyjnych. Dlatego celem prowadzonych badań w pracy **H2** była ocena wpływu metody ekstrakcji, wstępnego przygotowania biomasy oraz metod dezintegracji na wydajność ekstrakcji lipidów z biomasy komórkowej *Chlorella protothecoides*.

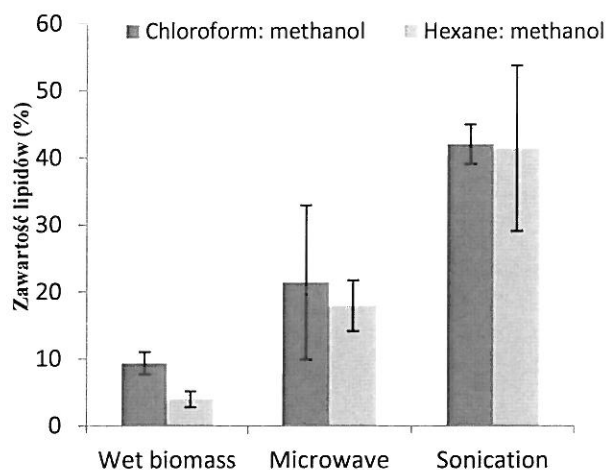
W celu określenia wpływu wstępnego przygotowania biomasy na proces ekstrakcji lipidów i profil kwasów tłuszczowych, ekstrakcję przeprowadzono na biomacie: poddanej procesowi suszenia w trzech temperaturach (40°, 60°, 90°C); procesowi liofilizacji oraz na biomacie nie poddanej procesom wstępnego przygotowania tj. na biomacie mokrej.

W celu oceny wpływu zastosowanej metody ekstrakcji na wydajność odzysku lipidów analizowano wpływ dwóch rozpuszczalników organicznych. Proces ekstrakcji przeprowadzono metodą ekstrakcyjno- wagową z zastosowaniem: chloroformu w mieszaninie z metanolem – zmodyfikowana metoda Bligh and Dyer (1959) oraz z wykorzystaniem n-heksanu w mieszaninie z metanolem. Porównano także wpływ dwóch metody dezintegracji komórkowej: mikrofalowej i fal ultradźwiękowych na wydajność procesu ekstrakcji lipidów.

Po procesie ekstrakcji lipidów, przeprowadzono proces estryfikacji i dokonano rozdziału estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS).

Stwierdzono, że ekstrakcja lipidów z zastosowaniem mieszaniny chloroform-metanol zwiększała wydajność ekstrakcji w porównaniu do ekstrakcji z zastosowaniem niepolarnego heksanu. Wyniki wykazały największy odzysk lipidów z biomasy nie poddanej procesowi wstępnego przygotowania: z biomasy mokrej. Z tego względu, w dalszym etapie badań, wpływ procesów dezintegracji na efektywność procesu ekstrakcji lipidów analizowano na biomacie mokrej. Stwierdzono istotny wpływ zastosowanych metod dezintegracji na odzysk lipidów z biomasy. Największą efektywność ekstrakcji 42% stwierdzono dla biomasy po dezintegracji ultradźwiękami w ekstrakcji z użyciem chloroformu- metanolu. Wyniki wykazały wzrost odzysku lipidów o 32.67% dla biomasy poddanej działaniu ultradźwięków i o 12.05% dla biomasy poddanej działaniu mikrofal w ekstrakcji z chloroformem- metanolem w stosunku do kontroli. W metodzie ekstrakcji z heksanem–metanolem stwierdzono wzrost o 37.48% (ultradźwięki) i 13.97% (mikrofale) (Rys 2). Wyniki wykazały, że w przypadku zastosowania procesu dezintegracji rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika nie był istotny.

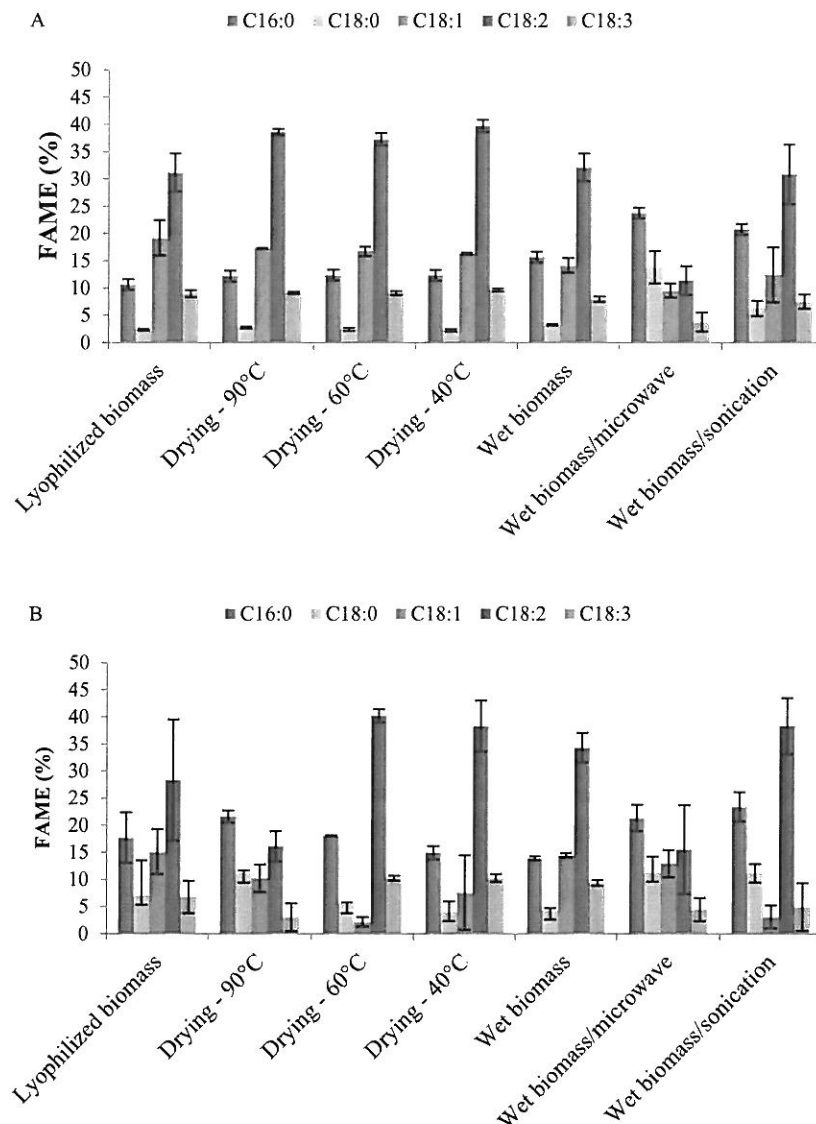
Rys 2. Zawartość lipidów w mokrej biomase *C. protothecoides* i po zastosowaniu dezintegracji mikrofalowej i ultradźwiękami.



Analiza profilu kwasów tłuszczowych wykazała, że typ zastosowanej metody ekstrakcji (rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika) miał istotny wpływ na zawartość kwasu palmitynowego, stearynowego i oleinowego. Natomiast wstępne przygotowanie próbki (suszenie, liofilizacja i mokra biomasa) miało istotny wpływ na zawartość wszystkich analizowanych kwasów tłuszczowych. Stwierdzono, że po ekstrakcji z wykorzystaniem chloroformu z metanolem biomasa *C. protothecoides* charakteryzowała się wysoką zawartością kwasu oleinowego i niską zawartością palmitynowego. Natomiast po ekstrakcji z wykorzystaniem heksanu z metanolem zawartość kwasu palmitynowego w biomase była wyższa w stosunku do metody z zastosowaniem chloroformu.

Zastosowanie dezintegracji mikrofalowej wpłynęło na zwiększenie zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych: C16:0 i C18:0 i spadek zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych C18:1, C18:2, C18:3 w metodzie ekstrakcji chloroform-metanol (Rys 3). Wyniki wykazały, także że zastosowanie dezintegracji ultradźwiękowej powoduje wzrost nasyconych kwasów tłuszczowych C16:0 i C18:0 oraz spadek zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych C18:1 i C18:3. W profilu kwasów tłuszczowych *C. protothecoides* stwierdzono także, niezależnie od zastosowanych metod ekstrakcji, dominujący udział kwasu C18:2, którego obecność jest charakterystyczna dla komórek wzrastających w optymalnych warunkach środowiska (Yeh i Chang 2012).

Rys 3. Zmiany w zawartości kwasów tłuszczowych w komórkach *C. protothecoides* : A- ekstrakcja chloroform: metanol; B – ekstrakcja heksan : metanol.



Podsumowując, badania przedstawione w pracy **H2** pokazały, że najbardziej odpowiednie rozpuszczalniki do ekstrakcji lipidów z biomasy zielenicy *C. protothecoides* to chloroform w mieszaninie z metanolem w zmodyfikowanej metodzie Bligh and Dyer. Wykazano, że wykorzystanie w ekstrakcji mokrej biomasy *C. protothecoides* umożliwiło największy odzysk lipidów. Dezintegracja komórek z wykorzystaniem mikrofal i fal ultradźwiękowych wpłynęła na zmiany w zawartości nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych. Jako najskuteczniejszą metodę dezintegracji wpływającą na zwiększenie efektywności ekstrakcji lipidów z biomasy *C. protothecoides* wskazano dezintegrację ultradźwiękową.

Ocena wpływu natężenia światła na tempo wzrostu, produktywność biomasy oraz zawartość lipidów i profil kwasów tłuszczowych *Chlorella protothecoides*.

Ze względu na zdolność do akumulacji znacznych ilości lipidów biomasa jednokomórkowych glonów stanowi potencjalny substrat do produkcji biopaliw (Tan i Lin 2011). Lipidy (tłuszcze) dzielą się na tłuszcze właściwe (triacyloglicerole), pełniące funkcję zapasową i ochronną w komórce oraz złożone, które stanowią składnik błon komórkowych. Głównym składnikiem tłuszczów prostych i złożonych stanowią kwasy tłuszczowe (Kączkowski 1992). Glony syntezują kwasy tłuszczowe średniołańcuchowe (C_{10} - C_{14}), o długim łańcuchu (C_{16} - C_{18}) i bardzo długim łańcuchu ($\geq C_{20}$). W naturze proces akumulacji lipidów w komórkach glonów zależy od szeregu czynników środowiskowych. Czynniki chemiczne mające wpływ na zawartość lipidów to dostępność składników odżywczych (głównie źródła węgla i azotu), zasolenie oraz odczyn podłoża. Natomiast kluczowe fizyczne czynniki to natężenie światła i temperatura (Heredia-Arroyo i in., 2010; Hu i in. 2008; Liu i Benning 2013). W optymalnych warunkach wzrostu zielenice syntetyzują głównie kwasy tłuszczowe wchodzące w skład lipidów błonowych natomiast w niekorzystnych warunkach środowiskowych syntetyzowane i akumulowane są lipidy głównie w postaci triacylogliceroli, które wskazywane są jako potencjalny substrat do produkcji biodiesla (Hu i in. 2008; Ren i in. 2016). Skład i struktura kwasów tłuszczowych: długość łańcucha węglowego i stopień nienasycenia kwasów tłuszczowych mają wpływ na właściwości biodiesla (Ren i in. 2016). Poznanie składu kwasów tłuszczowych komórek zielenic jest więc kluczowe w celu określenia przydatności danego szczepu do produkcji biodiesla. Profil kwasów tłuszczowych zielenic stanowią głównie nasycone i jednonienasycone kwasy tłuszczowe o długości 16 - 18 atomów węgla. Zwiększanie natężenia światła ma wpływ na tempo wzrostu komórek glonów, ale powyżej określonych wartości może powodować zahamowanie tempa podziałów komórkowych z powodu fotoinhibicji – uszkodzenia centrum reakcji PS II, spowolnienia transportu elektronów oraz wytwarzania reaktywnych form tlenu. Z tego względu w pracy **H3** określiłam wpływ natężenia światła na produktywność biomasy *C. protothecoides*, aktywność fotosyntetyczną oraz zmiany w zawartości lipidów i profilu kwasów tłuszczowych pod kątem ich wykorzystania do produkcji biodiesla (praca **H3**).

W doświadczeniu zastosowano 3 natężenia światła w warunkach oświetlenia ciągłego: 35 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LL), 130 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (ML), oraz 420 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

(HL) promieniowania fotosyntetycznie czynnego. Zawartość lipidów w biomacie oznaczono zmodyfikowaną metodą Bligha and Dyera. W celu oznaczenia profilu kwasów tłuszczowych przeprowadzono proces estryfikacji. Do oznaczenia kwasów tłuszczowych zastosowano metodę chromatografii gazowej sprzężoną ze spektrometrią mas (GC/MS). Dodatkowo przeprowadzono pomiary aktywności fotosyntetycznej w oparciu o pomiary modulowanej fluorescencji chlorofilu *in vivo* (Dual-PAM -100, Waltz): wyznaczając maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II (F_v/F_m) oraz współczynnik wygaszania fotochemicznego q_P .

W oparciu o uzyskane wyniki badań stwierdzono, że wzrost natężenia światła spowodował zwiększenie tempa wzrostu i skrócenie czasu podwojenia biomasy (Tab. 2). Najwyższe tempo wzrostu oraz najkrótszy czas podwojenia biomasy stwierdzono w warunkach najwyższego natężenia światła.

Stosunek F_v/F_m stosowany jest jako wskaźnik wydajności kwantowej fotosystemu PSII. Średnie wartości F_v/F_m , badane drugiego dnia wzrostu hodowli, były na podobnym poziomie, w zakresie 0.604 do 0.672, dla wszystkich badanych natężeń światła co świadczy, że komórki prawidłowo funkcjonowały we wszystkich analizowanych natężeniach światła. W stacjonarnej fazie wzrostu (5 dzień) zaobserwowano istotny spadek wartości F_v/F_m dla natężenia światła ML i HL w stosunku do LL. Spadek ten jest typowy dla fazy stacjonarnej ze względu na wyczerpywanie składników odżywczych, ograniczenie podziałów komórkowych, a także procesy naprawcze ewentualnie uszkodzonych fotosystemów. Wartości q_P (drugiego dnia wzrostu) były najwyższe dla kultur rosnących w HL, najniższe dla LL. Stwierdzono również, najmniejszy zakres spadku wartości q_P ze wzrostem natężenia światła, dla glonów hodowanych w $420 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Uzyskane wyniki wskazują, że *C. protothecoides* aklimatyzuje się do warunków HL, wykorzystując większą ilość zaabsorbowanej energii świetlnej w procesie fotosyntezy w porównaniu do ML i LL. W pierwszych dniach doświadczenia, wysokie natężenie światła HL wpływało na szybszy proces akumulacji biomasy w porównaniu do ML i LL, ze względu na dużą wydajność wykorzystywania światła w procesach fotochemicznych. **Jednocześnie zaobserwowane wyższe wartości q_P w warunkach ML w porównaniu z LL, potwierdzają proces aklimatyzacji *C. protothecoides*, który umożliwia komórkom zdolność do wzrostu we wszystkich badanych natężeniach światła.**

Stwierdzono, że zawartość i proporcje poszczególnych kwasów tłuszczowych w biomacie *C. protothecoides* zmieniała się w zależności od natężenia światła (H3). Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) wykazała, że główne kwasy tłuszczowe to kwasy posiadające w łańcuchu 16 do 18 atomów węgla: kwas palmitynowy (C16: 0), kwas oleinowy (C18: 1), kwas linolowy (C18: 2) i kwas linolenowy (C18: 3). Warunki niskiego

natężenia światła miały wpływ na zwiększenie akumulacji kwasu linolowego i kwasu linolenowego i zmniejszenie akumulacji kwasu oleinowego i palmitynowego.

Uzyskane wyniki wskazują, że **suma kwasów tłuszczowych C16-C18 wzrosła z 76.97% w niskim natężeniu światła do 90.24% w wysokim natężeniu światła, zaś zawartość kwasu linolenowego zmniejszyła się z 12.34 % w LL do 7.44 % w HL co jest wymagane do spełnienia standardów jakościowych określonych dla biodiesla (EN 14214, 2008). Analiza profilu kwasów tłuszczowych wykazała, także że natężenie światła wpływało na stopień nasycenia kwasów tłuszczowych (Tab. 3).** W pracy H3 po raz pierwszy wykazano korzystne zmiany w zawartości kwasów tłuszczowych, pod kątem produkcji biodiesla, w biomacie *C. protothecoides* w odpowiedzi na wysokie natężenie światła.

Tabela 2. Wpływ warunków hodowli na specyficzne tempo wzrostu, czas podwojenia biomasy, produktywność biomasy oraz zawartość lipidów w biomacie *C. protothecoides*.

Natężenie światła ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Specyficzne tempo wzrostu $\mu(\text{d}^{-1})^*$	Czas podwojenia biomasy (h)*	Produktywność biomasy ($\text{g L}^{-1} \text{dzień}^{-1}$)	Zawartość lipidów (% s.m.)*
35	0.61± 0.013 a	27.22 ±0.59 a	0.085±0.001	24.83±3.09 a
130	0.86±0.015 b	19.33±0.34 b	0.091±0.001	16.78±2.37 b
420	1.06±0.013 c	15.67±0.19 c	0.09±0.004	37.53±1.53 c

*wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie $p < 0.01$

Stwierdzono, zmniejszenie zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, któremu towarzyszył ponad dwukrotny wzrost zawartości jednonienasyconych kwasów tłuszczowych wraz ze wzrostem natężenia światła. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe są istotne w procesie aklimatyzacji do niskiego natężenia światła (Klyachko-Gurvichi in., 1999). Niska zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w biomacie jest korzystna pod kątem przydatności biomasy do produkcji biodiesla. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe są bowiem niewskazane jako substrat do produkcji biodiesla ze względu na ich podatność do utlenienia i polimeryzacji (Hu et al.2008).

Tabela 3. Średnia zawartość kwasów C16-C18 w biomase *C. protothecoides* ze względu na stopień nasycenia.

Kwasy tłuszczowe%	Natężenie światła ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		
	35	130	420
Nasycone kwasy tłuszczowe *	14.92±1.96	17.89 ±1.18	15.24±1.65
Jednonienasycone kwasy tłuszczowe*	13.8±1.91	18.03±1.49	34.74±4.12
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe*	47.60 ±4.66	43.06±2.59	38.96±1.46

*(wśród C16-C18)

Podsumowując wyniki przedstawione w pracy **H3**, należy podkreślić, że natężenie światła jest istotnym czynnikiem kontrolującym wzrost biomasy *C. protothecoides* oraz że warunki **wysokiego natężenia światła są korzystne do wzrostu biomasy**. Bardzo istotne jest stwierdzenie, że **wraz ze wzrostem natężenia światła następował wzrost zawartości lipidów; wysokie natężenie światła zwiększało zawartość kwasów C16-C18 przy jednoczesnym spadku zawartości kwasu linolenowego (18:3)** i że, w warunkach wzrostu w wysokim natężeniu światła lipidy *C. protothecoides* są korzystnym substratem do produkcji biodiesla.

Wpływ suplementacji glukozą na wzrost, zawartość lipidów i profil kwasów tłuszczowych biomasy *Auxenochlorella protothecoides*.

Głony są to głównie organizmy autotroficzne, ale część gatunków może wykorzystywać zarówno ditlenek węgla jaki organiczne formy węgla (miksotrofia). Najczęściej stosowanym sposobem pozyskiwania biomasy mikroglonów są hodowle oparte na wzroście fotoautotroficznym z wykorzystaniem węgla nieorganicznego (CO_2). Hodowle te jednak charakteryzują niższą produktywnością biomasy w stosunku do hodowli rosnących w obecności organicznej formy węgla, która wynika z ograniczenia dostępności światła w hodowlach o wysokiej gęstości komórek (Gim i in. 2016). Dla komórek hodowanych w środowisku gdzie występuje organiczna forma węgla dodatkowym źródłem węgla jest ditlenek węgla uwalniany z procesu oddychania w metabolizmie węgla organicznego (Ren i in. 2016).

Celem przeprowadzonych przeze mnie badań w pracy **H4** było poznanie wpływu suplementacji podłoża hodowlanego egzogennym źródła węgla – glukożą, na wzrost biomasy, zawartość chlorofilu, akumulację lipidów i profil kwasów tłuszczowych *A. protothecoides*. Określenie zmian zachodzących w kwasach tłuszczowych przy różnych stężeniach glukozy w podłożu ma znaczenie ze względu na możliwość wykorzystania ścieków do produkcji biomasy glonów, które są źródłem m.in. węgla organicznego dla komórek glonów. W doświadczeniu analizowano wpływ 3 stężeń glukozy: 1g, 3g, i 5 gL⁻¹, które dodawano do podłoża.

Stwierdzono, że dodatek glukozy wpływał na zwiększenie specyficznego tempa wzrostu *A. protothecoides*. Stwierdzono istotne różnice w tempie wzrostu hodowli wraz ze wzrostem stężenia glukozy. Dodatek glukozy wpływał też na skrócenie czasu podwojenia biomasy w porównaniu z kontrolą. Wyniki pracy **H4** wykazały więc że suplementacja glukożą zwiększała produktywność biomasy w porównaniu z hodowlą bez dodatku glukozy. Najwyższą produktywność biomasy zaobserwowano w warunkach suplementacji 5 gL⁻¹ i była ona 2.8-krotnie wyższa niż w kontroli.

W pracy **H4** wykazano, że w warunkach suplementacji 1 gL⁻¹ glukożą zawartość lipidów w biomacie była istotnie wyższa (19.38%) w porównaniu do kontroli (6.84%). W hodowlach wzrastających w warunkach suplementacji 3 i 5 gL⁻¹ stwierdzono zmniejszenie zawartości lipidów, zawartość lipidów wynosiła odpowiednio 12% i 11.4 %. Analiza profilu kwasów tłuszczowych wykazała, że **profil kwasów tłuszczowych zmieniał się w zależności od stężenia glukozy** (Tab.4). Wraz ze wzrostem stężenia glukozy wzrastała zawartość kwasu oleinowego (z 11.57% do 41.43%) oraz spadała zawartość kwasu linolenowego 18:3 (z 8.28% do 2.91%). **Zawartość estrów metylowych kwasu linolenowego poniżej 12 % jest jednym ze standardów jakościowych określonych dla biodiesla. Wykazano również, że suplementacja glukożą wpłynęła na wzrost zawartości jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (z 11.69% do 42.77%) oraz spadek zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (z 62.52% do 33.65%).** Obserwowane zmiany w profilu kwasów tłuszczowych są korzystne w kontekście wykorzystania biomasy *A. protothecoides* jako surowca do produkcji biodiesla.

Tabela 4. Wpływ suplementacji glukozą na profil kwasów tłuszczowych *A. protothecoides*.

Kwasy tłuszczowe %	Stężenie glukozy (g L ⁻¹)			
	0	1	3	5
16:0 (kwas palmitynowy)	23.16±0.87	17.68±2.03	16.02±2.75	16.29±0.4
16:1 (kwas palmitoleinowy)	0.23±0.09	0.43±0.06	0.97±0.22	1.16±0.11
18:0 (kwas stearynowy)	11.47±0.58	7.98±1.13	6.26±0.99	5.91±0.34
18:1 (kwas oleinowy)	8.32±0.32	11.57±0.49	19.49±7.45	41.43±1.4
18:2 (kwas linolowy)	35.54±1.62	52.29±0.93	50.31±0.49	30.93±1.12
18:3 (kwas linolenowy)	17.52±1.29	8.26±1.4	4.9±0.82	2.91±0.82
Suma C16-C18	96.24	98.21	97.95	98.63
Nasycone kwasy tłuszczowe*	34.62±1.35	24.24±0.53	22.56±1.21	22.18±0.38
Jednonienasycone kwasy tłuszczowe*	8.38±0.50	11.69±0.16	20.00±2.70	42.77±1.29
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe*	52.06±0.52	62.52±1.01	56.05±1.15	33.65±1.30

*(wśród C16-C18)

Podsumowując, w pracy H4 wykazano, że dodatek egzogenego źródła węgla – glukozy do podłoża zwiększał tempo wzrostu *Auxenochlorella protothecoides*, a także, że suplementacja glukozą indukowała zmiany w zawartości lipidów oraz profilu kwasów tłuszczowych w biomase glonów. W pracy H4 po raz pierwszy wykazano zmiany zachodzące w zawartości kwasów tłuszczowych w biomase *A. protothecoides*, w zależności od różnych stężeń glukozy. **Wzrost stężenia glukozy w podłożu wpływał na wzrost zawartości kwasu oleinowego i spadek zawartości kwasu linolenowego oraz zmniejszenie zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co poprawia jakość biomasy glonów jako potencjalnego substratu do produkcji biodiesla.**

Ocena wpływu kwasu indolilo-3-octowego (IAA) na produktywność biomasy *Parachlorella kessleri* w warunkach zastosowania fotoperiodu i oświetlenia ciągłego.

Kwas indolilo-3-octowy (IAA) to hormon roślinny zaliczany do grupy auksyn. U roślin wyższych odpowiada między innymi za regulację procesu wzrostu komórek i stymulowanie podziałów komórek (Kączkowski 1992). Zagadnienie wpływu regulatorów wzrostu na komórki glonów jest w znacznie mniejszym stopniu poznana w porównaniu z badaniami dotyczącymi

ich wpływu na rośliny wyższe (Piotrowska-Niczyporuk i Bajguz 2014). W literaturze dostępne są badania dotyczące wpływu dodatku IAA na procesy wzrostu *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus quadricauda*, *S. obliquus* (Lu i Xu, 2015; Parki in. 2014; Piotrowska-Niczyporuk i Bajguz, 2014). Odpowiedź komórek glonów na działanie fitohormonów różni się w zależności od gatunku (Salama i in., 2014). Istotne jest określenie optymalnego stężenia fitohormonów stymulującego wzrost dla gatunków glonów, które charakteryzują się wysokim potencjałem produkcyjnym i mogą znaleźć zastosowanie w hodowlach masowych. Zielenica *Parachlorella kessleri*, ze względu na wysokie tempo wzrostu i wysoką produktywność biomasy uważana jest za gatunek o dużym potencjale biotechnologicznym (Li i in. 2013). Badania dotyczące **wplywu kwasu indolilo-3-octowego w zróżnicowanych warunkach oświetlenia** na produktywność biomasy *Parachlorella kessleri* nie były wcześniej prowadzone.

Celem badań podjętych w pracy **H5** było określenie wpływu dodatku egzogenego kwasu indolilo-3-octowego na produktywność biomasy *P. kessleri* w dwóch wariantach oświetlenia: fotoperiodu (16 h światła / 8 h ciemności) i w warunkach oświetlenia ciągłego, przy stałym jego optymalnym natężeniu. W celu określenia wpływu zastosowanego fitohormonu na produktywność biomasy analizowano dwa stężenia IAA 10^{-4} M i 10^{-5} M.

Badania wykazały, że wzrost *P. kessleri* zależał od zastosowanego stężenia kwasu indolilo-3-octowego oraz od warunków oświetlenia. W warunkach fotoperiodu i suplementacji IAA nie zaobserwowano stacjonarnej fazy wzrostu niezależnie od zastosowanego stężenia kwasu indolilo-3-octowego. Różnice w przebiegu krzywej wzrostu zaobserwowano po 6 dniach hodowli, gdzie dodatek 10^{-4} M IAA miał stymulujący wpływ na wzrost. Komórki osiągnęły fazę wzrostu logarytmicznego wcześniej niż hodowla suplementowana 10^{-5} M IAA i hodowla kontrolna (bez suplementacji IAA). W przypadku hodowli w warunkach oświetlenia ciągłego i stężeniu 10^{-4} M IAA zaobserwowano fazę wykładniczą (5-10 dni) oraz stacjonarną fazę wzrostu. W warunkach niższego stężenia IAA i warunkach kontrolnych przebieg krzywej wzrostu był do siebie zbliżony.

Stwierdzono, że kwas indolilo-3-octowego istotnie zwiększał specyficzne tempo wzrostu i czas podwojenia biomasy w stosunku do hodowli w warunkach kontrolnych (Tab.5). Zaobserwowano, że zastosowanie fotoperiodu przy jednoczesnej suplementacji IAA wpłynęło na wydłużenie czasu podwojenia biomasy i zmniejszenie tempa wzrostu w porównaniu z hodowlą w warunkach oświetlenia ciągłego. Najwyższe tempo wzrostu i najkrótszy czas podwojenia biomasy stwierdzono w warunkach suplementacji 10^{-4} M IAA i oświetleniu ciągłym.

Tabela 5. Wpływ fotoperiodu, oświetlenia ciągłego i suplementacji kwasem indolilo-3-octowym na specyficzne tempo wzrostu i czas podwojenia biomasy *P. kessleri* ; $p < 0.01$.

Stężenie IAA [mol dm^{-3}]	Specyficzne tempo wzrostu μ [dzień $^{-1}$] (0-8 dni)	Czas podwojenia bioamsy [h] (0-8 dni)
Oświetlenie ciągłe		
10^{-4}	0.37±0.02a	44.95±2.06a
10^{-5}	0.30±0.01b	55.57±2.72b
Kontrola	0.25±0.01c	65.35±2.46c
Fotoperiod		
10^{-4}	0.27±0.02a	61.52±3.72a
10^{-5}	0.24±0.01b	66.31±1.52b
Kontrola	0.18±0.01c	93.88±2.73c

Wyniki wykazały, także że dodatek fitohormonu wpływał na zwiększenie produktywności biomasy *P. kessleri*. Wyższe końcowe przyrosty biomasy stwierdzono w warunkach suplementacji wyższym stężeniem kwasu indolilo-3-octowego (10^{-4} M). Największy końcowy przyrost biomasy stwierdzono, w warunkach suplementacji 10^{-4} M IAA i w warunkach fotoperiodu (16h światła /8h ciemności). W warunkach tych, przyrost biomasy *P. kessleri* po 14 dniach hodowli był 3.4 krotnie wyższy w stosunku do warunków kontrolnych, co może wskazywać na to, że zastosowane połączenie fotoperiodu i dodatku IAA spowodowało zmiany w zawartości metabolitów w komórkach *P. kessleri*. W warunkach oświetlenia ciągłego i suplementacji 10^{-4} M IAA przyrost biomasy po 14 dniach hodowli był ponad 2- krotnie wyższy w porównaniu z kontrolą.

Podsumowując, badania wykazały że suplementacja podłoża hodowlanego kwasem indolilo-3-octowym zwiększała produktywność biomasy *Parachlorella kessleri*. **Maksymalną wartość specyficznego tempa wzrostu zaobserwowano w warunkach oświetlenia ciągłego i dodatku 10^{-4} M IAA. Suplementacja kwasem indolilo-3-octowym w warunkach oświetlenia ciągłego sprzyjała proliferacji komórek *Parachlorella kessleri*.** Natomiast w warunkach fotoperiodu i suplementacji 10^{-4} M IAA stwierdzono największy końcowy przyrost biomasy *P. kessleri*.

Podsumowanie

Analiza wpływu wybranych warunków fizycznych i chemicznych na produktywność i zmiany w składzie biochemicznym biomasy zielenic w kontekście ich wykorzystania do celów energetycznych stanowiła przedmiot badań wskazanych jako osiągnięcie naukowe (H1-H5). Badania te mają charakter zarówno podstawowy jak i aplikacyjny. Wiedza na temat wpływu abiotycznych czynników środowiskowych na produktywność biomasy i zmiany metabolizmu glonów jednokomórkowych istotna jest m.in. dla pełniejszego zrozumienia ekologii i fizjologii mikroorganizmów fotosyntetyzujących, ich zastosowań biotechnologicznych jako źródła cennych substancji np. kwasów tłuszczowych oraz zastosowań do produkcji biodiesla z biomasy zielenic jako alternatywnego źródła surowca energetycznego.

Podsumowując całość omówionych powyżej wyników badań opublikowanych w publikacjach **H1-H5** do najbardziej istotnych wyników należy zaliczyć:

- określenie zmian w produktywności biomasy zielenic w warunkach wzrostu w oświetleniu ciągłym i fotoperiodzie
- wskazanie optymalnej metody ekstrakcji pozwalającej na maksymalny odzysk lipidów z biomasy glonów
- określenie zmian zachodzących w warunkach wysokiego natężenia światła w produktywności biomasy, akumulacji lipidów i kwasach tłuszczowych oraz wykazanie, że w warunkach wysokiego natężenia światła lipidy *C. protothecoides* stanowią odpowiedni substrat do syntezy biodiesla
- wykazanie, że suplementacja egzogennym źródła węgla jest czynnikiem zwiększającym produktywność biomasy, wykazanie zmian w profilu kwasów tłuszczowych w biomacie *A. protothecoides* w zależności od stężenia glukozy oraz, że obserwowane zmiany w profilu kwasów tłuszczowych są korzystne w kontekście wykorzystania biomasy w produkcji biodiesla
- określenie pozytywnego wpływu suplementacji kwasem indolilo-3-octowego na produktywność biomasy *P. kessleri* w warunkach wzrostu w oświetleniu ciągłym i fotoperiodzie.

Piśmiennictwo uzupełniające:

- Singh J., Gu S., 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 2596–2610.
- Mata T.M., Martins A. A., Caetano N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217–232.
- Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54, 621–639.
- Řezanka, T., Petránková, M., Cepák, V., Pribyl, P., Sigler, K., Cajthaml, T. 2010. *Trachydiscus minutus*, a new biotechnological source of eicosapentaenoic acid. *Folia microbiologica* 55, 265–269.
- Sforza E., Simionato D., Giacometti G.M., Bertucco A., Morosinotto T. 2012. Adjusted Light and Dark Cycles Can Optimize Photosynthetic Efficiency in Algae Growing in Photobioreactors. *PLoS ONE*.7,6 e38975
- Fernandes B., Teixeira J., Dragone G., Vicente A.A., Kawano S., Bišova K., Pribyl P., Zachleder V., Vitova M. 2013. Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource Technology* 144, 268–274.
- Murray K.E., Healy F.G., McCord R.S., Shields J.A. 2011 Biomass production and nutrient uptake by *Neochloris oleoabundans* in an open through system. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:89–95.
- Bligh E.G. and Dyer W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.*, 37, 911-917.
- Yeh K.L. and Chang J.S., 2012. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous micro alga *Chlorella vulgaris*ESP-31. *Biores. Technol.*, 105, 120-127.
- Tan X., Lin J. 2011. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. *Bioresource Technology* 102, 10131–10135.
- Kączkowski J. 1992. *Biochemia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Hu, B., 2010. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 1978–1995.
- Liu, B., Benning, C., 2013. Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Curr. Opin. Biotech.* 24, 300–309.
- Ren, X., Chen, J., Deschênes, J.S., Tremblay, R., Jolicoeur, M., 2016. Glucose feeding recalibrates carbon flux distribution and favours lipid accumulation in *Chlorella protothecoides* through cell energetic management. *Algal Research* 14, 83–91.
- Klyachko-Gurvich, G., Tsoglin, L.N., Doucha, J., Kopetskii, J., Shebalina, B.I., Semenenko, V.E., 1999. Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity. *Physiol. Plantarum* 07, 240–249.
- Gim, G.H, Ryu, J., Kim, M.J., Kim, P.I., Kim, S.W., 2016. Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 43, 605-616.
- Piotrowska-Niczyporuk A. and Bajguz A., 2014. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (*Trebouxiophyceae*). *Plant Growth Regul.*, 73, 57-66.
- Lu Y. and Xu J., 2015. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends in Plant Sci.*, 20, 273-82.
- Park W.K., Yoo G., Moon M., Kim C.W., Choi Y.E., and Yang J.W., 2014. Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 171, 1128-1142.

Salama E.S., Kabra A.N., Ji M.K., Kim J.R., Min B., and Jeon B.H., 2014. Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. *Biores. Technol.*, 172, 97-103.

Li X., Pribyl P., Bisova K., Kawano S., Cepak V., Zachleder V., Cizkova M., Branyikova I., Vitova M. 2013. The Microalga *Parachlorella kessleri*—A Novel Highly Efficient Lipid Producer. *Biotechnology and Bioengineering*, 110,1, 97-107.

Fields M.W., Hise A., Lohman E.J., Bell T., Gardner R.D., Corredor L., Moll K., Peyton B.M., Characklis G.W., Gerlach R. 2014. Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 4805–4816.

Xin L., Hong-ying H., Yu-ping Z. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a fresh water microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation. *Bioresource Technology* 102, 3098–3102.

D) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

- **przed uzyskaniem stopnia doktora**

W roku 2004 zostałam słuchaczem Studiów Doktoranckich w Instytucie Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie w Zakładzie Fizykochemii Materiałów Porowatych gdzie pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Sokołowskiej prowadziłam badania. W czasie Studiów Doktoranckich byłam beneficjentem Projektu Stypendialnego „Stypendia dla młodych naukowców szansą agrorozwoju Lubelszczyzny” finansowanego z Europejskich Funduszy Strukturalnych i Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego, w latach 2005-2006 (Zał. III I 1). W ramach realizacji projektu przygotowałam trzy prace, które ukazały się w książkach (Zał. III D 3-5). W 2009 roku zostałam laureatką projektu „Stypendia dla doktorantów” współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Budżetu Państwa oraz Budżetu Województwa Lubelskiego (Zał. III I 2). W latach 2009-2010, po przewie w studiach, związanej z urlopem macierzyńskim i wychowawczym, byłam wykonawcą projektu promotorskiego pt. „Wybrane właściwości gleb i ich przestrzenna zmienność w skali pola” (Zał. II H 3), którego wyniki przedstawiłam w rozprawie doktorskiej pt. „Wybrane właściwości gleb wytworzonych z piasków i ich przestrzenna zmienność w skali pola” pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Sokołowskiej. Rozprawa doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu Agrofizyki PAN (Zał. II I). Wyniki badań zostały zaprezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych (Zał. II J 1-16), rozdziale w monografii (Zał. II C 7) oraz opublikowanych sprawozdaniach Instytutu Agrofizyki PAN (Zał. II D 1-3).

Przed obroną pracy doktorskiej byłam współautorem 1 oryginalnej pracy w czasopiśmie znajdującym się w bazie *Journal Citation Reports* (pub II A 7). Byłam współautorem 1 rozdziału w monografii i 3 opracowań w monografiach (Zał. III D 3-5) o charakterze popularno-naukowym. Brałam udział w konferencjach krajowych i międzynarodowych, gdzie prezentowałam referaty i postery (łącznie 16 doniesień konferencyjnych).

- **po uzyskaniu stopnia doktora**

Osiągnięcia w pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora (nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego)

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii – agrofizyki zostałam zatrudniona na stanowisku mikrobiologa (2011 r.) a następnie w 2013 roku na stanowisku adiunkta, w Zakładzie Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych Instytucie Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie w grupie prof. dr hab. Jerzego Tysa. W styczniu 2019 r. zostałam powołana na stanowisko kierownika zadania badawczego nr 7 pt. „Badanie metabolitów mikroglonów i procesu fermentacji metanowej”. W ramach zadania badawczego kieruję zespołem badawczym złożonym z 5 osób.

Od roku 2011 rozpoczęłam badania koncentrujące się nad zagadnieniami wpływu fizycznych i chemicznych czynników na produktywność biomasy jednokomórkowych glonów oraz odpowiedzi metabolicznej komórek glonów na zmieniające się warunki środowiska. Oprócz badań opisanych w pracach **H1-H5** zajmowałam, się także tematyką wykorzystania melasy buraczanej, będącej źródłem węgla i azotu, w hodowli glonów. Wykorzystanie melasy, która jest tanim produktem ubocznym pochodzenia rolniczego ma znaczenie w kontekście obniżania kosztów produkcji biomasy glonów. Celem prowadzonych badań była ocena wpływu suplementacji podłoża melasą buraczaną na kinetykę wzrostu i metabolizm *Parachlorella kessleri* (**Pub. II A3**). W pracy wykazano, że suplementacja melasą zwiększa istotnie końcowe stężenie biomasy komórkowej, dzienną produktywność biomasy i zawartość białka w komórkach. W hodowli suplementowanej melasą i suplementowanej melasą z jednoczesnym napowietrzaniem odnotowano istotny wzrost zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). Stwierdzono, także że suplementacją melasą wpłynęła istotnie na zawartość kwasu palmitynowego, stearynowego i linolenowego. Suplementacja melasą i jednoczesne suplementowanie z napowietrzaniem spowodowały istotny statystycznie spadek zawartości kwasu linolenowego w stosunku do kontroli. Tematyka ta była prezentowana w formie wystąpień ustnych i posterów na konferencjach (Zał. II J 17,21,28,33).

Moje zainteresowania naukowe związane były również z tematyką akumulacji lipidów i węglowodanów w biomacie zielenic w warunkach stresu. W pracy przeglądowej przeanalizowałam, na podstawie doniesień literaturowych, główne czynniki mające wpływ na procesy akumulacji lipidów, kwasów tłuszczowych oraz węglowodanów w warunkach wzrostu fotoautotroficznego (**Pub. IIA 2**). W pracy podsumowano wpływ najważniejszych czynników odżywczych: azotu i fosforu, węgla nieorganicznego, światła oraz temperatury. W pracy wykazano, że stres odżywczy: ograniczenie dostępności azotu jest najczęściej stosowaną strategią w celu zwiększenia akumulacji lipidów w biomacie zielenic. Podsumowano, także badania wskazujące na wzrost zawartości lipidów w odpowiedzi na ograniczenie dostępności fosforu w podłożu. Na zwiększenie zawartości lipidów, oprócz stresu odżywczego (N i P), wpływ ma także zwiększone natężenie światła (stres świetlny) oraz źródło i ilość węgla nieorganicznego. Przeanalizowano także badania wskazujące, że proces akumulacji węglowodanów może być wywołany wyczerpywaniem się azotu i fosforu, zwiększeniem natężeniem światła i zmianami stężenia CO₂. Sprzeczne doniesienia literaturowe dotyczące wpływu niektórych czynników na akumulację lipidów i węglowodanów w biomacie zielenic, świadczą, że w znacznym stopniu odpowiedź komórek uwarunkowana jest też cechami gatunkowymi (Pub. IIA 2).

Podczas mojej pracy naukowej brałam, także udział w badaniach dotyczących możliwości zastosowania metod dynamicznego rozpraszania światła w ocenie dezintegracji komórek *P. kessleri* (**Pub IIA 1**). Prowadziłam, także badania dotyczące wpływu stężenia ditlenku węgla i zróżnicowanego fotoperiodu na tempo wzrostu, produktywność biomasy oraz zmiany w składzie biochemicznym biomasy zielenicy *C. protothecoides* (**Pub IIA 6**). Badania wykazały istotne statystycznie zmiany w zawartości lipidów i węglowodanów w zależności od zastosowanych warunków. Stwierdzono, że zastosowanie oświetlenia ciągłego w warunkach napowietrzania powietrzem hodowli korzystne było dla akumulacji lipidów w biomacie. Tematyka kolejnej pracy, w której jestem współautorem (**Pub. IIA 4**) dotyczyła wpływu biomasy nawłoci pospolitej i zawartych w niej związków bioaktywnych na proces fermentacji metanowej. W pracy wykazano pozytywny wpływ kofermentacji kukurydzy i nawłoci w porównaniu z fermentacją pojedynczych substratów.

Nowy obszar moich zainteresowań dotyczy badań biomasy jednokomórkowych glonów z klasy Eustigmatophyceae – bardzo mało poznanych pod względem fizjologicznym, biochemicznym i ekologicznym. Eustigmatophyceae to klasa jednokomórkowych kokoidalnych glonów żyjących głównie w glebie i wodach słodkich. Niektóre gatunki należące do Eustigmatophyceae np. *Nannochloropsis* spp. uważane są za modelowe organizmy

olejogenne. W 2017 otrzymałam wsparcie finansowe w ramach konkursu **Sonata 12** (Zał. II H1). Projekt, którego jestem kierownikiem, „Zdolność jednokomórkowych glonów *Eustigmatos calaminaris* i *Eustigmatos magnus* (Eustigmatophyceae) do syntezy nienasyconych kwasów tłuszczowych w zmieniających się warunkach wzrostu” realizowany jest od sierpnia 2017 r. Celem projektu jest zbadanie wybranych procesów fizjologicznych (w tym aktywności fotosyntetycznej, profilu metabolicznego oraz zdolności wzrostowych) *E. calaminaris* i *E. magnus*, w warunkach stresu odżywczego i świetlnego, jako potencjalnego źródła cennych substancji bioaktywnych: nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych. W zależności od profilu kwasów tłuszczowych, badanych w projekcie gatunków Eustigmatophyceae, mogą one znaleźć zastosowanie w badaniach jako producenci kwasu eikozapentaenowego (EPA), który należy do grupy nienasyconych kwasów, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego człowieka lub w badaniach dotyczących produkcji biodiesel'a z biomasy glonów (Zał. II J 30).

W latach 2011-2012 odbyłam staż naukowy w Centrum Badań Ekologicznych PAN w Dziekanowie Leśnym, Stacja Badawcza w Lublinie, w trakcie którego przeprowadziłam doświadczenie wpływu fotoperiodu na produktywność 5 gatunków zielenic pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Pawlik-Skowrońskiej (Zał. III G 1). Wyniki badań prowadzonych na stażu naukowy zostały opublikowane w pracy **H1**. Aby pogłębić swoje umiejętności dotyczące pomiarów modulowanej fluorescencji chlorofilu odbyłam staż w University of Padova, Department of Biology we Włoszech w grupie profesora prof. T. Morosinotto (Zał. III G 2). Efekty nawiązanej współpracy opublikowane zostały w pracy **H3**. W 2015 odbywałam staż w Zakładzie Biofizyki, Instytut Fizyki UMCS Lublin, pod kierunkiem prof. dr hab. W. Gruszeckiego, gdzie w jego zespole prowadziłam badania dotyczące procesów adaptacji komórek glonów *Chlorella vulgaris* i *Chlorella protothecoides* do warunków stresu świetlnego (Zał. III G 3). Wyniki badań opublikowane zostały w **pracy II A5** i na konferencjach (Zał. II J 14, 26). Wyniki badań wykazały, że w warunkach stresu świetlnego *C. protothecoides* i *C. vulgaris* uruchamiają mechanizmy ochronne m.in. syntezę karotenoidów. Wytworzona zeaksantyna akumuluje się w okolicy jądra komórki w celu jego ochrony przed fotodegradacją poprzez m.in. gaszenie reaktywnych form tlenu. Zeaksantyna może też działać jak filtr pochłaniający światło z zakresu UV- jako „molekularne okulary słoneczne” .

W latach 2011-2014 uczestniczyłam w realizacji projektu „Opracowanie założeń fizjologiczno-technicznych do produkcji glonów na cele energetyczne” (Zał. II H 2). Wynikiem realizacji tego projektu jest patent (Zał. II B) oraz monografia (Zał. II C 1), których jestem współautorem. W 2016 r. zostałam nominowana jako Członek Komitetu Zarządzającego MC

Member Akcji COST ES1408 European network for algal - bioproducts (EUALGAE) (Zał. III A).

Do chwili obecnej ukazało się łącznie 19 recenzowanych prac naukowych, których jestem współautorem, w tym 12 w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*, których sumaryczny *Impact Factor* wynosi **29,947**, a liczba punktów MNiSW **433**. Po uzyskaniu stopnia doktora opublikowano łącznie 12 recenzowanych prac naukowych (które nie wliczają się do osiągnięcia naukowego wymienionego w części I) mojego współautorstwa, w tym 6 w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (wykaz IIA 1-6), których sumaryczny *Impact Factor* wynosi 13,964 a liczba punktów MNiSW 205. Liczba cytowań moich prac według bazy Web of Science Core Collection wynosi **113** (bez autocytowań **89**), natomiast indeks Hirscha **6**.

Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski

W ramach działalności dydaktycznej pełniłam funkcje **opiekuna pomocniczego trzech słuchaczy Studiów Doktoranckich** Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie. Od 2012 roku pełniłam funkcję opiekuna pomocniczego mgr Agaty **Piaseckiej**, a po otwarciu przewodu doktorskiego w 2015 **promotora pomocniczego**. Obrona pracy doktorskiej: „Wykorzystanie melasy w hodowli wybranych gatunków zielenic (Chlorophyta)” odbyła się w 2018 r. Od roku 2015 byłam opiekunem pomocniczym mgr Edyty **Magierek** a od 2018 roku jestem opiekunem pomocniczym mgr Wiolety **Babiak** (Zał. III F 1-3).

Pracując w Instytucie Agrofizyki PAN sprawowałam też opiekę nad stażystami oraz praktykantami. Pełniłam funkcje opiekuna praktyk i stażu, w sumie 8 osób w Laboratorium Nowych Technologii Pozyskiwania Energii Odnawialnej (Zał. III E). Od roku 2011 aktywnie prowadzę działalność popularyzatorską uczestnicząc w Lubelskim Festiwalu Nauki (LFN 2011, LFN 2013 oraz LFN 2014), Pikniku Naukowym Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik (2014 r) oraz Festiwalu Nauki w Jabłonie (2013 i 2015 r), (Zał. III J 1-6). W roku 2011 projekt festiwalowy pt.: ”Algi – energia jutra” zdobył nagrodę za Najciekawszy Projekt piknikowy (Zał. III B). W 2011 roku wygłosiłam wykład otwarty: „Czy glony (algi) mogą być konkurencją dla roślin energetycznych?” w ramach wykładów Wszechnicy na zaproszenie Polskiej Akademii Nauk Oddział w Lublinie i Lubelskiego Towarzystwa Naukowego (Zał. III J 7). W latach 2014-2015, w ramach projektu „PI:e-Odnawialne Źródła Energii Lubelszczyzny (e-OZEL)-system zwiększający zainteresowanie uczniów kontynuacją kształcenia na kierunkach GOW” nr POKL.09.02.00-06-070/12, realizowanego przez Fundację Polskiej Akademii Nauk w Lublinie prowadziłam cykl wykładów dotyczących biomasy mikroglonów

i jej energetycznego wykorzystania dla 120 uczniów szkół gimnazjalnych i ponadgimnazjalnych z województwa lubelskiego (Zał. III J 8). Jestem też współautorką prac o charakterze popularyzatorskim (Zał III D 1-2).

Jestem współautorem łącznie 49 doniesień konferencyjnych, w tym 33 po uzyskaniu stopnia doktora. Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Biofizycznego i Polskiego Towarzystwa Fykologicznego.

Jako pracownik naukowy regularnie podnosiłam swoje kompetencje poprzez uczestnictwo w studiach podyplomowych oraz różnego rodzaju szkoleniach (Zał. III I 3). W celu poszerzenia wiedzy chemicznej, niezbędnej w realizowaniu mojej tematyki badawczej w 2018 roku rozpoczęłam Studia Podyplomowe w zakresie „Chromatografia i techniki pokrewne w różnych wariantach oznaczeń śladowych” na wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (Zał. III I 4). Przewidywany termin ukończenia studiów to czerwiec 2019 r.

Wykonałam w sumie **15 recenzji artykułów** wszystkie złożone do czasopism z listy *Journal Citation Report*, takie jak: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *Engineering in Life Sciences*, *Journal of Applied Phycology*, *International Agrophysics*, *Phycologia*, *Energy Conversion and Management* (Zał. III H 1-7).

Zestawienie liczbowe mojego dorobku naukowego znajduje się w tabeli poniżej. Wykaz opublikowanych prac naukowych i informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki dołączam do dokumentów jako Załącznik 4.

Dorobek naukowy	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Całkowity dorobek
Oryginalne prace twórcze, w tym:	2	17	19
Oryginalne prace twórcze w czasopiśmie z IF stanowiące osiągnięcie naukowe ¹	nd	5	5
Pozostałe oryginalne prace twórcze w czasopiśmie z IF ¹	1	6	7
Pozostałe oryginalne prace twórcze bez IF ²	0	5	5
Monografie	0	1	1
Rozdziały w monografii	1	0	1
Sumaryczny IF	1,059	28,888	29,947
Punkty MNiSW	14	419	433
Komunikaty naukowe wygłoszone na konferencjach:			
- krajowych	2	20	22
- międzynarodowych	4	3	7
Komunikaty naukowe prezentowane w formie posterów na konferencjach:			
- krajowych	6	2	8
- międzynarodowych	4	8	12
Udzielone patenty krajowe			
	0	1	1
Udział w projektach naukowo-badawczych, programach europejskich oraz innych			
- kierowanie projektami badawczymi	0	1	1
- wykonawstwo w projektach badawczych	1	1	2
- udział w programach europejskich	0	1	1
Recenzje artykułów naukowych			
	0	15	15

¹-czasopisma z listy A MNiSW; ²-czasopisma z listy B MNiSW

Izabela Krzemińska