

# **RAPORT KOŃCOWY Z REALIZACJI PROJEKTU BADAWCZEGO**

## **A. Dane ogólne**

1. Nazwa i adres jednostki naukowej  
**Instytut Przemysłu Organicznego  
ul. Annopol 6, 03-252 Warszawa**
2. Numer telefonu, numer faksu, e-mail, WWW  
**Tel. (22) 811 12 31, fax. (22) 811 07 99, [ipo@ipo.waw.pl](mailto:ipo@ipo.waw.pl), [www.ipo.waw.pl](http://www.ipo.waw.pl)**
3. NIP, REGON  
**525-00-08-577, 000042613**

## **B. Informacje o projekcie**

1. Numer rejestracyjny projektu badawczego  
**N N209 133440**
2. Numer umowy  
**1334/B/H03/2011/40**
3. Tytuł projektu  
**Wykorzystanie cieczy jonowych do otrzymywania taksanów przeciwnowotworowych z endofitów roślinnych**
4. Kierownik projektu (tytuł naukowy lub stopień naukowy, tytuł zawodowy, imię i nazwisko, numer telefonu, numer faksu, e-mail).  
**mgr Alicja Michalczyk  
tel. (22) 811 12 31 wew. 246 (346), fax. (22) 811 07 99, e-mail: [Michalczyk@ipo.waw.pl](mailto:Michalczyk@ipo.waw.pl)**
5. Termin rozpoczęcia realizacji projektu: **18.04.2011**
6. Termin zakończenia realizacji projektu: **17.04.2014**
7. Słowa kluczowe  
**taksany, endofity roślinne, ciecze jonowe, aktywność przeciwnowotworowa**

## **C. Syntetyczny opis uzyskanych wyników, osiągnięcia naukowe i zastosowania praktyczne** *(maksimum 2 strony formatu A4, w nagłówku opisu należy podać numer projektu, tytuł projektu i nazwę jednostki naukowej; treść i forma opisu do ewentualnej publikacji)*

## Projekt badawczego własny

Nr N N209133440 pt': "Wykorzystanie cieczy jonowych do otrzymywania taksanów przeciwnowotworowych z endofitów roślinnych"

### Instytut Przemysłu Organicznego

Badania prowadzone w ramach niniejszego projektu dotyczyły izolowania grzybów endofitycznych z różnych części takich roślin jak leszczyna, bazylika oraz barwinek, a także sprawdzenia ich zdolności do biosyntezy taksanów na drodze fermentacji na sztucznych pożywkach. W wyniku prac izolacyjnych otrzymano 82 gatunków grzybów endofitycznych należących do 14 różnych rodzajów. Z liści i łodyg bazyliki uzyskano 18 izolatów, z gałązek, łupin i liści leszczyny 51 izolatów, z liści łodyg i korzeni barwinka 15 izolatów. Wstępnym badaniem pozwalającym wytypować spośród 82 izolatów grzybowych, izolaty zdolne do biosyntezy związków z grupy taksanów był test na grzybach *Oomycetes* prowadzony metodą "dual culture". W wyniku skryningu wybrano 14 gatunków grzybów, które wykazały umiarkowaną lub wysoką aktywność w stosunku do przynajmniej jednego z grzybów testowych i one też zakwalifikowały się do dalszych etapów badań. Izolaty hodowano na płynnych pożywkach zalecanych przez literaturę jako optymalne do otrzymywania taksanów w procesie fermentacji prowadzonej przez endofity. Uzyskane brzeczki fermentacyjne izolatów poddano badaniom biologicznym w teście Crown Gall Tumor Disc na krążkach ziemniaków, BSL na larwach krewetek. Aktywność brzeczek fermentacyjnych oceniano także w stosunku do trzech grzybów z klasy *Oomycetes* *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora capsici* oraz *Pythium ultimum*.

Spośród zbadanych brzeczek fermentacyjnych najwyższą aktywnością we wszystkich stosowanych testach wykazały się płynne kultury izolatów C-9, C-45, C-96, C-100, O-42, O-79 i R-9, które poddano procesowi ekstrakcji za pomocą 3 rozpuszczalników organicznych oraz 5 cieczy jonowych. Zastosowane do ekstrakcji salicylan dodecyloksymetylo-3-hydroksypirydyniowy oraz salicylan dodecyloksymetylo-3-dimetyloaminopirydyniowy nie sprawdziły się jako ekstrahenty związków aktywnych z brzeczek fermentacyjnych endofitów roślinnych. Najlepszymi ekstrahentami okazały się acetonitryl, imidek bis(trifluorometylosulfonylo) 4-benzylo-4-metylmorfoliniowy oraz imidek bis(trifluorometylosulfonylo) 4-benzylo-4-etylmorfoliniowy. Ekstrakty z brzeczek fermentacyjnych izolatów C-9 oraz O-42 uzyskanych za pomocą wyżej wymienionych rozpuszczalników charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwnowotworową niż ekstrakty uzyskane octanem etylu, chlorkiem metylenu oraz metylosiarczanem tris-(2-hydroksyetylo)metyloamoniowym. Obecność taksanów w ekstraktach z brzeczek fermentacyjnych izolatów C-9 oraz O-42 otrzymanych acetonitrylem potwierdzono w analizie TLC oraz HPLC-MS. W ekstraktach z brzeczek fermentacyjnych izolatów C-9 oraz O-42 otrzymanych za pomocą morfoliniowych cieczy jonowych oraz metylosiarczanu tris-(2-hydroksyetylo)metyloamoniowego stwierdzono obecność jonów mogących pochodzić od części węglowodorowej pochodnych taksolu, co może wskazywać, że w próbkach nastąpił rozkład tych związków. Izolat C-9 oraz O-42 na podstawie standardowej metodyki opisanej w literaturze zidentyfikowano odpowiednio jako rodzaj *Alternaria* i *Phomopsis*. Prace prowadzone nad optymalizacją parametrów wzrostu izolatów C-9 oraz O-42 wykazały, że izolat C-9 najlepszy wzrost osiągnął na pożywce M-1-D o pH =6,5, temp. 25°C po 10 dniach inkubacji, a izolat O-42 na pożywce M-1-D o pH 5.5, temp. 25°C po 14 dniach inkubacji. Wprowadzenie do pożywki M-1-D dodatkowych węglowodanów w postaci sacharozy, glukozy, zastąpienie winianu amonu octanem amonu oraz dodatek peptonu spowodowało znaczny przyrost masy izolatów C-9 oraz O-42 w porównaniu z próbą kontrolną. Ekstrakty otrzymane acetonitrylem oraz cieczami morfoliniowymi z brzeczek fermentacyjnych kultur izolatów C-9 oraz O-42 wyhodowanych na zmodyfikowanej pożywce M-1-D o następującym składzie: (KNO<sub>3</sub>-80.mg/l, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-0.5g/l, KCl-60 mg/l, MgSO<sub>4</sub> 10 mg/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O-1,0mg, sacharoza-40g, octan amonu 5.0g, FeCl<sub>3</sub> -2 mg, MnSO<sub>4</sub> 100-

mg,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ -1000 mg,  $H_3BO_3$ - 1.4mg, KI 0.7mg, ekstrakt drożdżowy- 0, 5g, mąka sojowa- 1,0g,, 10g/l glukozy+ 10g/l fruktozy, wykazały wyższą aktywność we wszystkich stosowanych testach niż ekstrakty sporządzone tymi samymi rozpuszczalnikami z kultur wyhodowanych na pożywce M-1-D. Wprowadzenie do pożywki dodatkowych składników takich jak : 1g/biotyny, 1g/l tiaminy, 0,1g/l glicyny oraz 10mg/l benzoesu sodu skutkowało zwiększeniem biosyntezy taksanów, co przejawiało się wzrostem aktywności ekstraktów sporządzonych acetonitrylem oraz imidekiem bis (trifluorometylosulfonylo) 4-benzylo-4-metylomorfoliniowym oraz imidekiem bis-(trifluorometylosulfonylo) 4-benzylo-4-etylomorfoliniowym. w testach na grzybach *Oomycetes*, Crown Gall Tumor Disc oraz BSL na krewetkach.

Uzyskane wyniki badań potwierdziły możliwość otrzymywania taksanów jako metabolitów endofitycznych grzybów izolowanych z leszczyny oraz z bazylii. Dalsze postępowanie w badaniach będzie prowadziło do hodowli wytypowanych grzybów zdolnych do produkcji taksanów w fermentorach oraz prowadzenie biosyntezy taksolu z uwzględnieniem optymalizacji parametrów procesu biotechnologicznego w skali produkcyjnej. Uzyskanie dobrych wydajności biosyntezy taksolu w procesie fermentacji pozwoli na obniżenie ceny taksanów oraz zwiększy ich dostępność w terapii przeciwnowotworowej. Efektem realizacji niniejszego projektu jest zgłoszenie patentowe nr . P. 407907 z dnia 15.04.2014 dotyczące działania przeciwnowotworowego ekstraktów z brzeczek fermentacyjnych grzybów endofitycznych. Wyniki badań były prezentowane na międzynarodowej konferencji „Plant-the source of research material”, która odbyła się w dniach 16-18.10. 2013 w Lublinie oraz zostały opisane w publikacji pt:” Plant endophytic fungi as a source of taxol”, zgłoszonej do redakcji czasopisma „Herba Polonica”. Ponadto opracowano procedury badawcze dotyczące badania skryningowego aktywności przeciwnowotworowej z wykorzystaniem larw krewetek oraz krążków ziemniaków, które dołączono do sprawozdania końcowego. Powyższe procedury są bardzo pomocne w badaniach przesiewowych związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym.

**D. SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**

(składane tylko w przypadku raportu końcowego, może stanowić odrębny załącznik)

**E. WYKONANE ZADANIA WEDŁUG HARMONOGRAMU**

Lp.	Nazwa zadania	Termin zakończenia (miesiąc, rok)	Koszty poniesione ze środków projektu (zł)	Koszty poniesione łącznie (zł)
1	2	3	4	5
1	Projektowanie i synteza cieczy jonowych	03-2012	25 000,00	25 000,00
2	Izolacja endofitów z leszczyny, bazylii i barwinka różowego	06-2011	25 000,00	25 000,00
3	Hodowla endofitów na pożywkach w warunkach <i>in vitro</i> , określenie parametrów wzrostu	09-2011	38 000,00	38 000,00
4	Dostosowanie biologicznych metod oceny środków przeciwnowotworowych do potrzeb badań związanych z metabolitami wtórnymi endofitów roślinnych. Opracowanie standardowych procedur roboczych do badań skryningowych w IPO	11-2011	35 000,00	35 000,00
5	Sprawdzenie aktywności przeciwnowotworowej brzeczek fermentacyjnych endofitów metodami biologicznymi	12-2011	30 000,00	30 000,00
6	Ekstrakcja taksanów z brzeczek fermentacyjnych za pomocą rozpuszczalników organicznych oraz cieczy jonowych	04-2012	37 000,00	37 000,00
7	Badanie aktywności przeciwnowotworowej uzyskanych ekstraktów	07-2012	20 000,00	20 000,00
8	Analiza chemiczna oraz spektroskopowa uzyskanych ekstraktów	06-2012	25 000,00	25 000,00
9	Optymalizacja składu podłoża hodowlanego w celu uzyskania maksymalnej ilości biomasy	12-2012	39 000,00	39 000,00
10	Sprawdzenie aktywności przeciwnowotworowej brzeczek fermentacyjnych endofitów dla poszczególnych składów podłoży hodowlanych	12-2012	22 000,00	22 000,00

11	Ekstrakcja taksanów z poszczególnych podłoży płynnych z hodowli endofitów za pomocą rozpuszczalników organicznych i cieczy jonowych	02-2013	21 000,00	21 000,00
12	Badanie działania przeciwnowotworowego ekstraktów uzyskanych z poszczególnych podłoży z hodowli endofitów metodami biologicznymi	04-2013	22 000,00	22 000,00
13	Analiza chemiczna i spektroskopowa uzyskanych ekstraktów z poszczególnych podłoży	04-2013	25 000,00	25 000,00
14	Optymalizacja biosyntezy taksanów poprzez modyfikację składu pożywek hodowlanych (dodawanie prekursorów oraz elicitorów biosyntezy)	01-2014	29 000,00	29 000,00
15	Sprawdzenie aktywności przeciwnowotworowej brzeczek fermentacyjnych z kultur endofitów hodowlanych z dodatkiem stymulatorów biosyntezy	07-2013	20 000,00	20 000,00
16	Ekstrakcja taksanów z pożywek z dodatkiem stymulatorów za pomocą rozpuszczalników organicznych i cieczy jonowych	09-2013	18 000,00	18 000,00
17	Badanie działania przeciwnowotworowego uzyskanych ekstraktów	12-2013	20 000,00	20 000,00
18	Analiza chemiczna i spektroskopowa otrzymanych ekstraktów	02-2014	25 000,00	25 000,00
19	Opracowanie raportu końcowego	04-2014	11 000,00	11 000,00
		<b>Razem</b>	<b>487 000,00</b>	<b>487 000,00</b>

## F. WYKAZ PRAC PRZYJĘTYCH DO DRUKU LUB OPUBLIKOWANYCH W WYNIKU REALIZACJI PROJEKTU

(tytuł publikacji, autorzy, wydawnictwo - nazwa, tom, rok, strony<sup>2)</sup>)

1. A. Michalczyk, A. Cieniecka-Rosłonkiewicz, M. Cholewińska „Plant endophytic fungi as a source of taxol”, 4/2014, 22-33.

## G. INNE FORMY UPOWSZECHNIENIA WYNIKÓW

(informacje o upowszechnianiu wyników uzyskanych w wyniku realizacji projektu - konferencje, sympozja, wdrożenia, patenty, Internet, liczba i nazwa pozycji zamieszczonych w publicznych bazach danych z podaniem nazwy bazy)

1. A. Michalczyk, A. Cieniecka-Rosłonkiewicz, M. Cholewińska, Ekstrakt z grzybów endofitycznych izolowanych z leszczyny i zastosowania, P.407907 zgłoszenie z dnia 15.04.2014
2. A. Michalczyk, A. Cieniecka-Rosłonkiewicz, B. Morytz “ Endophytic fungus from hazel as a source of taxanes” Materiały Konferencyjne z 3<sup>rd</sup> International Conference and Workshop- Plant-the source of research material’ –16-18.10, 2013, Lublin
1. A. Michalczyk, A. Cieniecka-Rosłonkiewicz, M. Cholewińska, A. Michalczyk, Optymalizacja procesu biosyntezy pakliatakselu w płynnych kulturach grzyba endofitycznego wyizolowanego z leszczyny, Mat. Konf. XXXVIII Międzynarodowe Seminarium Naukowo Techniczne, „Chemistry for Agriculture” 23-26 listopada 2014, Karpacz

Syntetyczny opis uzyskanych wyników z badań zostanie zamieszczony na stronie internetowej Instytutu Przemysłu Organicznego: [www.pl.ipo.waw.pl/projekty-br](http://www.pl.ipo.waw.pl/projekty-br)

## H. WYKAZ APARATURY NAUKOWO-BADAWCZEJ ZAKUPIONEJ LUB WYTWORZONEJ DO REALIZACJI PROJEKTU

1. Aparatura zakupiona  
Rok zakupu: **2011**  
Nazwa aparatury: **Wyparka rotacyjna z pompą próżniową**  
Koszty aparatury poniesione ze środków projektu: **31 604,31 zł**
  
- Aparatura zakupiona  
Rok zakupu: **2011**  
Nazwa aparatury: **Spektrofotometr z wyposażeniem**  
Koszty aparatury poniesione ze środków projektu: **38 745,00 zł**
  
- Aparatura zakupiona  
Rok zakupu: **2012**  
Nazwa aparatury: **Waga analityczna**  
Koszty aparatury poniesione ze środków projektu: **14 760,00 zł**
  
- Koszty aparatury poniesione łącznie: 85 109,31 zł**

Ze względu na zmiany kursu euro, a co za tym idzie wzrostem kosztów aparatury badawczej zostaliśmy zmuszeni do rezygnacji z realizacji części zakupów zaplanowanych w kosztorysie projektu nr N N209 133440. Zdecydowaliśmy się zrezygnować z zakupu wytrząsarki laboratoryjnej, której koszt wstępnie oszacowano na 15 000 zł. Powyższy fakt został zaakceptowany przez Panią mgr inż. Urszulę Wyrzykowską - Dyrektora Instytutu Przemysłu Organicznego.  
Kopię pisma z informacją dla Dyrekcji IPO załączono do raportu rocznego za 2011 rok.

2. Aparatura wytworzona.

*(rok wytworzenia, nazwa aparatury, koszty aparatury poniesione ze środków projektu - w zł, koszty aparatury poniesione łącznie - w zł)*

**I. OCENA REALIZACJI PROJEKTU PRZEZ JEDNOSTKĘ NAUKOWĄ**

Czy projekt ~~jest realizowany~~ / został wykonany zgodnie z harmonogramem i kosztorysem umowy oraz zgodnie z umową?

**TAK/NIE<sup>3)</sup>**

## J. SPRAWOZDANIE FINANSOWE - ZESTAWIENIE KOSZTÓW PLANOWANYCH I PONIESIONYCH (zł)

Lp.	Treść	Rok 2011		Rok 2012		Rok 2013		Rok 2014		Razem	
		Planowane	Poniesione	Planowane	Poniesione	Planowane	Poniesione	Planowane	Poniesione	Planowane	Poniesione
1	2	3	4	5	6	7	8	7	8	9	10
1	Koszty bezpośrednie realizacji projektu	185 000,00	126 399,03	97 000,00	115 780,82	99 000,00	90 025,38	0,00	48 794,77	381 000,00	381 000,00
	- wynagrodzenia wraz z pochodnymi	50 000,00	45 013,00	51 000,00	55 987,00	49 000,00	44 014,65	0,00	4 985,35	150 000,00	150 000,00
	- inne koszty bezpośrednie	135 000,00	81 386,03	46 000,00	59 793,82	50 000,00	46 010,73	0,00	43 809,42	231 000,00	231 000,008
2	Koszty pośrednie	38 200,00	38 200,00	34 300,00	34 300,00	33 500,00	30 500,00	0,00	3 000,00	106 000,00	106 000,00
3	<b>Koszty ogółem</b>	<b>223 200,00</b>	<b>164 599,03</b>	<b>131 300,00</b>	<b>150 080,82</b>	<b>132 500,00</b>	<b>120 525,38</b>	<b>0,00</b>	<b>51 794,77</b>	<b>487 000,00</b>	<b>487 000,00</b>

## K. OŚWIADCZENIA

1. Dokumentacja potwierdzająca realizację projektu znajduje się do wglądu w: Instytucie Przemysłu Organicznego, ul. Annopol 6, 03-252 Warszawa, Dział MA – Barbara Truszkowska, tel. (22)811 12 31 w. 371, truszkowska@ipo.waw.pl  
(adres, osoba upoważniona, numer telefonu, e-mail)
2. Dokumentacja dotycząca wyników realizacji projektu jest dostępna w jednostce naukowej.
3. Osoba odpowiedzialna za przygotowanie raportu: **Alicja Michalczyk**, tel. (22)811 12 31 w. 246 (346), fax. (22) 811 07 99, e-mail: michalczyk@ipo.waw.pl  
(imię i nazwisko, numer telefonu, numer faksu, e-mail)

Raport sporządzono dnia: 14.06.2014 r.

pieczęć jednostki

.....  
*podpis i pieczęć Kierownik jednostki*

.....  
*podpis i pieczęć Główny księgowy/Kwestor*

.....  
*Podpis Kierownik projektu*



- 1) Niepotrzebne skreślić.
- 2) W przypadku prac opublikowanych powinna być dołączona odbitka pracy lub kserokopia pierwszej i ostatniej strony. W przypadku prac złożonych - dokument (redakcji lub upoważnionego organu) potwierdzający przyjęcie do druku.
- 3) Niepotrzebne skreślić. Jeżeli odpowiedź NIE, należy przedstawić informację o zmianach warunków realizacji projektu wraz z uzasadnieniem.

## Projekt badawczego własny

Nr N N209133440 pt': "Wykorzystanie cieczy jonowych do otrzymywania taksanów przeciwnowotworowych z endofitów roślinnych"

### Instytut Przemysłu Organicznego

Badania prowadzone w ramach niniejszego projektu dotyczyły izolowania grzybów endofitycznych z różnych części takich roślin jak leszczyna, bazylika oraz barwinek, a także sprawdzenia ich zdolności do biosyntezy taksanów na drodze fermentacji na sztucznych pożywkach. W wyniku prac izolacyjnych otrzymano 82 gatunków grzybów endofitycznych należących do 14 różnych rodzajów. Z liści i łodyg bazyliki uzyskano 18 izolatów, z gałązek, łupin i liści leszczyny 51 izolatów, z liści łodyg i korzeni barwinka 15 izolatów,. Wstępnym badaniem pozwalającym wytypować spośród 82 izolatów grzybowych, izolaty zdolne do biosyntezy związków z grupy taksanów był test na grzybach *Oomycetes* prowadzony metodą "dual culture". W wyniku skryningu wybrano 14 gatunków grzybów, które wykazały umiarkowaną lub wysoką aktywność w stosunku do przynajmniej jednego z grzybów testowych i one też zakwalifikowały się do dalszych etapów badań. Izolaty hodowano na płynnych pożywkach zalecanych przez literaturę jako optymalne do otrzymywania taksanów w procesie fermentacji prowadzonej przez endofity. Uzyskane brzeczki fermentacyjne izolatów poddano badaniom biologicznym w teście Crown Gall Tumor Disc na krążkach ziemniaków, BSL na larwach krewetek. Aktywność brzeczek fermentacyjnych oceniano także w stosunku do trzech grzybów z klasy *Oomycetes* *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora capsici* oraz *Pythium ultimum*. Spośród zbadanych brzeczek fermentacyjnych najwyższą aktywnością we wszystkich stosowanych testach wykazały się płynne kultury izolatów C-9, C-45, C-96, C-100, O-42, O-79 i R-9, które poddano procesowi ekstrakcji za pomocą 3 rozpuszczalników organicznych oraz 5 cieczy jonowych. Zastosowane do ekstrakcji salicylan dodecyloksymetylo-3- hydroksypirydyniowy oraz salicylan dodecyloksymetylo-3-dimetyloaminopirydyniowy nie sprawdziły się jako ekstrahenty związków aktywnych z brzeczek fermentacyjnych endofitów roślinnych. Najlepszymi ekstrahentami okazały się acetonitryl, imidek bis (trifluorometylosulfonylo) 4-benzyl-4-metylomorfoliniowy oraz imidek bis-(trifluorometylosulfonylo) 4-benzyl-4-etylomorfoliniowy. Ekstrakty z brzeczek fermentacyjnych izolatów C-9 oraz O-42 uzyskanych za pomocą wyżej wymienionych rozpuszczalników charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwnowotworową niż ekstrakty uzyskane octanem etylu, chlorkiem metylenu oraz metylosiarczanem tris-(2-hydroksyetylo)metyloamoniowym. Obecność taksanów w ekstraktach z brzeczek fermentacyjnych izolatów C-9 oraz O-42 otrzymanych acetonitrylem potwierdzono w analizie TLC oraz HPLC-MS. W ekstraktach z brzeczek fermentacyjnych izolatów C-9 oraz O-42 otrzymanych za pomocą morfoliniowych cieczy jonowych oraz metylosiarczanu tris-(2-hydroksyetylo)metyloamoniowym stwierdzono obecność jonów mogących pochodzić od części węglowodorowej pochodnych taksolu, co może wskazywać, że w próbkach nastąpił rozkład tych związków. Izolaty C-9 oraz O-42 wytwarzające metabolity o najwyższej aktywności biologicznej na podstawie standardowej metodyki opisanej w literaturze zidentyfikowano jako rodzaj *Alternaria* i *Phomopsis*. Prace prowadzone nad optymalizacją parametrów wzrostu izolatów C-9 oraz O-42 wykazały, że izolat C-9 najlepszy wzrost osiągnął na pożywce M-1-D o pH =6,5, temp. 25°C po 10 dniach inkubacji, a izolat O-42 na pożywce M-1-D o pH 5.5, temp. 25°C po 14 dniach inkubacji. Wprowadzenie do pożywki M-1-D dodatkowych węglowodanów w postaci sacharozy, glukozy, zastąpienie winianu amonu octanem amonu oraz dodatek peptonu spowodowało znaczny przyrost masy izolatów C-9 oraz O-42 w porównaniu z próbą kontrolną. Ekstrakty otrzymane acetonitrylem oraz cieczami morfoliniowymi z brzeczek fermentacyjnych kultur izolatów C-9 oraz O-42 wyhodowanych na zmodyfikowanej pożywce M-1-D o następującym składzie : (KNO<sub>3</sub>-80.mg/l, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-0.5g/l, KCl-60 mg/l, MgSO<sub>4</sub> 10 mg/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x H<sub>2</sub>O-1,0mg, sacharoza-40g, octan amonu 5.0g,

FeCl<sub>3</sub> -2 mg, MnSO<sub>4</sub> 100-mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-1000 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>- 1.4mg, KI 0.7mg, ekstrakt drożdżowy- 0, 5g, mąka sojowa- 1,0g., 10g/l glukozy+ 10g/l fruktozy, wykazały wyższą aktywność we wszystkich stosowanych testach niż ekstrakty sporządzone tymi samymi rozpuszczalnikami z kultur wyhodowanych na pożywce M-1-D. Wprowadzenie do pożywki dodatkowych składników takich jak : 1g/biotyny, 1g/l tiaminy, 0,1g/l glicyny oraz 10mg/l benzoesu sodu skutkowało zwiększeniem biosyntezy taksanów, co przejawiało się wzrostem aktywności ekstraktów sporządzonych acetonitrylem oraz imidekiem bis (trifluorometylosulfonylo) 4-benzylo-4-metylomorfoliniowym oraz imidekiem bis-(trifluorometylosulfonylo) 4-benzylo-4-etylomorfoliniowym. w teście na grzybach *Oomycetes*, Crown Gall Tumor Disc oraz BSL na krewetkach.

Uzyskane wyniki badań potwierdziły możliwość otrzymywania taksanów jako metabolitów endofitycznych grzybów izolowanych z leszczyny oraz z bazylii. Dalsze postępowanie w badaniach będzie prowadziło do hodowli wytypowanych grzybów zdolnych do produkcji taksanów w fermentorach oraz prowadzenie biosyntezy taksolu z uwzględnieniem optymalizacji parametrów procesu biotechnologicznego w skali produkcyjnej. Uzyskanie dobrych wydajności biosyntezy taksolu w procesie fermentacji pozwoli na obniżenie ceny taksanów oraz zwiększy ich dostępność w terapii przeciwnowotworowej. Efektem realizacji niniejszego projektu jest zgłoszenie patentowe nr . P. 407907 z dnia 15.04.2014 dotyczące działania przeciwnowotworowego ekstraktów z brzeczek fermentacyjnych grzybów endofitycznych. Wyniki badań były prezentowane na międzynarodowej konferencji „Plant-the source of research material”, która odbyła się w dniach 16-18.10. 2013 w Lublinie oraz zostały opisane w publikacji pt:” Plant endophytic fungi as a source of taxol”, zgłoszonej do redakcji czasopisma „Herba Polonica”. Ponadto opracowano procedury badawcze dotyczące badania skryningowego aktywności przeciwnowotworowej z wykorzystaniem larw krewetek oraz krążków ziemniaków, które dołączono do sprawozdania końcowego. Powyższe procedury są bardzo pomocne w badaniach przesiewowych związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym.