

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, 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**
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: (KNO₃-80.mg/l, Ca(NO₃)₂-0.5g/l, KCl-60 mg/l, MgSO₄ 10 mg/l, NaH₂PO₄·H₂O-1,0mg, sacharoza-40g, octan amonu 5.0g, FeCl₃ -2 mg, MnSO₄ 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
		Razem	487 000,00	487 000,00

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

(tytuł publikacji, autorzy, wydawnictwo - nazwa, tom, rok, strony²⁾)

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 3rd 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

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/NIE³⁾

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	Koszty ogółem	223 200,00	164 599,03	131 300,00	150 080,82	132 500,00	120 525,38	0,00	51 794,77	487 000,00	487 000,00

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 : (KNO₃-80.mg/l, Ca(NO₃)₂-0.5g/l, KCl-60 mg/l, MgSO₄ 10 mg/l, NaH₂PO₄x H₂O-1,0mg, sacharoza-40g, octan amonu 5.0g,

FeCl₃ -2 mg, MnSO₄ 100-mg, ZnSO₄·7H₂O-1000 mg, H₃BO₃- 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.