

Załącznik nr 3

do wniosku o wszczęcie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego

AUTOREFERAT

Dr inż. Aleksandra Grudniewska

Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław 2023

SPIS TREŚCI

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne.....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4.2. Wykaz cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych.....	4
4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego.....	6
4.3.1. Wprowadzenie	6
4.3.2. Cel badań	10
4.3.3. Omówienie wyników badań	11
4.3.4. Podsumowanie	21
4.3.5. Spis literatury	22
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	28
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	28
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne.....	28
6.2. Osiągnięcia organizacyjne	29
6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę.....	30
7. Inne informacje.....	30
7.1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	30
7.2. Odbyte kursy, szkolenia i warsztaty.....	38
7.3. Otrzymane nagrody	39
7.4. Podsumowanie dorobku naukowego – wskaźniki bibliometryczne.....	40

1. Imię i nazwisko

Aleksandra Grudniewska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne

- 2010** Doktor nauk chemicznych w zakresie chemii organicznej
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii
Tytuł rozprawy: *Synteza i przekształcenia mikrobiologiczne bicyklicznych laktonów terpenoidowych*
Promotor: prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk
- 2004** Magister inżynier biotechnologii w zakresie biotechnologii żywności
Akademia Rolnicza (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności (obecnie Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności)
Tytuł pracy: *Synteza α -metyleno- γ -laktonów*
Promotor: prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk
- 2003** Inżynier biotechnologii w zakresie biotechnologii żywności
Akademia Rolnicza (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności (obecnie Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności)

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

- 12.2010 – obecnie** Adiunkt
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy (do 12.2021 r. Katedra Chemii), Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- 10.2004 – 11.2010** Asystent
Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Stáže naukowe

- 10.2012 – 03.2013** Staż podoktorski
Tokushima Bunri University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima, Japonia
Kierownik zespołu: prof. Yoshinori Asakawa
- 06.2011 – 05.2012** Staż podoktorski
Tokushima Bunri University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima, Japonia
Kierownik zespołu: prof. Toshihiro Hashimoto

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

Podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego jest cykl czterech powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie z bazy *Journal Citation Reports*. Zgodnie z wykazem MEiN (komunikat MEiN z dnia 17 lipca 2023 r.) czasopisma te przypisane są do dyscypliny *technologia żywności i żywienia*.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Zastosowanie rozpuszczalników głęboko eutektycznych oraz konwencjonalnych do izolowania wybranych związków naturalnych jako potencjalnych dodatków do żywności i suplementów diety

4.2. Wykaz cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych

C1) A. Grudniewska,* S. Hayashi, M. Shimizu, M. Kato, M. Suenaga, H. Imagawa, T. Ito, Y. Asakawa, S. Ban, T. Kumada, T. Hashimoto, A. Umeyama*: Opaliferin, a new polyketide from cultures of entomopathogenic fungus *Cordyceps* sp. NBRC 106954, *Organic Letters* **2014**, 16, 4695-4697; DOI: 10.1021/ol502216j.

IF₂₀₁₄ = **6,364**, pkt. MNiSW₂₀₁₄ = 45

Liczba cytowań (bez autocytoowań) wg bazy:

▪ *Web of Science*: 18 (18) ▪ *Scopus*: 19 (19) ▪ *Google Scholar*: 24

Mój wkład w powstanie pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu doświadczeń. Wykonałam większość prac eksperymentalnych. Samodzielnie wyizolowałam, oczyściłam i określiłam struktury poszczególnych związków na podstawie danych spektroskopowych. Opracowałam koncepcję publikacji i dokonałam przeglądu literatury dotyczącej jej tematu. Napisałam pierwszą wersję manuskryptu artykułu, przygotowałam odpowiedzi na pytania/uwagi recenzentów oraz wykonałam ostateczną korektę pracy.

C2) A. Grudniewska,* E.M. de Melo, A. Chan, R. Gniłka, F. Boratyński, A.S. Matharu*: Enhanced protein extraction from oilseed cakes using glycerol–choline chloride deep eutectic solvents: A biorefinery approach, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2018**, 6, 15791-15800; DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b04359.

IF₂₀₁₈ = **6,970**, pkt. MNiSW₂₀₁₈ = 40

Liczba cytowań (bez autocytoowań) wg bazy:

▪ *Web of Science*: 52 (50) ▪ *Scopus*: 57 (55) ▪ *Google Scholar*: 66

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu doświadczeń. Wykonałam większość prac eksperymentalnych (analizę NMR i TGA przeprowadził dr E.M. de Melo, a analizę SDS-PAGE A. Chan) oraz zinterpretowałam wszystkie uzyskane wyniki badań. Opracowałam koncepcję publikacji i dokonałam przeglądu literatury dotyczącej jej tematu. Napisałam pierwszą wersję

manuskryptu artykułu, przygotowałam odpowiedzi na pytania/uwagi recenzentów oraz wykonałam ostateczną korektę pracy.

- C3) A. Grudniewska,*** J. Popłoński: Simple and green method for the extraction of xanthohumol from spent hops using deep eutectic solvents, *Separation and Purification Technology* **2020**, 250, 11719626; DOI: 10.1016/j.seppur.2020.117196.

IF₂₀₂₀ = **7,312**, pkt. MNiSW₂₀₂₀ = 140

Liczba cytowań (bez autocytoowań) wg bazy:

▪ *Web of Science*: 26 (25) ▪ *Scopus*: 27 (26) ▪ *Google Scholar*: 31

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu doświadczeń. Wykonałam większość prac eksperymentalnych (analizę LCMS przeprowadził dr inż. Jarosław Popłoński) oraz zinterpretowałam wszystkie uzyskane wyniki badań. Opracowałam koncepcję publikacji i dokonałam przeglądu literatury dotyczącej jej tematu. Napisałam wstępną wersję manuskryptu artykułu, przygotowałam odpowiedzi na pytania/uwagi recenzentów oraz wykonałam ostateczną korektę pracy.

- C4) A. Grudniewska,*** N. Pastyrzyk: New insight for spent hops utilization: simultaneous extraction of protein and xanthohumol using deep eutectic solvents, *Biomass Conversion and Biorefinery* **2022**; DOI: 10.1007/s13399-022-03462-5.

IF₂₀₂₂ = **4,00**, pkt. MEiN₂₀₂₂ = 70

Liczba cytowań (bez autocytoowań) wg bazy:

▪ *Web of Science*: 1 (1) ▪ *Scopus*: 1 (1) ▪ *Google Scholar*: 2

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu doświadczeń. Wspólnie z magistrantką Natalią Pastyrzyk wykonałam eksperymenty oraz zinterpretowałam uzyskane wyniki badań. Opracowałam koncepcję publikacji i dokonałam przeglądu literatury dotyczącej jej tematu. Napisałam manuskrypt artykułu, przygotowałam odpowiedzi na pytania/uwagi recenzentów oraz wykonałam ostateczną korektę pracy.

* autor korespondencyjny

Sumaryczny Impact Factor (IF) publikacji **C1-C4** (zgodnie z rokiem opublikowania danej pracy): **24,646**

Sumaryczna liczba punktów ministerialnych publikacji **C1-C4** (zgodnie z wykazem MEiN/MNiSW obowiązującym w roku opublikowania danej pracy): **295**

Sumaryczna liczba cytowań (bez autocytoowań) publikacji **C1-C4** (stan z dnia 14.08.2023) wg bazy:

▪ *Web of Science*: **97 (94)** ▪ *Scopus*: **104 (101)** ▪ *Google Scholar*: **123**

Kopie powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących osiągnięcie naukowe znajdują się w załączniku nr 5.

Kopie oświadczeń autorów prac zbiorowych, stanowiących część cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, wskazujących na ich wkład w powstanie danej pracy znajdują się w załączniku nr 6.

4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.3.1. Wprowadzenie

Zrównoważone gospodarowanie zasobami naturalnymi jest aktualnie nie tylko wyzwaniem, ale i koniecznością, zarówno ze względów ekologicznych, ekonomicznych jak i socjalnych.¹ Przewiduje się, że w 2050 r. liczba ludności na świecie wyniesie 9,7 mld.,² a globalne zapotrzebowanie na żywność między 2010 a 2050 r. wzrośnie aż o 56%.³ Ze względu na ograniczone zasoby gruntów i wody oraz aspekty środowiskowe, zwłaszcza emisję gazów cieplarnianych, niezbędne jest poszukiwanie alternatywnych dla zwierzęcych źródeł białka – jednego z najważniejszych składników diety człowieka.^{4,5} Istotną kwestią jest także wzrastająca świadomość społeczeństwa na temat prozdrowotnych właściwości przyjmowanego pokarmu.⁶ Uwzględniając coraz większy popyt na odżywcze i bioaktywne składniki pochodzenia naturalnego konieczne jest opracowanie efektywnych metod ich izolowania.

Pozyskiwanie związków naturalnych z wybranych matryc wymaga zastosowania odpowiednich rozpuszczalników. Ich doboru dokonuje się w oparciu o budowę chemiczną planowanych do wyizolowania połączeń. Do ekstrakcji białek wykorzystuje się wodę, wodne roztwory zasad i soli, jak również rozpuszczalniki organiczne. Jednak najczęściej stosowana metoda izolowania protein polega na ich ekstrakcji w warunkach alkalicznych, a następnie wytrącaniu w punkcie izoelektrycznym.⁷ Do izolowania szerokiej gamy związków bioaktywnych (polifenoli, alkaloidów, steroli i in.) powszechnie stosuje się lotne rozpuszczalniki organiczne (m.in. heksan, chloroform, chlorek metylenu, aceton, metanol).⁸ Niestety, większość z nich jest toksyczna, łatwopalna i ulega długiej biodegradacji.⁹ Zwiększenie wydajności ekstrakcji można uzyskać stosując specyficzne techniki destrukcji komórek, np. za pomocą enzymów, wysokiego ciśnienia, ultradźwięków, mikrofal, czy pulsacyjnego pola elektrycznego.^{7,10} Coraz częściej do ekstrakcji wykorzystuje się przyjazne środowisku rozwiązania, np. z wykorzystaniem płynów w stanie nadkrytycznym, głównie ditlenku węgla.^{11,12} Nie zmienia to jednak faktu, że nadal poszukuje się bardziej efektywnych, selektywnych i eko-innowacyjnych metod izolowania związków pochodzenia naturalnego.

W ostatnich latach ogromną popularność zyskują rozpuszczalniki głęboko eutektyczne (DES, ang. deep eutectic solvent). DES-y to mieszaniny, które charakteryzują się znacznie niższą temperaturą topnienia, niż ich poszczególne składniki. Rozpuszczalniki te powstają poprzez zmieszanie w odpowiednim stosunku molowym co najmniej dwóch związków, z których jeden pełni funkcję dawcy wiązań wodorowych (HBD, ang. hydrogen bond

donor), a drugi ich akceptora (HBA, ang. hydrogen bond acceptor).^{13,14} Klasycznym przykładem DES-u jest relina (ang. reline), składająca się z chlorku choliny i mocznika w stosunku molowym odpowiednio 1:2. Temperatura zamarzania reliny wynosi 12 °C i jest znacznie niższa niż temperatura topnienia któregokolwiek z jej komponentów (chlorek choliny: 302 °C, mocznik: 133 °C), co umożliwia jej zastosowanie jako rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej.¹⁵ Jako HBA najczęściej wykorzystuje się czwartorzędowe sole amoniowe (np. chlorek choliny), a jako HBD poliole, amidy, kwasy karboksylowe i cukry. Mieszaniny eutektyczne uzyskane z naturalnych związków często nazywane są NADES (ang. natural deep eutectic solvent). DES-y mają wiele zalet: są łatwe w przygotowaniu, tanie, nietlone, biodegradowalne i wykazują niską toksyczność, dlatego też uznawane są za *zielone rozpuszczalniki*,¹⁴ a przez niektórych naukowców wręcz jako *rozpuszczalniki XXI wieku*.¹⁶ DES-y najczęściej stosowane są do izolowania związków fenolowych,^{17,18} jednak ze względu na ogromną różnorodność HBA i HBD pula ekstrahowanych za ich pomocą związków ciągle wzrasta.¹⁹

W procesie izolowania związków naturalnych równie istotne jak rodzaj odpowiedniego rozpuszczalnika jest także dostępność, cena i pochodzenie wyjściowego surowca. Jako źródło odżywczych i/lub bioaktywnych substancji wykorzystuje się rośliny, mikroorganizmy, grzyby, owady, czy organizmy morskie. Tanim i atrakcyjnym surowcem są także produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego, których zagospodarowanie, zgodnie z koncepcją biorafinacji, umożliwia otrzymanie szeregu cennych produktów.^{20,21} Należy jednak dodać, iż wybór odpowiedniej biomasy jest uzależniony od zawartości w niej pożądaných związków.

W prowadzonych przeze mnie badaniach, opisanych w publikacjach **C1-C4**, materiałem wyjściowym stosowanym do izolowania wybranych związków naturalnych były entomopatogeniczne grzyby z rodzaju *Cordyceps* (**C1**) oraz produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego: **wytłoki nasion roślin oleistych (makuch rzepakowy i wiesiołkowy, C2)** oraz **wychmieliny (C3 i C4)**.

- *Cordyceps* to rodzaj grzybów z gromady *Ascomycota* obejmujący ponad 700 gatunków, z których większość jest patogeniczna względem owadów lub innych stawonogów. *Cordyceps* spp. występują w różnych rejonach świata, ale głównie na terenie Azji Południowej, Europy i Ameryki Północnej.²² Jednym z najbardziej znanych gatunków jest *Cordyceps sinensis* (syn. *Ophiocordyceps sinensis*; polska nazwa: maczuźnik chiński), którego atrybuty wykorzystywane są od setek lat w chińskiej medycynie ludowej. Grzyby

te występują na terenach Płaskowyżu Tybetańskiego na wysokości 3000–5000 m n.p.m., a ich unikatowe właściwości przypisuje się produkowanym przez nie związkom z grupy nukleozydów, steroli, polisacharydów, peptydów i in.^{23,24} *C. sinensis* wykorzystywany jest do łagodzenia objawów licznych schorzeń, w tym układu oddechowego, nerwowego, krążenia, a także nerek i wątroby. Wykorzystywane są także w leczeniu dolegliwości związanych z obniżonym libido, stresem, zmęczeniem i starzeniem się.^{23,25} Warto dodać, że *C. sinensis* znajduje się w *Katalogu Nowej Żywności* opracowanym przez Komisję Europejską.²⁶

Popularność maczużnika chińskiego drastycznie wzrosła po 1993 r., kiedy chińskie biegaczki odniosły spektakularny sukces podczas mistrzostw świata w lekkoatletyce, a ich trener wyjawiał, że suplementowały się naparem z *C. sinensis*. Zwiększone zainteresowanie spowodowało nie tylko wzrost ceny tych grzybów (do 60 000 USD/kg), ale także doprowadziło do znacznego zmniejszenia ich zasobów naturalnych.^{27,28} Ponieważ hodowla *C. sinensis* w sztucznych warunkach jest trudna, zintensyfikowano badania nad poszukiwaniem alternatywnych grzybów z tego rodzaju zdolnych do syntezy bioaktywnych związków i wzrostu w kontrolowanych warunkach.^{29,30,31} W tym kontekście największe znaczenie odgrywa maczużnik bojowy (*C. militaris*), który hodowany jest w skali przemysłowej, głównie w Azji.^{32,33} Należy podkreślić, że badania również innych gatunków *Cordyceps* spp. przyczyniają się do poszerzenia wiedzy na temat produkowanych przez nie związków, które mogą znaleźć zastosowanie zarówno w przemyśle spożywczym jak i farmaceutycznym.

- W procesie tłoczenia oleju z nasion roślin oleistych powstaje 62-70% produktów ubocznych w postaci **wytłoków (makuchów)**.^{34,35} Do ekstrakcji resztkowego oleju z makuchów wykorzystuje się *n*-heksan,³⁶ a uzyskane w ten sposób pozostałości biomasy nazywane są śrutą poekstrakcyjną.

Rzepak (*Brassica napus* L.) jest drugą po soi rośliną oleistą uprawianą na świecie.³⁷ Zarówno makuch jak i śruta rzepakowa wykorzystywane są jako pasza dla zwierząt. Zawartość białka w nasionach rzepaku mieści się w zakresie 17,5-24,6%, w makuchach 31-35%, a w śrucie poekstrakcyjnej 32,6-44,8%.³⁸ Głównymi białkami zapasowymi występującymi w nasionach rzepaku są krucyferyna (globulina, 11S, 300-350 kDa) i napina (albumina, 2S, 12-16 kDa), które stanowią 80% całkowitej zawartości białka w dojrzałych nasionach (60% krucyferyna i 20% napina). Nasiona *B. napus* zawierają także białka strukturalne, takie jak oleozyny (2-8% wszystkich białek nasion, 18-25 kDa) oraz białka

transportujące lipidy (LTPs, ang. lipid transfer proteins). Białka rzepakowe posiadają dobrze zbilansowany skład aminokwasowy i są uznawane za białka wysokiej jakości, porównywalne z tymi izolowanymi z mleka i jaj.^{39,40}

Czynnikami ograniczającymi wykorzystanie makuchów rzepakowych jako źródła białka przeznaczonego do celów spożywczych jest obecność niepożądanych związków, takich jak glukozynolany, fityniany i związki fenolowe. Większość związków fenolowych to wolne bądź zestryfikowane kwasy karboksylowe (głównie synapina, ok. 1%) oraz skondensowane taniny (do 3%).^{41,42} Związki te ekstrahowane są wraz z białkami w warunkach alkalicznych (stosowanych najczęściej do izolowania białek roślinnych) i odpowiadają za ciemną barwę i gorzki smak uzyskanych preparatów.⁴³ Jak wskazują dane literaturowe zarówno ultrafiltracja jak i diafiltracja mogą znacznie obniżyć poziom niektórych składników antyodżywczych.^{44,45}

Wraz ze wzrostem zapotrzebowania na białka roślinne, rozwijają się technologie pozyskiwania białka rzepakowego. Istnieje kilka firm zajmujących się tym zagadnieniem: NapiFeryn BioTech (Polska),⁴⁶ Burcon NutraScience Corporation (Canada),⁴⁷ TEUTEXX (Canada),⁴⁸ DSM (Holandia).⁴⁹ Według mojej najlepszej wiedzy preparaty zawierające białka rzepakowe nie są jeszcze stosowane jako składniki żywności. Izolowanie białek rzepakowych przeznaczonych do celów spożywczych jest dużym wyzwaniem, dlatego też wskazana jest intensyfikacja badań w tym zakresie.

Olej z wiesiołka dwuletniego (*Oenothera biennis* L.) wzbudza zainteresowanie ze względu na wysoką zawartość kwasu γ -linolenowego (6,9–12,6%) i stosowany jest zarówno w celach spożywczych jak i medycznych.⁵⁰ Wykorzystywany jest w leczeniu różnych dolegliwości, w tym chorób reumatycznych, egzemy, łuszczycy, zespołu napięcia przedmiesiączkowego i menopauzy oraz neuropatii cukrzycowej.⁵¹

Nasiona *O. biennis* L. zawierają 13-18% białka, a pozyskane z nich makuchy 21-25%. Białka wiesiołka są bogate w aminokwasy siarkowe, ale ubogie w lizynę. Stosowanie makuchów wiesiołkowych jako paszy dla zwierząt jest ograniczone ze względu na ich niską strawność. Wysoki poziom tanin (12–14%) i błonnika pokarmowego (22–23%) ma negatywny wpływ na biodostępność zawartego w nich białka.^{52,53,54}

- Chmiel (*Humulus lupulus* L.) jest jednym z niezbędnych składników stosowanych do produkcji piwa. Charakterystyczny aromat i gorzki smak tego napoju uzyskuje się poprzez dodatek wysuszonych szyszek chmielowych lub pozyskiwanych z nich preparatów w postaci granulatów bądź ekstraktów chmielowych.^{55,56} W przemyśle piwowarskim

wykorzystuje się m.in. ekstrakty otrzymywane przy użyciu ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Metoda ta umożliwia bardzo efektywne izolowanie gorzkich kwasów i olejków chmielowych.^{57,58} Substancje polarne, w tym flawonoidy i białka, nie są ekstrahowane w tych warunkach i pozostają w produkcie ubocznym tego procesu – **wychmielinach**.⁵⁹

Głównym flawonoidem występującym w szyszkach chmielowych (0,1–1% suchej masy) jest ksantohumol (XN). Związek ten posiada bardzo szerokie spektrum aktywności biologicznych. Udowodniono jego działanie m.in. przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe.^{60,61} Chmiel jest głównym naturalnym źródłem XN i w tym ujęciu wychmieliny stanowią cenny surowiec do jego pozyskiwania. Warto także zaznaczyć, że wychmieliny zawierają ok 30% białka,⁶² a więc można je uznać za atrakcyjne źródło protein roślinnych.²⁰ Niestety, ze względu na gorzki smak zastosowanie wychmielin np. jako dodatku do żywności, czy pasz dla zwierząt jest ograniczone, dlatego też wykorzystywane są one głównie jako nawóz.^{63,64} Uzasadnione wydaje się zatem poszukiwanie sposobów zrównoważonego zagospodarowania tych produktów ubocznych i opracowanie efektywnych metod izolowania z nich wartościowych związków, w tym XN i białek.

4.3.2. Cel badań

Celem osiągnięcia będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego było opracowanie efektywnych (innowacyjnych lub konwencjonalnych) metod izolowania wybranych związków naturalnych ze źródeł, których potencjał nie został dotąd doceniony bądź nie znaleziono rozwiązań ich racjonalnego wykorzystania.

Realizacja badań ujętych w niniejszym osiągnięciu pozwoliła zweryfikować hipotezę, która zakładała, że zastosowanie rozpuszczalników głęboko eutektycznych lub konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych umożliwia pozyskanie z określonych surowców związków, które mogą znaleźć zastosowanie jako dodatki do żywności i suplementy diety.

Cykl publikacji stanowiący osiągnięcie naukowe obejmuje wyniki badań, które dotyczą:

- Izolowania poliketydów z entomopatogenicznych grzybów *Cordyceps* sp. NBRC 106954 za pomocą rozpuszczalników konwencjonalnych (C1),
- Izolowania białek z wytlóków nasion roślin oleistych za pomocą rozpuszczalników głęboko eutektycznych (C2),
- Izolowania ksantohumolu i białek z wychmielin za pomocą rozpuszczalników głęboko eutektycznych (C3 i C4).

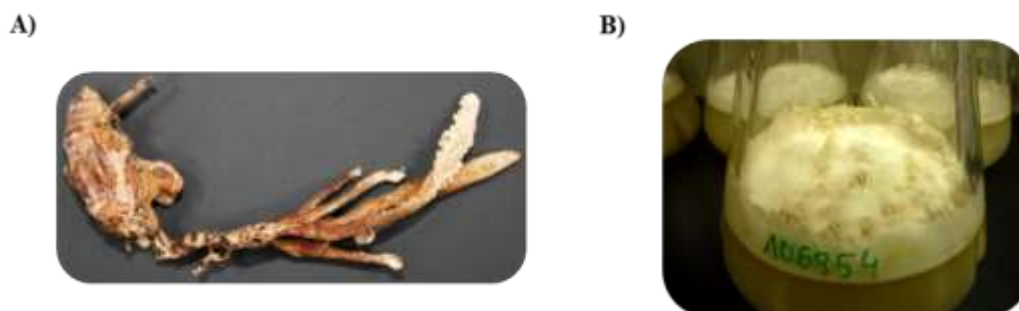
4.3.3. Omówienie wyników badań

- **Izolowanie poliketydów z entomopatogenicznych grzybów *Cordyceps* sp. NBRC 106954 za pomocą rozpuszczalników konwencjonalnych**

C1) A. Grudniewska, S. Hayashi, M. Shimizu, M. Kato, M. Suenaga, H. Imagawa, T. Ito, Y. Asakawa, S. Ban, T. Kumada, T. Hashimoto, A. Umeyama: Opaliferin, a new polyketide from cultures of entomopathogenic fungus *Cordyceps* sp. NBRC 106954, *Organic Letters* **2014**, 16, 4695-4697; DOI: 10.1021/ol502216j.

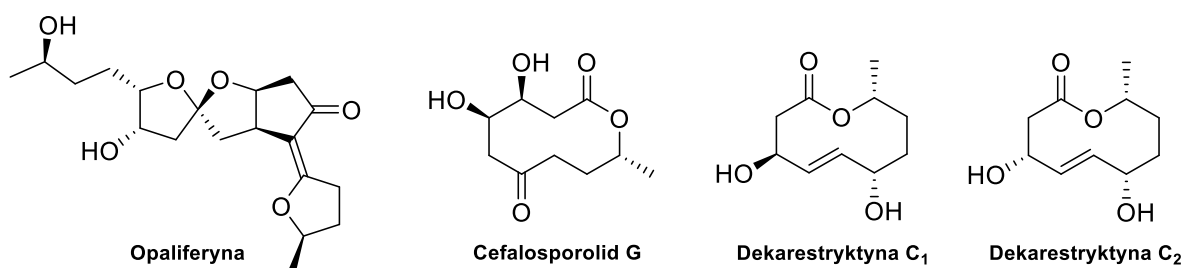
Pierwsza z cyklu prac związanych z izolowaniem związków ze źródeł naturalnych dotyczy metabolitów z grupy poliketydów, produkowanych przez entomopatogeniczne grzyby z rodzaju *Cordyceps*. W doświadczeniach opisanych w artykule C1 zarówno do ekstrakcji, jak i do oczyszczania poszczególnych połączeń wykorzystano konwencjonalne rozpuszczalniki organiczne (metanol, octan etylu, *n*-butanol, chloroform, heksan, aceton). Badania te wykonałam podczas stażu podoktorskiego w Tokushima Bunri University w laboratorium kierowanym przez prof. Toshichiro Hashimoto.

Cordyceps sp. NBRC 106954 wyizolowano z owocnika występującego na larwie cykady *Meimuna opalifera* (Rys. 1A). Przynależność tych grzybów do *Cordyceps* sp. potwierdzono w oparciu o analizę taksonomiczną, która obejmowała zarówno charakterystykę morfologiczną, jak i porównanie sekwencji regionów rDNA z danymi zamieszczonymi w bazie GenBank. Aby wyizolować i określić strukturę związków syntezowanych przez *Cordyceps* sp. NBRC 106954 niezbędne było przygotowanie odpowiedniej ilości biomasy. W tym celu grzyby hodowano przez 30 dni w 1-litrowych kolbach Erlenmayera na agarowo-sacharozo-ziemniaczanej pożywce w temperaturze 28 °C (Rys. 1B). Po narośnięciu biomasy pożywkę oddzielono od grzybni, rozdrobniono, a następnie poddano ekstrakcji metanolem w łaźni ultradźwiękowej. Po odparowaniu alkoholu, do otrzymanego ekstraktu dodano wodę, a zawarte w nim związki ekstrahowano octanem etylu.



Rysunek 1. Larwa cykady *Meimuna opalifera* zainfekowana *Cordyceps* sp. NBRC 106954 (A) oraz *Cordyceps* sp. NBRC 106954 wyhodowane w warunkach laboratoryjnych (B).

Metabolity rozpuszczalne w warstwie organicznej frakcjonowano stosując metodę chromatografii kolumnowej. W artykule omówiono strukturę związków występujących w jednej z tak otrzymanych frakcji. Przed przystąpieniem do analizy strukturalnej poszczególnych połączeń (nie dysponując ich wzorcami) konieczne było ich rozdzielenie i oczyszczenie. W tym celu także wykorzystano metodę chromatografii kolumnowej. Wyizolowano cztery związki z grupy poliketydów, których budowę ustalono w oparciu o dane spektroskopowe (NMR, HR-MS, IR). Trzy spośród otrzymanych połączeń okazały się związkami znanymi, były to: cefalosporolid G oraz dekarestryktyna C₁ i C₂ (Rys. 2). Ich dane fizykochemiczne oraz spektroskopowe są zgodne z tymi opisanymi w literaturze.^{65,66} Jeden z wyizolowanych związków, nazwany opaliferyną (od nazwy cykady z której wyizolowano grzybnię) okazał się związkiem nowym, dotąd nieopisanym (Rys. 2).



Rysunek 2. Wzory związków wyizolowanych z kultur *Cordyceps* sp. NBRC 106954.

Budowę opaliferyny, określoną na podstawie widm 1D i 2D NMR, potwierdzono metodami rentgenograficznymi. Związek ten zawiera ugrupowanie spiroacetalowe, charakterystyczne dla wielu biologicznie aktywnych połączeń.⁶⁷ Warto zwrócić szczególną uwagę na unikatowy fragment w strukturze opaliferyny, w którym pierścienie cyklopentanonu i tetrahydrofuranu połączone są egzocyklicznym wiązaniem podwójnym. Dotychczas taki układ zidentyfikowano jedynie w oudenonie – związku wyizolowanym z grzybów *Hymenopellis (Oudemansiella) radicata* (polska nazwa: pieniążkówka gładkotrzonowa).⁶⁸

Aby określić budowę przestrzenną opaliferyny otrzymano jej krystaliczną pochodną – di-(*p*-bromobenzoilo)opaliferynę. Konfigurację absolutną wszystkich centrów stereogenicznych tego związku, a tym samym opaliferyny, ustalono w oparciu o badania rentgenograficzne, uwzględniając efekt anomalnej dyspersji podczas dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na badanym kryształ.

W artykule zaproponowano także ścieżkę biosyntezy opaliferyny. Ponadto związek ten przebadano pod kątem aktywności antytypanosomalnej i antymalarycznej. Nie

zaobserwowano istotnej aktywności hamującej (w stężeniu 100 μM) wobec *Trypanosoma brucei brucei* i *Plasmodium falciparum*. Opaliferyna wykazała słabą aktywność cytotoksyczną wobec trzech nowotworowych linii komórkowych: HSC-2 (rak płaskonabłonkowy jamy ustnej), HeLa (rak szyjki macicy) i RERF-LC-KJ (gruczolakorak płuc). Związek ten w stężeniu 100 μM hamował odpowiednio 60% proliferacji komórek HSC-2, 30% komórek HeLa i 20% komórek RERF-LC-KJ.

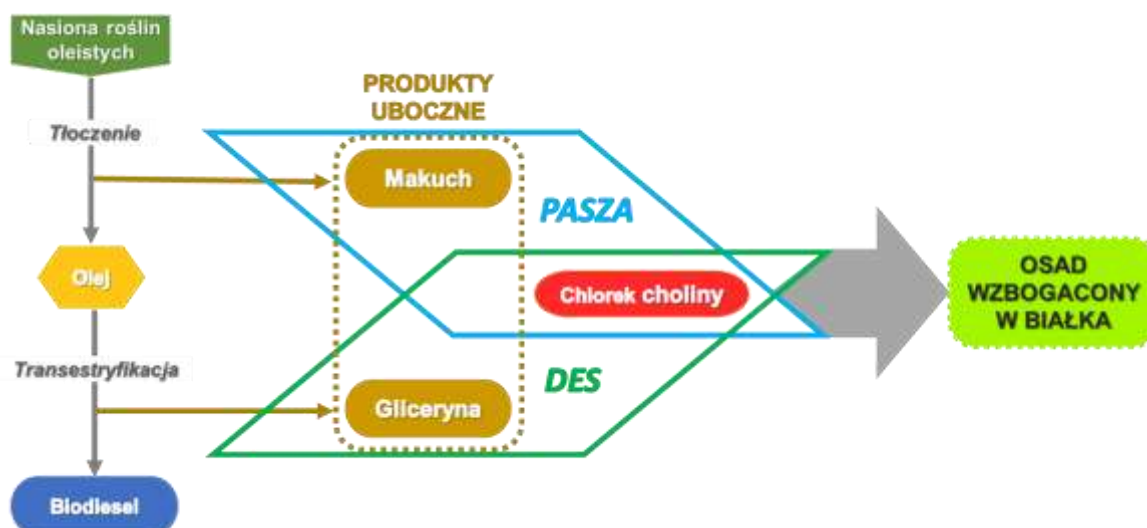
Przedstawione w artykule **C1** wyniki badań przyczyniają się do poszerzenia zakresu wiedzy na temat związków syntezowanych przez grzyby z rodzaju *Cordyceps*.

Z satysfakcją stwierdzam, że opaliferyna budzi zainteresowanie innych grup badawczych. Na Uniwersytecie w Auckland (Nowa Zelandia) prowadzone są badania nad chemiczną syntezą tego związku.⁶⁹ Niestety, jak dotąd nie pojawiła się publikacja naukowa wskazująca na sukces w tym zakresie.

- **Izolowanie białek z wyłoków nasion roślin oleistych za pomocą rozpuszczalników głęboko eutektycznych**

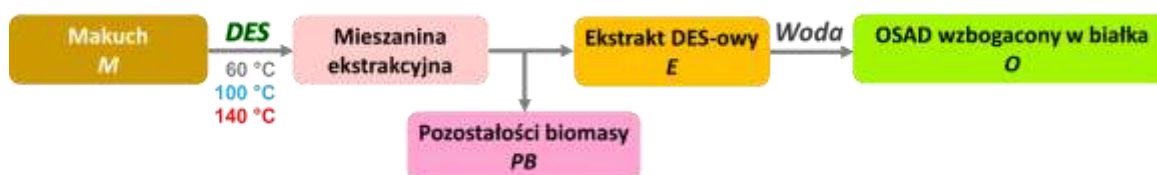
C2) A. Grudniewska, E.M. de Melo, A. Chan, R. Gniłka, F. Boratyński, A.S. Matharu: Enhanced protein extraction from oilseed cakes using glycerol–choline chloride deep eutectic solvents: A biorefinery approach, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2018**, 6, 15791-15800; DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b04359.

Celem badań opisanych w publikacji **C2** było wyizolowanie białek za pomocą DES z makuchów otrzymanych po tłoczeniu na zimno oleju z nasion rzepaku (*B. napus* L.) oraz wiesiołka dwuletniego (*O. biennis* L.). W doświadczeniach wykorzystano DES składający się z chlorku choliny i glicerolu (w stosunku molowym odpowiednio 1:2), który znany jest pod nazwą glicelina (ang. gliceline). Motywacją do zastosowania tego rozpuszczalnika była cena oraz dostępność jego poszczególnych komponentów. Związki te posiadają status GRAS (ang. generally recognized as safe), co także było ważnym kryterium podczas ich wyboru.⁷⁰ Chlorek choliny stosowany jest jako dodatek do pasz dla zwierząt, a gliceryna wykorzystywana jest w przemyśle kosmetycznym oraz jako dodatek do żywności (E422).^{71,72} Istotnym czynnikiem wyboru glicerolu jako donora wiązań wodorowych (HBD), był fakt, że jest to produkt uboczny (10% wag.) produkcji biodiesla.⁷³ Realizacji badań opisanych w artykule przyświecała idea holistycznego wykorzystania produktów ubocznych przemysłu olejarskiego (makuchów, gliceryny), zgodnie z koncepcją biorafinacji, oraz włączenie do tego procesu chlorku choliny (Rys. 3).



Rysunek 3. Holistyczne podejście stosowane do otrzymywania osadów wzbogaconych w białka z produktów ubocznych przemysłu olejarskiego za pomocą DES.

Poszczególne etapy otrzymywania preparatów białkowych z makuchów (M) w sposób uproszczony przedstawiono na Rys. 4. W pierwszym etapie wytlóki ekstrahowano gliceliną (2 godz., przy ciągłym mieszaniu) w 60, 100 i 140 °C. Zastosowano dziewięciokrotny nadmiar wagowy DES w stosunku do makuchów. Następnie otrzymane ekstrakty (E) oddzielano od pozostałości biomasy (PB) poprzez wirowanie. Osady wzbogacone w białka (O) wytrącano z poszczególnych ekstraktów (supernatantów) poprzez dodanie do nich odpowiedniej ilości wody jako antyrozpuszczalnika i inkubowaniu przez 12 godz. w 4 °C. Uzyskane precypitaty oddzielano od roztworu poprzez wirowanie lub filtrację, przemywano wodą w celu usunięcia pozostałości DES, a następnie liofilizowano i ważono.



Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie metody izolowania białek z makuchów za pomocą DES.

W zależności od temperatury ekstrakcji z makucha rzepakowego otrzymano 11,5-19,9 g O/100 g M, a z wiesiołkowego 8,4-34,2 g O/100 g M. Zmiana temperatury z 60 na 140°C skutkowałą blisko 2-krotnym zwiększeniem ilości powstającego osadu w przypadku wytlóków rzepakowych i ponad 4-krotnym wzrostem w przypadku wytlóków z nasion wiesiołka. Warto zwrócić szczególną uwagę na barwę tych preparatów. Stosując temperaturę ekstrakcji 60 lub 100 °C z makucha rzepakowego otrzymano osady o barwie

jasnobeżowej. Wzrost temperatury do 140 °C skutkował powstawaniem ciemnobrązowych preparatów, co prawdopodobnie związane jest z procesem ciemnienia nieenzymatycznego. Wszystkie osady uzyskane z wycieków wiesiołkowych posiadają barwę brązową, ale jej intensywność pogłębia się wraz ze wzrostem temperatury ekstrakcji. Zabarwienie to może być związane z obecnością związków fenolowych, takich jak taniny czy antocyjanidyny, które syntezowane są przez rośliny z rodzaju *Oenothera*.⁷⁴

Obecność białek w osadach wytrąconych z ekstraktów DES-owych potwierdzono na podstawie szczegółowej interpretacji widm ¹³C CP-MAS NMR, ATR-IR oraz wyników analizy termogravimetrycznej (TGA). Uzyskane dane wskazują, że w skład osadów wchodzi także ligniny. Ponadto precypitaty z makucha rzepakowego zawierają niewielkie ilości polisacharydów. Potwierdzono również, iż w porównaniu z osadami z wycieków rzepakowych, preparaty z wycieków wiesiołkowych zawierają znacznie większe ilości związków fenolowych, co może być przyczyną ich ciemnej barwy.

Zawartość białka (obliczona na podstawie całkowitej zawartości azotu oznaczonej metodą analizy elementarnej; N % x 6,25) w osadach pozyskanych z makucha rzepakowego wynosi od 36 do 48%, natomiast w tych z wiesiołka od 40 do 50%. Wartości te zwiększają się wraz ze wzrostem temperatury ekstrakcji i są wyższe niż w wyjściowej biomacie (makuch rzepakowy: 32 %, makuch wiesiołkowy: 27%).

Na podstawie analizy SDS-PAGE w osadach otrzymanych podczas ekstrakcji makuchów rzepakowych w 60 i 100 °C zidentyfikowano pasma polipeptydowe pochodzące od krucyferyny – głównego białka występującego w nasionach *B. napus*. Nie potwierdzono natomiast obecność napiny. Pasma polipeptydowe charakterystyczne dla białek występujących w makuchu wiesiołkowym zidentyfikowano także w pozyskanych z nich osadach (w 60 i 100 °C). Elektroforetyczny rozdział protein otrzymanych w wyniku ekstrakcji w 140 °C był utrudniony, co może wynikać z szeregu przemian zachodzących w tak wysokiej temperaturze pomiędzy składnikami osadów.

Zgodnie z moją najlepszą wiedzą w publikacji **C2** po raz pierwszy przedstawiono możliwość zastosowania DES do izolowania białek z wycieków nasion roślin oleistych. Jest to także pierwsza praca, w której opisano metodę izolowania białek roślinnych za pomocą gliceliny. W artykule zwrócono uwagę na potrzebę przeprowadzenia dodatkowych badań otrzymanych osadów (np. określenie zawartości substancji antyodżywczych i właściwości funkcjonalnych), aby móc brać pod uwagę ich zastosowanie w celach spożywczych.

- **Izolowanie ksantohumolu i białek z wychmielin za pomocą rozpuszczalników głęboko eutektycznych**

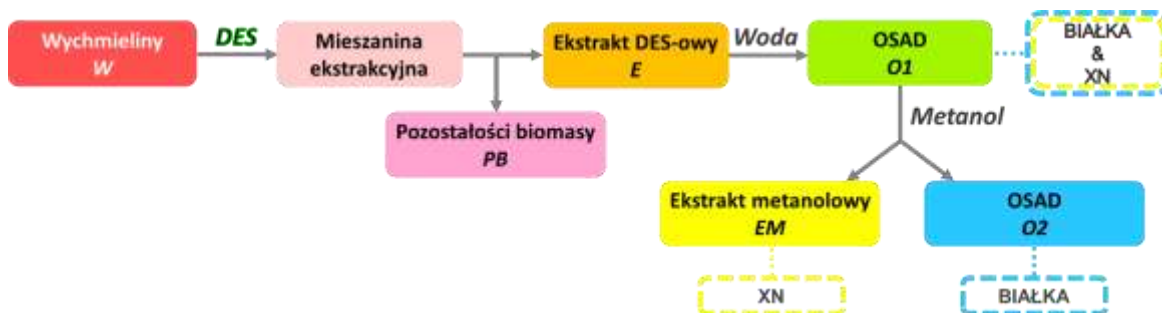
- C3)** A. Grudniewska, J. Popłoński: Simple and green method for the extraction of xanthohumol from spent hops using deep eutectic solvents, *Separation and Purification Technology* **2020**, 250, 11719626; DOI: 10.1016/j.seppur.2020.117196.
- C4)** A. Grudniewska, N. Pastyrzyk: New insight for spent hops utilization: simultaneous extraction of protein and xanthohumol using deep eutectic solvents, *Biomass Conversion and Biorefinery* **2022**; DOI: 10.1007/s13399-022-03462-5.

W publikacjach **C3** i **C4** opisano metodę izolowania za pomocą DES związków naturalnych z wychmielin (W) – produktu ubocznego przemysłu piwowarskiego. W artykule **C3** przedstawiono badania dotyczące ekstrakcji ksantohumolu (XN), doboru optymalnych warunków tego procesu oraz recyklingu DES. W pracy **C4** wskazano na możliwość jednoczesnego izolowania XN i białek z wychmielin za pomocą DES, lecz skoncentrowano się głównie na analizie preparatów białkowych otrzymanych tą metodą. W przeprowadzonych badaniach do ekstrakcji stosowano cztery rozpuszczalniki głęboko eutektyczne (ChCl-Gly, ChCl-Eg, ChCl-Pg i ChCl-Lac), w których akceptorem wiązań wodorowych (HBA) był chlorek choliny (ChCl), a donorem wiązań wodorowych (HBD) glicerol (Gly), glikol etylenowy (Eg), glikol propylenowy (Pg) lub kwas mlekowy (Lac). Stosunek molowy HBA do HBD w otrzymanych DES-ach wynosił 1:2. Wyboru tych rozpuszczalników dokonano ze względu na stabilność otrzymanych mieszanin, a także dostępność i niski koszt ich poszczególnych składników.^{75,76}

W badaniach wstępnych (opisanych w publikacji **C3**) ekstrakcję XN prowadzono w temp. 60 °C przez 1 godz. przy ciągłym mieszaniu (500 obr./min.), stosując 10-krotny nadmiar wagowy poszczególnych DES w odniesieniu do wychmielin. Aby oddzielić otrzymane ekstrakty (E) od pozostałości biomasy (PB) niezbędne było zastosowanie skonstruowanej specjalnie do tego celu prasy filtracyjnej. Ze względu na dużą lepkość mieszanin ekstrakcyjnych zarówno wirowanie, jak i filtracja nie przynosiły bowiem oczekiwanych rezultatów.

W kolejnym etapie badań analizowano zawartości XN w uzyskanych ekstraktach. Uwzględniając, iż związek ten bardzo słabo rozpuszcza się w wodzie wytrącano go poprzez dodatek do ekstraktów DES-owych odpowiedniej ilości wody, jako antyrozpuszczalnika, a następnie chłodzeniu w 4 °C przez 12 godz. Wytrącone osady (O-1) oddzielano od roztworu poprzez wirowanie. W celu oznaczenia zawartości XN w precypitatach O-1 ekstrahowano go metanolem, w którym XN bardzo dobrze się

rozpuszcza, a następnie otrzymane ekstrakty (EM) analizowano za pomocą HPLC. Aby określić skład frakcji nierozpuszczonych w metanolu (O-2) niezbędne było zwiększenie skali procesu oraz przeprowadzanie dodatkowych eksperymentów; wyniki tych badań omówię w dalszej części niniejszego podrozdziału. Na Rys. 5 w sposób uproszczony przedstawiłam etapy opracowanej metody.



Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie metody izolowania ksantohumolu (XN) i białek z wychmielin za pomocą DES.

Na podstawie analizy HPLC ekstraktów metanolowych potwierdzono, że XN jest ich głównym składnikiem ($\geq 93\%$). Dysponując krzywą kalibracyjną XN określono jego zawartość w poszczególnych próbkach. Wydajność ekstrakcji była zbliżona przy zastosowaniu ChCl-Eg, ChCl-Pg i ChCl-Lac (0,68-0,75 mg XN/g W), a najmniej efektywny okazał się ChCl-Gly (0,42 mg XN/g W).

Opartą na DES metodę ekstrakcji XN porównano z metodami konwencjonalnymi. Stosując aceton lub metanol (10 ml/g W) otrzymano ekstrakty zawierające znacznie większe ilości XN, odpowiednio 3,31 i 4,45 mg/g W. Warto jednak podkreślić, że uzyskane w ten sposób roztwory posiadały ciemnozieloną barwę, podczas gdy w metodzie z zastosowaniem DES otrzymano ekstrakty alkoholowe o barwie jasnożółtej, co wskazuje na jej selektywność. Powszechnie wiadomo, że ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi jest nieselektywna, a procedury rozdziału i oczyszczania poszczególnych komponentów są wieloetapowe, czasochłonne i wymagają użycia dużej ilości lotnych rozpuszczalników. Etapy te znacznie zmniejszają wydajność izolowaną poszczególnych związków.^{55,77} Przykładowo, Anioł i wsp. otrzymali 2,04 g XN z 1 kg wychmielin; do ekstrakcji stosowano aceton, a XN oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej z wykorzystaniem chloroformu i metanolu, a następnie poprzez krystalizację z chlorku metylenu.⁷⁸

W celu zwiększenia wydajności ekstrakcji XN za pomocą DES przeprowadzono optymalizację tego procesu. Uwzględniono przy tym takie parametry jak: dodatek

wody do DES (0, 10, 20, 30 i 40%, w/w), stosunek W/DES (1:10, 1:20, 1:40 i 1:50, w/w), stosunek antyrozpuszczalnik/DES (3:1, 4:1 i 5:1, v/w), temperatura (40, 50, 60, 70, 80 °C) i czas ekstrakcji (15, 30, 60 i 120 min.).

Otrzymane wyniki badań potwierdziły, że zawartość wody w DES znacznie wpływa na proces ekstrakcji XN. Dodanie wody powoduje zmniejszenie lepkości mieszanin eutektycznych, umożliwiając jednocześnie lepszy transfer masy.^{79,80} Najlepsze rezultaty uzyskano stosując dodatek wody w ilości 10% do ChCl-Eg oraz 5% do ChCl-Gly, ChCl-Pg i ChCl-Lac, zwiększając tym samym średnią wydajność ekstrakcji XN odpowiednio o 45, 65, 21 i 28%.

Badając wpływ stosunku W/DES oraz antyrozpuszczalnik/DES (eksperymenty prowadzono w 60 °C przez 60 min.) najwięcej XN (2,30 mg/g W) uzyskano za pomocą ChCl-Pg z 5% dodatkiem wody, stosując 50-krotny nadmiar DES w odniesieniu do wychmielin i 3-krotny nadmiar antyrozpuszczalnika w stosunku do DES. Nieco niższe wartości otrzymano używając ChCl-Eg z 10% dodatkiem wody, przy zachowaniu stosunku W/DES 1:40 (2,09 mg XN/g W) i 1:50 (2,25 mg XN/g W). W tych wariantach ilość wody stosowanej jako antyrozpuszczalnik nie miała większego znaczenia. Stosując ChCl-Gly i ChCl-Lac obserwowano wzrost wydajności ekstrakcji XN wraz ze zwiększaniem stosunku W/DES z 1:10 do 1:40. Rozpuszczalniki te okazały się jednak znacznie mniej efektywne, otrzymano maksymalnie 1,13 i 1,51 mg XN/g W, odpowiednio za pomocą ChCl-Gly i ChCl-Lac.

Do badań nad wpływem temperatury i czasu na ilość ekstrahowanego XN wybrano ChCl-Eg oraz ChCl-Pg, przy zachowaniu optymalnych opisanych powyżej parametrów. Udowodniono, iż wraz ze wzrostem temperatury z 40 do 60 °C następuje poprawa wydajności ekstrakcji XN, natomiast dalsze podwyższenie temperatury wpływa negatywnie na ten proces, co prawdopodobnie związane jest z degradacją XN. Analizując wpływ czasu na ekstrakcję XN zaobserwowano, że wskazane jest prowadzenie tego procesu przez 30 min. stosując ChCl-Eg oraz 60 min. przy zastosowaniu ChCl-Pg. Reasumując, dobór odpowiednich parametrów umożliwił znaczne zwiększenie wydajności ekstrakcji XN, w przypadku ChCl-Pg wartość ta wzrosła aż 3-krotnie.

W artykule **C3** opisano także możliwość odzyskania i ponownego użycia DES. Eksperymenty prowadzono stosując warunki, w których uzyskano największą ilość XN (2,30 mg/g W): ChCl-Pg z 5% dodatkiem wody, stosunek W/DES 1:50, stosunek antyrozpuszczalnik/DES 5:1, 60°C, 60 min. Procedura odzyskiwania rozpuszczalnika eutektycznego polegała na odparowaniu wody pod zmniejszonym ciśnieniem

z supernatantu oddzielonego od osadu O-1, a następnie jej uzupełnieniu do odpowiedniej wartości (5% w stosunku do DES, w/w). Udowodniono, iż ChCl-Pg można wykorzystać co najmniej 3-krotnie, bez znaczącego wpływu na ilość ekstrahowanego XN.

Jak wcześniej wspomniano, aby określić skład osadów nierozpuszczalnych w metanolu (O-2) niezbędne było przeprowadzenie doświadczeń w większej skali – zakres tych badań przedstawiono w publikacji **C4**.

Zwiększając 8-krotnie skalę procesu (przy zachowaniu optymalnych warunków ekstrakcji omówionych w artykule **C3**) otrzymano od 2,11 do 2,98 g osadu O-1/100 g W. W prowadzonych eksperymentach analizowano także poekstrakcyjne pozostałości wychmielin (PB) i na tej podstawie ustalono, że utrata masy materiału wyjściowego (W) w zależności od zastosowanego DES wynosi od 32% (ChCl-Gly) do 45% (ChCl-Lac).

W celu określenia zawartości XN w poszczególnych precypitatach (O-1) także i tym razem przeprowadzono ekstrakcję metanolem, a następnie roztwory alkoholowe analizowano przy użyciu HPLC. Największą ilość XN otrzymano stosując ChCl-Lac (1,92 mg/g W), a najmniej efektywny okazał się ChCl-Pg (0,52 mg/g W). Porównując uzyskane wyniki z omówionymi wcześniej (publikacja **C3**) wydajność ekstrakcji XN wzrosła o 19% przy użyciu ChCl-Lac, lecz zmalała o 25, 39 i 77%, przy zastosowaniu odpowiednio ChCl-Eg, ChCl-Gly i ChCl-Pg (zarówno wychmieliny, jak i wszystkie stosowane odczynniki pochodziły z tych samych źródeł/partii). Doszukując się przyczyn tych rozbieżności, zwrócono szczególną uwagę na etap precypitacji. Wiadomo bowiem, że szereg czynników (np. stężenie związku, stosunek objętościowy rozpuszczalnika do antyrozpuszczalnika, szybkość mieszania, temperatura) może wpływać na formę powstającego osadu.^{81,82} Różnice w wielkości cząstek O-1 były szczególnie widoczne w przypadku ChCl-Pg. Dodając antyrozpuszczalnik do ekstraktu otrzymanego w mniejszej skali (0,5 g W) obserwowano powstawanie dużych agregatów/skupisk, natomiast w zwiększonej skali (4 g W) powstawał bardzo drobnoziarnisty osad. Różnice te były zauważalne gołym okiem. Zastosowane parametry wirowania były prawdopodobnie niewystarczające do efektywnego oddzielenia drobnoziarnistego osadu O-1 od roztworu. Obserwacje te wskazują, że precypitacja jest kluczowym etapem w opracowanej metodzie i należy zwracać szczególną uwagę na warunki wytrącania osadów w poszczególnych wariantach.

Stosując ChCl-Eg i ChCl-Lac otrzymano największą ilość frakcji nierozpuszczalnej w metanolu (O-2), odpowiednio 2,24 i 2,13 g/100 g W. Używając do ekstrakcji ChCl-Gly i ChCl-Pg uzyskano około 1,5 g O-2/100 g W. Na uwagę zasługuje barwa otrzymanych osadów, która różniła się w zależności od zastosowanego do ekstrakcji rozpuszczalnika.

Najciemniejszy, brązowy osad O-2 otrzymano stosując ChCl-Eg, natomiast wykorzystując ChCl-Pg uzyskano osad O-2 o barwie jasnobieżowej. Ciemne zabarwienie może wynikać z obecności tanin, podobnie jak w przypadku preparatów białkowych uzyskanych z makucho wiesiołkowego (publikacja C2). W przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano zależności pomiędzy barwą i masą otrzymanych osadów a pH poszczególnych ekstraktów DES-owych (E), które wynosiło: 5,1 (E ChCl-Eg), 5,3 (E ChCl-Gly), 4,9 (E ChCl-Pg) i 1,5 (E ChCl-Lac).

Osady O-2, poekstrakcyjne pozostałości biomasy (PB) oraz wychmieliny (W) analizowano metodami spektroskopowymi – ^{13}C CP-MAS NMR i ATR-IR. Z otrzymanych widm wynika, że osady O-2 zawierają znacznie większą ilość białka w porównaniu do wychmielin, a większość polisacharydów nie jest ekstrahowana za pomocą DES i pozostaje w biomacie poekstrakcyjnej (PB).

Zawartość białka w poszczególnych próbkach (O-2, PB i W) określono na podstawie całkowitej zawartości azotu (oznaczonej metodą analizy elementarnej, $\text{N} \% \times 6,25$). W zależności od zastosowanego DES-u osady O-2 zawierają od 40% do 64% białka. Warto podkreślić, że osady otrzymane za pomocą ChCl-Eg i ChCl-Gly posiadają odpowiednio aż o 87% i 74% więcej białka w porównaniu do wyjściowej biomasy (W). Zbliżona ilość białka we wszystkich PB (19-21%) potwierdza opisane wcześniej przypuszczenia, że część precipitatów O-1 (zwłaszcza w przypadku ChCl-Pg) nie została skutecznie oddzielona od roztworów otrzymanych po dodaniu antyrozpuszczalnika do ekstraktów DES-owych.

Obecność białek w osadach O-2 potwierdzono metodą elektroforetyczną. SDS-PAGE stosowano także do analizy białek wyizolowanych z wychmielin za pomocą uniwersalnej, dedykowanej do celów proteomicznych metody.⁸³ We wszystkich próbkach zidentyfikowano prążki polipeptydowe w zakresie ~19–22 kDa i ~29–35 kDa. Uwzględniając ograniczone dane literaturowe na temat białek chmielu⁸⁴ przeprowadzono analizę wyciętych z żelu prążków wg strategii bottom-up techniką nano-LC-MS/MS.

Według mojej wiedzy w omówionych powyżej publikacjach po raz pierwszy przedstawiono możliwość zastosowania DES do ekstrakcji związków zawartych w wychmielinach. Opracowana prosta, *zielona* metoda umożliwia otrzymanie osadów (O1) wzbogaconych zarówno w XN jak i białka, a zatem precipitaty te można uznać za *produkty dwufunkcyjne*. Jednoczesne izolowanie związków fenolowych i białek za pomocą DES jest podejściem nowatorskim. Badania w tym zakresie ograniczone są, zgodnie z moją najlepszą wiedzą, do pracy autorstwa Hernández-Corroto i wsp., w której opisano analityczne metody ekstrakcji tej grupy związków ze skórki granatu.⁸⁵

W ostatnich latach zastosowanie białek jako systemów dostarczania związków bioaktywnych zyskuje coraz większą popularność.^{86,87} Ze względu na szerokie spektrum aktywności biologicznych, słabą rozpuszczalność w wodzie i niską biodostępność XN istotne jest opracowanie efektywnych metod dostarczania tego związku.^{88,89} W tym kontekście otrzymywanie wzbogaconych w XN i białka osadów O1 wydaje się interesującym rozwiązaniem. Jednak aby potwierdzić słuszność takiego podejścia niezbędne jest przeprowadzenie szeregu odpowiednich badań.

Przedstawione w publikacjach **C3** i **C4** badania były finansowane ze środków MEiN w ramach działania naukowego MINIATURA 2 (*zał. 4, II.9.4*). Opracowana metoda izolowania XN z wychmielin za pomocą DES została objęta ochroną patentową (*zał. 4, III.3.22*).

4.3.4. Podsumowanie

Cykl publikacji stanowiący osiągnięcie naukowe umożliwił poszerzenie wiedzy na temat związków naturalnych i metod ich izolowania. Przedstawione wyniki badań dostarczają nowych informacji na temat pozyskiwania związków, które mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym np. jako dodatki do żywności, czy suplementy diety.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych przedstawionych w publikacjach **C1-C4** zaliczam:

- Wyizolowanie, określenie unikatowej struktury, konfiguracji absolutnej i prawdopodobnego szlaku biosyntezy opaliferyny, a tym samym poszerzenie bazy danych na temat metabolitów produkowanych przez grzyby z rodzaju *Cordyceps*.
- Wskazanie możliwości zastosowania DES do izolowania białek z wycieków nasion roślin oleistych i wychmielin.
- Opracowanie nowej, prostej, opartej na DES, *zielonej* metody izolowania białek z makucha rzepakowego i wiesiołkowego oraz z wychmielin; o uniwersalności opracowanej przeze mnie metody świadczy fakt, iż była ona z powodzeniem stosowana przez różne grupy badawcze do pozyskiwania protein z takich surowców jak: ziarna owsa,^{90,91} śruta poekstrakcyjna z nasion rokitnika,⁹² wycieki z nasion Sacha inchi,⁹³ lnu, lnicznika siewnego i słonecznika.⁹⁴

- Opracowanie innowacyjnej, prostej metody izolowania za pomocą DES ksantohumolu z wychmielin.
- Wskazanie możliwości jednoczesnego izolowania ksantohumolu i białek za pomocą DES z wychmielin i tym samym otrzymanie *produktu dwufunkcyjnego*.
- Wskazanie sposobów zrównoważonego zagospodarowania produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego (makuchów, wychmielin, gliceryny), zgodnie z koncepcją biorafinacji, do otrzymywania produktów o wartości dodanej.

4.3.5. Spis literatury

1. Ubando, A. T.; Felix, C. B.; Chen, W.-H. Biorefineries in Circular Bioeconomy: A Comprehensive Review. *Bioresour. Technol.* **2020**, *299*, 122585.
2. *United Nations*. <https://www.un.org/en/global-issues/population> (2023-07-07).
3. van Dijk, M.; Morley, T.; Rau, M. L.; Saghai, Y. A Meta-Analysis of Projected Global Food Demand and Population at Risk of Hunger for the Period 2010–2050. *Nat. Food* **2021**, *2*, 494–501.
4. Sá, A. G. A.; Moreno, Y. M. F.; Carciofi, B. A. M. Plant Proteins as High-Quality Nutritional Source for Human Diet. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *97*, 170–184.
5. Bashi, Z.; McCullough, R.; Ong, L.; Ramirez, M. Alternative Proteins: The Race for Market Share Is On. *McKinsey Co. - Agric. Pract.* **2019**, 1–11.
6. Langhans, W. Food Components in Health Promotion and Disease Prevention. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 2287–2294.
7. Kumar, M.; Tomar, M.; Potkule, J.; Verma, R.; Punia, S.; Mahapatra, A.; Belwal, T.; Dahuja, A.; Joshi, S.; Berwal, M. K.; Satankar, V.; Bhoite, A. G.; Amarowicz, R.; Kaur, C.; Kennedy, J. F. Advances in the Plant Protein Extraction: Mechanism and Recommendations. *Food Hydrocoll.* **2021**, *115*, 106595.
8. Joana Gil-Chávez, G.; Villa, J. A.; Fernando Ayala-Zavala, J.; Basilio Heredia, J.; Sepulveda, D.; Yahia, E. M.; González-Aguilar, G. A. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to Be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 5–23.
9. Joshi, D. R.; Adhikari, N. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *J. Pharm. Res. Int.* **2019**, *28*, 1–18.
10. Chemat, F.; Abert Vian, M.; Fabiano-Tixier, A. S.; Nutrizio, M.; Režek Jambrak, A.; Munekata, P. E. S.; Lorenzo, J. M.; Barba, F. J.; Binello, A.; Cravotto, G. A Review of Sustainable and Intensified Techniques for Extraction of Food and Natural Products. *Green Chem.* **2020**, *22*, 2325–2353.
11. Vandepoosele, A.; Draye, M.; Piot, C.; Chatel, G. Subcritical Water and Supercritical Carbon Dioxide: Efficient and Selective Eco-Compatible Solvents for Coffee and Coffee by-Products Valorization. *Green Chem.* **2020**, *22*, 8544–8571.
12. Arumugham, T.; K, R.; Hasan, S. W.; Show, P. L.; Rinklebe, J.; Banat, F. Supercritical Carbon

- Dioxide Extraction of Plant Phytochemicals for Biological and Environmental Applications – A Review. *Chemosphere* **2021**, 271, 129525.
13. Zainal-Abidin, M. H.; Hayyan, M.; Hayyan, A.; Jayakumar, N. S. New Horizons in the Extraction of Bioactive Compounds Using Deep Eutectic Solvents: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2017**, 979, 1–23.
 14. Hansen, B. B.; Spittle, S.; Chen, B.; Poe, D.; Zhang, Y.; Klein, J. M.; Horton, A.; Adhikari, L.; Zelovich, T.; Doherty, B. W.; Gurkan, B.; Maginn, E. J.; Ragauskas, A.; Dadmun, M.; Zawodzinski, T. A.; Baker, G. A.; Tuckerman, M. E.; Savinell, R. F.; Sangoro, J. R. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem. Rev.* **2021**, 121, 1232–1285.
 15. Abbott, A. P.; Capper, G.; Davies, D. L.; Rasheed, R. K.; Tambyrajah, V. Novel Solvent Properties of Choline Chloride/Urea Mixtures. *Chem. Commun.* **2003**, 70–71.
 16. Paiva, A.; Craveiro, R.; Aroso, I.; Martins, M.; Reis, R. L.; Duarte, A. R. C. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, 2, 1063–1071.
 17. Ali Redha, A. Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, 69, 878–912.
 18. Cao, D.; Liu, Q.; Jing, W.; Tian, H.; Yan, H.; Bi, W.; Jiang, Y.; Chen, D. D. Y. Insight into the Deep Eutectic Solvent Extraction Mechanism of Flavonoids from Natural Plant. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, 8, 19169–19177.
 19. del Mar Contreras-Gómez, M.; Galán-Martín, Á.; Seixas, N.; da Costa Lopes, A. M.; Silvestre, A.; Castro, E. Deep Eutectic Solvents for Improved Biomass Pretreatment: Current Status and Future Prospective towards Sustainable Processes. *Bioresour. Technol.* **2023**, 369, 128396.
 20. Contreras, M. del M.; Lama-Muñoz, A.; Manuel Gutiérrez-Pérez, J.; Espínola, F.; Moya, M.; Castro, E. Protein Extraction from Agri-Food Residues for Integration in Biorefinery: Potential Techniques and Current Status. *Bioresour. Technol.* **2019**, 280, 459–477.
 21. Castro-Muñoz, R.; Díaz-Montes, E.; Gontarek-Castro, E.; Boczkaj, G.; Galanakis, C. M. A Comprehensive Review on Current and Emerging Technologies toward the Valorization of Bio-Based Wastes and by Products from Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2022**, 21, 46–105.
 22. Olatunji, O. J.; Tang, J.; Tola, A.; Auberon, F.; Oluwaniyi, O.; Ouyang, Z. The Genus *Cordyceps*: An Extensive Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Fitoterapia* **2018**, 129, 293–316.
 23. Shashidhar, M. G.; Giridhar, P.; Udaya Sankar, K.; Manohar, B. Bioactive Principles from *Cordyceps Sinensis*: A Potent Food Supplement - A Review. *J. Funct. Foods* **2013**, 5, 1013–1030.
 24. Winkler, D. Yartsa Gunbu (*Cordyceps Sinensis*) and the Fungal Commodification of Tibet's Rural Economy. *Econ. Bot.* **2008**, 62, 291–305.
 25. Chen, P. X.; Wang, S.; Nie, S.; Marcone, M. Properties of *Cordyceps Sinensis*: A Review. *J. Funct. Foods* **2013**, 5, 550–569.
 26. *Novel Food Catalogue*. https://webgate.ec.europa.eu/fip/novel_food_catalogue/ (2023-08-04).
 27. Lei, W.; Zhang, G.; Peng, Q.; Liu, X. Development of *Ophiocordyceps Sinensis* through Plant-Mediated Interkingdom Host Colonization. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 17482–17493.
 28. Negi, V. S.; Rana, S. K.; Giri, L.; Rawal, R. S. *Caterpillar Fungus in the Himalaya, Current Understanding and Future Possibilities*; Kosi-Katarmal, Almora, India, 2020.

29. Nxumalo, W.; Abdelfattah, A.; Sun, Y. Can Cordyceps Cicadae Be Used as an Alternative to Cordyceps Militaris and Cordyceps Sinensis? – A Review. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *257*, 112879.
30. Raethong, N.; Thananusak, R.; Cheawchanlertfa, P.; Prabhakaran, P.; Rattanaporn, K.; Laoteng, K.; Koffas, M.; Vongsangnak, W. Functional Genomics and Systems Biology of Cordyceps Species for Biotechnological Applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2023**, *81*, 102939.
31. Zhang, M.; Sun, X.; Miao, Y.; Li, M.; Huang, L. Cordyceps Cicadae and Cordyceps Gunnii Have Closer Species Correlation with Cordyceps Sinensis: From the Perspective of Metabonomic and MaxEnt Models. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 20469.
32. Phull, A. R.; Ahmed, M.; Park, H. J. Cordyceps Militaris as a Bio Functional Food Source: Pharmacological Potential, Anti-Inflammatory Actions and Related Molecular Mechanisms. *Microorganisms* **2022**, *10*, 405.
33. Dong, C.; Guo, S.; Wang, W.; Liu, X. Cordyceps Industry in China. *Mycology* **2015**, *6*, 121–129.
34. Ferchau, E. *Equipment for Decentralised Cold Pressing of Oil Seeds*; Folkecenter for Renewable Energy, Hurup Thy, Denmark, 2000.
35. Pińkowska, H.; Wolak, P.; Oliveros, E. Hydrothermolysis of Rapeseed Cake in Subcritical Water. Effect of Reaction Temperature and Holding Time on Product Composition. *Biomass Bioenergy* **2014**, *64*, 50–61.
36. Pudel, F.; Wiesen, S. Vegetable Oil-Biorefinery. In *Biorefineries. Advances in biochemical engineering/biotechnology*; Wagemann, K., Tippkötter, N., Eds.; Springer, 2017; Vol. 166.
37. USDA. *United States Department of Agriculture, 2023. Oilseeds: world markets and trade.* <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade> (2023-07-09).
38. Heuzé V., Tran G., Sauvant D., Lessire M., L. F. *Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO.* <https://www.feedipedia.org/node/15617> & <https://www.feedipedia.org/node/52> (2023-07-09).
39. Chmielewska, A.; Kozłowska, M.; Rachwał, D.; Wnukowski, P.; Amarowicz, R.; Nebesny, E.; Rosicka-Kaczmarek, J. Canola/Rapeseed Protein–Nutritional Value, Functionality and Food Application: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 3836–3856.
40. Wanasundara, J. P. D.; McIntosh, T. C.; Perera, S. P.; Withana-Gamage, T. S.; Mitra, P. Canola/Rapeseed Protein-Functionality and Nutrition. *OCL* **2016**, *23*, D407.
41. Khattab, R.; Goldberg, E.; Lin, L.; Thiyam, U. Quantitative Analysis and Free-Radical-Scavenging Activity of Chlorophyll, Phytic Acid, and Condensed Tannins in Canola. *Food Chem.* **2010**, *122*, 1266–1272.
42. Aider, M.; Barbana, C. Canola Proteins: Composition, Extraction, Functional Properties, Bioactivity, Applications as a Food Ingredient and Allergenicity - A Practical and Critical Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 21–39.
43. Wanasundara, J. P. D. Proteins of Brassicaceae Oilseeds and Their Potential as a Plant Protein Source. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 635–677.
44. Xu, L.; Diosady, L. L. Removal of Phenolic Compounds in the Production of High-Quality Canola Protein Isolates. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 23–30.
45. Ali, F.; Mondor, M.; Ippersiel, D.; Lamarche, F. Production of Low-Phytate Soy Protein Isolate by Membrane Technologies: Impact of Salt Addition to the Extract on the Purification Process.

- Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2011**, *12*, 171–177.
46. *NapiFeryn BioTech*. <https://napiferyn.com/> (2023-07-08).
 47. *Burcon NutraScience Corporation*. <https://burcon.ca/> (2023-07-08).
 48. *TEUTEXX*. <https://teutexx.com/> (2023-07-08).
 49. *DSM*. <https://www.dsm.com/corporate/markets/food-beverage/canolapro-plant-protein.html> (2023-07-08).
 50. Yang, R.; Zhang, L.; Li, P.; Yu, L.; Mao, J.; Wang, X. A Review of Chemical Composition and Nutritional Properties of Minor Vegetable Oils in China. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *74*, 26–32.
 51. Montserrat-De La Paz, S.; Fernández-Arche, M. A.; Ángel-Martín, M.; García-Giménez, M. D. Phytochemical Characterization of Potential Nutraceutical Ingredients from Evening Primrose Oil (*Oenothera Biennis* L.). *Phytochem. Lett.* **2014**, *8*, 158–162.
 52. Hanczakowski, P.; Szymczyk, B.; Wolski, T. The Nutritive Value of the Residues Remaining after Oil Extraction from Seeds of Evening Primrose (*Oenothera Biennis* L.). *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *63*, 375–376.
 53. Stasiniewicz, T.; Niwińska, B.; Strzetelski, J. A.; Kowalczyk, J.; Maciaszek, K.; Bilik, K. Nutritive Value of Evening Primrose (*Oenothera Paradoxa*) Cake for Ruminants. *J. Anim. Feed Sci.* **1998**, *7*, 187–195.
 54. Gołabczak, J.; Strąkowska, J.; Konstantynowicz, A. Dynamics of Evening Primrose Protein Hydrolysis. *Chem. Pap.* **2005**, *59*, 409–412.
 55. Stevens, J. F.; Ivancic, M.; Hsu, V. L.; Deinzer, M. L. Prenylflavonoids from *Humulus Lupulus*. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1575–1585.
 56. Carbone, K.; Macchioni, V.; Petrella, G.; Cicero, D. O. Exploring the Potential of Microwaves and Ultrasounds in the Green Extraction of Bioactive Compounds from *Humulus Lupulus* for the Food and Pharmaceutical Industry. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *156*, 112888.
 57. Sanz, V.; Torres, M. D.; López Vilariño, J. M.; Domínguez, H. What Is New on the Hop Extraction? *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *93*, 12–22.
 58. Rój, E.; Tadić, V. M.; Mišić, D.; Žižović, I.; Arsić, I.; Dobrzyńska-Inger, A.; Kostrzewa, D. Supercritical Carbon Dioxide Hops Extracts with Antimicrobial Properties. *Open Chem.* **2015**, *13*, 1157–1171.
 59. Kostrzewa, D.; Dobrzyńska-Inger, A.; Rój, E. Experimental Data on Xanthohumol Solubility in Supercritical Carbon Dioxide. *Fluid Phase Equilib.* **2013**, *360*, 445–450.
 60. Stevens, J. F.; Page, J. E. Xanthohumol and Related Prenylflavonoids from Hops and Beer: To Your Good Health! *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1317–1330.
 61. Bolton, J. L.; Dunlap, T. L.; Hajirahimkhan, A.; Mbachu, O.; Chen, S. N.; Chadwick, L.; Nikolic, D.; Van Breemen, R. B.; Pauli, G. F.; Dietz, B. M. The Multiple Biological Targets of Hops and Bioactive Compounds. *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32*, 222–233.
 62. Anioł, M.; Żołnierczyk, A. Extraction of Spent Hops Using Organic Solvents. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2018**, *66*, 208–214.
 63. Kerby, C.; Vriesekoop, F. An Overview of the Utilisation of Brewery By-Products as Generated by British Craft Breweries. *Beverages* **2017**, *3*, 24.

64. Mussatto, S. I. Biotechnological Potential of Brewing Industry By-Products. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*; Nigam, P. S. nee', Pandey, A., Eds.; Springer Netherlands, 2009; pp 313–326.
65. Farooq, A.; Gordon, J.; Hanson, J. R.; Takahashi, J. A. Two C10 Lactones from *Cephalosporium Aphidicola*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 557–558.
66. Göhrt, A.; Zeeck A.; Hüetter, K.; Kirsh, R.; Kluge, H.; Thiericke, R. Secondary Metabolites by Chemical Screening. 9. Decarestrictines, a New Family of Inhibitors of Cholesterol Biosynthesis from *Penicillium*. II. Structure Elucidation of the Decarestrictines A to D. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 66–73.
67. Zhang, F.-M.; Zhang, S.-Y.; Tu, Y.-Q. Recent Progress in the Isolation, Bioactivity, Biosynthesis, and Total Synthesis of Natural Spiroketal. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 75–104.
68. Ohno, M.; Okamoto, M.; Kawabe, N. Oudenone, a Novel Tyrosine Hydroxylase Inhibitor from Microbial Origin. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1285–1286.
69. Opiyo, G. O. Synthetic Studies towards the Total Synthesis of Apoptosis Inducing Natural Products, Jahanyne and Opaliferin, praca doktorska, The University of Auckland, 2019. <https://researchspace.auckland.ac.nz/handle/2292/49326> (2023-07-08).
70. *Electronic Code of Federal Regulations.* <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=97868f80bf753caa25204bdb32667f83&mc=true&node=pt21.6.582&rgn=div5> (2023-08-04).
71. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific Opinion on Safety and Efficacy of Choline Chloride as a Feed Additive for All Animal Species. *EFSA J.* **2011**, *9*, 2353.
72. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Re-Evaluation of Glycerol (E 422) as a Food Additive. *EFSA J.* **2017**, *15*, e04720.
73. Ciriminna, R.; Pina, C. Della; Rossi, M.; Pagliaro, M. Understanding the Glycerol Market. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116*, 1432–1439.
74. Zinsmeister, H. D.; Bartl, S. The Phenolic Compounds of *Oenothera*. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 3129–3132.
75. Ozturk, B.; Parkinson, C.; Gonzalez-Miquel, M. Extraction of Polyphenolic Antioxidants from Orange Peel Waste Using Deep Eutectic Solvents. *Sep. Purif. Technol.* **2018**, *206*, 1–13.
76. Bakirtzi, C.; Triantafyllidou, K.; Makris, D. P. Novel Lactic Acid-Based Natural Deep Eutectic Solvents: Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Common Native Greek Medicinal Plants. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2016**, *3*, 120–127.
77. Tronina, T.; Strugała, P.; Popłoński, J.; Włoch, A.; Sordon, S.; Bartmańska, A.; Huszcza, E. The Influence of Glycosylation of Natural and Synthetic Prenylated Flavonoids on Binding to Human Serum Albumin and Inhibition of Cyclooxygenases COX-1 and COX-2. *Molecules* **2017**, *22*, 1230.
78. Anioł, M.; Szymańska, K.; Zołnierczyk, A. An Efficient Synthesis of the Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin from Isoxanthohumol with Magnesium Iodide Etherate. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9544–9547.
79. Dai, Y.; Witkamp, G. J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus Tinctorius* L. *Anal. Chem.* **2013**, *85*,

6272–6278.

80. Wei, Z.; Qi, X.; Li, T.; Luo, M.; Wang, W.; Zu, Y.; Fu, Y. Application of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction and Determination of Phenolics in *Cajanus cajan* Leaves by Ultra Performance Liquid Chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *149*, 237–244.
81. Thorat, A. A.; Dalvi, S. V. Liquid Antisolvent Precipitation and Stabilization of Nanoparticles of Poorly Water Soluble Drugs in Aqueous Suspensions: Recent Developments and Future Perspective. *Chem. Eng. J.* **2012**, *181–182*, 1–34.
82. Lonare, A. A.; Patel, S. R. Antisolvent Crystallization of Poorly Water Soluble Drugs. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* **2013**, *4*, 337–341.
83. Wang, W.; Vignani, R.; Scali, M.; Cresti, M. A Universal and Rapid Protocol for Protein Extraction from Recalcitrant Plant Tissues for Proteomic Analysis. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2782–2786.
84. Neugrodda, C.; Gastl, M.; Becker, T. Protein Profile Characterization of Hop (*Humulus lupulus* L.) Varieties. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2014**, *72*, 184–191.
85. Hernández-Corroto, E.; Plaza, M.; Marina, M. L.; García, M. C. Sustainable Extraction of Proteins and Bioactive Substances from Pomegranate Peel (*Punica granatum* L.) Using Pressurized Liquids and Deep Eutectic Solvents. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2020**, *60*, 102314.
86. Diaz, J. T.; Allen, E.; Lila, M. A. Function Formulation of Protein – Polyphenol Particles for Applications in Food Systems. *Food Funct.* **2020**, *11*, 5091–5104.
87. Qiaozhi, Z.; Zhouzhou, C.; Yanbo, W.; Linglin, F. Dietary Protein-Phenolic Interactions: Characterization, Biochemical-Physiological. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 3589–3615.
88. O'Connor, A.; Konda, V.; Reed, R. L.; Christensen, J. M.; Stevens, J. F.; Contractor, N. Rice Protein Matrix Enhances Circulating Levels of Xanthohumol Following Acute Oral Intake of Spent Hops in Humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, 1700692.
89. Zugravu, C.; Bohiltea, R.; Salmen, T.; Pogurschi, E.; Otelea, M. R. Antioxidants in Hops: Bioavailability, Health Effects and Perspectives for New Products. *Antioxidants* **2022**, *11*, 241.
90. Yue, J.; Zhu, Z.; Yi, J.; Lan, Y.; Chen, B.; Rao, J. Structure and Functionality of Oat Protein Extracted by Choline Chloride–dihydric Alcohol Deep Eutectic Solvent and Its Water Binary Mixtures. *Food Hydrocoll.* **2021**, *112*, 106330.
91. Yue, J.; Zhu, Z.; Yi, J.; Li, H.; Chen, B.; Rao, J. One-Step Extraction of Oat Protein by Choline Chloride-Alcohol Deep Eutectic Solvents : Role of Chain Length of Dihydric Alcohol. *Food Chem.* **2022**, *376*, 131943.
92. Lin, J.; Xiang, H.; Sun-Waterhouse, D.; Cui, C.; Wang, W. Deep Eutectic Solvents and Alkaline Extraction of Protein from Seabuckthorn Seed Meal: A Comparison Study. *Food Sci. Hum. Wellness* **2022**, *11*, 1028–1035.
93. Sharma, V.; Tsai, M. L.; Sun, P. P.; Chen, C. W.; Nargotra, P.; Dong, C. Di. Sequential Ultrasound Assisted Deep Eutectic Solvent-Based Protein Extraction from Sacha Inchi Meal Biomass: Towards Circular Bioeconomy. *J. Food Sci. Technol.* **2023**, *60*, 1425–1434.
94. Parodi, E.; La Nasa, J.; Ribechini, E.; Petri, A.; Piccolo, O. Extraction of Proteins and Residual Oil from Flax (*Linum usitatissimum*), Camelina (*Camelina sativa*), and Sunflower (*Helianthus annuus*) Oilseed Press Cakes. *Biomass Convers. Biorefin.* **2023**, *13*, 1915–1926.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Po uzyskaniu stopnia doktora odbyłam dwa staże naukowe w Tokushima Bunri University w Japonii (01.06.2011-31.05.2012 i 12.10.2012-31.03.2013). Podczas pierwszego z nich (12 miesięcy) pracowałam w zespole kierowanym przez prof. Toshihiro Hashimoto, w którym zajmowałam się izolowaniem bioaktywnych związków z entomopatogenicznych grzybów z rodzaju *Cordyceps*. W trakcie drugiego stażu (6 miesięcy) pracowałam w zespole prof. Yoshinori Asakawy i prowadziłam badania dotyczące izolowania związków naturalnych z wątrobowców (*Marchantiophyta*) oraz z rdestu ostrogorzkiego (*Polygonum hydropiper*). Zajmowałam się także syntezą estrowych pochodnych marchantyny A oraz badałam aktywność przeciwgrzybiczą wybranych aldehydów terpenoidowych.

Wymiernym efektem badań prowadzonych przeze mnie podczas staży naukowych w Tokushima Bunri University są trzy publikacje naukowe (*Zał. 4, II.4.P8, P9/C1, P24*), z których jedna (*P9/C1*) wchodzi w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Uzyskane wówczas wyniki badań były także prezentowane w formie posterów na trzech konferencjach naukowych: *9th International Symposium on Chromatography of Natural Products* (Lublin, 26-29.05.2014), *The 133rd Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan* (Yokohama, Japonia, 27-30.03.2013), *The 132nd Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan* (Sapporo, Japonia, 28-31.03.2012) (*Zał. 4, II.7.21-24 i 26*).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

- Od roku akademickiego 2018/2019 jestem koordynatorem przedmiotu *chemia organiczna* na kierunku *biotechnologia* (Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności) – prowadzę wykład i ćwiczenia z tego przedmiotu.
- W ramach zatrudnienia na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu prowadziłam ćwiczenia laboratoryjne na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności, Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt oraz na Wydziale Przyrodniczo-Technologicznym z następujących przedmiotów: *chemia organiczna, chemia nieorganiczna, chemia ogólna i organiczna, biochemia, analiza żywności*.

- Brałam udział w tłumaczeniu z języka angielskiego rozdziału P-10 (str. 1216-1348) w książce *Macierzyste struktury produktów naturalnych i pokrewnych związków. Nomenklatura Związków Organicznych Rekomendacje IUPAC i Nazwy Preferowane 2013*. Narodowy Komitet Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej, **2013**. ISBN 978-0-85404-182-4.
- Byłam promotorem 10 prac magisterskich oraz 6 prac inżynierskich.
- Pełniłam funkcję opiekuna naukowego 5 prac magisterskich (promotorem prac był prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk).
- Pełniłam funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim dra Marka Kłobuckiego; tytuł rozprawy: *Chemoenzymatyczne otrzymywanie fosfolipidów zawierających farmakologicznie aktywne związki*; promotor: prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk; przewod doktorski zakończony (07.2017).
- Zrecenzowałam 4 prace magisterskie i 8 prac inżynierskich.
- Czynnie uczestniczyłam w działalności Studenckiego Koła Naukowego *OrgChem* – pełniłam funkcje opiekuna naukowego 3 studentów wykonujących w jego ramach prace badawcze; dla członków SKN *OrgChem* prowadziłam szkolenia dotyczące: 1) wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC); 2) określania struktury związków na podstawie widm 1D i 2D NMR.
- Brałam udział w przygotowaniu skryptu: W. Gładkowski, A. Chojnacka, *Chemia organiczna: ćwiczenia laboratoryjne dla studentów kierunków przyrodniczych*; Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław, 2014, 2017. Uczestniczyłam w opisie ćwiczeń z preparatyki organicznej.
- Jestem współautorem 10 multimedialnych materiałów dydaktycznych (filmów) z *chemii organicznej* przygotowanych w ramach projektu *POWER na UPWr – kompleksowy program rozwoju uczelni*. Rok akademicki 2020/2021. Materiały dostępne są w Bazie Wiedzy UPWr (<https://bazawiedzy.upwr.edu.pl/>).

6.2. Osiągnięcia organizacyjne

- Jestem członkiem zarządu Oddziału Wrocławskiego *Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności* (kadencja 2022-2025).
- Jestem członkiem *Zespołu ds. Oceny Parametrycznej Dyscypliny (Ewaluacji) Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia* (2019 – obecnie).
- Pełniłam funkcję opiekuna roku kierunku *biotechnologia* (Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności UPWr) w okresie I i II cyklu kształcenia, od roku akademickiego 2015/2016 do roku akademickiego 2019/2020.
- Byłam członkiem *Dziekańskiej Komisji ds. Kontaktów Naukowych z Zagranicą Wydziału Nauk o Żywności UPWr* (2014).

- Brałam udział w pracach komisji rekrutacyjnych na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności UPWr.
- Byłam członkiem komitetu organizacyjnego ogólnopolskiej konferencji naukowej *Bioaktywne związki pochodzenia naturalnego*, Trzebnica, 23-24.01.2017.
- Aktualnie jestem członkiem komitetu organizacyjnego II ogólnopolskiej konferencji naukowej *Bioaktywne związki pochodzenia naturalnego*, która odbędzie się w dniach 9-10.10.2023 w Trzebnicy.

6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

- W ramach promocji oferty UPWr prowadziłam wykłady popularnonaukowe *Świat okiem chemiczki – jak polubić i zrozumieć chemię* dla uczniów szkół średnich we Wrocławiu (LO nr I, VI, X; 03-12.2022).
- Prowadziłam zajęcia praktyczne *Tajemnice związków występujących w roślinach – izolowanie, identyfikacja oraz oznaczanie ilościowe wybranych substancji* dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych kształcących się w zawodach rolniczych i gastronomicznych; 11-14.06.2014, UPWr.

7. Inne informacje

7.1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę naukową rozpoczęłam w 2004 r. w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (ówczesnej Akademii Rolniczej), gdzie zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta. Jednak pierwszy artykuł naukowy mojego współautorstwa (*zał. 4, II.4.P1*) dotyczy badań, które wykonywałam realizując pracę magisterską pod kierunkiem prof. Czesława Wawrzeńczyka, opiekunem naukowym pracy był prof. Antoni Szumny. Zajmowałam się wówczas syntezą α -metyleno- γ -laktonów wychodząc zarówno z naturalnych terpenów (myrcen, 3-karen, limonen, kamfen), jak i z alkenów syntetycznych (2-metylopent-1-en, 1-metylocykloheksen, teradec-1-en). Wspomniana wyżej publikacja (**P1**) dotyczy aktywności deterentnej otrzymanych połączeń względem pleśniakowca lśniącego (*Alphitobius diaperinus* Panz.).

Deterenty pokarmowe (antyfidanty) to substancje oddziałujące na narządy smaku owadów powodując ograniczenie lub całkowite zaprzestanie żerowania, doprowadzając tym samym do ich śmierci głodowej. Cechą charakterystyczną antyfidantów jest selektywność działania (są aktywne wobec określonych grup owadów), co stwarza możliwość ich

wykorzystania do ochrony upraw roślinnych i magazynów żywności przed owadziemi szkodnikami.

Rozpoczynając pracę na UPWr włączyłam się w nurt badań prowadzonych w zespole kierowanym przez prof. Czesława Wawrzeńczyka dotyczących otrzymywania deterentów pokarmowych owadów z funkcją laktonową. Realizując pracę doktorską, której promotorem był prof. C. Wawrzeńczyk, zajmowałam się syntezą oraz mikrobiologiczną funkcjonalizacją bicyklicznych laktonów terpenoidowych z układem *p*-mentanu. Badania te były finansowane ze środków MNiSW w ramach projektu badawczego promotorskiego (*zał. 4, II.9.1*). Pracę doktorską obroniłam z wyróżnieniem w roku 2010 na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, uzyskując stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii organicznej.

Związkiem wyjściowym we wszystkich przeprowadzonych przeze mnie syntezach był monoterpenowy keton – piperyton. Wybór tego substratu był podyktowany jego strukturą (α,β -nienasycony keton) oraz szeroką gamą aktywności biologicznej olejków eterycznych, których jest on głównym składnikiem. Modyfikacja takiego ketonu umożliwiała otrzymanie związków zawierających izoprenoidową budowę, co jest charakterystyczną cechą strukturalną dużej części produktów naturalnych, które łatwo ulegają biodegradacji. Jestem współautorką rozdziału w monografii naukowej *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, w którym opisano właściwości biologiczne, występowanie oraz możliwość wykorzystania piperytenu w syntezie laktonów (*zał. 4, II.2.2*).

W ramach pracy doktorskiej zsyntezowałam diastereoizomeryczne nasycone laktony z układem *p*-mentanu, ich jodo-, bromo-, chloro- i hydroksylowe pochodne oraz laktony zawierające w swojej strukturze wiązanie podwójne. Łącznie otrzymałam 30 laktonów, w tym 10 w postaci racemicznej oraz 20 enancjomerycznie wzbogaconych ($ee = 91\text{--}99\%$).

Pierwszym etapem prowadzonych przeze mnie syntez była redukcja racemicznego piperytenu do odpowiednich alkoholi allilowych (*cis*- i *trans*-piperytoli). Związki te w kolejnych etapach przekształcałam w γ,δ -nienasycone estry (w wyniku ortoocetanowej modyfikacji przegrupowania Claisena), a następnie, w wyniku laktonizacji estrów bądź uzyskanych z nich kwasów karboksylowych czy epoksyestrów, otrzymywałam odpowiednie racemiczne laktony terpenoidowe.

W celu uzyskania optycznie czynnych laktonów racemiczne alkohole allilowe rozdzielałam na drodze enzymatycznej estryfikacji. W opracowanej przeze mnie metodzie donorem grupy acylowej był propionian winylu, a biokatalizatorem lipaza Amano PS. Wyniki badań dotyczące enancjoselektywnej estryfikacji piperytoli zostały opublikowane

w czasopiśmie *Tetrahedron: Asymmetry* (zał. 4, II.4.P2). Optycznie czynne alkohole (ee = 91–99%) zastosowałam jako substraty w syntezie enncjomerycznie wzbogaconych laktonów.

Otrzymane przeze mnie laktony zostały przebadane pod kątem aktywności antyfidantnej wobec wybranych owadzych szkodników magazynów żywności oraz roślin zielonych. Testy aktywności biologicznej zostały wykonane w zespołach badawczych kierowanych przez: prof. Beatę Gabryś z Uniwersytetu Zielonogórskiego (testy na mszycy brzoskwińskiej), prof. Marylę Szczepaniak z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (testy na sronce ziemniaczanej i pleśniakowcu lśniącym) oraz prof. Jana Nawrota z Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu (testy na trojszyku ulcu, wołku zbożowym i skórku zbożowym). Badania te byłyby podstawą do przeprowadzenia przeze mnie analizy korelacyjnej struktura – aktywność biologiczna.

Uzyskane wyniki badań względem wszystkich testowanych owadów potwierdziły słuszność założonej przeze mnie hipotezy, że wprowadzenie pierścienia γ -laktonowego do struktury piperytonu skutkuje zwiększeniem aktywności antyfidantnej. Niektóre z otrzymanych połączeń wykazują bardzo wysoką aktywność deterentną wobec wybranych owadów, porównywalną bądź przewyższającą tę, którą posiadają związki referencyjne. Analiza porównawcza wpływu konfiguracji absolutnej testowanych par enancjomerów nie dostarczyła jednoznacznych wniosków. Obserwowałam sytuacje, w których: 1) poszczególne enancjomery wykazywały zdecydowanie różne aktywności, 2) konfiguracja absolutna centrów stereogenicznych nie wpływała na aktywność związku, 3) mieszanina racemiczna była bardziej aktywna niż optycznie czynne izomery.

Wyniki badań dotyczące syntezy laktonów z układem *p*-mentanu oraz ich aktywności antyfidantnej zostały opublikowane po uzyskaniu przeze mnie stopnia naukowego doktora w następujących czasopismach: *RSC Advances*, *Molecules*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Pest Management Science*, *PLoS ONE* (zał. 4, II.4.P4-P7 i P11). Sposoby otrzymywania tych związków zostały opatentowane (zał. 4, III.3.1-10).

Kolejny obszar prowadzonych przeze mnie badań dotyczył mikrobiologicznej funkcjonalizacji racemicznych laktonów terpenoidowych, które otrzymałam na drodze syntezy chemicznej. Zastosowanie biokatalizatorów umożliwia zarówno uzyskanie nowych tlenowych pochodnych, których synteza na drodze chemicznej wymagałaby przeprowadzenia wielu skomplikowanych reakcji, jak i określenie metabolicznych przemian zastosowanych substratów. Produktami biotransformacji laktonów z układem *p*-mentanu w kulturach wybranych szczepów grzybów strzępkowych były pochodne zawierające grupę

hydroksylową w nieaktywowanych pozycjach. Wyniki badań dotyczące mikrobiologicznej funkcjonalizacji γ,δ -nienasyconego laktonu z układem *p*-mentanu zostały opublikowane w czasopiśmie *Molecules* (zał. 4, II.4.P5). Jestem także współautorką artykułu opublikowanego na łamach czasopisma *Journal of Bioscience and Bioengineering*, który dotyczy biotransformacji zsyntezowanych przeze mnie jodo-, bromo- i chlorolaktonów z układem *p*-mentanu (zał. 4, II.4.P10). Prace te ukazały się po uzyskaniu przeze mnie stopnia naukowego doktora.

Mikrobiologicznym transformacjom poddałam także związek wyjściowy w prowadzonych przeze mnie syntezach – piperyton. W wyniku enancjoselektywnej hydroksylacji tego ketonu z udziałem wybranych szczepów grzybów strzępkowych otrzymałam pięć produktów. Rezultaty tych badań ukazały się w czasopiśmie *Chirality* (zał. 4, II.4.P3).

Prowadziłam także badania dotyczące utlenienia typu Baeyera Villigera piperytonu za pomocą kwasu *m*-chloroperoksybenzoesowego. Otrzymałam w ten sposób dwie epoksydowe pochodne piperytonu oraz trzy epoksy- ϵ -laktony. Wyniki tych przemian zostały opublikowane jako oryginalna praca w materiałach konferencyjnych w książce z cyklu *Chemistry for Agriculture* (zał. 4, II.2.1).

Po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora (10.2010) zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii UPWr (12.2010). Pół roku później wyjechałam na roczny staż podoktorski do Tokushima Bunri University (6.2011-5.2012). Po trzymiesięcznej przerwie rozpoczęłam kolejny staż w tej samej jednostce naukowej (10.2012-3.2013). Zakres prowadzonych przeze mnie badań w Japonii opisałam w pkt. 5. Ten okres uważam za przełomowy w mojej pracy naukowej. Przed obroną doktoratu zajmowałam się chemiczną i mikrobiologiczną modyfikacją związku naturalnego – piperytonu, natomiast podczas stażu rozpoczęłam badania związane z izolowaniem produktów ze źródeł naturalnych. Niezwykle przydatne okazały się wówczas wiedza i doświadczenia, które zdobyłam realizując pracę doktorską, zwłaszcza te związane z określaniem struktury związków organicznych za pomocą metod spektroskopowych. Umiejętności te doskonaliłam w zespołach kierowanych przez prof. Hashimoto i prof. Asakawę. Miałam także ogromny zaszczyt nawiązać ścisłą współpracę z prof. Akemi Umeyamą, która bezpośrednio wprowadziła mnie w świat związków naturalnych. Podczas stażu miałam możliwość samodzielnego korzystania z wyspecjalizowanej aparatury (m.in.

spektrometrów NMR), co znacznie poszerzyło moje umiejętności. Za niezwykle cenne uważam także swobodę w planowaniu prowadzonych przeze mnie doświadczeń oraz doboru metod stosowanych do izolowania i rozdziału poszczególnych połączeń.

Po powrocie do Polski postanowiłam kontynuować badania związane z pozyskiwaniem związków ze źródeł naturalnych. Zmianie jednak uległo moje podejście do tego zagadnienia. Dotyczyło ono głównie dwóch kwestii. Pierwsza z nich, kluczowa, związana była z metodą ekstrakcji, a ściślej rodzajem stosowanych w tym celu rozpuszczalników. Zdając sobie sprawę jak ogromna ilość lotnych rozpuszczalników organicznych niezbędna jest do ekstrakcji, rozdziału i oczyszczania związków naturalnych, poszukiwałam bardziej selektywnych i ekologicznych rozwiązań. Moje szczególne zainteresowanie zyskały rozpuszczalniki głęboko eutektyczne (DES), które okazały się niezwykle użyteczne w prowadzonych przeze mnie badaniach. Druga kwestia, równie dla mnie istotna, odnosiła się do wyboru odpowiedniego materiału wyjściowego, z którego planowałam izolować produkty naturalne. Poszukiwałam na rynku europejskim biomasy, której potencjał nie został do tej pory doceniony, bądź nie znaleziono rozwiązań jej efektywnego wykorzystania. Swoją uwagę skoncentrowałam na produktach ubocznych przemysłu rolno-spożywczego, głównie olejarskiego.

Rozpoczynając nową tematykę badawczą istotną kwestią było pozyskanie funduszy umożliwiających realizację zaplanowanych badań. Jako kierownik złożyłam trzy wnioski projektowe w ramach programów: LIDER V (2014 r., wniosek nr 033/L-5/2013, NCBiR), SONATA 9 (2015 r., wniosek nr 2015/17/D/NZ9/02024, NCN) oraz FIRST TEAM (2016 r. wniosek nr 0017, FNP). Wszystkie z tych projektów związane były z zagospodarowaniem wyłoków nasion roślin oleistych (makuchów) pod kątem otrzymywania produktów o wartości dodanej. Niestety, w/w wnioski nie zostały zakwalifikowane do finansowania. Mimo tego, czas poświęcony na ich przygotowanie nie uważam za stracony. Pomysły, które wówczas powstały oraz liczne dyskusje z dr. Radosławem Gniłką (aktualnie pracownik firmy *Healthcann S.A.*) i dr. hab. Filipem Boratyńskim, prof. UPWr, zapoczątkowały nowy etap badań prowadzonych w Katedrze Chemii UPWr dotyczący zrównoważonego wykorzystania produktów ubocznych przemysłu olejarskiego.

Ograniczone środki finansowe nie zniechęciły mnie do zaangażowania się w badania związane z zastosowaniem DES do izolowania białek z makuchów. Nawiązałam współpracę z prof. Avtarem Matharu oraz pracownikami kierowanego przeze niego zespołu z Green Chemistry Centre of Excellence z University of York (Wielka Brytania), dzięki czemu możliwe było przeprowadzenie specjalistycznych analiz otrzymanych przeze mnie

preparatów białkowych. Rezultatem tej współpracy jest artykuł **C2**, który wchodzi w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Współpracując z dr. hab. F. Boratyńskim uczestniczyłam także w badaniach związanych z wykorzystaniem makuchów jako medium do hodowli mikroorganizmów zdolnych do wzmożonej produkcji enzymów hydrolitycznych oraz biotransformacji racemicznych laktonów stosowanych w przemyśle spożywczym ze względu na atrakcyjne właściwości zapachowe (*trans*- i *cis*-whisky laktony oraz γ - i δ -dekalaktony). Efektem tych badań są trzy artykuły opublikowane w czasopismach: *Catalysts*, *Molecules* i *Scientific Reports* (**zał. 4, II.4.P15-P17**).

Jako promotor pomocniczy pracy doktorskiej dr. Marka Kłobuckiego byłam zaangażowana w badania nad otrzymywaniem na drodze chemoenzymatycznej fosfolipidów zawierających farmakologicznie aktywne związki. Podejściu temu przyświecała idea wykorzystania glicerofosfolipidów jako proleków, w których bioaktywny związek związany jest kowalencyjnie z lipidem. Rezultatem tych badań było otrzymanie szeregu fosfatydylocholin zawierających w pozycji *sn*-1 i/lub *sn*-2 dehydroepiandrosteron (DHEA) lub niesteroidowe leki przeciwzapalne z grupy profenów (ibuprofen, naproksen, ketoprofen, flurbiprofen). Związki te zostały przebadane pod kątem aktywności antyproliferacyjnej bądź cytotoksycznej wobec wybranych nowotworowych linii komórkowych. Sprawując opiekę merytoryczną nad badaniami prowadzonymi przez dr. M. Kłobuckiego współuczestniczyłam w analizie oraz weryfikacji otrzymanych wyników, które zostały opublikowane w czasopiśmie *Steroids* (**zał. 4, II.4.P12**) oraz *Scientific Reports* (**zał. 4, II.4.P19**). Sposoby otrzymywania pochodnych fosfatydylocholiny zostały objęte ochroną patentową (**zał. 4, III.3.11-21**). Uczestniczyłam także w przygotowaniu rozdziału w monografii *Na Pograniczu Chemii i Biologii* na temat modyfikowanych glicerofosfolipidów – ich właściwości i metod otrzymywania (**zał. 4, II.2.3**).

Fosfolipidy były także przedmiotem mojej współpracy z dr. hab. Anną Chojnacką, prof. UPWr, która zajmuje się m.in. metodami enzymatycznego wzbogacania tej grupy lipidów w bioaktywne kwasy tłuszczowe. Celem badań było zwiększenie zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny *n*-3 – kwasu dokozaheksaenowego (DHA) i eikozapentaenowego (EPA), w fosfatydylocholinie żółtka jaja kurzego. W procesie acydolizy fosfatydylocholiny stosowano koncentrat kwasów wielonienasyconych otrzymany z oleju z wątroby dorsza oraz *sn*-1,3 regioselektywne lipazy. Wyniki tych badań ukazały się w czasopiśmie *Molecules* (**zał. 4, II.4.P14**).

Jestem także współautorką artykułu dotyczącego aktywności deterentnej β -tujonu oraz jego syntetycznych pochodnych: adduktu z wodorosiarczanem(IV) sodu, oksymu, laktamu i laktonu względem mszycy brzoskwiniowo-ziemniaczanej (*zał. 4, II.4.P20*). Badania ujęte w tej pracy są pewnego rodzaju powrotem do tematyki, którą zajmowałam się realizując pracę doktorską.

Prowadziłam także badania związane z projektem pt. *Badanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych glicerydów sterolowych oraz ich produktów powstających podczas termicznej oksydacji* realizowanego we współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym w Poznaniu (lider konsorcjum), a finansowanego ze środków NCN w ramach konkursu OPUS 16 (*zał. 4, II.9.5*, kierownik projektu: prof. Magdalena Rudzińska). Celem projektu było opracowanie metody otrzymywania lipidów strukturyzowanych będących hybrydą acylogliceroli ze sterolem roślinnym, badanie ich właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych oraz stabilności termiczno-oksydacyjnej. Głównym założeniem badań było otrzymanie pochodnych o zwiększonej stabilności, w porównaniu do wolnych fitosteroli oraz ich estrów z kwasami tłuszczowymi. Mój udział w realizacji projektu związany był przede wszystkim z otrzymywaniem glicerydów sterolowych. Jako kierownik w/w projektu ze strony UPWr (partner konsorcjum) koordynowałam prace związane z zadaniami badawczymi przypisanymi do tej jednostki, które obejmowały zarówno syntezę strukturyzowanych lipidów jak i badanie ich oddziaływań z różnymi modelami błon biologicznych i biomolekułami.

W ramach projektu zsyntezowano dwie serie acylogliceroli, z których jedna zawiera resztę stigmasterolu w pozycji zewnętrznej (*sn-3*) lub wewnętrznej (*sn-2*), a druga dwie reszty stigmasterolu w pozycjach *sn-1* i *sn-2*, *sn-2* i *sn-3* lub *sn-1* i *sn-3*. W pozostałych pozycjach/pozycji szkieletu glicerolu znajdują się reszty kwasu palmitynowego, oleinowego albo mirystynowego. Stigmasterol połączono z acyloglicerolami stosując łącznik (linker) bursztynowy bądź węglanowy. Otrzymane połączenia, oprócz badań dotyczących ich oddziaływań z błonami biologicznymi, poddawane były testom stabilności termiczno-oksydacyjnej w warunkach przechowalniczych i smaźalniczych. Prowadzono także badania *in vitro* oceniające cytotoksyczność, genotoksyczność i mutagenność przed i po termicznej oksydacji glicerydów sterolowych. Uzyskane wyniki badań są sukcesywnie publikowane; dotychczas ukazało się 6 artykułów mojego współautorstwa w następujących czasopismach: *Food Chemistry, Molecules, Membranes* i *ChemPlusChem* (*zał. 4, II.4.P22, P23, P25, P26, P28, P29*).

Moje zainteresowania badawcze dotyczą także izolowania związków naturalnych za pomocą DES z produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego. W latach 2019-2020 w ramach działania naukowego MINIATURA 2 (jako kierownik, *zał. 4, II.9.4*) prowadziłam badania dotyczące zastosowania rozpuszczalników głęboko eutektycznych do izolowania ksantohumolu z wychmielin. Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w postaci dwóch artykułów, które wchodzi w skład osiągnięcia będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego (C3 i C4).

Aktualnie jako kierownik projektu MISTRZ (*zał. 4, II.15.2*) jestem zaangażowana w badania nad opracowaniem innowacyjnej metody izolowania białek z makucha słonecznikowego za pomocą DES. Zadania ujęte w projekcie obejmują optymalizację tego procesu oraz określenie składu aminokwasowego i właściwości funkcjonalnych otrzymanych preparatów. Wstępne wyniki badań są bardzo obiecujące, wskazują bowiem na możliwość pozyskiwania preparatów białkowych w sposób prosty, selektywny, wydajny i zarazem przyjazny środowisku.

Realizowane przeze mnie badania wpisują się w cele i założenia powołanego w 2019 r. na UPWr Wiodącego Zespołu Badawczego o akronimie *BioActiv*, którego liderem jest dr hab. Filip Boratyński, prof. UPWr. Wchodząc w skład zespołu *BioActiv* biorę udział m.in. w pracach związanych z przygotowaniem projektów umożliwiających nawiązanie współpracy, zarówno krajowej, jak i międzynarodowej w zakresie opracowania nowatorskich i zrównoważonych metod zagospodarowania produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego.

Studiując, a następnie pracując na UPWr związana byłam i jestem z Wydziałem Biotechnologii i Nauk o Żywności, dlatego też *żywność* odgrywa kluczową rolę w prowadzonych przeze mnie badaniach. W kręgu moich zainteresowań znajdują się istotne z punktu widzenia technologii żywności związki, takie jak białka, fosfolipidy, acyloglicerole, sterole oraz związki z grupy terpenów i polifenoli. Prowadzone przeze mnie badania obejmują zarówno izolowanie, jak i modyfikacje (na drodze chemicznej i enzymatycznej) związków naturalnych.

Staram się, aby mój rozwój naukowy przebiegał wielotorowo, dlatego też zajmuję się badaniami o charakterze interdyscyplinarnym. Współpracując z różnymi jednostkami naukowymi zamierzam nadal dzielić się wiedzą, umiejętnościami i doświadczeniem z zakresu syntezy związków, które mogą znaleźć zastosowanie np. jako dodatki do żywności czy suplementy diety. Jednak swoje przyszłe plany badawcze wiąże głównie z opracowaniem innowacyjnych, *zielonych* metod izolowania składników odżywczych

(głównie białek) i związków bioaktywnych z produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego. Badaniom tym przyświeca idea zrównoważonego gospodarowania zasobami naturalnymi, zgodnie z koncepcją biorafinacji.

Szczegółowy wykaz moich osiągnięć naukowych znajduje się w **załączniku nr 4**.

7.2. Odbyte kursy, szkolenia i warsztaty

- *Warsztaty z zakresu pracy z osobami z różnymi rodzajami niepełnosprawności w procesie dydaktycznym* – warsztaty organizowane przez UPWr w ramach projektu *Uniwersytet Przyrodniczy dostępny dla wszystkich*, online, 8-9.11.2021.
- *Cyfrowy niezbędnik nauczyciela akademickiego* – szkolenie organizowane przez Centrum Zasobów i Wsparcia Dydaktyki – Sekcji Kształcenia Ustawicznego i Organizacji Szkoleń oraz Sekcji Kształcenia na Odległość i Nowoczesnych Form Kształcenia UPWr, 09.09.2021.
- *DOE – komputerowe wspomaganie planowania i analizy statystycznej badań innowacyjnych* – szkolenie organizowane przez StatSoft Polska, online, 26-27.11.2020.
- *Wysokorozdzielcza spektrometria mas...dla każdego* – warsztaty organizowane przez SCIEX i BIOANALYTIC, Wrocław 28.05.2019.
- Szkolenie we Wrocławskim Parku Technologicznym (WPT) z *Ochrony patentowej i możliwości pozyskania grantów przez przedsiębiorstwa*, Wrocław, 03.2016.
- Szkolenie z zakresu *Przedsiębiorczości* organizowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej – projekt SKILLS w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. Wrocław, 4-7.02.2015.
- Szkolenie z zakresu *Komercjalizacji Wyników Prac Badawczych* organizowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej – projekt SKILLS w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. Poznań, 3-5.12.2014.
- Szkolenie z zakresu *Zarządzania Projektami Badawczymi* organizowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej – projekt SKILLS w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. Warszawa, 3-4.11.2014.
- Kurs *Obsługa autoklawów i destylatorów*, Stowarzyszenie Inżynierów i Techników Mechaników Polskich, Ośrodek Doskonalenia Kadr we Wrocławiu. 04.2008.
- Kurs specjalistyczny *Nowoczesny Pracownik Laboratorium*, Certyfikat Biegłości w Analizie Fizyko-Chemicznej, Specjalność *Chromatografia Gazowa*, Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski, 10-12.2006.
- Kurs specjalistyczny *Nowoczesny Pracownik Laboratorium*, Certyfikat Biegłości w Analizie Fizyko-Chemicznej, Specjalność *Chromatografia Cieczowa*, Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski, 10-12.2006.

7.3. Otrzymane nagrody

- W latach 2011-2023 otrzymałam łącznie 12 *Nagród Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu* za osiągnięcia naukowe, w tym: 1 nagrodę indywidualną II stopnia (2012), 2 nagrody indywidualne III stopnia (2020, 2023), 7 nagród zespołowych I stopnia (2021, 2019, 2018, 2016, 2015, 2013, 2011), 1 nagrodę zespołową II stopnia (2014) oraz 1 nagrodę zespołową III stopnia (2022).
- Nagroda publiczności za wygłoszenie referatu *Zastosowanie rozpuszczalników głęboko eutektycznych do waloryzacji produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego* na XXV Sesji Naukowej Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ *Przyszłość w żywności – żywność w przyszłości*, Wrocław, online, 21-22.05.2021.

7.4. Podsumowanie dorobku naukowego – wskaźniki bibliometryczne

Parametr aktywności naukowej	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
Publikacje, w tym opublikowane w czasopismach:	3	26	29
– z bazy <i>Journal Citation Reports</i>	2	26	28
– spoza bazy <i>Journal Citation Reports</i>	1	-	1
Rozdziały w monografiach	2	1	3
Doniesienia konferencyjne, w tym wystąpienia ustne	9	34	43
	1	3	4
Patenty	1	21	22
Liczba pkt. ministerialnych,^a w tym za:	105	2990	3095
– publikacje	65	1860	1925
– rozdziały w monografiach	15	5	20
– patenty	25	1125	1150
Impact Factor^b	5,376	99,620	104,996
Liczba cytowań (bez autocytowań)^c publikacji wg bazy:			
– Web of Science			349 (318)
– Scopus			372 (334)
– Google Scholar			460
Indeks Hirscha^c wg bazy:			
– Web of Science			13
– Scopus (bez autocytowań)			13 (12)
– Google Scholar			14

^a zgodnie z wykazem MEiN/MNiSW obowiązującym w roku opublikowania danej pracy.

^b zgodnie z rokiem opublikowania danej pracy; dla publikacji z roku 2023 uwzględniono IF z 2022 r.

^c stan z dnia 14.08.2023.

Gmdućchi Aleksandra

(podpis wnioskodawcy)