

Autoreferat

dotyczący działalności naukowo-badawczej

dr Lucyna Dymińska

*Katedra Chemii Bioorganicznej
Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu*

1. Imię i nazwisko

Lucyna Dymińska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne

licencjat biotechnologii: Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, Biotechnologia, czerwiec 1994 r.

tytuł pracy licencjackiej: „Rośliny transgeniczne i ich rola w przemyśle”

praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Bronisławy Morawieckiej

magister biotechnologii: Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, Biotechnologia, czerwiec 1996 r.

tytuł pracy magisterskiej: „Otrzymywanie i oczyszczanie przeciwciał monoklonalnych dla antygeny karcynoembrionalnego (CEA)”

praca wykonana pod kierunkiem dr hab. Anny Krop-Wątopek

doktor nauk chemicznych w zakresie chemii: Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu, 6 czerwiec 2008 r.

tytuł rozprawy doktorskiej: „Struktura i właściwości spektroskopowe imidazopirydyny i jej pochodnych”

promotor: doc. dr hab. Mirosław Mączka

recenzenci: prof. dr hab. Eugeniusz Grech

prof. dr hab. Jerzy Hawranek

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych / artystycznych

- Adiunkt w Katedrze Chemii Bioorganicznej (stanowisko naukowo-dydaktyczne), Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu; 15.02.2015 - obecnie
- Adiunkt naukowy w Katedrze Chemii Bioorganicznej, Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu; 1.10.2010 - 14.02.2015

- Asystent w Katedrze Chemii Bioorganicznej, Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu; 1.10.2004 - 30.09.2010
- Starszy technik w Katedrze Chemii Bioorganicznej, Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny, Akademia Ekonomiczna we Wrocławiu; 1.04.2004 - 30.09.2004
- Samodzielny chemik na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego; 1.09.1996 - 30.09.1996

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

A) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl siedmiu publikacji naukowych powiązanych tematycznie oraz zebranych pod wspólnym tytułem:

Zastosowanie spektroskopii oscylacyjnej w badaniach składu chemicznego materiałów roślinnych

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

H1. Dymińska L., Spectroscopic properties of spinacine – an active component of ginseng (*Panax ginseng*) and spinach (*Spinacia oleracea*). Spectroscopy Letters 49 (2016) 635-646.

IF_{5-letni} = 0,763 IF₂₀₁₆ = 0,794 MNiSW = 15

H2. Dymińska L., Imidazopyridines as a source of biological activity and their pharmacological potentials - Infrared and Raman spectroscopic evidence of their content in pharmaceuticals and plant materials. Bioorganic and Medicinal Chemistry 23 (2015) 6087-6099.

IF_{5-letni} = 2,869 IF₂₀₁₅ = 2,923 MNiSW = 30

H3. Żuk M., **Dymińska L.**, Kulma A., Boba A., Prescha A., Szopa J., Mączka M., Zając A., Szołtysek K., Hanuza J., IR and Raman studies of oil and seedcake extracts from natural and genetically modified flax seeds. *Spectrochimica Acta Part A* 78 (2011) 1080-1089.

IF_{5-letni} = 1,952 IF₂₀₁₁ = 2,098 MNiSW = 25

H4. **Dymińska L.**, Gągor A., Hanuza J., Kulma A., Preisner M., Żuk M., Szatkowski M., Szopa J., Spectroscopic characterization of genetically modified flax fibres. *Journal of Molecular Structure* 1074 (2014) 321-329.

IF_{5-letni} = 1,585 IF₂₀₁₄ = 1,602 MNiSW = 20

H5. Wróbel-Kwiatkowska M., Szopa J., **Dymińska L.**, Mączka M., Hanuza J., Spectroscopic Characterization of Genetically Modified Flax Fibers Enhanced with Poly-3-hydroxybutyric Acid. *Journal of Molecular Structure* 920 (2009) 214-219.

IF_{5-letni} = 1,698 IF₂₀₀₉ = 1,551 MNiSW = 15

H6. Wróbel-Kwiatkowska M., Żuk M., Szopa J., **Dymińska L.**, Mączka M., Hanuza J., Poly-3-hydroxy butyric acid interaction with the transgenic flax fibers: FT-IR and Raman spectra of the composite extracted from a GM flax. *Spectrochimica Acta Part A* 73 (2009) 286-294.

IF_{5-letni} = 1,745 IF₂₀₀₉ = 1,566 MNiSW = 20

H7. **Dymińska L.**, Szatkowski M., Wróbel-Kwiatkowska M., Żuk M., Kurzawa A., Syska W., Gągor A., Zawadzki M., Ptak M., Mączka M., Hanuza J., Szopa J., Improved properties of micronized genetically modified flax fibers. *Journal of Biotechnology* 164 (2012) 292-299.

IF_{5-letni} = 3,340 IF₂₀₁₂ = 3,183 MNiSW = 30

Wkład wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w załączniku 3, natomiast oświadczenia współautorów w załączniku 7.

Sumaryczny *impact factor* prac stanowiących najważniejsze osiągnięcie w dorobku naukowym według listy *Journal Citation Reports* (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: **13,717**, punkty MNiSW = **155**.

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

W latach 2009 - 2016 realizowałam prace badawcze i studia literaturowe dotyczące wykorzystania metod spektroskopowych (spektroskopii w podczerwieni, spektroskopii Ramana) do badań składu chemicznego materiałów roślinnych. Uzyskane rezultaty opublikowałam w postaci cyklu prac powiązanych tematycznie (H1-H7), które uważam za swoje największe osiągnięcie w dotychczasowej działalności naukowej i przedkładam jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Wprowadzenie

Rośliny, ze względu na różnorodność związków organicznych w nich zawartych, stanowią ważne źródło surowcowe wykorzystywane w licznych gałęziach przemysłu. Do cennych substancji wchodzących w skład komórki roślinnej należą m.in. witaminy, barwniki, białka, tłuszcze, ligniny, a także polisacharydy: pektyny, hemiceluloza, celuloza i skrobia. Len zwyczajny (*Linum usitatissimum L.*), szpinak warzywny (*Spinacia oleracea L.*) i żeń-szeń właściwy (*Panax ginseng C.A. Meyer*) są przykładami roślin o szczególnie istotnym znaczeniu. Ze względu na atrakcyjny skład chemiczny zapotrzebowanie na te rośliny w ostatnich latach znacząco rośnie.

Len zwyczajny jest gatunkiem uprawianym w dwóch formach użytkowych - jako len oleisty (*Linum usitatissimum L. var. brevimulticaulis Vav.*) i len włóknisty (*Linum usitatissimum L. var. elongatum Vav.*). Najlepsze plony lnu oleistego otrzymuje się w krajach klimatu suchego i ciepłego lub umiarkowanego: w Indiach, Argentynie, USA i przede wszystkim w Kanadzie, która jest największym producentem i eksporterem nasion lnianych na świecie. W 2016 roku powierzchnia upraw lnu oleistego na świecie wyniosła 2,8 mln ha. W Polsce, w ostatnich latach zainteresowanie uprawą lnu oleistego rośnie, co wyraża się w stopniowym wzroście areału uprawy tej rośliny (2013 rok: 1,5 tys. ha, 2014 rok: 2,4 tys. ha, 2015 rok: 4,5 tys. ha, 2016 rok: 7,5 tys. ha) (FAOSTAT, 2018). Z kolei len włóknisty uprawiany jest w krajach o klimacie wilgotnym i umiarkowanym, między innymi we Francji, Anglii, Białorusi, Czechach, Belgii, Chinach i Egipcie (Burbulis i in., 2007). W Polsce, w 2016 roku areał uprawy lnu włóknistego wyniósł 0,2 tys. ha (Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej, 2017).

Len używany jest w różnych gałęziach przemysłu: kosmetycznym, włókienniczym, farmaceutycznym, spożywczym, papierniczym i samochodowym. Nasiona lnu zwyczajnego są bogatym źródłem białka, błonnika pokarmowego, witamin z grupy A, D, E i B6 oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Mielone siemię lniane, ze względu na prozdrowotne właściwości, dodawane jest do żywności i pasz, wykorzystywane jest również w przemyśle farmaceutycznym. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe zawarte w nasionach lnu są ważnym elementem diety, ponieważ stanowią substraty do syntez kwasów tłuszczowych grupy ω -3 i grupy ω -6. Spożywanie kwasu linolenowego powoduje wzrost elastyczności i płynności błon plazmatycznych oraz obniża ryzyko zachorowania na niektóre nowotwory oraz zawał mięśnia sercowego (Chibnall, 1924; Han i in., 1987; Żuk i in., 2014; Żuk i in., 2015). Zarówno kwas linolowy, jak i linolenowy wspomagają procesy trawienne, wzmacniają i regenerują błony śluzowe układu pokarmowego i oddechowego, skutecznie przeciwdziałają miażdżycy i chorobie nadciśnieniowej. Olej lniany wspomaga leczenie nadpobudliwości dziecięcej a także depresji, ponieważ zwiększa produkcję serotoniny i dopaminy (Tolkachev i Zhuchenko, 2000). Nasiona lnu zawierają również lignany o właściwościach przeciwnowotworowych (Boucher i in., 2012). Odpady powstałe przy przetwórstwie nasion lnu oraz torebki nasienne (zawierające ok. 36% białka i ok. 7% tłuszczu) są wykorzystywane przy produkcji pasz (Tolkachev i Zuchenko, 2000).

Włókno lniane stanowi surowiec do wyrobu materiałów domowego użytku (obrusy, serwety) oraz materiałów obiciowych, jak również do nietekstylnego wykorzystania, np. w produkcji wykładzin podłogowych i samochodowych. Tkaniny pochodzenia lnianego mają wiele cennych właściwości: nie elektryzują się, nie uczulają, doskonale wchłaniają pot, są wytrzymałe. W trakcie pozyskiwania włókna z rośliny powstają odpady - paździerz (zdrewniała, połamana część rośliny), z których wytwarza się płyty lignocelulozowe o właściwościach podobnych do płyt wiórowych. Odpady, jakie powstają podczas rośnięcia lnu, a następnie wytwarzania włókna, można wykorzystać do wyrobu papieru.

Dzięki inżynierii genetycznej można modyfikować len na wiele różnych sposobów, nadając mu nowe właściwości. Uzyskano transgeniczny len ze zwiększoną produkcją flawonoidów. Celem tej manipulacji było stworzenie lnu o zwiększonej zawartości przeciwutleniaczy i jednocześnie bardziej odpornego na choroby powodowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (Lorenc-Kukuła i in., 2005). Produkty powstałe z naturalnych odmian lnu podatne są na utlenianie, natomiast olej otrzymany z nasion lnu, wzbogacony o karotenoidy, wolniej się utlenia, dlatego można go stosować jako suplement diety.

Celem kolejnej manipulacji genetycznej było zmniejszenie zawartości lignin w włóknie lnianym. Jakość włókien lnianych zależy w dużym stopniu od zastosowanego sposobu i warunków roszenia, czyli wstępnej obróbki słomy lnianej, mającej na celu oddzielenie włókien od części zdrewniałych rośliny. Zmniejszenie poziomu lignin w włóknie lnianym wpływa korzystnie na proces roszenia, dlatego zastosowano wyciszenie genu odpowiedzialnego za aktywność regulatora procesu lignifikacji. Dodatkowo spowodowało to obniżenie ilości pektyn i hemiceluloz, co ułatwiło ich degradację przez mikroorganizmy w trakcie roszenia. Zastosowana modyfikacja miała również pozytywny wpływ na poprawę właściwości mechanicznych włókien lnianych ze względu na zwiększony stosunek zawartości celulozy względem lignin (Czemplik i Szopa, 2009). Włókna lniane niskopektynowe i niskoligninowe, zawierające wysokie stężenie przeciwutleniaczy są wyjątkowo mocne i elastyczne. Mogą posłużyć do produkcji opatrunków przeznaczonych do leczenia ran powstałych na skutek owrzodzeń żylnych i nowotworowych, a także odleżyn (Czemplik i Szopa, 2009; Skórkowska-Telichowska i in., 2010).

Inna modyfikacja genetyczna, dzięki której komórki lnu produkują kwas poli-3-hydroksymasłowy (PHB), powoduje, iż materiały opatrunkowe, utworzone z takiego lnu, wspomagają leczenie ran, pobudzając narastanie komórek w miejscu ubytku. W badaniach z wykorzystaniem metody *in vitro* zaobserwowano, że wzbogacone włókno posiada właściwości bakteriostatyczne, co daje nowe możliwości jego zastosowania do wytwarzania implantów ortopedycznych lub nici chirurgicznych (Czemplik i Szopa, 2009). Ponadto polihydroksymaślan jest biodegradowalnym tworzywem sztucznym tak wytrzymałym jak typowe syntetyczne materiały używane do produkcji opakowań, klawiatur do komputerów czy desek rozdzielczych w samochodach (Wróbel i in., 2004).

Kolejną rośliną o istotnym znaczeniu dla przemysłu spożywczego jest szpinak warzywny. W ostatnich latach na świecie obserwowany jest wzrost areału uprawy tej rośliny. W 2015 roku powierzchnia upraw szpinaku wyniosła 916 tys. ha, a w roku 2016 - 921 tys. ha. W Europie najwięcej szpinaku uprawia się w Belgii, Francji i we Włoszech. (FAOSTAT, 2018). Szpinak warzywny dzięki zawartości witamin: A, C, E, kwasu foliowego i minerałów (żelazo, magnez, mangan i wapń), jest wartościowym warzywem. Wykazano, iż obecny w szpinaku błonnik wpływa na obniżenie poziomu cholesterolu we krwi (Vadhra i in., 2003). Szpinak jest również źródłem białka. Jest to szczególnie ważne w diecie bezmięsnej (Lisiewska i in., 2011). Istotnym walorem tego warzywa są niskie koszty uprawy i jego dostępność niemal przez cały rok, zwłaszcza w okresach niedoboru świeżych warzyw.

Żeń-szeń właściwy uprawiany jest głównie w Azji Wschodniej: w Korei, Chinach, Japonii, a także w Ameryce Północnej: Kanadzie i USA. W 2010 roku, światowa produkcja żeń-szenia wyniosła 80 tys. ton (Baeg i So, 2013). Do celów leczniczych wykorzystuje się głównie korzenie (Park i in., 2005). Wykazano, że związki chemiczne zawarte w korzeniach żeń-szenia spełniają funkcje przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe i przeciwzapalne. Głównym składnikiem aktywnym są saponiny triterpenowe (zwane również ginsenozydami). Innymi związkami o znaczeniu farmakologicznym są kwasy tłuszczowe, fenole i olejki eteryczne (Kim i in., 2015). Włókniste, nierozpuszczalne w wodzie produkty uboczne pozyskane podczas produkcji ekstraktów ze świeżych korzeni żeń-szenia wykorzystywane są jako składnik pasz dla drobiu (Chung i in., 2015). Wyniki badań na zwierzętach sugerują, że żeń-szeń ma właściwości relaksujące, antystresowe oraz przeciwzapalne (Peng i in., 1995). Wykazano obniżony poziom cholesterolu u broilerów Hubbard karmionych paszą zawierającą wyłoki korzenia żeń-szenia i α -tokoferol (Kim i in., 2014). Ponadto udowodniono, iż korzeń żeń-szenia dodawany jako nanoproszek do produktów mlecznych i piekarniczych nie zmienia właściwości fizykochemicznych i sensorycznych produktu końcowego (Choi i in., 2014, Jung i in., 2010). Żeń-szeń jest coraz częściej uprawiany również w Polsce (Chmiel i Graczkowska-Chmiel, 2008).

Len, szpinak i żeń-szeń są przykładami roślin różniących się właściwościami użytkowymi, wymaganiami dotyczącymi miejsca i sposobu uprawy, wielkością produkcji i kierunkami zastosowań. Jednak ich wspólną cechą jest znacząca zawartość antyoksydantów. Nasiona i łodyga lnu, liście szpinaku i korzeń żeń-szenia są bogate w polifenole, flawonoidy i karotenoidy - związki o właściwościach przeciwutleniających i eliminujących wolne rodniki, wykazujących właściwości przeciwnowotworowe, antyangiogenetyczne, antyproliferacyjne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwcukrzycowe i przeciwzakrzepowe (Bergman i in., 2001; Buena i in., 2008; Mattila i Kumpulainen, 2002; Toledo i in., 2003; Wang i in., 2007). Rosnącemu zapotrzebowaniu przemysłu spożywczego i farmaceutycznego na len, szpinak i żeń-szeń towarzyszy wzmożone zainteresowanie opracowaniem precyzyjnych, szybkich, powtarzalnych i czułych metod oznaczania i analizy składu chemicznego, struktury i właściwości fizykochemicznych oraz użytkowych tych roślin. Najszersze zastosowanie znalazły metody spektroskopowe, takie jak spektroskopia w podczerwieni (IR) i Ramana (RS), wykorzystujące zjawiska wynikające z oddziaływania między promieniowaniem elektromagnetycznym i materią.

Zdolność do szybkiego wykrywania różnych składników w materiałach roślinnych metodami spektroskopowymi umożliwia odróżnienie roślin naturalnych – wzorcowych

od roślin modyfikowanych genetycznie. Metody spektroskopowe mogą być również wykorzystywane przez przemysł przetwórczy w celu prowadzenia kontroli jakości dostarczanych surowców, a także w ciągłej kontroli poszczególnych etapów produkcji. Dzięki technikom spektroskopowym można także badać pierwotne i wtórne metabolity komórki roślinnej, na przykład składniki ściany komórkowej oraz metabolity szlaku fenylopropanoidowego. W większości przypadków metabolity wtórne są charakterystyczne dla poszczególnych gatunków roślin, zwykle występują w niskich stężeniach i nie są niezbędne do przetrwania komórki roślinnej. Ich funkcja związana jest przede wszystkim z obroną przed drapieżnikami, pasożytami oraz ułatwieniem procesów reprodukcyjnych (związki barwne, zapachowe).

Opublikowano wiele prac dotyczących widm oscylacyjnych tkanek roślinnych i związków izolowanych z roślin (Ozen i Mauer, 2002; Robert i in., 2005). Metody spektroskopii oscylacyjnej ułatwiają analizę składu chemicznego produktów roślinnych (Robert i in., 2005). Pozwalają na ilościowe i jakościowe oznaczanie związków biologicznych. Metody te umożliwiają również wykrycie różnych zanieczyszczeń w produktach pochodzenia roślinnego (Ozen i Mauer, 2002). Techniki te nie wymagają skomplikowanego przygotowania próbek. Dzięki rozwojowi spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR - Attenuated Total Reflectance) można przeprowadzać szybkie pomiary większości płynów, takich jak oleje jadalne, olejki eteryczne i ekstrakty różnych tkanek roślinnych. Metody spektroskopowe mają wiele zalet w porównaniu do konwencjonalnych metod analitycznych. Mogą być wykorzystane w analizie materiału nawet bez wstępnego przygotowania próbki (ATR), nie działają destrukcyjnie na badany materiał i badania mogą być wykonane dla niewielkiej ilości analizowanego materiału. Na podstawie pojedynczego pomiaru widma może być oznaczonych równocześnie kilka składników próbki i ilościowe zależności między nimi. Metody spektroskopowe są szybkie, proste i przyjazne środowisku, eliminują użycie niebezpiecznych i drogich odczynników i są szczególnie użyteczne w przypadku rutynowej analizy dużej liczby próbek. Główną wadą tych metod jest wysoki koszt aparatury.

Metody spektroskopowe mogą być wykorzystywane zarówno w badaniach podstawowych materiałów roślinnych, jak również w kontroli oraz ocenie jakości roślin leczniczych, materiału siewnego lub pasz wzbogaconych różnymi mieszankami.

Cel naukowy

Wspólnym celem naukowym prac, stanowiących osiągnięcie naukowo-badawcze było opracowanie i wdrożenie szybkich metod identyfikacji związków chemicznych w wybranych materiałach roślinnych – lnie, szpinaku i żeń-szeniu z zastosowaniem spektroskopii oscylacyjnej.

Dodatkowo zostały określone następujące cele szczegółowe:

- wdrożenie metody identyfikacji związków zawierających szkielet imidazopirydynowy w materiałach roślinnych (**publikacje H1 i H2**);
- opracowanie metody identyfikacji metabolitów szlaku fenylopropanoidowego w ekstraktach i olejach roślinnych (**publikacje H1 i H3**);
- określenie zmian ilościowych i strukturalnych składników ściany komórkowej włókien lnu naturalnego i modyfikowanego genetycznie (**publikacje H4, H5, H6 i H7**).

Omówienie wyników badań

Identyfikacja związków zawierających sprzężony układ imidazopirydynowy w materiałach roślinnych (H1, H2)

Spektroskopia oscylacyjna jest doskonałym narzędziem identyfikacji substancji biologicznie czynnych w roślinach. Selekcja pasm charakterystycznych dla tych związków spośród innych pasm pojawiających się w widmach jest kluczowym problemem w analizie widm IR i Ramana materiału roślinnego. W analizie widm stosuje się metodę częstości grupowych, która często okazuje się niewystarczająca. W pracy **H1** zaproponowano innowacyjne podejście, polegające na trój etapowej procedurze identyfikacji pasm pochodzących od spinacyny w produktach naturalnych.

- Pierwszym etapem były chemiczne obliczenia kwantowe (DFT) wykonane dla cząsteczki spinacyny jako modelowego związku dla szerokiej klasy jego pochodnych.
- Drugi etap to identyfikacja i charakterystyka dynamiki drgań podwójnego pierścienia spinacyny.
- W trzecim etapie położenie i intensywności integralne obserwowanych pasm IR i Ramana wykorzystano do wykrywania obecności badanego związku w materiale roślinnym.

Takie podejście jest najefektywniejszą metodą analizy widm złożonych związków biologicznych występujących w roślinach.

Spinacyna (SPI), tj. kwas 4,5,6,7-tetrahydroimidazo[4,5-c]pirydyno-6-karboksylowy, będąca pochodną imidazopirydyny jest jednym ze związków wykazujących profilaktyczne i lecznicze właściwości. Spinacyna znana jest jako aktywny inhibitor receptorów kwasu γ -aminomasłowego, dlatego hamuje transfer między neuronami rdzenia kręgowego. U ludzi kwas γ -aminomasłowy jest również bezpośrednio odpowiedzialny za regulację napięcia mięśniowego (Boreisha i in., 1988).

Założeniem badań prezentowanych w publikacji **H1** była charakterystyka struktury molekularnej i analiza właściwości oscylacyjnych spinacyny istniejącej w formie monomerycznej oraz dimerycznej. Do obliczeń struktury molekularnej spinacyny wykorzystano metodę *ab initio* DFT posługującą się funkcjonałem gęstości (Density Functional Theory). Zastosowano bazę funkcyjną 6-311G (2d, 2p). W obliczeniach wykorzystano metodę B3LYP, czyli 3-parametrowy hybrydowy model z funkcjonałem korelacyjnym Lee-Yang-Parr (Becke, 1993; Frish i in., 1984). Do obliczenia energii drgań oraz parametrów strukturalnych cząsteczki stosowano program Gaussian 03W (Frisch i in., 2003). Obliczenia kwantowe przeprowadzono dla monomeru spinacyny, a także jej postaci dimerycznej, w której dwie molekuly połączone są dwoma wiązaniami wodorowymi.

Wyznaczone parametry geometryczne spinacyny w formie monomerycznej i dimerycznej porównano z danymi rentgenowskimi otrzymanymi dla pochodnych tego związku $\text{Spi}(\pi\text{MeOH})\cdot\text{H}_2\text{O}$ [$\text{N}\pi$ -hydroksymetylo-spinacyna] i $\text{Spm}(\alpha\text{Me})\cdot 2\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ [$\text{N}\alpha$ -metylo-spinaceamina] (Remelli i in., 1997). Długości wiązań i kąty pomiędzy nimi otrzymane dla SPI w wyniku chemicznych obliczeń kwantowych, wykazały dobrą zgodność z doświadczalnymi wartościami rentgenowskimi. Największa różnica między doświadczalnymi i obliczonymi długościami wiązań wynosi 0,083 Å dla monomerycznej postaci spinacyny i $\text{Spi}(\pi\text{MeOH})\cdot\text{H}_2\text{O}$. W przypadku formy dimerycznej największa różnica długości wiązań SPI i $\text{Spm}(\alpha\text{Me})\cdot 2\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ wynosi 0,052 Å. Porównanie obliczonych i obserwowanych wartości kątów pokazuje, że największe różnice występują dla $\text{Spm}(\alpha\text{Me})\cdot 2\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ i spinacyny w formie monomerycznej: 4,3° i dimerycznej: 4,1°.

Chemiczne obliczenia kwantowe posłużyły również do opisu struktury elektronowej spinacyny. Rozkład ładunku elektronowego spinacyny pozwala na porównanie właściwości monomeru i dimeru. Tworzenie dimeru wywołuje zmiany w rozkładzie ładunku. Grupa

karboksylowa uczestniczy w wiązaniach wodorowych między jednostkami SPI dimeru. Udział atomów tlenu i wodoru z grup karboksylowych w wewnątrzcząsteczkowym transferze ładunku wynika z analizy NBO (Natural Bond Orbital). Tworzenie się dimeru powoduje wzrost ładunku atomu wodoru z 0,484e dla monomeru do 0,508e i 0,511e dla jednostek dimeru. Atom tlenu jest bardziej ujemnie naładowany w dimerze (-0.678e, -0.682e) niż w monomerze (-0,612e). Jest to wynikiem przeniesienia ładunku z wodoru do atomu tlenu grupy karbonylowej w obu składowych dimeru.

Na podstawie obliczeń teoretycznych oraz danych eksperymentalnych, uzyskanych z badań spektroskopowych, udowodniono tworzenie wiązań wodorowych (HB) w spinacynie. Występowanie charakterystycznych drgań rozciągających wiązań wodorowych $\nu(\text{O-H}\cdots\text{O})$ dla dimeru spinacyny zostało przewidziane w wyniku obliczeń DFT przy następujących liczbach falowych: 2989, 2873 cm^{-1} . Widmo IR kwasów karboksylowych posiada charakterystyczne szerokie pasmo absorpcji w zakresie 3300 - 2500 cm^{-1} , odpowiadające drganiom wiązań wodorowych występujących w formach dimerycznych. Widmo w podczerwieni spinacyny zawiera szeroki kontur w zakresie 3750 - 2000 cm^{-1} . Dekonwolucja tego konturu na składowe Lorentza przeprowadzona przy pomocy programu Origin 7.5 wykazała, że składa się on z pasm odpowiadających drganiom: $\nu(\text{NH})_I$ (3496 cm^{-1}); $\nu(\text{NH})_P$ (3301 cm^{-1}); $\nu(\text{CH})_I$ (3133 cm^{-1}); $\nu(\text{OH})_{\text{HB}}$ (2993 cm^{-1}). Pasma, odpowiadające drganiom rozciągającym CH, pokrywają się z szerokim pasmem, charakterystycznym dla drgań wiązania wodorowego. Składowa o maksymalnej intensywności, występująca przy liczbie falowej 2822 cm^{-1} odpowiada drganiom $\nu(\text{CH})_P$.

Teoretyczne widma w podczerwieni i Ramana dla spinacyny zostały obliczone na tym samym poziomie DFT za pomocą programu GAUSSIAN 03W. Obliczone i eksperymentalne wartości liczb falowych i intensywności pasm zostały porównane z zastosowaniem współczynników skalowania (SF – scaling factor), uwzględniających anharmonizm drgań oraz specyficzność stosowanego funkcjonału i bazy. Chemiczne obliczenia kwantowe pomagają w identyfikacji i analizie drgań charakterystycznych dla sprzężonych pierścieni spinacyny.

Podstawowe drgania spinacyny przypisano do odpowiednich modów normalnych za pomocą chemicznych obliczeń kwantowych. W tym celu zastosowano procedurę rozkładu energii potencjalnej drgań normalnych (PED – Potential Energy Distribution) wykorzystując zestaw programów Balga (Rostkowska i in., 2009).

W analizie widm spinacyny uwzględniono wyniki uzyskane dla imidazo[4,5-b]pirydyny (IPb) i imidazo[4,5-c]pirydyny (IPc) oraz ich metylowych pochodnych. Dynamika drgań szkieletu imidazopirydyny (IP) objawiająca się poprzez widma IR i Ramana została opisana w pracy **H2** cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.

Spinacyna zawiera podwójny szkielet, taki sam jak izomer IPc. Wśród modów normalnych SPI można wyszczególnić drgania, w których uczestniczą atomy dwu sprzężonych pierścieni. Są to drgania: rozciągające asymetryczne $\nu_{as}(\Phi)$ (Φ oznacza szkielet imidazopirydynowy), rozciągające symetryczne $\nu_s(\Phi)$ i wachlarzowe $\omega(\Phi)$ całej cząsteczki. Zaobserwować można podobieństwo położenia pasm, odpowiadających tym drganiom w widmach w podczerwieni i Ramana spinacyny i innych pochodnych imidazopirydynowych.

Ostatni etap badań, mający na celu identyfikację związków zawierających podwójny pierścień imidazopirydynowy w materiale pochodzenia roślinnego, został opisany w pracy **H1**. Polegał on na porównaniu położenia i intensywności integralnych pasm obserwowanych w widmach IR i Ramana spinacyny z widmami materiałów biologicznych pochodzących z liści szpinaku i korzeni żeń-szenia. W widmach IR ekstraktów korzenia żeń-szenia właściwego (*Panax ginseng* C.A. Meyer) i liści szpinaku warzywnego (*Spinacia oleracea* L.) zaobserwowano szereg pasm charakterystycznych dla spinacyny. W widmach IR i Ramana spinacyny asymetryczne drganie rozciągające szkieletu imidazopirydynowego $\nu_{as}(\Phi)$ występuje odpowiednio przy 1250 i 1249 cm^{-1} . Pasma, odpowiadające drganiom $\nu_{as}(\Phi)$ obserwowane są w widmach IR ekstraktów korzenia żeń-szenia i liści szpinaku w zakresie 1245-1260 cm^{-1} . Kolejne drganie charakterystyczne dla spinacyny, symetryczne drganie rozciągające $\nu_s(\Phi)$ występuje w widmie IR przy liczbie falowej 714 cm^{-1} , a w widmie Ramana – przy 716 cm^{-1} . W widmach IR badanych ekstraktów roślinnych pasmo występujące przy liczbie falowej około 735 cm^{-1} pochodzi od drgania $\nu_s(\Phi)$ spinacyny. Jest to dowód na to, iż podwójny pierścień imidazopirydynowy jest charakterystyczną jednostką spinacyny, a analiza jego drgań oscylacyjnych może być wykorzystana jako narzędzie diagnostyczne do identyfikacji tego związku w naturalnych produktach.

Pasma obserwowane w widmach IR ekstraktów korzenia żeń-szenia i liści szpinaku, występujące przy liczbach falowych 1717, 1307 i 530 cm^{-1} są charakterystyczne dla drgań grupy karboksylowej spinacyny i innych kwasów, obecnych w ekstraktach roślinnych. Obecność pasm, odpowiadających drganiom pierścieni imidazolu i tetrahydropirydyny

również potwierdzają występowanie spinacyny w badanych ekstraktach roślinnych. Pasma te obserwuje się przy liczbach falowych: 1612, 1145, 1013, 890 i 864 cm^{-1} .

Podsumowując, w pracy **H1** zaproponowano metodę identyfikacji pasm odpowiadających drganiom szkieletu imidazopirydynowego, wyizolowanych spośród innych pasm pojawiających się w widmie IR lub Ramana. Takie podejście wiąże się z rozważaniami teoretycznymi opartymi na kwantowych obliczeniach chemicznych i matematycznym dopasowaniu widm teoretycznych i eksperymentalnych w celu przypisania najbardziej charakterystycznych pasm analizowanego związku biologicznie aktywnego. Na tej podstawie stwierdzono, że pasma charakterystyczne dla drgań spinacyny w widmach oscylacyjnych obserwowane są przy około 1612, 1307, 1250, 730 i 530 cm^{-1} . Występowanie tych pasm w widmach rośliny, jej ekstraktach lub środkach farmaceutycznych jest dowodem obecności substancji zawierającej szkielet imidazopirydynowy. Ogólny wniosek wyprowadzony z takiej procedury jest taki, że widma IR i Ramana mogą być stosowane do identyfikacji spinacyny w złożonych układach biologicznych. Stwierdzenia te zostały potwierdzone wynikami ultrawydajnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas, uzyskanymi dla ekstraktów korzeni żeń-szenia i liści szpinaku.

W pracy **H1** przeanalizowano widmo, przykładowego związku zawierającego w swej budowie pierścień IP. SPD, czyli trifluorooctan kwasu [(S)-1-[(4-amino-3-metylofenylo)metylo]-5-(difeniloacetylo)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pirydyno-6-karboksyłowego jest selektywnym antagonistą receptora angiotensyny AT2. Receptor AT2 angiotensyny jest atypowym receptorem sprzężonym z aktywacją fosfatazy tyrozynowej i hamowaniem kinazy MAP. Widma IR i Ramana tego związku zawierają szereg pasm charakterystycznych dla spinacyny. Pasma obserwowane przy 1257 i 711 cm^{-1} w widmie Ramana i przy 1260 i 704 cm^{-1} w widmie IR badanego związku zostały przypisane do asymetrycznych i symetrycznych drgań rozciągających szkieletu imidazopirydyny.

Założeniem pracy **H2** było przedstawienie związków chemicznych, zawierających podwójny pierścień IP pod kątem ich właściwości farmakologicznych, jak również szczegółowa analiza spektroskopowa pochodnych imidazopirydynowych, mająca na celu wyznaczenie pasm charakterystycznych dla drgań szkieletu podwójnych pierścieni.

Imidazopirydyna jest ważnym heterocyklicznym składnikiem biologicznie aktywnych związków występujących w roślinach, farmaceutykach i ludzkich enzymach. Jej podwójny pierścień odgrywa kluczową rolę w strukturze tych związków. Dzięki modyfikacjom strukturalnym i wprowadzeniu nowych grup funkcyjnych można zmieniać właściwości

elektronowe i chemiczne imidazopirydyn, co pozwala uzyskać nowe materiały biologicznie aktywne. Imidazopirydyny są związkami, podobnymi do puryn i benzimidazoli. Wykorzystuje się je do syntezy między innymi środków terapeutycznych. W publikacji przeglądowej **H2** omówiono ich właściwości przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, przeciw pasożytnicze, przeciwskurczowe i przeciwzapalne (Bergman i in., 1999; Cristalli i in., 1991; Ramasamy i in., 1990; Salvatori i in., 2002). Niektóre związki ze szkieletem imidazopirydyny są stosowane w psychiatrii oraz leczeniu zaburzeń autoimmunologicznych (Deghati i in., 2000; Deghati i in., 2003).

Spektroskopia oscylacyjna jest bardzo cennym narzędziem do identyfikacji złożonych związków chemicznych. Szkielety IPb i IPc tworzą charakterystyczne fragmenty wszystkich związków omówionych w publikacji **H2** cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.

Największe znaczenie diagnostyczne mają dwa drgania rozciągające: $\nu_{as}(\Phi)$ i $\nu_s(\Phi)$ obserwowane w zakresach odpowiednio 1258-1317 cm^{-1} i 690-798 cm^{-1} . Pojawienie się tych pasm obok innych charakterystycznych pasm w widmach oscylacyjnych materiałów roślinnych lub farmaceutykach potwierdza obecność szkieletu IP.

Jako narzędzie diagnostyczne do identyfikacji układu heterocyklicznego imidazopirydyny w badanych materiałach wykorzystuje się także intensywności charakterystycznych pasm. Są to pasma obserwowane w widmie IR przy liczbie falowej około: 1620 m (m - średnia intensywność), 1588 m, 1500 m, 1340 s (s - silna intensywność), 1180 m, 900 m, 640 s i 600 m cm^{-1} i w widmie Ramana: 1500 m, 1340 s, 1175 m, 1050 m i 895 m cm^{-1} .

W publikacji **H2** zidentyfikowano pasma odpowiadające wiązaniom wodorowym występującym w pochodnych imidazopirydynowych. Takie oddziaływania występują między cząsteczkami imidazopirydyny w krystalograficznej komórce elementarnej, jak również między imidazopirydyną a innymi związkami organicznymi materiału biologicznego. Wiązania wodorowe wpływają na właściwości chemiczne i aktywność biologiczną związków, w których one występują.

W pochodnych imidazopirydynowych wiązania wodorowe występują pomiędzy donorem N-H pierścienia imidazolowego i akceptorem - azotem pierścienia pirydynowego. Siłę i geometrię tego wiązania można opisać za pomocą badań rentgenowskich, obliczeń kwantowych oraz pomiarów widm IR i Ramana. W wiązaniu wodorowym, utworzonym między azotami: imidazolowym i pirydynowym można wyznaczyć parametry strukturalne,

tj. długość i kąt układu $N_I-H\cdots N_P$. Średnia długość HB w imidazopirydynach przyjmuje wartości 2,810 - 2,928 Å, świadcząc o średniej sile wiązania wodorowego w tych związkach. Dla IPb wiązania te są dłuższe (2,869 - 2,928 Å) niż dla izomeru IPc (2,810 - 2,825 Å). Kąty układu $N_I-H\cdots N_P$ zmieniają się w zakresie 159,0 - 179,6° dla wszystkich imidazopirydyn.

Analiza spektroskopowa potwierdza obecność wiązań wodorowych w pochodnych imidazopirydynowych. W widmach IR tych związków zaobserwowano bardzo szeroki i silny kontur w zakresie 1800 - 3000 cm^{-1} , który pochodzi od drgań rozciągających wiązania wodorowego $N_I-H\cdots N_P$. Obliczenia kwantowe lokalizują pasma drgań $\nu(NH)$ przy liczbie falowej: 3500 cm^{-1} , co odpowiada pasmom charakterystycznym dla drgań rozciągających N-H amin drugorzędowych. Inne pasma pochodzące od drgań wiązań wodorowych są obserwowane w zakresie 1356 - 1393 cm^{-1} dla IPb i 1411 - 1493 cm^{-1} dla IPc. Są one identyfikowane jako drgania zginające $\delta(N_I-H\cdots N_P)$. Drgania poza płaszczyznowe $\gamma(N_I-H\cdots N_P)$ pojawiają się w zakresie 795 - 888 cm^{-1} , a drgania rozciągające $\nu(N_IH)\cdots N_P$ są obserwowane między 77 a 152 cm^{-1} dla wszystkich pochodnych imidazopirydyny.

Podsumowując, wybrane drgania układu imidazopirydynowego mogą być wykorzystywane jako narzędzie diagnostyczne do wykrywania pochodnych imidazopirydyny w farmaceutykach i materiałach biologicznych. Chemiczne obliczenia kwantowe oraz pomiary widm IR i Ramana dla pochodnych IPb i IPc pozwoliły określić wszystkie drgania tego szkieletu. Intensywności pasm odpowiadających tym modom również przeanalizowano na podstawie obliczeń DFT i porównano z intensywnościami pasm widm eksperymentalnych. Można zauważyć, że kilka pasm w widmie IR i Ramana ma słabą intensywność i nie mogą być użyte do celów analitycznych. Jednakże w widmach tych występują również pasma o dużym znaczeniu diagnostycznym. Występowanie tych pasm w widmach rośliny, jej ekstraktach lub środkach farmaceutycznych potwierdza obecność szkieletu imidazopirydyny w tych substancjach.

Identyfikacja metabolitów szlaku fenylopropanoidowego w ekstraktach i olejach roślinnych (H1, H3)

W publikacji **H1** przedstawiono również wyniki badań spektroskopowych próbek pochodzenia roślinnego: wysuszonego i pokruszonego korzenia żeń-szenia, wysuszonych i pokruszonych liści szpinaku, ekstraktów z korzenia żeń-szenia i ekstraktów z liści szpinaku. Główne kontury widm IR i Raman korzenia żeń-szenia i liści szpinaku są podobne

do przedstawianych w literaturze widm próbek korzeni i liści (Konwar i Baruah, 2011; Velmurugan i in., 2012). Analizowane widma można podzielić na pięć wyraźnych zakresów: 3750 – 2000, 1800 – 1500, 1500 – 1200, 1200 – 900, 900 – 400 cm^{-1} . Taki układ jest charakterystyczny dla głównych składników komórek roślinnych - substancji polisacharydowych, takich jak celuloza i pektyny oraz ligniny.

Widma IR ekstraktów z korzeni żeń-szenia i liści szpinaku potwierdzają obecność kilku związków szlaku fenylopropanoidowego (flawonoidów i kwasów fenolowych) wykrytych w tych materiałach roślinnych metodą chromatografii gazowej przez Buenea i in. (2008) i Chung'a i in. (2012).

Aby przeanalizować widma oscylacyjne badanych ekstraktów, koniecznym było porównanie ich z otrzymanymi widmami oscylacyjnymi wzorców: kwasu syringowego, kwasu 4-hydroksybenzoesowego, kwasu kumarowego, kwasu ferulowego, kwasu synapinowego, kwasu kawowego, kemferolu, witeksyny, waniliny i kwasu protokatechowego.

Proponowane przypisania pasm, obserwowanych w widmach IR związków wzorcowych, do odpowiednich drgań normalnych przeprowadzono przez porównanie analizowanych w pracy **H1** wyników z danymi literaturowymi (Günzler i Gremlich, 2002; Socrates, 2001). Widmo IR kwasu 4-hydroksybenzoesowego jest zdominowane przez trzy szerokie pasma o średniej do wysokiej intensywności z maksimami przy 3200, 1300 i 700 cm^{-1} . Taka sekwencja pasm jest charakterystyczna dla układów z silnymi wiązaniami wodorowymi i odpowiada drganiom rozciągającym $\nu(\text{O-H}\cdots\text{O})$, zginającym w płaszczyźnie $\delta(\text{O-H}\cdots\text{O})$ i zginającym poza płaszczyznę $\gamma(\text{O-H}\cdots\text{O})$. Obserwowane w widmach IR pasma przypisano następującym drganiom normalnym (ϕ - pierścień benzenowy): 3250 – 3500 $\nu(\text{OH})$, 2980 – 3090 $\nu(\text{CH})_{\phi}$, 1680 – 1700 $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$, 1660 – 1680 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 1620 – 1640 $\nu(\phi)$, 1590 – 1610 $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$, 1510 – 1520 $\nu(\phi)$, 1440 – 1470 $\delta(\text{OH})$, 1320 – 1380 $\delta(\text{CH})_{\phi}$, 1280 – 1320 $\nu(\text{CO})$, 1160 – 1250 $\delta(\text{CH})_{\phi}$, 1000 – 1120 $\nu(\text{CC})$, 970 – 980 $\nu_{\text{s}}(\phi)$, 920 – 940 $\gamma(\text{OH})$, 700 – 870 $\gamma(\text{CH})_{\phi}$, 550 – 570 $\delta(\text{COO})$, 400 – 530 cm^{-1} $\delta(\phi) + \gamma(\phi)$.

Widmo IR kwasu syringowego jest podobne w niektórych regionach do widma kwasu 4-hydroksybenzoesowego. Kwas syringowy zawiera grupy metoksyłowe, dlatego w jego widmie IR obserwuje się dodatkowe pasma występujące w zakresach liczb falowych: 2960 – 3005 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 2830 – 2935 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 1450 – 1470 $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1330 – 1340 $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 1250 – 1280 i 1150 – 1160 $\rho(\text{CH}_3)$, 1110 – 1140 $\nu_{\text{as}}(\text{COC})$, 1040 – 1060 $\rho(\text{COCH}_3)$, 800 – 830

$\nu_s(\text{COC})$, 700 – 730, 620 – 640 i 490 – 500 $\delta(\text{COCH}_3)$, 370 – 400 cm^{-1} $\delta(\text{COC})$. Odpowiadają one drganiom grup metoksylowych połączonych z pierścieniem benzenowym.

Cząsteczkę kwasu protokatechowego odróżnia od kwasu 4-hydroksybenzoesowego jedynie dodatkowa grupa hydroksylowa, dlatego widma obu kwasów są bardzo podobne.

Kwas kawowy jest wzbogacony o dodatkowe grupy -CH względem kwasu protokatechowego, dlatego widmo kwasu kawowego zawiera dodatkowe pasma obserwowane przy 2800 – 2960 cm^{-1} $\nu(\text{CH})$ i 1410 – 1430 cm^{-1} $\delta(\text{CH})$. Widmo IR kwasu kumarowego jest podobne do kwasu kawowego, ponieważ jedyną różnicą między tymi kwasami jest brak jednej grupy hydroksylowej w kwasie kumarowym. Analiza spektroskopowa kwasu kumarowego, synapowego i ferulowego oraz kemferolu została opisana w pracy **H3**. Witeksyna jest cukrową pochodną apigeniny, a analiza spektroskopowa tego związku została opublikowana wcześniej przez Mariappan i in. (2012).

W pracy **H1** dokonano analizy widm IR ekstraktów z korzeni żeń-szenia i liści szpinaku poprzez porównanie z widmami wzorców. Położenie pasm w analizowanych widmach pokrywa się z pasmami o silnej lub średniej intensywności obserwowanymi w widmach IR dla wzorcowych związków. Badania w podczerwieni ekstraktów z liści szpinaku ujawniły obecność metabolitów szlaku fenylopropanoidowego. Świadczą o tym pasma, obserwowane przy liczbach falowych: 1612 cm^{-1} , które pokrywają się z pasmami kemferolu, witeksyny i kwasów fenolowych: hydroksybenzoesowym, protokatechowym, kawowym, kumarowym i ferulowym; 1442 cm^{-1} (kwas hydroksybenzoesowy, kawowy, kumarowy i kemferol); 1374 cm^{-1} (wanilina, kemferol, witeksyna, kwas syryngowy i protokatechowy); 1307 cm^{-1} (kwas hydroksybenzoesowy, kumarowy i kwas synapinowy); 1145 cm^{-1} (wanilina); 1098 cm^{-1} (kwasy hydroksybenzoesowy, protokatechowy, kumarowy i ferulowy); 1055 cm^{-1} (witeksyna, kwas synapinowy); 801 cm^{-1} (kwas syryngowy, kawowy, synapinowy i ferulowy); 757 cm^{-1} (kwas protokatechowy i witeksyna); 590 cm^{-1} (wanilina, witeksyna i kwas kawowy); 526 cm^{-1} (kwas kumarowy i ferulowy); 494 cm^{-1} (kemferol). Widma IR ekstraktów z korzeni żeń-szenia składają się z kilku pasm, które należy przypisać pasmom obserwowanym dla waniliny (1455, 1377, 1201, 1026 cm^{-1}), kwasu kumarowego (1455, 1377, 1201 cm^{-1}), kwasu ferulowego (1455, 1377, 1201, 1026 cm^{-1}), kwasu kawowego (1455, 1377, 1201 cm^{-1}), kwasu syryngowego (1455, 1377, 1201, 1069 cm^{-1}).

Identyfikacja metabolitów szlaku fenylopropanoidowego w ekstraktach i olejach roślinnych była celem badań prowadzonych w publikacji **H3**. Jako materiał roślinny w całym

badaniu wykorzystano naturalny len zwyczajny (*Linum usitatissimum L.*) oraz len z nadekspresją kluczowych genów szlaku flawonoidów. Zainteresowanie probiotycznymi właściwościami lnu, wynika z jego składu chemicznego. Olej lniany jest bogatym źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), które są niezbędne dla ludzi, ponieważ nie mogą być syntezowane w organizmie człowieka i muszą być dostarczane z pożywieniem. Jednak wielonienasycone kwasy tłuszczowe są podatne na utlenianie, dlatego olej lniany ma krótki okres przydatności do spożycia. W nasionach lnu fenylopropanoidy zabezpieczają PUFA przed utlenianiem. Związki przeciwutleniające, występujące w nasionach lnu mogą mieć potencjalne zastosowanie w medycynie. Udowodniono korzystny wpływ kemferolu i lignanów na przeciwdziałanie chorobom układu krążenia i cukrzycy, a także spowolnienie rozwoju nowotworów (Czemplik i Szopa 2009; Skórkowska-Telichowska i in., 2010).

Jednakże nawet w wyniku ekstrakcji na zimno, fenylopropanoidy pozostają w pozostałościach nasion, tzw. makuchach. Aby uniknąć szybkiego utleniania PUFA, olej lniany jest wzbogacany witaminami A i E lub jest przechowywany w ciemnych szklanych butelkach. Ponieważ żadna z tych metod ochrony nie jest w pełni skuteczna, poszukuje się modyfikacji roślinnych, aby poprzez inżynierię genetyczną spowodować nadprodukcję naturalnych przeciwutleniaczy w ziarnie lnu. Zespół Profesora Jana Szopy otrzymał len modyfikowany genetycznie z nadekspresją genów regulatorowych szlaku fenylopropanoidowego (Żuk i in., 2011). Rośliny transgeniczne powinny oznaczać się wzrostem zawartości flawonoidów w ekstrakcie z nasion i większą stabilnością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych względem roślin naturalnych.

Celem pracy **H3** była analiza ekstraktów i olejów z nasion lnu technikami spektroskopowymi: FT-IR i Ramana, dzięki którym uzyskać można informacje na temat składu chemicznego badanego materiału roślinnego, jak również zmian molekularnych, występujących w próbkach genetycznie modyfikowanych. Oczekiwano, iż widma IR i Ramana badanych materiałów, doprowadzą do opracowania metody wykrywania różnic składu jakościowego i ilościowego produktów lnianych. Z wykorzystaniem technik spektroskopowych zaplanowano również szczegółową analizę nasion lnu, jako materiału siewnego.

Ponieważ analiza biochemiczna olejów i ekstraktów z nasion roślin transgenicznych ujawnia obecność cennych z biotechnologicznego punktu widzenia związków, interesujące było wykonanie szczegółowej analizy tych materiałów. W tym celu przeprowadzono badania FT-IR i Ramana olejów i ekstraktów z nasion lnu naturalnego i transgenicznego.

Aby przeprowadzić szczegółową analizę badanych produktów roślinnych, wykonano pomiary widm oscylacyjnych dla wzorcowych związków chemicznych: kemferolu (KPF), kwasu p-kumarowego (P-CA), kwasu ferulowego (FA), kwasu synapinowego (SA), sekoizolaricirezinolu (SECO) i diglukozydu sekoizolaricirezinolu (SDG).

W widmie IR kemferolu obserwuje się trzy szerokie pasma, charakterystyczne dla drgań wiązania wodorowego: rozciągającego $\nu(\text{O-H}\cdots\text{O})$ - 3200 cm^{-1} , zginającego w płaszczyźnie $\delta(\text{O-H}\cdots\text{O})$ - 1300 cm^{-1} i zginającego poza płaszczyznę $\gamma(\text{O-H}\cdots\text{O})$ - 700 cm^{-1} . Widmo Ramana wykazuje również wzrastające tło w zakresie $1200 - 1750\text{ cm}^{-1}$, co odpowiada drganiom wiązań wodorowych. Pozostałe pasma pochodzą od drgań: $\nu(\text{CH})_{\phi}$ (ϕ -pierścień benzenowy) $2930 - 3090$, $\nu(\text{C=O})$ $1650 - 1670$, $\nu(\text{C=C})$ $1600 - 1620$, $\nu(\phi)$ $1560 - 1600$, $\nu(\phi) + \delta(\text{CH})$ $1450 - 1520$, $\nu(\phi)$ $1410 - 1450$, $\delta(\text{CH})$ $1370 - 1390$, $\delta(\text{CH})$ $1300 - 1320$ i $1220 - 1260$, $\nu_{\text{as}}(\text{COC})$ $1160 - 1190$, $\delta(\text{CH})$ $1080 - 1130$, $\nu(\text{C-C})$ $970 - 1010$, $\gamma(\text{CH})$ $780 - 820$, $\nu(\text{C-C})$ i $\nu_{\text{s}}(\text{COC})$ $840 - 890$, $\delta(\phi)$ $720 - 750$, $\gamma(\phi) + \gamma(\text{CH})$ $680 - 690$ i $620 - 640$, $\delta(\text{C=O})$ $560 - 600$, $\delta(\text{COC})$ i $\delta(\text{CCC})$ $490 - 520$, $\gamma(\text{C=O})$ $450 - 470$, $\gamma(\phi)$ $400 - 420$, $\gamma(\phi + \theta)$ (θ -pierścień benzopirenu) $200 - 320$, $\nu(\text{H}\cdots\text{O})$ $130 - 180$ i $\tau(\phi+\theta)$ $80 - 110\text{ cm}^{-1}$.

Pasma obserwowane w widmie kwasu p-kumarowego można przypisać następującym drganiom: (ϕ - pierścień benzenowy): $\nu(\text{OH})$ $3250 - 3500$, $\nu(\text{CH})_{\phi}$ $2980 - 3090$, $\nu(\text{CH})$ $2800 - 2960$, $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ $1680 - 1700$, $\nu(\text{C=C})$ $1670 - 1680$, $\nu(\phi)$ $1620 - 1640$, $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ $1600 - 1610$, $\nu(\phi)$ $1510 - 1520$, $\delta(\text{OH})$ $1440 - 1450$, $\delta(\text{CH})_{\text{et}}$ $1410 - 1430$, $\delta(\text{CH})_{\phi}$ $1320 - 1380$, $\nu(\text{C-O})$ $1280 - 1320$, $\delta(\text{CH})_{\phi}$ $1170 - 1250$, $\nu(\text{C-C})$ $1000 - 1120$, $\nu_{\text{s}}(\phi)$ $970 - 980$, $\gamma(\text{OH})$ $920 - 940$, $\gamma(\text{CH})_{\phi}$ $700 - 870$, $\delta(\text{COO})$ $550 - 570$, $\delta + \gamma(\phi)$ $400 - 530$, $\nu(\text{H}\cdots\text{O})_{\text{HB}}$ $100 - 130\text{ cm}^{-1}$.

Intensywności i położenia pasm w widmach kwasu synapinowego (SA) są podobne do tych, jakie obserwuje się dla kwasu p-kumarowego, ze względu na podobną strukturę cząsteczek. Kwas synapinowy zawiera dwie dodatkowe grupy metoksyłowe, przyłączone do pierścienia benzenowego, których drgania obserwuje się przy długościach fal: $2960 - 3005\text{ cm}^{-1}$ $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $2830 - 2935\text{ cm}^{-1}$ $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, $1450 - 1470\text{ cm}^{-1}$ $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $1330 - 1340\text{ cm}^{-1}$ $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, $1250 - 1280$ i $1150 - 1160\text{ cm}^{-1}$ $\rho(\text{CH}_3)$, $1110 - 1140\text{ cm}^{-1}$ $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$, $1040 - 1060\text{ cm}^{-1}$ $\rho(\text{COCH}_3)$, $800 - 830\text{ cm}^{-1}$ $\nu_{\text{s}}(\text{C-O-C})$, $700 - 730$, $620 - 640$ i $490 - 500\text{ cm}^{-1}$ $\delta(\text{COCH}_3)$, $370 - 400\text{ cm}^{-1}$ $\delta(\text{C-O-C})$.

Widma kwasu ferulowego (FA) są podobne do widm kwasu synapinowego, ponieważ jedyną różnicą między tymi kwasami jest brak jednej grupy metoksyłowej w kwasie ferulowym. W związku z tym pasma odpowiadające grupom metoksyłowym rozszczepiają się na dwie

składowe dla kwasu synapinowego, podczas gdy tylko jedno pasmo obserwuje się w odpowiednich zakresach dla kwasu ferulowego. Efekt ten można zaobserwować w zakresach 2800 – 2950, 1400 – 1500, 1300 – 1350, 1100 – 1220, 900 – 1000 i 550 – 850 cm^{-1} , w których pojawiają się drgania grupy metoksylowej. Porównując widma kwasu ferulowego i synapinowego obserwuje się niewielkie przesunięcia pasm, np. dla drgania wiązania wodorowego $\nu(\text{O-H}\cdots\text{O})$, które pojawia się w rejonie 3200 – 3400 cm^{-1} dla SA i 3300 – 3500 cm^{-1} dla FA. Podobnie drganie $\nu(\text{C=O})$ w widmie Ramana obserwuje się przy 1643 cm^{-1} dla SA i 1630 cm^{-1} dla FA. Wynik ten wskazuje, że brak jednej z grup metoksylowych w FA zmienia polaryzowalność pierścienia benzenowego, co prowadzi do zmiany siły wiązania wodorowego $\text{OH}\cdots\text{O}=\text{C}$.

Pasma obserwowane w widmach sekoizolaricirezinolu (SECO) należy przypisać następującym drganiom normalnym (ϕ - pierścień benzenowy): $\nu(\text{O-H}\cdots\text{O})$ 1700 – 3600, $\nu(\text{CH})_{\phi}$ 2990 – 3070, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ 2960 – 3000, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ i $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ 2920 – 2950, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ 2840 – 2900, $\nu(\phi)$ 1600 – 1620, $\nu(\phi)$ 1510 – 1520, $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{CH}_2)$ 1430 – 1490, $\delta(\text{OH}\cdots\text{O})$ 1200 – 1450, $\delta(\text{CH})_{\phi} + \delta(\phi)$ 1340 – 1360, $\nu(\phi)$ 1300 – 1320, $\rho(\text{CH}_3)$ 1260 – 1280, $\delta(\text{CH})_{\phi}$ 1150 – 1200, $\rho(\text{CH}_3)$ 1180 – 1200, $\delta_{\text{as}}(\text{C-O-C})_{\text{metoxy}}$ 1120 – 1140, $\nu(\text{C-C}) + \nu(\text{C-O})$ 1080 – 1090, $\rho(\text{COCH}_3) + \delta(\text{CH})$ 1020 – 1050, $\nu_{\text{s}}(\phi) + \gamma(\text{CH})$ 950 – 980, $\gamma(\text{OH}) + \rho(\text{CH}_3)$ 930 – 940, $\gamma(\text{CH})_{\phi}$ 880 – 890, $\nu_{\text{s}}(\text{C-O-C})_{\text{metoxy}}$ 770 – 810, $\delta(\phi)$ 710 – 740, $\gamma(\text{CH})$ 660 – 680, $\delta(\phi)$ 620 – 640, $\delta(\text{CCC})$ 500 – 570, $\delta(\text{CCO}) + \gamma(\phi)$ 400 – 460, $\rho(\text{COCH}_3)$ 360 – 380, $\gamma(\text{CCC}) + \gamma(\text{CCO})$ 250 – 350, $\tau(\text{CH}_3)$ 190 – 230, $\nu(\text{H}\cdots\text{O})_{\text{HB}}$ 90 – 160 cm^{-1} .

Widma diglukozydu sekoizolaricirezinolu (SDG) wykazują duże podobieństwo do widm sekoizolaricirezinolu w położeniu i intensywnościach pasm. Dodatkowe pasma obserwuje się w zakresach liczb falowych: 3100 – 3600 (IR) $\nu(\text{O-H}\cdots\text{O})_{\text{G}}$; 2800 – 2950 (RS) $\nu(\text{CH})_{\text{G}}$; 1600 – 1700 (IR) $\delta(\text{OH})_{\text{G}}$; 1370 – 1375 $\delta(\text{O-H}\cdots\text{O})_{\text{G}}$; 1373 (IR,RS), 1237, 1170 (IR) $\delta(\text{CH})_{\text{G}}$; 1100 (IR), 1125 (RS) $\nu(\text{COC})_{\text{G}}$; 1076 (IR), 1065 (RS) $\nu(\text{C-O-C})$, 940 (IR), 894 (IR), 899 (RS), 819 (IR) $\gamma(\text{CH}) + \nu(\text{G ring})$, 715 (IR) 634 (IR), 610 (IR), 530 (IR), 500 cm^{-1} (RS) $\delta(\text{G})$. Powyższe pasma odpowiadają drganiom cząsteczki glukozy (G) i wiązania glikozydowego C-O-C.

Celem pracy **H3** była między innymi analiza składu chemicznego olejów, z wykorzystaniem technik spektroskopowych. Materiałem badań był olej, otrzymany z nasion lnu naturalnego (Linola) oraz olej uzyskany z nasion roślin modyfikowanych genetycznie (W92) z nadekspresją kluczowych genów szlaku fenylopropanoidowego. Aby dokonać

porównawczej analizy widm oscylacyjnych, próbki mierzono w identycznych warunkach, a następnie uzyskane widma standaryzowano przez ich przesunięcie do punktów wspólnych. Punkty te to maksymalne intensywności dwóch pasm obserwowanych przy liczbach falowych 2928 i 1747 cm^{-1} . Pierwsze z nich odpowiada asymetrycznym drganiom rozciągającym $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, a drugie – drganiom rozciągającym $\nu(\text{C}=\text{O})$. Są to drgania charakterystyczne dla estrów glicerynowych kwasów tłuszczowych, których intensywności pasm można wykorzystać jako punkty odniesienia w analizie porównawczej widm IR i Ramana badanych olejów.

Widma IR oleju z nasion lnu naturalnego i rośliny transgenicznej są podobne zarówno w położeniu, jak i intensywności najsilniejszych pasm. Jednak kontury widmowe, obserwowane dla oleju z rośliny transgenicznej są nieco szersze, a ponadto widmo zawiera kilka dodatkowych składowych.

Widma w podczerwieni olejów zawierają pasma przy liczbach falowych: 3009 m, 2954 s, 2928 vs, 2854 s, 1747 vs, 1657 vw, 1466 m, 1419 w, 1397 w, 1378 m, 1352 w, 1280 m, 1238 m, 1164 m, 1121 m, 1100 m, 1061 w, 1034 w, 964 vw, 914 vw, 871 vw, 844 vw, 723 m, 693 w, sh, 601 vw, 581 vw, 461 vw, 449w, 427 vw, 405 vw cm^{-1} , gdzie vs oznacza pasmo o bardzo silnej intensywności; s – pasmo o silnej intensywności; m – pasmo o średniej intensywności; w – pasmo o słabej intensywności; vw – pasmo o bardzo słabej intensywności. W widmach Ramana obserwuje się pasma przy zbliżonych liczbach falowych: 3012 s, 2928 vs, 2900 vs, 2874 vs, 2853 vs, 2723 w, 1746 w, 1658 s, 1440 s, 1399 vw, 1302 m, 1265 m, 1111 vw, 1077 w, 972 w, 909 w, 872 w, 845 w, 725 vw, 597 vw, 108 m cm^{-1} . Powyżej wyszczególnione pasma można przypisać następującym modom: $\nu(=\text{CH})$ 3000 – 3015, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ 2920 – 2960, $\nu(\text{CH}_2)$ 2900 – 2930, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ 2880 – 2900, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ 2850 – 2860, $\nu(\text{C}=\text{O})$ 1740 – 1750, $\nu(\text{C}=\text{C})$ 1650 – 1660, $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3) + \delta_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ 1420 – 1470, $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3) + \delta_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ 1360 – 1380, $\omega(\text{CH}_2)$ 1260 – 1310, $\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$ 1100 – 1170, $\nu_{\text{s}}(\text{CO-O-C})$ 1070 – 1115, $\nu(\text{C-C})$ 840 – 980, $\rho(\text{CH}_3) + \rho(\text{CH}_2)$ 680 – 770, $\delta(\text{C}=\text{O})$ 550 – 610, $\gamma(\text{C}=\text{O})$ 300 – 465, $\gamma(\text{CCC}) + \gamma(\text{CCO})$ 100 – 300 cm^{-1} .

Różnice pomiędzy widmami IR oleju pochodzącego z kontrolnego i transgenicznego lnu są widoczne po standaryzacji pasm obu widm w obszarze 1500 - 1680 cm^{-1} . Intensywności pasm w tym zakresie są większe dla oleju rośliny transgenicznej. Ponadto, jedno pasmo występujące w widmie oleju rośliny naturalnej przy liczbie falowej około 1650 cm^{-1} w widmie IR oleju rośliny transgenicznej rozszczepia się na dwie składowe (1648 i 1657

cm^{-1}). Pasma te przypisać należy drganiom $\nu(\text{C}=\text{C})$ kwasów: synapinowego, ferulowego i kemferolu, ponieważ w widmach wzorcowych pasma tych drgań pojawiają się przy liczbach falowych odpowiednio: 1663, 1664 i 1662 cm^{-1} .

Podobną zależność zauważyć można dla innych pasm omawianego zakresu. Pasma widm olejów, występujące przy 1608 cm^{-1} odpowiadają pasmom, obserwowanym w widmach standardów SECO (1601 cm^{-1}), SDG (1604 cm^{-1}) i kwasu kumarowego (1602 cm^{-1}). Kolejne pasma widm olejów, występujące przy 1589 cm^{-1} odpowiadają pasmom 1591, 1589 i 1583 cm^{-1} , charakterystycznym kolejno dla kwasów: ferulowego, kumarowego i synapinowego. Pasma przy 1567 cm^{-1} odpowiadają pasmom kemferolu (1569 cm^{-1}), pasma przy 1512 cm^{-1} - SECO (1515 cm^{-1}), SDG (1516 cm^{-1}), kwasu kumarowego (1512 cm^{-1}), kwasu synapinowego (1517 cm^{-1}). Wymienione pasma mają większą intensywność dla widm oleju rośliny transgenicznej, co sugeruje wyższy poziom metabolitów szlaku fenylopropanoidowego w roślinach modyfikowanych genetycznie. Wyniki te są zgodne z wynikami analizy biochemicznej UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography).

W widmach IR badanych olejów obserwowane są dwa pasma przy liczbach falowych 1549 i 1567 cm^{-1} , które nie występują w widmach omawianych wyżej wzorców. Można je przypisać drganiom zginającym $\delta(\text{NH}_3^+)$, $\delta(\text{NH}_2)$ lub $\delta(\text{NH})$ grup aminowych lub wiązań amidowych, pochodzących prawdopodobnie z aminokwasów lub peptydów.

Ogólny wniosek z badania widm IR olejów jest taki, że kilka związków o charakterze hydrofilowym przechodzi do oleju. Wśród tych związków są flawonoidy, kwasy fenolowe i lignany. Poziom tych związków jest wyższy w oleju z nasion roślin transgenicznych w porównaniu z olejem z nasion lnu naturalnego. Wykryte związki szlaku fenylopropanoidowego w oleju są dobrym czynnikiem ochrony kwasów tłuszczowych przed utlenianiem.

Analiza UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography) ekstraktów z nasion lnu naturalnego i transgenicznego wykazała obecność związków o aktywności antyoksydacyjnej, pochodzących ze szlaku fenylopropanoidowego. Wśród tych związków wykryto kemferol, kwas kumarowy, ferulowy i/lub synapinowy i lignany. W pracy **H3** cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wykazano również wyższy poziom tych związków w ekstrakcie z nasion rośliny transgenicznej w porównaniu z ekstraktem z rośliny naturalnej.

Kolejnym zamierzeniem pracy **H3** było porównanie wyników analizy biochemicznej z wynikami badań spektroskopowych ekstraktów z nasion lnu naturalnego i transgenicznego.

W widmach w podczerwieni badanych ekstraktów występują pasma przy liczbach falowych: 3007 s, 2950 vs, 2924 vs, 2873 s, 2854 s, 1741vs, 1651 s, 1547 vw, 1515 w, 1460 m, 1451 m, 1439 s, 1418 m, 1404 m, 1376 m, 1317 m, 1239 s, 1202 s, 1169 s, 1152 s, 1102 vs, 1076 vs, 1049 vs, 1019 vs, 920 w, 901 w, 858 vw, 835 vw, 778 m, 753 m, 709 m, 667 m, 619 m, 495 m cm^{-1} . Powyższe pasma tworzą pięć wyraźnych konturów spektralnych: 2000 – 3750, 1580 – 1800, 1310 – 1350, 950 – 1530 i 400 – 850 cm^{-1} . Kontury z drugiego, czwartego i piątego zakresu zostały rozłożone na składowe Lorentza. Liczbę składowych szerokich, złożonych konturów określono na podstawie najlepszego dopasowania między teoretyczną i eksperymentalną obwiednią konturów pasm. Porównując składowe Lorentza badanych widm zauważyć można, iż intensywności i szerokości połówkowe niektórych składowych w widmie ekstraktów nasion roślin transgenicznych są odpowiednio wyższe o około 60% i około 100%. Zauważyć również można zmianę pozycji energetycznej niektórych składowych. Różnice te charakteryzują składowe, których maksima intensywności występują przy liczbach falowych: 1678, 1262, 1231, 657 i 614 cm^{-1} . Te położenia pasm pokrywają się pozycjami pasm o silnej intensywności, obserwowanymi w widmach związków wzorcowych. Składowa przy 1678 cm^{-1} odpowiada pasmu o silnej intensywności, występującemu w widmie kwasu kumarowego przy 1671 cm^{-1} . Składowa przy 1261 cm^{-1} pokrywa się z pozycją silnego pasma widocznego w widmie SECO (1266 cm^{-1}), SDG (1273 cm^{-1}) i kwasu ferulowego (1277 cm^{-1}). Kolejna składowa, obserwowana przy 657 cm^{-1} odpowiada pasmu z widma kwasu ferulowego (667 cm^{-1}). Natomiast pozycja składowej przy 614 cm^{-1} pokrywa się z położeniem pasm, występujących w widmach SDG, kwasu kumarowego, ferulowego i kemferolu.

Analiza pasm przeprowadzona w pracy **H3** dla widm IR, charakterystycznych dla drgań związków szlaku fenylopropanoidowego, potwierdza wyższy poziom tych substancji w ekstraktach z nasion lnu modyfikowanego genetycznie względem ekstraktów z nasion lnu naturalnego. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi z analizy biochemicznej UPLC, badanych materiałów.

Zmierzone widma substancji wzorcowych, stosowanych w pracy **H3**, posłużyły również do wygenerowania widma teoretycznego ekstraktu z nasion lnu, w oparciu o stężenia, ustalone metodą UPLC. Zakładając, że absorbancja IR (I_{ekstrakt}) przy każdej liczbie falowej (ν_i) widma ekstraktu z nasion pochodzi z absorbancji odpowiednich wzorców ($I_n^{\nu_i}$), których obecność i ilość została ustalona w biochemicznej analizie, otrzymano widma teoretyczne. Obliczenia przeprowadzono wykorzystując wzór: $I_{\text{ekstrakt}}(\nu_i) = 1/n_k \sum(I_n^{\nu_i})$, gdzie

$1/n_k$ oznacza częściową zawartość wzorca w badanym ekstrakcie z nasion lnu. Widmo teoretyczne porównano z widmami w podczerwieni analizowanych materiałów. Okazuje się, że obliczone widmo ekstraktów z nasion lnu jest podobne do widma eksperymentalnego, zarówno w położeniu, jak i w intensywnościach obserwowanych pasm. Pasma widma teoretycznego występujące w zakresie $1530-1800\text{ cm}^{-1}$, szczególnie dwa silne pasma przy liczbach falowych 1742 i 1656 cm^{-1} , można przypisać drganiom grup karboksylowych z kwasów fenolowych. Pierwsze z nich (1742 cm^{-1}) należy przypisać drganiom rozciągającym C=O izolowanej grupy karboksylowej, a drugie (1656 cm^{-1}), odpowiada drganiom cząsteczki, uczestniczącej w wiązaniu wodorowym.

Określenie zmian ilościowych i strukturalnych składników ściany komórkowej włókien lnu naturalnego i modyfikowanego genetycznie (H4-H7)

Włókno lniane jest włóknem łądygi, tak jak włókna konopi siewnych czy bambusa zwyczajnego. Pochodzi z komórek łyka i jest zlokalizowane na obwodzie łądygi. Pojedyncza komórka włókna lnianego ma wydłużony, cylindryczny kształt o średniej długości 27 mm i szerokości $23\text{ }\mu\text{m}$ (Charlet i in., 2010). Dojrzałe włókno lnu jest bardzo dobrym surowcem technologicznym, jednym z najmocniejszych spośród naturalnych włókien. Jest bardziej wytrzymałe na rozciąganie od bawełny. Zawiera związki o charakterze przeciwutleniającym. Cechuje go również wysoka chłonność wody. Jednakże włókno lnu ma również wady. Ze względu na obecność lignin jest sztywne i trudne w obróbce, a utkana z niego tkanina łatwo się gniece. Dodatkowo proces otrzymywania włókna jest czasochłonny a jego jakość zależy od wielu czynników. Ważne jest dokładne poznanie składu i struktury włókna lnianego oraz tworzenie nowych odmian roślin o ulepszonych właściwościach.

Włókno lnu to głównie ściana komórkowa, w skład której wchodzi celuloza (65-70% suchej masy włókna), hemicelulozy (15%), pektyny oraz ligniny (10-12%). Polimery te wspólnie tworzą sieć przestrzenną, wzmocnioną za pomocą różnego rodzaju wiązań chemicznych. Ściana komórkowa włókna zawiera również śladowe ilości cukrów prostych, metabolitów szlaku fenylopropanoidowego, sterole i woski (3-10%) (Preisner i in., 2015).

Genetyczna modyfikacja lnu może wpływać między innymi na udoskonalenie włókien lnianych. Celem pracy **H4** była charakterystyka włókien lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum L.*) oraz jego pochodnych transgenicznych. Materiałem analizowanym w tej pracy były: rośliny naturalne NIKE oraz modyfikowane genetycznie:

- PGI11 z nadekspresją enzymów pektynazy grzybowej, powodującej obniżenie poziomu pektyn w włóknie lnianym, a tym samym poprawioną wydajność roszenia (Musiałak i in., 2008);
- CAD27 o zmniejszonej zawartości ligniny, co wpływa na poprawę właściwości sprężystych włókna (Wróbel-Kwiatkowska i in., 2007);
- M50 – rośliny, z ulepszonymi właściwościami mechanicznymi, zawierające w ścianie komórkowej kwas poli-3-hydroksymasłowy (Wróbel i in., 2004).

Włókna lnu zwyczajnego oraz jego pochodnych transgenicznych porównano wykorzystując metody spektroskopii oscylacyjnej. Dzięki tej metodzie scharakteryzowano zmiany w ilości głównych składników ściany komórkowej (celulozy, hemicelulozy, pektyn i lignin). Wykazano również różnice w budowie szkieletów celulozowych, a także siły i orientacji wiązań wodorowych łączących łańcuchy celulozowe. Dzięki spektroskopii w podczerwieni można udowodnić, iż modyfikacja genetyczna odniosła pożądany skutek w odmianach roślin GM (genetycznie modyfikowane). Metoda ta stanowi szybki sposób porównania związków zawartych w materiałach roślinnych zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym pomiędzy naturalnymi i genetycznie modyfikowanymi odmianami roślin uprawnych.

Metody spektroskopowe dostarczają również informacji na temat zmian molekularnych włókien lnu spowodowanych starzeniem, obróbką mechaniczną i chemiczną (Edwards i in., 1997; Jähn i in., 2002; Schrader i in., 1999).

W pracy **H4** cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zmierzono widma IR włókien lnianych roślin kontrolnych oraz modyfikowanych genetycznie. Dla każdej próbki zarejestrowano trzy powtórzenia widm. Procedury pomiarów spektroskopowych zostały ustandaryzowane. Te same parametry spektralne, zostały zastosowane do wszystkich badanych próbek. Zauważono, że widma IR składają się głównie z pasm charakterystycznych dla celulozy (Carrillo i Colom, 2004; Colom i Carrillo, 2002; Dai i Fan, 2011; Marechal i Chanzy, 2000; Schwanninger i in., 2004). W celu analizy lignin i pektyn dokonano rozkładu wybranych, szerokich konturów na składowe Lorentza oraz porównano intensywności integralne określonych składowych.

Kontury spektralne analizowano za pomocą komercyjnego programu komputerowego Origin 7.5. Ta analiza obejmowała odejmowanie tła i rozkład eksperymentalnych pasm na składowe Lorentza. Wszystkie intensywności integralne obserwowanych pasm zostały

ustandaryzowane za pomocą statystycznego współczynnika determinacji R^2 . W tym celu przeprowadzono kilka symulacji rozkładu Lorentza przy użyciu szerokiej i zmiennej liczby składowych. Najlepsze dopasowanie pomiędzy eksperymentalnym i teoretycznym zarysem spektralnym osiągnięto, gdy ich wartości statystyczne R^2 mieściły się w granicach 0,98 - 1,0, a współczynnik zbieżności χ^2 był rzędu 10^{-6} .

Aby ustalić ilościową zawartość poszczególnych składników ściany komórkowej włókna lnianego, należy dokonać standaryzacji porównywanych widm. Określono punkt wspólny badanych widm IR, w tym przypadku maksimum intensywności pasma przy 2920 cm^{-1} , które odpowiada drganiu $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$. Wcześniejsze badania Popescu i in. (2006) pokazały, że intensywność tego pasma pozostawała niezmienną dla różnych badanych włókien roślinnych. Takie podejście pozwoliło na porównanie intensywności pasm w widmach włókien lnianych pochodzących z roślin kontrolnych i transgenicznych.

Celuloza jest najpowszechniejszym biopolimerem występującym w przyrodzie i głównym składnikiem ściany komórkowej roślin. Łańcuchy celulozowe zbudowane są z cząsteczek glukozy, połączonych wiązaniami β -1,4'-glikozydowymi. Stabilizowane są wiązaniami wodorowymi wewnątrz- i międzycząsteczkowymi.

Szerokie pasmo w widmie IR przy 3400 cm^{-1} odpowiada drganiu rozciągającemu wolnych grup hydroksylowych $\nu(\text{OH})$ i grup zaangażowanych w wewnątrz- i międzycząsteczkowe wiązania wodorowe. Kształt tego konturu jest prawie taki sam dla wszystkich badanych próbek, jednakże różnią się one intensywnością absorpcji: $I_{\text{M50}} > I_{\text{NIKE}} \geq I_{\text{PGI11}} > I_{\text{CAD27}}$. Zmiany w intensywności składowych pasma 3400 cm^{-1} dla włókien kontrolnych i transgenicznych wynikają z różnych konformacji wewnątrzcząsteczkowych i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych $\text{O-H}\cdots\text{O}$, stabilizujących łańcuchy celulozowe. W ścianie komórkowej celuloza obecna jest w dwóch konformacjach: amorficznej, o nieuporządkowanych, luźno ułożonych mikrofibrylach i krystalicznej, o wysoko uporządkowanej strukturze i równolegle ułożonych mikrofibrylach.

Mniejsze intensywności omawianego pasma dla włókien z transgenicznych roślin (PGI11 i CAD27), świadczą o słabszych oddziaływaniach pomiędzy polimerami celulozowymi. Przeciwny wynik zaobserwowano dla włókna M50 zawierającego kwas poli-3-hydroksymasłowy. W tym przypadku intensywność pasma 3400 cm^{-1} była znacznie większa niż w przypadku kontrolnych włókien NIKE.

Należy zauważyć, że w rozważaniach na temat roli wiązań wodorowych w strukturze włókien lnianych uwzględniono możliwość obecności pozostałości wody w badanych materiałach. Dlatego materiały suszono przed pomiarami spektroskopowymi. Stwierdzono, że resztkowa woda nie występowała w badanych próbkach.

W celu dokładniejszej charakterystyki wiązań wodorowych wzmacniających strukturę ściany komórkowej włókna, zakres widma IR 3800 – 3000 cm^{-1} rozłożono na sześć składowych Lorentza. Następnie porównano położenia oraz intensywności integralne składowych pasm. Pasma te odpowiadają drganiom wiązań wodorowych wewnątrzcząsteczkowych 2-OH...O-6 i 3-OH...O-5, międzycząsteczkowym 6-OH...O-3' oraz drganiu rozciągającemu $\nu(\text{OH})$ celulozy (Carrillo i Colom, 2004; Colom i Carrillo, 2002; Dai i Fan, 2011; Schwanninger i in., 2004). Pasma widma IR włókna lnu, występujące w zakresie 3455 – 3410 cm^{-1} odpowiada drganiu wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego 2-OH...O-6 celulozy. Kolejne pasmo z zakresu 3375 – 3340 cm^{-1} przypisuje się drganiu wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego 3-OH...O-5, natomiast pasmo z zakresu 3310 – 3230 cm^{-1} odpowiada drganiu międzycząsteczkowego wiązania wodorowego 6-OH...O-3' celulozy. Analiza położenia i intensywności tych pasm sugeruje większą liczbę wiązań wodorowych w włóknie lnu PGI11, natomiast mniejszą w CAD27. Zatem łańcuchy celulozowe włókna CAD27 odznaczają się większą elastycznością w porównaniu z łańcuchami celulozowymi włókna lnu naturalnego. Analizując ten obszar widma IR włókna M50, zauważyć można dodatkowe składowe przy liczbach falowych 3482 i 3400 cm^{-1} , co sugeruje tworzenie nowych wiązań wodorowych, zanikają natomiast pasma powyżej 3500 cm^{-1} odpowiadające drganiom rozciągającym $\nu(\text{OH})$ wolnych grup hydroksylowych. Potwierdza to fakt, że wolne grupy OH biorą udział w dodatkowych wiązaniach wodorowych. Głównym założeniem modyfikacji genetycznej roślin M50 było wzmocnienie właściwości mechanicznych łądyg poprzez zgromadzenie PHB w ścianach komórkowych włókien, a obszar widma IR przy około 3400 cm^{-1} pokazuje, że polimery celulozowe M50 są silniej związane niż te w próbach kontrolnych NIKE.

Ogólny kształt widma IR włókien lnianych jest typowy dla widma celulozy, wzbogaconego pasmami lignin i pektyn. Poszczególne pasma mogą być przypisane charakterystycznym drganiom celulozy (ϕ – pierścień glukozy): $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$ przy 1429 cm^{-1} , $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$ przy 1372 cm^{-1} , $\delta(\text{CH})$ przy 1319 i 1336 cm^{-1} , $\nu(\text{C-C})$ i $\nu(\text{C-O})$ w zakresie 1200 – 1300 cm^{-1} , $\delta(\phi\text{-OH})$ przy 1163 cm^{-1} , $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ w zakresie 1000 – 1110 cm^{-1} , $\gamma(\text{CH})$

w zakresie of $850 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ i $\delta(\phi)$ w zakresie $500 - 720 \text{ cm}^{-1}$ (Schulz i Baranska, 2007; Socrates, 2001; Szymańska-Chargot i in., 2011; Wojtkowiak i Chanabel, 1984).

Porównując intensywności integralne pasm, odpowiadających drganiom $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ (1429 cm^{-1}) i $\delta(\text{CH}) + \delta(\text{OH})$ (1318 cm^{-1}), zauważyć można taką samą zależność $I_{\text{PGI11}} > I_{\text{NIKE}} > I_{\text{CAD27}} > I_{\text{M50}}$. Intensywności integralne pasma przy 898 cm^{-1} spełniają zależność: $I_{\text{PGI11}} > I_{\text{NIKE}} > I_{\text{M50}} > I_{\text{CAD27}}$. Różnica pomiędzy intensywnościami integralnymi odmian lnu NIKE i PGI11 wynosi 23,4%, natomiast między próbą kontrolną a M50 i CAD27 różnice te są mniejsze (6,8-14,6%). Dane te sugerują, że włókno z lnu PGI11 posiada najwyższą zawartość celulozy w porównaniu z włóknem kontrolnym, podczas gdy włókna z M50 i CAD27 wykazują mniejszą jej ilość.

Cenne wnioski można wysunąć z analizy pasm, obserwowanych przy około 1200 cm^{-1} , w zakresie $950 - 1160 \text{ cm}^{-1}$ i przy około 600 cm^{-1} . Pierwsze pasmo odpowiada drganiom rozciągającym w płaszczyźnie pierścienia monomeru celulozy, sprzężonym z drganiami zginającymi w płaszczyźnie O-H...O. Drugie pasmo charakterystyczne jest dla drgań $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$, a trzecie - dla zginających poza płaszczyznę drgań wiązań wodorowych $\gamma(\text{O-H}\cdots\text{O})$. Intensywność integralna pasma przy 1200 cm^{-1} dla M50 jest o 43% większa niż dla próby kontrolnej, porównywalna dla NIKE i PGI11, natomiast dla CAD27 jest o 37% mniejsza niż dla włókna lnu naturalnego. Takie same zależności obserwuje się, analizując pasmo przy 665 cm^{-1} : $I_{\text{NIKE}} < I_{\text{M50}}, I_{\text{NIKE}} > I_{\text{CAD27}}$. Dane te potwierdzają wyniki analizy widma IR z zakresu $3000 - 3800 \text{ cm}^{-1}$, charakterystycznego dla drgań wiązań wodorowych. Dowodzą one, iż włókna roślin CAD27 są bardziej elastyczne niż włókna kontrolne, natomiast włókna rośliny M50 są bardziej wytrzymałe, co jest zgodne z założeniami modyfikacji genetycznych.

Pasma, obserwowane przy liczbach falowych: 1158 i 990 cm^{-1} charakterystyczne są dla drgań $\nu(\text{COC})$ wiązania β -1,4'-glikozydowego łańcuchów celulozowych. Analizując te pasma, zauważa się zdecydowanie większą intensywność integralną dla włókien M50. Dane te sugerują, że włókna M50 zawierają więcej mostków C-O-C niż celuloza z naturalnych włókien, ponieważ wiązania te występują nie tylko w polimerach celulozowych, ale także w PHB.

Kolejnym celem pracy **H4** cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe była analiza zawartości pektyn w włóknach lnu GM. Celulozowe rusztowanie ściany komórkowej wzmocnione jest pektynami. Jest to kolejny polimer węglowodanowy o zróżnicowanej

budowie. Pekтины zbudowane są z kwasowego łańcucha głównego oraz łańcuchów bocznych, zawierających cukry obojętne. Najczęściej występującym monomerem łańcucha głównego jest kwas galakturonowy, który stanowi około 70% wszystkich węglowodanów pektynowych. W skład pektyn wchodzi również ramnoza, arabinoza, ksyloza, kwas glukuronowy i galaktoza (Xiao i Anderson, 2013). Pekтины zapewniają ścianie komórkowej odpowiednią gęstość, porowatość oraz dystrybucję enzymów i innych białek. Na wczesnych etapach infekcji pektyny trawione są przez patogeny. Powstają oligogalakturoniany, pełniące rolę cząstek sygnałnych, indukujących mechanizmy obronne, takie jak produkcja fitoaleksyn lub innych związków o charakterze antybiotykowym. Oligogalakturoniany wpływają również na syntezę toksycznych dla patogenu peptydów oraz wzmocnienie ściany komórkowej poprzez wzmożone wbudowywanie lignin, białek i węglowodanów (Decreux i Messiaen, 2005). Ponadto oligogalakturoniany biorą udział we wzroście i rozwoju rośliny.

Pekтины występując w blaszce środkowej spajają komórki, dzięki temu zapewniają spistość wiązkom komórek włókna. W trakcie rośnienia (ekstrakcji włókna ze słomy) mikroorganizmy oddziałują na pektyny. Dłuższe rośnienie niekorzystnie wpływa na jakość włókna, dlatego niższy poziom pektyn mógłby poprawić jakość włókna (Musialak i in., 2008).

Aby dokonać oceny zawartości pektyn w materiale roślinnym, należy zbadać obszar widma IR, charakterystyczny dla drgań tego polimeru. Analizę widm IR włókien roślinnych z zakresu $1600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ stosuje się do charakterystyki pektyn w materiale roślinnym. Aby tego dokonać, pasma z tego zakresu należy rozłożyć na trzy składowe Lorentza. Pierwsza składowa z maksimum intensywności, występującym przy liczbie falowej 1737 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym, asymetrycznym $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ wolnych grup karboksylowych, a drugie pasmo (1650 cm^{-1}) dotyczy drgań rozciągających, asymetrycznych grup karboksylowych, uczestniczących w wiązaniach. Trzecie pasmo, które pojawia się przy około 1609 cm^{-1} , odpowiada drganiom $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ grupy karboksylowej obecnej w pektynach (Boeriu i in., 2004). Intensywności integralne tych pasm, obserwowanych w widmach IR naturalnych i transgenicznym włókien lnianych: NIKE, M50, CAD27 i PGI11 wykazują następujące zależności:

- dla pasma 1737 cm^{-1} : $I_{\text{M50}} > I_{\text{NIKE}} \geq I_{\text{PGI11}} > I_{\text{CAD27}}$;
- dla pasma 1655 cm^{-1} : $I_{\text{M50}} > I_{\text{NIKE}} > I_{\text{PGI11}} \geq I_{\text{CAD27}}$;
- dla pasma 1602 cm^{-1} : $I_{\text{M50}} > I_{\text{NIKE}} > I_{\text{CAD27}} > I_{\text{PGI11}}$.

Dane te sugerują, że włókna z PGI11 zawierają mniejszą ilość pektyn w porównaniu z włóknami naturalnymi NIKE. Zgadza się to z założeniem modyfikacji genetycznej roślin PGI11. W przypadku włókien lnianych M50 multiplet w zakresie $1600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ odpowiada drganiom grup karboksylowych występujących nie tylko w pektynach, ale również w kwasie poli-3-hydroksymasłowym, wbudowanym między łańcuchami celulozowymi. Z tego powodu zależność $I_{M50} > I_{NIKE}$ nie oznacza większej ilości pektyn w włóknach lnianych M50, ale daje informację o ogólnej zawartości grup karboksylowych w tej próbce.

Ligniny oprócz celulozy i pektyn to kolejne związki polimerowe występujące w włóknie lnianym. Są one zbudowane z pochodnych związków fenolowych, syntezowanych w ramach szlaku fenylopropanoidowego. W skład złożonych polimerów lignin wchodzi: p-hydroksyfenyl, guajazyl i syringal. Monolignole łączą się poprzez różne wiązania, np. eterowe oraz węgiel-węgiel. Najważniejszą funkcją lignin jest zapewnienie ścianom komórkowym mechanicznej wytrzymałości, co wpływa na wzrost i utrzymanie pionowej orientacji łodygi, jak również na przewodzenie wody i substancji odżywczych. Kolejną rolę lignin jest ochrona przed np. insektami. Ligniny stanowią dla nich mechaniczną barierę odporną na degradację. Ligniny stanowią główną przeszkodę wykorzystania słomy lnianej - biomasy roślinnej jako źródła do produkcji bioetanolu, biogazu, papieru lub karmy dla zwierząt. Jednakże usuwanie lignin z włókien roślinnych w procesach technologicznych jest czasochłonne, energochłonne oraz kosztowne. Kolejną wadą obecności lignin w włóknach jest słaba elastyczność tkanin z nich powstających (Boeriu i in., 2004; Wróbel-Kwiatkowska i in., 2007).

Pasma widma IR w zakresie $1300 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ mogą być stosowane do identyfikacji zmian zawartości ligniny w naturalnych i genetycznie zmodyfikowanych włóknach lnianych. Obszar ten można rozłożyć na cztery składowe Lorentza. Składowe obserwowane przy około 1264 cm^{-1} i 1247 cm^{-1} odpowiadają sprzężonym drganiom $\nu(\text{CC}) + \nu(\text{CO}) + \delta(\text{C}=\text{O})$ lignin (Dai i Fan, 2011). Intensywności integralne tych pasm dla badanych włókien lnianych spełniają zależność: $I_{NIKE} \geq I_{PGI11} > I_{CAD27} > I_{M50}$. Intensywności integralne są praktycznie bardzo zbliżone dla włókien lnianych NIKE i PGI11, co świadczy, że stężenie lignin jest prawie takie samo dla włókien lnianych NIKE i PGI11. Włókna z M50 i CAD27 zawierają mniejszą ilość ligniny w porównaniu z włóknami NIKE. Ta sama zależność jest obserwowana w wynikach analizy biochemicznej, w której poziom lignin mierzony był metodą spektrofotometryczną przy 280 nm.

Pasma charakterystyczne dla drgań pierścieni aromatycznych lignin pojawiają się przy około 1515 i 1462 cm^{-1} . Analizując intensywności integralne tych pasm dla badanych próbek można stwierdzić, iż włókna roślin transgenicznych zawierają mniej lignin w porównaniu z włóknami naturalnymi. Wnioski te zgadzają się z wynikami uzyskanymi z analizy biochemicznej. Najmniej lignin zawierają włókna roślin CAD27, co zgadza się założeniem modyfikacji genetycznej dla tych roślin.

W pracy **H5** cyklu publikacji, stanowiących osiągnięcie naukowe, przedstawiono wyniki badań wykonanych dla włókien lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.) oraz włókien pochodzących z transgenicznych roślin wzbogaconych o trzy geny bakteryjne, niezbędne do syntezy kwasu poli-3-hydroksymasłowego (PHB). Stwierdzono, że wytrzymałość i właściwości sprężyste (moduł Younga) włókien roślin transgenicznych ulegają znacznej poprawie w porównaniu z włóknami kontrolnymi (Wróbel i in., 2004). Analiza głównych składników włókien transgenicznych wykazała jednak, że ilość pektyn pozostała niezmieniona, a także poziom lignin i celulozy nie zmienił się znacząco w porównaniu do próbek kontrolnych. Tak więc dane analizy biochemicznej sugerują, że synteza PHB w włóknach lnianych nie wpływa na syntezę głównych składników chemicznych. Celem pracy **H5** było potwierdzenie wyników analizy biochemicznej metodami spektroskopii w podczerwieni.

Przy użyciu spektroskopii IR zbadano i porównano skład chemiczny włókien lnu naturalnego (Wt) oraz włókien lnianych roślin transgenicznych (M13, M42, M48, M50), wzbogaconych o kwas poli-3-hydroksymasłowy. Intensywności integralne pasm IR zostały wykorzystane do oszacowania składu chemicznego naturalnych i transgenicznych włókien. Dane spektroskopowe włókien lnianych porównano z wynikami uzyskanymi z analizy biochemicznej.

Widma IR badanych włókien składają się z pasm występujących w zakresach 2000 – 3750, 800 – 1800 i 100 – 800 cm^{-1} . W pracy dokonano przypisania obserwowanych pasm drganiom odpowiednich grup, wchodzących w skład związków budujących włókno. Szczegółowa analiza widm pozwala na uzyskanie ważnych wniosków dotyczących składu chemicznego lnu transgenicznego w odniesieniu do rośliny naturalnej. Szczególnie przydatny jest rozkład szerokich pasm na składowe Lorentza. Intensywności integralne składowych, odpowiadających ligninom i pektynom oszacowano przez ich odjęcie od linii podstawowej widma celulozy.

Intensywność pasma 2918 cm^{-1} jest najbardziej odpowiednia jako porównawczy standard, podobnie jak w analizie badań spektroskopowych w pracy **H4**. Szerokie pasmo absorpcji przy około 3400 cm^{-1} odpowiada drganiu rozciągającemu $\nu(\text{OH})$ grup hydroksylowych biorących udział w tworzeniu wewnątrz- i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Kształt tego pasma jest prawie taki sam dla wszystkich badanych próbek, Ten kontur może zostać rozłożony na co najmniej cztery składowe Lorentza, obserwowane przy długościach fal: 3460 , 3410 , 3350 i 3300 cm^{-1} . Intensywności integralne składowych Lorentza, obserwowanych dla włókien lnu modyfikowanego genetycznie (M42, M13, M50) są wyższe względem intensywności integralnych pasm włókien lnu naturalnego: $I_{M42} > I_{M13} > I_{M50} > I_{wt} > I_{M48}$. Zmiany intensywności integralnych pasm zakresu $3000 - 3600\text{ cm}^{-1}$ sugerują, że liczba wiązań wodorowych $\text{O-H}\cdots\text{O}$ jest wyższa w przypadku włókien lnu modyfikowanego genetycznie. Z tego powodu transgeniczne włókna są mechanicznie bardziej stabilne. Należy podkreślić, że odpowiednie liczby falowe pierwszych trzech składowych dla próbki M48 są przesunięte w kierunku niższych liczb falowych, co sugeruje, iż drgające wiązania są dłuższe i słabsze.

W zakresie $1200 - 1800\text{ cm}^{-1}$ widm IR badanych włókien obserwuje się złożony multiplet, odpowiadający między innymi drganiom $\nu(\text{COO})$ grup karboksylowych obecnych w PHB, wbudowanym pomiędzy łańcuchami celulozy. Widmo IR tego obszaru porównano z widmem PHB, w którym obserwuje się składową przy 1740 cm^{-1} , bardzo silne pasmo przy 1718 cm^{-1} , odpowiadające drganiom $\nu_{as}(\text{COO})$ i słabe pasmo 1687 cm^{-1} , charakterystyczne dla drgania $\nu_s(\text{COO})$. Dla włókien roślin transgenicznych, w których PHB wbudowane jest pomiędzy łańcuchy celulozy, składowe Lorentza dla obszaru $1600 - 1800\text{ cm}^{-1}$ odpowiadają drganiom wolnych grup karboksylowych (1735 cm^{-1}) i grup karboksylowych uczestniczących w wiązaniach (1655 i 1616 cm^{-1}). Intensywności integralne składowych, występujących przy liczbach falowych 1735 i 1655 cm^{-1} w dużej mierze zależą od zawartości PHB w włóknach lnianych. Największe wartości obserwuje się dla próbek M48 i M50, co sugeruje obecność PHB w próbkach. Należy jednak podkreślić, że kontur IR w zakresie $1500 - 1800\text{ cm}^{-1}$ jest charakterystyczny również dla widm pektyn i lignin. Bardzo słabe pasma IR, obserwowane przy 1550 i 1505 cm^{-1} przypisuje się drganiom pektyn i lignin. Intensywności integralne tych pasm są porównywalne dla badanych próbek. Oznacza to, że ilość pektyn i lignin jest porównywalna w badanych w pracy **H5** włóknach naturalnych i włóknach genetycznie modyfikowanych. Zgadza się to z wynikami uzyskanymi z analizy biochemicznej, w której poziom lignin i pektyn oznaczano metodą spektrofotometryczną.

Szerokie pasmo przy 600 cm^{-1} obserwuje się dla wszystkich badanych próbek. Odpowiada ono drganiu zginającemu poza płaszczyznę $\gamma(\text{O-H}\cdots\text{O})$ wiązań wodorowych. Intensywności tego pasma dla naturalnych i genetycznie zmodyfikowanych włókien lnu odzwierciedlają tę samą zależność, jaka występuje dla drgań $\nu(\text{O-H}\cdots\text{O})$. Obecność innych pasm odpowiadających drganiom grupy karboksylowej oczekiwana jest przy około $1300 - 1440$ [$\delta(\text{OH})$], $1060 - 1150$ [$\nu(\text{C-O})$] i $590 - 670\text{ cm}^{-1}$ [$\gamma(\text{OH}\cdots\text{O})$]. Jednak są one na tyle słabe, że są zasłaniane przez silniejsze pasma celulozy. Intensywności pasm z rozpatrywanego zakresu tworzą szereg zgodnie z kolejnością: $M50 > M42 > M13$.

Dzięki analizie widma IR potwierdzono wyniki uzyskane z analizy biochemicznej, dotyczącej porównania zawartości głównych polimerów ściany komórkowej pomiędzy włóknami lnu transgenicznego i naturalnego. Udowodniono również wbudowanie PHB pomiędzy łańcuchy celulozy w włóknach roślin GM.

W pracy **H6** omówiono wyniki badań spektroskopii w podczerwieni i Ramana dla komercyjnego kwasu 3-hydroksymasłowego, komercyjnego kwasu poli-3-hydroksymasłowego (PHB), jak również kwasu poli-3-hydroksymasłowego syntezowanego przez bakterie. Następnie wyniki tych badań porównano z właściwościami spektroskopowymi kwasu poli-3-hydroksymasłowego wyekstrahowanego z włókien lnu transgenicznego (M42, M48, M50). Omówiono oddziaływania między łańcuchami celulozy a wbudowanym w włókna kwasem poli-3-hydroksymasłowym. Dane spektroskopowe dostarczają dowodów na występowanie zmian strukturalnych w włóknach celulozowych, w których obecny jest kwas poli-3-hydroksymasłowy. Dane te świadczą o obecności wiązań wodorowych i estrowych pomiędzy celulozą i PHB.

Pierwszym etapem badań była analiza widm IR i Ramana wzorcowego związku, tzn. kwasu 3-hydroksymasłowego (3HB), którego atomy uczestniczą w szeregu drgań normalnych: rozciągających i zginających. Dla tego związku oczekuje się wystąpienia określonej liczby drgań rozciągających: $3 \times \nu(\text{CH}_3)$, $2 \times \nu(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{CH})$, $\nu(\text{OH})$ grupy hydroksylowej, $\nu(\text{OH})$ grupy karboksylowej, $2 \times \nu(\text{COO})$, $\nu(\text{C-O})$ i $3 \times \nu(\text{C-C})$. Mody zginające odpowiadają drganiom grup: CH_3 , CH_2 , CH , COO i COH . Położenie pasm, charakterystycznych dla tych drgań opisane są w literaturze (Socrates, 2001; Wojtkowiak i Chanabel, 1984).

Drugi etap obejmował porównanie widm IR i Ramana komercyjnego kwasu poli-3-hydroksymasłowego, kwasu poli-3-hydroksymasłowego syntezowanego przez bakterie oraz

PHB interkalowanego w próbkę naturalnego włókna. Istotna zwłaszcza jest charakterystyka spektralna grupy karboksylowej, biorącej udział w wiązaniach wodorowych oraz wiązań estrowych. Drgania asymetryczne rozciągające $\nu_{as}(\text{COO})$ pojawiają się w widmach IR jako złożony kontur o maksimum przy 1724 cm^{-1} i składowej przy 1740 cm^{-1} . W widmie Ramana drganiu $\nu_{as}(\text{COO})$ odpowiadają pasma przy 1724 cm^{-1} i przy 1743 cm^{-1} . Wynik ten wskazuje, że w polimerze występują dwa rodzaje grup karboksylowych o różnych długościach wiązań C=O. Słabe pasmo IR obserwowane w widmach PHB przy 1687 cm^{-1} odpowiada symetrycznemu drganiu rozciągającemu $\nu_s(\text{COO})$.

Porównanie widm IR bakteryjnego PHB i PHB wyekstrahowanego z włókna M50 pozwala na wyciągnięcie następujących wniosków. W obszarze $1500 - 1800\text{ cm}^{-1}$ widma bakteryjnego PHB obserwuje się składowe przy 1740 , 1724 i 1687 cm^{-1} , podczas gdy ten sam obszar widma PHB wyekstrahowanego z włókna M50 zawiera cztery składowe (1735 , 1662 , 1630 i 1536 cm^{-1}). Te dane dowodzą obecności czterech typów interakcji grup karboksylowych PHB z celulozową matrycą. Pasma o liczbie falowej 1735 cm^{-1} jest charakterystyczne dla drgań wolnych, końcowych grup karboksylowych nie uczestniczących w wiązaniach z celulozą włókna lnianego. Składowa przy 1662 cm^{-1} również odpowiada drganiom grupy karboksylowej. Jednak jej przesunięcie w kierunku niższych liczb falowych wskazuje, że odpowiednie grupy karbonylowe PHB uczestniczą w dodatkowych wiązaniach z łańcuchami celulozy. Grupy C=O są łączone z celulozą poprzez wiązania wodorowe typu C=O...H-O. Trzecia i czwarta składowa o średniej intensywności przy około 1630 cm^{-1} i 1536 cm^{-1} nie mają swojego odpowiednika w widmie IR bakteryjnego i syntetycznego PHB. Wskazuje to, że obserwuje się dodatkowe pasmo charakterystyczne dla PHB w włóknie M50, które można przypisać drganiom grupy karboksylowej związanej z celulozą jednocześnie przez wiązania wodorowe C=O...H-O i estrowe. Tak więc podczas wzrostu roślin powstaje naturalny kompleks PHB i matrycy celulozowej w wyniku wiązań estrowych i wodorowych.

Kolejne drganie, charakterystyczne dla grupy karboksylowej polimeru PHB to drganie rozciągające $\nu(\text{C-O})$. Pasma charakterystyczne dla tego modu, występujące przy około 1100 cm^{-1} , nazywane jest „pasmem kontrolnym wiązania estrowego” i odpowiada drganiu $\nu(\text{COC})$ (Wojtkowiak i Chanabel, 1984; Socrates, 2001). Pasma charakterystyczne dla tego drgania w widmach PHB obserwuje się przy 1102 cm^{-1} . Inne pasma charakterystyczne dla drgań grupy karboksylowej, uczestniczącej w wiązaniach estrowych obserwuje się przy następujących liczbach falowych: $\delta(\text{OCO})$: 678 cm^{-1} (IR i RS), $\gamma(\text{CO})$: 599 cm^{-1} (IR), $\rho(\text{CCO})$: 430 cm^{-1} (IR) i 434 cm^{-1} (RS), $\delta(\text{CCO})$: 366 cm^{-1} (IR): 353 cm^{-1} (RS).

Kolejny etap badań dotyczył analizy porównawczej widm IR włókna z lnu naturalnego z widmem ekstraktu PHB z włókna roślin GM. Aby wyjaśnić interakcje między polimerami ściany komórkowej włókna lnianego a wbudowanym PHB, należy zbadać obecność oraz siłę wiązań wodorowych występujących pomiędzy grupą karboksylową z kwasu poli-3-hydroksymasłowego oraz grupami hydroksylowymi celulozy. W tym celu przeanalizowano obszar $3000 - 3700 \text{ cm}^{-1}$ widma lnu naturalnego oraz widma ekstraktu z rośliny M50, zawierającego PHB (kompozyt PHB). Dokonano jego rozkładu na składowe Lorentza. Szeroki kontur widma lnu naturalnego rozłożono na cztery składowe ($3466, 3410, 3353$ i 3301 cm^{-1}), natomiast pasmo celulozy sprzężonej z PHB, wyizolowanym z lnu M50, zawiera sześć składowych Lorentza ($3549, 3470, 3388, 3297, 3201$ i 3115 cm^{-1}). Pasma z widma lnu naturalnego, występujące przy $3466, 3410$ i 3353 cm^{-1} , odpowiadają drganiom wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych celulozy, a pasmo przy 3301 cm^{-1} , charakterystyczne jest dla międzycząsteczkowego wiązania wodorowego. Składowa, występująca przy 3549 cm^{-1} widma PHB sprzężonego z celulozą odpowiada drganiu wolnych grup hydroksylowych. Kolejne składowe tego zakresu są przesunięte względem liczb falowych swych odpowiedników z widma włókien lnu naturalnego. Dane te sugerują zmianę oddziaływań w obrębie włókna lnianego po wbudowaniu PHB pomiędzy łańcuchy celulozy. Powstają silne wiązania wodorowe między grupami hydroksylowymi celulozy i PHB, a równocześnie inne wiązania wodorowe wydłużają się i stają się słabsze. Silne oddziaływania polihydroksymaślanu i celulozy były powodem, dla którego nie można było wyekstrahować wolnego PHB z włókna lnianego M50.

Analizując widma PHB wyekstrahowanego z włókien GM, można wysunąć ważne wnioski z zachowań silnego pasma przy około 1050 cm^{-1} dla próbki M50 i słabego pasma dla próbek M48 i M42. Pasma to jest charakterystyczne dla drgań celulozy. W widmie włókna lnu naturalnego ma ono bardzo silną intensywność. Oznacza to, że znacząca ilość celulozy jest ekstrahowana jednocześnie z PHB. Potwierdza to również obecność szerokiego pasma w obszarze $500 - 750 \text{ cm}^{-1}$ obserwowanego dla wszystkich badanych próbek GM. Ze względu na małą ilość pektyn zawartych we włóknach roślin GM ($0,02 - 0,03 \mu\text{g} / \text{mg DW}$), pasm odpowiadających drganiom tych związków nie obserwuje się w widmach PHB wyekstrahowanych z włókien lnu. Zawartość lignin w włóknach lnu GM jest znacznie wyższa niż pektyn ($2,0 - 2,5 \mu\text{g} / \text{mg DW}$), jednakże ekstrakcja PHB z włókien lnianych minimalizuje zawartość lignin w badanych próbkach. W podsumowaniu można stwierdzić, że pojawienie się multipletu złożonego z czterech składowych w zakresie $1500 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ udowadnia,

że podczas wzrostu roślin tworzy się naturalny kompleks PHB i matrycy celulozowej poprzez wiązania estrowe i wodorowe.

Założeniem pracy **H7** cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe było badanie wpływu mikronizacji na skład chemiczny i strukturę polimerów budujących włókno lnu transgenicznego (M50) za pomocą analizy biochemicznej oraz spektroskopowej. Mikronizowane włókna mogą być wykorzystane jako potencjalne dodatki odżywcze w żywności oraz mogą być stosowane do wytwarzania preparatów farmaceutycznych o powolnym uwalnianiu. W medycynie oraz kosmologii wykorzystywane są różnorodne metody przygotowania leków i preparatów w taki sposób, aby mogły wpływać na organizm człowieka jak najefektywniej. Jedną z najnowszych innowacyjnych metod, wykorzystywanych w laboratoriach medycznych, kosmetycznych i farmaceutycznych jest proces mikronizacji, który polega na zmniejszaniu wielkości cząstek preparatu do średnicy rzędu mikrometrów.

Badanym materiałem były włókna lnu modyfikowanego genetycznie M50, mielone w młynie kulowym w czterech pięciogodzinnych cyklach. Mikronizowane włókna wykazywały spadek zawartości związków fenolowych i zdolności przeciwutleniającej w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla niemielonych włókien. Mikronizacja powoduje zmiany strukturalnych składników włókna (celuloza, hemicelulozy, pektyny, ligninę, PHB), obserwowane przez zwiększony poziom grup funkcyjnych (hydroksylowe, karboksylowe), pochodzących z tych składników. Stwierdza się zatem, że mikronizacja wpływa na poprawę właściwości funkcjonalnych składników włókna. Mikronizowane włókna lnu pochodzące z genetycznie zmodyfikowanych roślin mogą służyć jako nośnik dla związków biologicznie czynnych (witamin, antybiotyków itp.).

Szczegółowa analiza widm w podczerwieni transgenicznego włókna lnianego M50 dostarcza informacji na temat właściwości strukturalnych polimerów budujących włókno. Szerokie pasmo obszaru $3000 - 3800 \text{ cm}^{-1}$ zostało rozłożone na trzy składowe Lorentza. Odpowiadają one drganiom wiązań wodorowych wewnątrz- i międzycząsteczkowych, tworzonym pomiędzy celulozą i PHB. Położenia pasm przesuwają się w kierunku niższych liczb falowych wraz z wzrastającym czasem mielenia. Jest to dowód na to, że wiązania wodorowe są coraz dłuższe i tym samym coraz słabsze. Największe przesunięcie następuje już po pierwszym cyklu mielenia. Składowa Lorentza z obszaru $900 - 1400 \text{ cm}^{-1}$, występująca przy 1238 cm^{-1} , odpowiada drganiom zginającym w płaszczyźnie wiązań wodorowych $\delta(\text{O-H}\cdots\text{O})$. Intensywność integralna tego pasma zmniejsza się wraz ze wzrostem czasu

mielenia, co sugeruje zmniejszenie liczby wiązań wodorowych. Wraz ze wzrostem czasu mielenia zmienia się również położenie pasma przy 613 cm^{-1} , odpowiadającego drganiom zginającym poza płaszczyznę wiązań wodorowych $\gamma(\text{O-H}\cdots\text{O})$. Wskazuje to, że proces mielenia wpływa na siłę wiązań wodorowych, występujących pomiędzy celulozą a PHB. Niektóre z tych wiązań są zrywane, a struktura włókna staje się mniej uporządkowana.

Kolejnym obszarem widma w podczerwieni mielonych włókien lnianych, dzięki któremu można uzyskać wiele cennych informacji jest zakres $1580 - 1800\text{ cm}^{-1}$, odpowiadający drganiom grupy karboksylowej. Intensywność integralna pierwszej składowej Lorentza tego obszaru, występującej przy 1736 cm^{-1} znacznie wzrasta wraz z czasem mielenia. Odzwierciedla to wzrost liczby wolnych grup karboksylowych w próbkach, co jest związane ze zmniejszeniem liczby wiązań wodorowych występujących pomiędzy grupami karboksylowymi PHB a łańcuchami celulozy. Kolejne dwie składowe, obserwowane przy liczbach falowych 1600 i 1650 cm^{-1} , pochodzą od drgań grup karboksylowych, uczestniczących w wiązaniach. Przesunięcie tych składowych w kierunku wyższych liczb falowych wraz z czasem mielenia, sugeruje skracanie długości wiązań grupy karboksylowej, a tym samym zmniejszenie oddziaływań z innymi grupami.

Bardzo istotna jest analiza pasm, odpowiadających drganiom $\nu(\text{COC})$ wiązania $\beta\text{-}1,4'$ -glikozydowego w łańcuchach celulozowych. Wraz ze wzrostem czasu mielenia obserwuje się przesunięcie w kierunku niższych liczb falowych pasma przy 1030 cm^{-1} i zmniejszenie intensywności integralnej pasma przy około 993 cm^{-1} . Zatem zmiany w pasmach, charakterystycznych dla drgań wiązań (C-O-C) sugerują, że mielenie powoduje rozrywanie niektórych z tych wiązań, co prowadzi do skracania łańcuchów celulozy.

Dla zobrazowania uporządkowania strukturalnego makrocząsteczek celulozy wykorzystuje się indeks krystaliczności I_{cr} (Langan i wsp. 1999, Nishiyama i wsp. 2003). Zaproponowano go jako stosunek intensywności pasm IR przy 1370 cm^{-1} i 2900 cm^{-1} . Obliczony parametr dla próbek wyjściowych M50 i mikronizowanych przez 5, 10, 15 i 20 h wynosił odpowiednio 0,90; 0,53; 0,38; 0,32 i 0,30. Zmniejszenie I_{cr} w zależności od czasu mikronizacji koreluje z wynikami, uzyskanymi z badań XRD (X-ray diffraction). Dane te dostarczają dowodów na zmiany stosunku celulozy amorficznej do krystalicznej zachodzące podczas mikronizacji włókien lnianych. Mielenie niszczy silne wiązania wodorowe, oddziałuje na kowalencyjne wiązania estrowe i glikozydowe oraz prowadzi do całkowitego nieuporządkowania łańcuchów celulozy.

Posumowanie

Podsumowując wyniki badań opublikowanych w cyklu publikacji **H1-H7**, stanowiących osiągnięcie naukowe, należy podkreślić, że opracowano nowe metody oznaczania wybranych składników komórki roślinnej i właściwości materiału roślinnego z zastosowaniem technik spektroskopowych. Przeprowadzone badania mają charakter podstawowy, jednak mogą być także wykorzystane do badań aplikacyjnych, wszędzie tam gdzie istotne jest poznanie składników komórki roślinnej.

Do najważniejszych osiągnięć naukowo-badawczych związanych z jednotematycznym cyklem publikacji, poddanym pod ocenę w ramach wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego zaliczam:

- W pracy **H1** po raz pierwszy wykorzystano widma IR i Ramana, UV-VIS oraz widma masowe ekstraktów roślinnych: liści szpinaku i korzenia żeń-szenia. Zastosowano nowatorskie podejście łączące chemiczne obliczenia kwantowe i matematyczne dopasowanie widm teoretycznych i eksperymentalnych, a następnie przypisano najbardziej charakterystyczne pasma omawianej cząsteczce biologicznie czynnej. Uzyskane wyniki spektroskopowe pozwalają na identyfikację obecności spinacyny w roślinach i materiałach biologicznych.

Ponadto wykorzystując spektroskopię w podczerwieni wzorcowych związków chemicznych, na podstawie położenia oraz intensywności pasm widm oscylacyjnych materiałów roślinnych wykazano obecność flawonoidów oraz kwasów fenolowych w ekstraktach z korzeni żeń-szenia i liści szpinaku.

- Analiza wyników, przedstawionych w pracach **H1 i H2** pokazuje, że metody spektroskopowe w podczerwieni i Ramana są efektywnymi metodami identyfikacji i charakterystyki związków zawierających rdzeń imidazopirydynowy. Wyznaczono pasma charakterystyczne dla drgań tego szkieletu, które mają znaczenie diagnostyczne. Pojawienie się tych pasm w widmach IR i Ramana niektórych roślin, tkanek i środków farmaceutycznych potwierdza obecność szkieletu imidazopirydyny w tych materiałach. Wnioski te potwierdzono badaniami ekstraktów liści szpinaku i korzenia żeń-szenia.
- Analizując widma oscylacyjne ekstraktów i oleju z nasion roślin naturalnych i transgenicznych oraz porównując je z widmami substancji wzorcowych, wykazano nadprodukcję flawonoidów (kemferol), kwasów fenolowych (kumarowy, ferulowy, synapinowy) i lignanu - diglukozydu sekoizolaricirezinolu (SDG) w materiałach GMO.

Wyniki otrzymane z badań spektroskopowych, opisane w pracy **H3**, potwierdzono rezultatami uzyskanymi z analizy biochemicznej. Zastosowanie różnych technik umożliwiło uzyskanie komplementarnych informacji o badanym materiale.

- Wykorzystując spektroskopię w podczerwieni zbadano i porównano skład chemiczny włókien lnu naturalnego oraz włókien lnianych roślin transgenicznych (prace **H4-H6**). Prowadząc badania w zakresach widma, charakterystycznych dla drgań głównych polimerów ściany komórkowej, dokonano rozkładu złożonych konturów pasm na składowe Lorentza. Analiza intensywności integralnych pasm IR została wykorzystana do oszacowania składu chemicznego naturalnych i transgenicznych włókien. Dane spektroskopowe włókien lnianych porównano z wynikami uzyskanymi z analizy biochemicznej. W pracach tych wykazano, że:
 - 1) Łańcuchy celulozowe w włóknie lnu transgenicznego M50 są połączone dodatkowymi wiązaniami wodorowymi, dzięki czemu włókna są mocniejsze w porównaniu z włóknami lnu naturalnego NIKE.
 - 2) Liczba wiązań C-O-C w włóknach lnu M50 jest wyższa niż w włóknach lnu naturalnego NIKE, co wynika z powstawania dodatkowych mostków między polimerami PHB.
 - 3) Łańcuchy celulozowe włókien lnu transgenicznego M50 są dłuższe i silniej związane niż w włóknie lnu naturalnego NIKE, podczas gdy łańcuchy celulozowe włókna lnu transgenicznego CAD27 są krótsze i luźniej związane, a włókna PGI11 - są krótsze i mocniejsze.
 - 4) W transgenicznych włóknach lnu PGI11 stężenie pektyn jest mniejsze, co jest zgodne z założeniem prowadzenia modyfikacji genetycznej.
 - 5) Poziom lignin w włóknach lnianych NIKE i PGI11 jest porównywalny, a znacznie niższy jest w włóknach lnu CAD27. Wyniki otrzymane z badań spektroskopowych, potwierdzono danymi uzyskanymi z analizy biochemicznej.
 - 6) Len genetycznie modyfikowany, wzbogacony w PHB wykazuje silniejsze oddziaływanie między włóknami w porównaniu z lnem naturalnym, gdyż PHB odgrywa rolę czynnika sieciującego między łańcuchami celulozowymi.

- 7) Silne sprzężenie między matrycą i PHB jest przyczyną, dla której nie jest możliwe wyodrębnienie wolnego PHB z kompozytu i zawsze pewna ilość celulozy, pektyn i lignin zanieczyszcza frakcję PHB.
- 8) Pasma charakterystyczne dla drgań $\nu(\text{OH})$ służy do badania oddziaływań wodorowych między łańcuchami celulozowymi. Przesunięcie pasma, jak również większa złożoność jego konturu wskazują, że polimer PHB silnie oddziałuje z matrycą, dzięki temu kompozyt jest bardziej stabilny i mocniejszy.
- 9) Kilka nowych pasm IR obserwuje się dla PHB pochodzącego z włókien lnu modyfikowanego genetycznie. Trzy typy grup karboksylowych są wykrywane w kompozycie lnu i PHB: wolne grupy $-\text{COOH}$, grupy karboksylowe sprzężone z łańcuchami celulozowymi poprzez wiązanie wodorowe i trzecia grupa, która jest podwójnie związana, poprzez wiązanie wodorowe $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}$ i estrowe $\text{C}_{\text{PHB}}-\text{O}-\text{C}_{\text{włókno}}$.
- W pracy **H7** metodą spektroskopii w podczerwieni zbadano wpływ mikronizacji na skład chemiczny i strukturę polimerów budujących włókno lnu transgenicznego. Mikronizacja prowadzi do wyraźnie mniejszych, ale mocno zagregowanych cząstek. Dane, otrzymane z analizy spektroskopowej potwierdzają wyniki badań uzyskanych metodą XRD. Mikronizacja wpływa na celulozowe wiązania wodorowe między- i wewnątrzcząsteczkowe i wiązania C-O-C, powodując mniej uporządkowane i krótsze łańcuchy celulozowe. Zmniejszenie indeksu krystaliczności w zależności od czasu mikronizacji koreluje z wynikami, uzyskanymi z badań XRD. W szczególności w pracy H7 udowodniono, że grupy funkcyjne (hydroksylowe, karboksylowe) pochodzące ze składników włókna lnu M50 (celuloza, pektyna, lignina, związki fenolowe, PHB) są bardziej dostępne, dzięki temu mikronizacja poprawia reaktywność i właściwości funkcjonalne włókna lnianego. Wysoce reaktywne zmikronizowane włókna lnu pochodzące z genetycznie modyfikowanych roślin mogą służyć jako nośnik dla związków biologicznie czynnych (witaminy, antybiotyki itp.).

Rezultaty prezentowane w pracach **H1-H7** cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, wykazały, iż spektroskopia oscylacyjna ma kluczowe zastosowanie w badaniach materiałów roślinnych. W pracach tych znacznie rozszerzono zakres stosowania metod spektroskopowych w analizach ilościowych wybranych roślin, w tym pochodzenia naturalnego i transgenicznego. Należy podkreślić rolę jaką może odgrywać w podobnych badaniach stosowanie metod kwantowych i obliczeń matematycznych w rozkładzie złożonych

konturów na pasma składowe. Podsumowując, zwiększony popyt na analizę procesów biochemicznych roślin wymaga interdyscyplinarnego podejścia, w którym spektroskopia w podczerwieni i Ramana może odgrywać znaczącą rolę.

Piśmiennictwo uzupełniające:

- Adom K.K., Liu R.H., Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002) 6182-6187
- Baeg I.H., So S.H., The world ginseng market and the ginseng (Korea). *Journal of Ginseng Research* 37 (2013) 1-7
- Becke, D. Density functional thermochemistry. IV. A new dynamical correlation functional and implications for exact exchange mixing. *Journal of Chemical Physics* 98 (1993) 5648-5652
- Bergman A.M., Cristalli G., Vittori S., Wang J., Eriksson S., Peters G.J., Biological activity of 1-deazapurine nucleosides: Role of deoxycytidine kinase? *Nucleosides and Nucleotides* 18 (1999) 897-898
- Bergman M., Varshavsky L., Gottlieb H.E., Grossman S., The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fraction. *Phytochemistry* 58 (2001) 143-152
- Boeriu C.G., Bravo D., Gosselink R.J.A., Van Dam J.E.G., Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy *Industrial Crops and Products* 20 (2004) 205-218
- Boreisha I.K., Dolzhenko A.T., Komissarov S.I., Yutilov Yu.M., Eilazyan O.G., Khabarova Y.V., Spinacine - an inhibitor of γ -aminobutyric acid uptake. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* 22(1) (1988) 20-23
- Boucher B.A., Cotterchio M., Curca I.A., Kreiger N., Intake of phytoestrogen foods and supplements among women recently diagnosed with breast cancer in Ontario, Canada. *Nutrition and Cancer* 64 (2012) 695-703
- Buenea A., Andjelkovic M., Socaciu C., Bobis O., Neascu M., Verhe R., Camp J., Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry* 108 (2008) 649-656
- Burbulis N., Blinstrubiene A., Kupriene R., Sliesaravicius A., Venskutoniene E., Optimization of linseed flax (*Linum usitatissimum* L.) in vitro cultures. *Agriculture* 94 (2007) 120 -128
- Carrillo F., Colom X., Sunol J.J., Saurina J., Structural FTIR analysis and thermal characterisation of lyocell and viscose-type fibres. *European Polymer Journal* 40 (2004) 2229-2234
- Charlet K., Jernot J.P., Breard J., Gomin M., Scattering of morphological and mechanical properties of flax fibres. *Industrial Crops and Products* 32 (2010) 220-224
- Chibnall A., Spinacin, a new protein from spinach leaves. *Journal of Biological Chemistry* 61 (1924) 303-308
- Chmiel S., Graczkowska-Chmiel T., Złote ziele dla cierpliwych. *Panacea* 4 (2008) 16-17

- Choi K.H., Yoo S.H., Kwak H.S., Comparison of the physicochemical and sensory properties of Asiago cheeses with added nano-powdered red ginseng and powdered red ginseng during ripening. *International Journal of Dairy Technology* 67 (2014) 348-357
- Chung I.M., Kim J.W., Seguin P., Jun Y.M., Kim S.H., Ginsenosides and phenolics in fresh and processed Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer): Effects of cultivation location, year, and storage period. *Food Chemistry* 130 (2012) 73-83
- Chung T.H., Park C., Choi I. H., Effects of Korean red ginseng marc with aluminum sulfate against pathogen populations in poultry litters. *Journal of Ginseng Research* 39 (2015) 414-417
- Colom X., Carrillo F., Crystallinity changes in lyocell and viscose-type fibres by caustic treatment. *European Polymer Journal* 38 (2002) 2225-2230
- Cristalli G., Vittori S., Eleuteri A., Grifantini M., Volpini R., Lupidi G., Capolongo L., Pesenti E., Purine and 1-Deazapurine Ribonucleosides and Deoxyribonucleosides: Synthesis and Biological Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 34 (1991) 2226-2230
- Czemplik M., Szopa J., CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutrition and Natural Resources 4 (2009) 1-10
- Dai D., Fan M., Investigation of the dislocation of natural fibres by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 55 (2011) 300-306
- Decreux A., Messiaen J., Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant and Cell Physiology* 46 (2005) 268-278
- Deghati P.Y.F., Bieräugel H., Wanner M.J., Koomen G.J., Mild and regioselective nitration of 1-deazapurine nucleosides using TBAN/TFAA. *Tetrahedron Letter* 41 (2000) 569-573
- Deghati P.Y.F., Borghini A., van den Nieuwendijk A.M.C.H., Dissen-de Groote M., Ijzerman A.P., Inhibition of nucleoside transport by new analogues of nitrobenzylthioinosine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 11 (2003) 899-908
- Delgado-Vargas F., Jimenez A.R., Paredes-Lopez O., Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40 (2000) 173-289
- Edwards H.M., Farwell D.W., Webster D., FT Raman microscopy of untreated natural plant fibres *Spectrochimica Acta A* 53 (1997) 2383-2392
- FAOSTAT, 2018, <http://fenix.fao.org/faostat/internal/en/#data/QD>, dostęp 12.06.2018 r.
- Frish M.J., People J.A., Binkley J.S., Self Consistent Molecular Orbital Methods. 25. Supplementary Functions for Gaussian Basis Sets. *Journal of Chemical Physics* 80 (1984) 3265-3269
- Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Zakrzewski V.G., Montgomery Jr J.A., Stratmann R.E., Burant J.C., Dapprich S., Millam J.M., Daniels A.D., Kudin K.N., Strain M.C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Cossi M., Cammi R., Mennucci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J., Petersson G.A., Ayala P.Y., Cui Q., Morokuma K., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Cioslowski J., Ortiz J.V., Baboul A.G., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B., Chen W., Wong M.W., Andres J.L., Gonzalez C., Head-Gordon M., Replogle E.S., Pople J.A., GAUSSIAN 03, Rev A. 1 programme, Gaussian. Inc. Pittsburgh, PA, 2003

- Günzler H., Gremlich H.U., IR Spectroscopy. An Introduction; Wiley-VCh, Weinheim, Germany, 2002, p. 178 (Chapter 6.4)
- Han Y.N., Ryu S.Y., Han B.H., Woo L.K., Spinacine from Panax Ginseng. Archives of Pharmacal Research 10(4) (1987) 258-259
- Jähn A., Schröder M.W., Fütting M., Schenzel K., Diepenbrock W., Characterization of alkali treated flax fibres by means of FT Raman spectroscopy and environmental scanning electron microscopy. Spectrochimica Acta A 58 (2002) 2271-2279
- Jung H.W., Kim J.E., Seo J.H., Lee S.P., Physicochemical and antioxidant properties of red ginseng marc fermented by Bacillus subtilis HA with mugwort powder addition. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 39 (2010) 1391-1398
- Kim Y.J., Lee G.D., Choi, I.H., Effects of dietary supplementation of red ginseng marc and alpha-tocopherol on the growth performance and meat quality of broiler chicken. Journal of the Science of Food and Agriculture 94 (2014) 1816-1821
- Kim Y.J., Zhang D., Yang D.C., Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides. Biotechnology Advances 33 (2015) 717-735
- Konwar M., Baruah G.D., On the nature of vibrational bands in the FTIR spectra of medicinal plant leaves. Archives of Applied Science Research 3 (2011) 214-221
- Langan P., Nishiyama Y., Chanzy H. A revised structure and hydrogen-bonding system in cellulose II from a neutron fiber diffraction analysis. Journal of American Chemical Society 121(43) (1999) 9940-9946
- Lisiewska Z., Kmiecik W., Gębczyński P., Sobczyńska L., Amino acid profile of raw and as-eaten products of spinach (Spinacia oleracea L.) Food Chemistry 126 (2) (2011) 460-465
- Lorenc-Kukuła K., Amarowicz R., Oszmiański J., Doermann P., Starzycki M., Skała J., Żuk M., Kulma A., Szopa J. Pleiotropic effect of phenolic compounds content increases in transgenic flax plant. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (2005) 3685-3692
- Łomnicki L., Bergman M., Nyska A., Ben-Shaul V., Grossman S., Composition, efficacy, and safety of spinach extract. Nutrition and Cancer 46 (2003) 222-231
- Marechal Y., Chanzy H., The hydrogen bond network in I(β) cellulose as observed by infrared spectrometry Journal of Molecular Structure 523 (2000) 183-196
- Mattila P., Kumpulainen J., Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(13) (2002) 3660-3667
- Musialak M., Wróbel-Kwiatkowska M., Kulma A., Starzycka E., Szopa J., Improving retting of fibre through genetic modification of flax to express pectinases. Transgenic Research 17 (2008) 133-147
- Nishiyama Y., Sugiyama J., Chanzy H., Langan P. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I (α) from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. Journal of American Chemical Society 125 (2003) 14300-14306
- Ozen B.F., Mauer L.J., Detection of Hazelnut Oil Adulteration Using FT-IR Spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(14) (2002) 3898-3901
- Park J.D., Rhee D.K., Lee Y.H., Biological activities and chemistry of saponins from Panax ginseng C.A. Meyer. Phytochemistry 4 (2005) 159-175

- Peng C.F., Li Y.J., Deng H.W., Effects of ginsenosides on vasodilator nerve actions in the rat perfused mesentery are mediated by nitric oxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 47 (1995) 614-617
- Popescu C-M., Cazacu G., Singurel G., Vasile C., Study of the process of the water desorption from lignins. *Romanian Journal of Physics* 51 (2006) 277-283
- Preisner M., Wojtasik W., Szopa J., Kulma A., Rozwój, różnicowanie się i skład komórek włókna lnianego. *Postępy Biochemii* 61 (2015) 416-429
- Puls Biznesu, 2014, <http://www.portalspozywczy.pl/owoce-warzywa/wiadomosci/polacy-coraz-chetniej-siegaja-po-szpinak,104627.html>, dostęp 12.06.2018 r.
- Ramasamy K., Imamura N., Hanna N.B., Finch R.A., Avery T.L., Robins R.K., Revankar G.R., Synthesis and Antitumor Evaluation in Mice of Certain 7-Deazapurine (Pyrrolo[2,3-D]Pyrimidine) and 3-Deazapurine (Imidazo[4,5-C]Pyridine) Nucleosides Structurally Related to Sulfenosine, Sulfinosine, and Sulfonosine. *Journal of Medicinal Chemistry* 33 (1990) 1220-1225
- Remelli M., Pulidori F., Guerrini R., Bertolasi V., Synthesis of spinacine and spinacine derivatives: crystal and molecular structures of N^π-hydroxymethyl spinacine and N^α-methyl spinaceamine. *Journal of Chemical Crystallography* 27 (1997) 507-513
- Robert P., Marquis M., Barron C., Guillon F., Saulnier L., FT-IR Investigation of Cell Wall Polysaccharides from Cereal Grains. Arabinoxylan Infrared Assignment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (18) (2005) 7014-7018
- Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej, Warszawa, 2017, <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-statystyczny-rzeczypospolitej-polskiej-2017,2,17.html>, dostęp 12.06.2018 r.
- Rostkowska H., Łapiński L., Nowak M., Analysis of the normal modes of molecules with D_{3h} symmetry. Infrared spectra of monomeric s-triazine and cyanuric acid. *Vibrational Spectroscopy* 2009, 49, 43 (Nowak, M.; Łapiński, L. BALGA computer program for PED calculations)
- Salvatori D., Volpini R., Vincenzetti S., Vita A., Costanzi S., Lambertucci C., Cristalli G., Vittori S., Adenine and deazaadenine nucleoside and deoxynucleoside analogues: Inhibition of viral replication of sheep MVV (in vitro model for HIV) and Bovine BHV-1. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 10 (2002) 2973-2980
- Schrader B., Klump H.H., Schenzel K., Schulz H., Non-destructive NIR FT raman analysis of plants. *Journal of Molecular Structure* 509 (1999) 201-212
- Schulz H., Baranska M., Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 43 (2007) 13-25
- Schwanninger M., Rodrigues J.C., Pereira H., Hinterstoisser B., Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. *Vibrational Spectroscopy* 36 (2004) 23-40
- Skórkowska-Telichowska K., Żuk M., Kulma A., Bugajska-Prusak A., Ratajczak K., Gąsiorowski K., Kostyń K., Szopa J., New dressing materials derived from transgenic flax products to treat long-standing venous ulcers - A pilot study. *Wound Repair and Regeneration* 18 (2010) 168-179
- Socrates G., *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. 3rd Ed.; J. Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, Toronto, Brisbane, Singapore, 2001, Chap. 2, pp. 50

- Szymańska-Chargot M., Cybulska M., Zdunek A., Sensing the structural differences in cellulose from apple and bacterial cell wall materials by Raman and FT-IR spectroscopy. *Sensors* 11 (2011) 5543-5560
- Toledo M.E.A., Ueda Y., Imahari Y., Ayaki M., L-Ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest Biology and Technology* 28 (2003) 47-53
- Tolkachev O.N., Zhuchenko Jr. A.A., Biologically active substances of flax: medicinal and nutritional properties (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 34 (2000) 360-367
- Vadhra S., Sangeeta W., Giridhar S., Hypocholesterolemic/hypolipidemic effects of fibre from leafy vegetables (spinach and mustard). *Journal of Food Science and Technology* 40 (5) (2003) 531-533
- Velmurugan S., Govindaraj R., Gokulakumar B., FT-IR -Analysis of Root Rot Disease Incidence In Sunflower (*Helianthus Annus* L). *International Journal of Recent Scientific Research* 3 (2012) 317-320
- Wang H., Cao G., Ronald L., Prior R.L., Total Antioxidant Capacity of Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(3) (1996) 701-705
- Wang W., Zhao Y., Rayburn E. R., Hill D.L., Wang H., Zhang R., In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 59 (2007) 589-601
- Wojtkowiak B., Chabanel M., *Spectrochimie Moleculaire, Technique et Documentation*. PWN, Warszawa, 1984, Chapter 4, pp. 114
- Wróbel M., Żebrowski J., Szopa J., Polyhydroxybutyrate synthesis in transgenic flax *Journal of Biotechnology* 107 (2004) 41-54
- Wróbel-Kwiatkowska M., Skórkowska-Telichowska K., Dymińska L., Mączka M., Hanuza J., Szopa J., Biochemical, mechanical and spectroscopic analysis of genetically engineered flax fibres producing bioplastic (poly-β-hydroxybutyrate), *Biotechnology Progress* 25 (2009) 1489-1498
- Wróbel-Kwiatkowska M., Starzycki M., Zebrowski J., Oszmiański J., Szopa J., Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties. *Journal of Biotechnology* 128 (2007) 919-934
- Xiao C., Anderson C., Roles of pectin in biomass yield and processing for biofuels. *Frontiers in Plant Science* 4 (2013) 1-7
- Żuk M., Dorodkiewicz-Jach A., Drulis-Kawa Z., Arendt M., Kulma A., Szopa J., Bactericidal activities of GM flax seedcake extract on pathogenic bacteria clinical strains. *BMC Biotechnology* (2014) 14:70
- Żuk M., Kulma A., Dymińska L., Szołtysek K., Prescha A., Hanuza J., Szopa J. Flavonoid engineering of flax potentiate its biotechnological application. *BMC Biotechnology* 11 (2011) 10
- Żuk M., Richter D., Matuła J., Szopa J., Linseed, the multipurpose plant. *Industrial Crops and products* 75B (2015) 165-177

D) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**• Przed uzyskaniem stopnia doktora**

Jestem współautorem 2 oryginalnych prac w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (wykaz prac poz. IIA 1-2), które ukazały się przed obroną pracy doktorskiej, a których sumaryczny *impact factor* zgodnie z rokiem publikacji wynosi **5,331**, a liczba punktów MNiSW **40**.

Od 2004 roku byłam asystentem w Katedrze Chemii Bioorganicznej na Wydziale Inżynieryjno-Ekonomicznym Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Jerzego Hanuzę. Od tego czasu współpracuję z Instytutem Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, gdzie prowadziłam badania pod kierunkiem doc. dr hab. Mirosława Mączki zwieńczone obroną pracy doktorskiej w 2008 roku.

Moje zainteresowania naukowe ukierunkowane były na badanie właściwości chemicznych i fizykochemicznych pochodnych pirydynowych, głównie triazolopirydyn (praca **II.A1**) oraz imidazopirydyn (praca **II.A2**). Były to: imidazo[4,5-b]pirydyny (IPb), imidazo[4,5-c]pirydyny (IPc) oraz ich pochodne. Moim celem było ustalenie struktury molekularnej badanych związków metodami chemii kwantowej oraz porównanie ich parametrów geometrycznych z wynikami rentgenowskiej analizy strukturalnej. Pełną dyskusję danych spektroskopowych tych materiałów również opierałam na obliczeniach wykonywanych metodami chemii kwantowej. Kolejnym celem było zbadanie wpływu miejsca podstawienia grupy metylowej na właściwości strukturalne i spektroskopowe pochodnych IP, a także opracowanie kryterium rozróżnienia metodami spektroskopowymi tautomerów 1H-IP oraz 3H-IP.

Dokonałam optymalizacji struktury wszystkich badanych związków, a także wykonałam obliczenia energii poziomów oscylacyjnych metodami chemii kwantowej. Wyliczone częstości drgań posłużyły do wyznaczenia rozkładu energii potencjalnej (PED) cząsteczek na poszczególne współrzędne wewnętrzne. Następnie wykonałam pomiary widm w podczerwieni oraz Ramana dla badanych związków. Na podstawie obliczeń kwantowych dokonałam konfrontacji porównawczego opisu pasm z wynikami uzyskanymi z rozkładu PED. Drgania fragmentu pierścienia imidazolowego N-C=N wchodzi w skład modów normalnych, którym odpowiadają następujące zakresy liczb falowych: 1485–1531 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{N})_i$; 1367–1388 cm^{-1} i 1048–1114 cm^{-1} $\nu(\text{C}-\text{N})_i$; 855–964 cm^{-1} $\delta(\text{NCN})_i$; 632–689 cm^{-1}

$\gamma(\text{NCN})_I$. Pomiarzy spektroskopowe sugerują, iż grupa NH pierścienia imidazolowego bierze udział w międzycząsteczkowym wiązaniu wodorowym. W obliczeniach kwantowych uzyskano wartości zero-fononowych poziomów energii potencjalnej (ZPVE). Wynoszą one od 21353 cm^{-1} dla 1H-7CIPc do 29522 cm^{-1} dla 1H-7MIPc. Różnice ZPVE dla 1H i 3H tautomerów są nieznaczne i wynoszą od 2 do 70 cm^{-1} . Zatem wartości ZPVE nie są przydatne jako kryterium rozróżnienia tautomerów 1H od 3H. Badane pochodne: 5MIPb (5-metyloimidazo[4,5-b]pirydyna), 6MIPb (6-metyloimidazo[4,5-b]pirydyna) i 4MIPc (4-metyloimidazo[4,5-c]pirydyna) występują w tautomerycznej formie 1H, natomiast pochodne 7MIPb (7-metyloimidazo[4,5-b]pirydyna), 7MIPc (7-metyloimidazo[4,5-c]pirydyna) i 7CIPc (7-chloroimidazo[4,5-b]pirydyna) w formie 3H.

Wyniki moich badań prezentowałam w formie posterów na dwóch międzynarodowych konferencjach naukowych: VIII International Conference on Molecular Spectroscopy, IX International Conference on Molecular Spectroscopy.

W 2006 roku byłam współorganizatorem międzynarodowej konferencji: VIth International Conference on f-Elements.

- **Po uzyskaniu stopnia doktora**

Stopień doktora uzyskałam w czerwcu 2008 roku. Od 2010 do 2015 roku pracowałam na stanowisku adiunkta naukowego, a od 2015 roku do chwili obecnej – na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Bioorganicznej na Wydziale Inżynieryjno-Ekonomicznym Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu.

Do chwili obecnej jestem współautorem 32 oryginalnych prac naukowych i jednej pracy przeglądowej w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*, których sumaryczny *impact factor* zgodnie z rokiem publikacji wynosi **80,531**, a liczba punktów MNiSW **895**, z czego po uzyskaniu stopnia doktora jest to 31 prac, dla których IF = **75,200** i MNiSW = **855**. Po wyłączeniu dorobku zaliczonego do osiągnięcia habilitacyjnego *impact factor* i liczba punktów MNiSW wynoszą odpowiednio **61,483** i **700**. Liczba cytowań moich prac według bazy Web of Science wynosi **288** (bez autocytowań **234**), a index Hirscha - **11**.

Po obronieniu rozprawy doktorskiej nadal kontynuowałam współpracę naukową z Instytutem Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu. Rozpoczęłam również współpracę naukową z Zakładem Biochemii Genetycznej, Wydziału Biotechnologii,

Uniwersytetu Wrocławskiego. W wyniku tej współpracy powstały publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (prace **H3 – H7**).

W następstwie kontynuacji badań dotyczących pochodnych imidazopirydynowych ukazały się trzy publikacje (**II.B3, II.B5, II.B8**). Na podstawie badań XRD, spektroskopii IR i Ramana przedstawiono analizę struktury molekularnej oraz właściwości spektroskopowe 1H-imidazo[4,5-b]pirydyny w postaci monomerycznej i dimerycznej. Dane teoretyczne omówiono na podstawie chemicznych obliczeń kwantowych (DFT) metodą funkcjonału gęstości B3LYP stosując bazę 6-31G(d, p). Związek ten krystalizuje w rombowej strukturze, grupa przestrzenna $Pna2_1$ i $Z = 4$. Stwierdzono płaską strukturę szkieletu imidazopirydynowego oraz obecność wiązania wodorowego N-H...N (**II.B3**).

W pracy **II.B5** porównano wyniki badań teoretycznych i eksperymentalnych przeprowadzonych dla 4-metylo-imidazo[4,5-c]pirydyny (4MIPc) i 7-metylo-imidazo[4,5-c]pirydyny (7MIPc). Dane teoretyczne otrzymano z chemicznych obliczeń kwantowych wykonanych metodą funkcjonału gęstości (DFT), natomiast badania eksperymentalne uzyskano z analizy dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) oraz spektroskopii IR i Ramana. Badania krystalograficzne wykazały, że 4MIPc krystalizuje w rombowej strukturze, grupa przestrzenna $Pna2_1$ i $Z = 4$, natomiast 7MIPc krystalizuje w strukturze grupy przestrzennej $P-1$ i $Z = 4$. Prawie płaską strukturę cząsteczki i obecność wiązania wodorowego N-H...N uznano za charakterystyczne cechy badanych układów. Obecność wiązań wodorowych potwierdzają również wyniki badań spektroskopowych (**II.B5**).

W kolejnej pracy **II.B8**, dotyczącej imidazopirydyn, przedstawiono wyniki badań spektroskopowych i strukturalnych izomeru IPc. Przeprowadzono badania struktury kryształu IPc metodą dyfrakcji rentgenowskiej. Dokonano optymalizacji struktury badanego związku, a także wykonano obliczenia energii poziomów oscylacyjnych metodami chemii kwantowej. Wyliczone częstości drgań posłużyły do wyznaczenia rozkładu energii potencjalnej (PED) cząsteczek na poszczególne współrzędne wewnętrzne. Wykonano pomiary widm w podczerwieni oraz Ramana imidazopirydyny. Na podstawie obliczeń kwantowych dokonano konfrontacji porównawczego opisu pasm z wynikami uzyskanymi z rozkładu PED. W badanym związku obserwuje się drgania całego szkieletu imidazopirydynowego (Φ): $\nu_{as}(\Phi)$, $\nu_s(\Phi)$, $\gamma(\Phi)$, $\tau(\Phi)$. Drgania te mogą być stosowane jako narzędzie diagnostyczne dla innych układów zawierających szkielet IPc. Pomiary spektroskopowe sugerują, iż grupa NH pierścienia imidazolowego bierze udział w międzycząsteczkowym wiązaniu wodorowym.

Siła tych oddziaływań została potwierdzona w elektronowych obliczeniach NBO (Natural Bond Orbital).

Kontynuowałam również badania pochodnych triazolopirydyn (**II.B20 i II.B22**). Celem opublikowanych prac było porównanie wyników badań teoretycznych i eksperymentalnych przeprowadzonych dla azotanu 7-metylo-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pirydyniowego (**II.B20**) i jonu obojnaczego aqua-4,6-dimetylo-5H-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pirydyny (**II.B22**). Opracowano strukturę krystaliczną i molekularną badanych związków za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej i chemicznych obliczeń kwantowych DFT. Przeprowadzono także termograwimetryczne i różnicowe analizy kalorymetryczne dla azotanu 7-metylo-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pirydyniowego. Scharakteryzowano drgania pierścienia triazolowego w badanych związkach. Badane pochodne zawierają szkielet triazolopirydyny występujący w szerokiej gamie leków. Obliczenia DFT i badania spektroskopowe pozwoliły na wyodrębnienie charakterystycznych pasm, które mogą być wykorzystane jako narzędzie diagnostyczne do identyfikacji układu podwójnego pierścienia w różnych materiałach.

W wyniku współpracy naukowej z Zakładem Biochemii Genetycznej, Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego powstało 11 publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego (**II.B1, II.B2, II.B4, II.B6, II.B7, II.B11, II.B13, II.B15, II.B16, II.B17, II.B21**). Metodami spektroskopii oscylacyjnej badano różnice między produktami lnu naturalnego i transgenicznego. Do charakterystyki włókien lnu wykorzystano między innymi spektroskopię IR. Dzięki tej metodzie scharakteryzowano zmiany w ilości głównych składników ściany komórkowej (celulozy, hemicelulozy, pektyn i lignin). Wykazano również różnice w budowie szkieletów celulozowych, siły i orientacji wiązań wodorowych łączących łańcuchy celulozowe. Przy użyciu metod spektroskopowych i rentgenograficznych wyznaczono indeks krystaliczności badanych włókien. Dane spektroskopowe włókien lnianych porównywano z wynikami uzyskanymi z analizy biochemicznej.

Jestem współautorką prac, w których metody spektroskopowe zastosowano do opracowania modeli kalibracyjnych, które opisują zależność między widmami oscylacyjnymi a określonymi właściwościami badanej próbki (liczba jodowa, stopień deacetylacji) (**II.B14, II.B18**). Opracowane modele kalibracyjne można wykorzystać do oznaczania wybranych właściwości chemicznych na podstawie pomiaru widma określonej próbki. W konsekwencji skomplikowane metody analizy chemicznej mogą być zastąpione

przez szybkie pomiary widm oscylacyjnych. Techniki spektroskopowe są doskonałym narzędziem do charakterystyki właściwości złożonych materiałów biologicznych. Pomiary są proste, a w wyniku analizy widma, uzyskać można wiele informacji o badanym materiale.

Celem badania opisanego w pracy **II.B14** było zaproponowanie nowej metody określania stopnia deacetylacji (DD) chitozanu, opartej na pomiarach widm Ramana. Stosując tę metodę uzyskano rozsądne wyniki, które wykazały dobre dopasowanie parametrów spektroskopowych i składu chemicznego badanych próbek. Wykorzystano intensywności integralne określonych pasm, uzyskując analityczne zależności liniowe: $A_{1654} = -0,021 DD + 2,68$ ($R^2 = 0,9468$); $A_{1591} = 0,016 DD - 0,92$ ($R^2 = 0,9787$); $A_{936} = -0,075 DD + 0,71$ ($R^2 = 0,9848$). Dobre dopasowanie między wartościami eksperymentalnymi i obliczonymi deacetylacji chitozanu uzyskano również stosując drugą procedurę zaproponowaną w niniejszej pracy. W tym przypadku intensywność rozpatrywanego pasma była związana z intensywnością pasma wzorcowego przy 896 cm^{-1} , które odpowiada drganiom $\nu(\phi) + \rho(\text{CH}_2)$. Wykazano, że zależności między stosunkami intensywności integralnych dla wybranych pasm widma Ramana, a stopniem deacetylacji opisują następujące równania: $A_{1591}/A_{896} = 0,014 DD - 0,86$ ($R^2 = 0,9901$) i $A_{936}/A_{896} = -0,007 DD + 0,69$ ($R^2 = 0,9962$). Zaproponowane nowe podejście do określania parametru DD dla próbek chitozanu okazało się bardzo użyteczne i wielokrotnie cytowane w literaturze światowej. Liczba cytowań publikacji **II.B14** wynosi 32.

Celem badania pracy **II.B18** było określenie składu kwasów tłuszczowych, wyznaczenie liczby jodowej, kwasowej, nadtlenkowej i zmydlania wybranych olejów jadalnych: słonecznikowego, z awokado, konopi, lnianego, szafranowego, orzechowego, z sezamu, ryżu, kukurydzy, rzepaku, pestek dyni i orzechów laskowych. Intensywności pasm widm oscylacyjnych, występujących przy około 1655 i 2852 cm^{-1} , odpowiadających drganiom $\nu(\text{C}=\text{C})$ i $\nu(\text{CH}_2)$ zostały wykorzystane do wyznaczenia zależności między danymi spektroskopowymi a wartością liczby jodowej (IV). Uzyskano następujące zależności liniowe: $I_{(\text{C}=\text{C})} / I_{(\text{CH}_2)} = 7,499 \times 10^{-4} \times \text{IV} - 0,0339$ i $I_{(\text{C}=\text{C})} / I_{(\text{CH}_2)} = 9,299 \times 10^{-4} \times \text{IV} - 0,023$ dla widm w podczerwieni i widm Ramana ze współczynnikiem korelacji odpowiednio $0,988$ i $0,976$. Linie kalibracyjne określone powyższymi równaniami można wykorzystać do określenia liczby jodowej dla olejów o nieznanym poziomie kwasów tłuszczowych nienasyconych, jak również margaryn i innych substancji tłuszczowych.

Brałam również udział w badaniach nad oceną przydatności spektroskopii oscylacyjnej w analizie żywności pochodzenia zwierzęcego (**II.B12**, **II.B19**, **II.B22**).

W pracy **II.B12.** opracowano metodę, umożliwiającą określenie zawartości mięsa końskiego (*Equus caballus*) w mieszaninie z wołowiną (*Bos taurus taurus*) z wykorzystaniem spektroskopii Ramana. W analizie widm Ramana mieszaniny mięs porównano stosunki intensywności integralnych następujących par pasm o maksimach przy liczbach falowych: 937/1003, 879/1003, 856/1003 i 829/1003 cm^{-1} . Za wewnętrzny standard widm Ramana posłużyło pasmo o maksimum intensywności przy liczbie falowej 1003 cm^{-1} . Jest to pasmo charakterystyczne dla drgania pierścienia fenyloalaniny. Uzyskane wyniki wskazują na wyraźną zależność parametrów spektroskopowych od różnic w składzie chemicznym badanych próbek. Wyprowadzono równania matematyczne opisujące zależności między tymi parametrami: $I_{937}/I_{1003} = 0,0075 C_{K/W} + 0,0403$ ($R^2 = 0,9146$); $I_{879}/I_{1003} = 0,0111 C_{K/W} - 0,0435$ ($R^2 = 0,9381$); $I_{856}/I_{1003} = 0,0045 C_{K/W} + 0,098$ ($R^2 = 0,9319$); $I_{829}/I_{1003} = 0,0016 C_{K/W} + 0,1216$ ($R^2 = 0,8277$). Za pomocą tych zależności wykazano doskonałą korelację wyników spektroskopowych i składu chemicznego mieszanin mięsnych. Opracowana metoda służąca do wykrywania zafałszowania mielonego mięsa wołowego charakteryzuje się krótkim czasem analizy i prostotą wykonania.

W publikacji **II.B19.** przedstawiono wyniki badań spektroskopowych mięsa drobiowego. Analizowano zmiany jakościowe zachodzące w mięsie w trakcie jego przechowywania. Wybrane zakresy widm FT-IR i Ramana rozłożono na składowe Lorentza i poprzez różnice w intensywnościach integralnych wybranych składowych wykazano wzrost ilości wolnych aminokwasów, obserwowanych jako główny rejestrowany spektroskopowo efekt psucia tkanki mięśniowej.

Celem badania opisanego w publikacji **II.B23.** było opracowanie metod rejestracji różnic w składzie ilościowym i jakościowym, występujących w przekroju badanej końskiej tkanki tłuszczowej. Porównując stosunki intensywności integralnych wybranych pasm widm FT-IR i Ramana, badano stopień nienasycenia, liczbę jodową i zawartość retinoidów w zewnętrznych i wewnętrznych warstwach tłuszczu. Wykazano charakterystyczne zmiany składu końskiej tkanki tłuszczowej w zależności od odległości od skóry.

W latach 2010, 2014, 2015, 2016, 2017 otrzymałam Nagrody Rektora Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, Pierwszego Stopnia za Osiągnięcia w Pracy Naukowo-Badawczej. Natomiast w latach 2011 i 2012 otrzymałam Nagrody Rektora Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, Drugiego Stopnia za Osiągnięcia w Pracy Naukowo-Badawczej.

Moim osiągnięciem w kształceniu kadr naukowych jest opieka nad dwoma doktorantami w charakterze promotora pomocniczego.

W ramach działalności popularyzującej naukę w latach 2014 - 2017 współorganizowałam Dolnośląski Festiwal Nauki. Przygotowałam i prowadziłam cykl imprez: "Abra-kadabra, czyli chemia dla dzieci", "To też jest chemia", "Chemia może być ciekawa" oraz "Hokus-pokus, czyli chemia dla najmłodszych"

W latach 2014 - 2015 prowadziłam zajęcia z uczniami dolnośląskich szkół w ramach projektu współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego "Nauka i technologia dla żywności" realizowane w Katedrze Chemii Bioorganicznej. Merytorycznie opracowałam projekt pt. „Spektroskopia w podczerwieni jako narzędzie badań produktów biologicznych i żywnościowych”, dodatkowo - materiał pt. „Instrukcja - krok po kroku dla ucznia” oraz karty pracy do wykonywanych zadań.

W ramach tego projektu w roku 2015 uczestniczyłam w Wyjeździe Studyjnym MINT do Berlina, gdzie uczestniczyłam w szkoleniu na Uniwersytecie Humbolta oraz Wolnym Uniwersytecie Berlina.

Od roku akademickiego 2014/2015 roku prowadzę laboratorium z Chemii Organicznej, Biochemii i Chemii Żywności na Wydziale Inżynieryjno-Ekonomicznym Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu.

Od roku akademickiego 2016/2017 prowadzę wykłady z Biochemii i Chemii Żywności na Wydziale Inżynieryjno-Ekonomicznym Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu.

W latach 2011 - 2017 moje badania prezentowane były łącznie na 14 konferencjach: 12 międzynarodowych i dwóch krajowych, gdzie byłam autorem lub współautorem. We wrześniu 2008 roku byłam współorganizatorem Międzynarodowej Konferencji Naukowej REMAT (International Conference on Rare Earth Materials).

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności oraz Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

W 2010 roku byłam członkiem zespołu ds. weryfikacji wniosków o nagrody J.M. Rektora Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu. Od 2013 roku jestem członkiem z wyboru Rady Naukowej Instytutu Chemii i Technologii Żywności. Jestem również Członkiem Komisji ds. Jakości Kształcenia na Uniwersytecie Ekonomicznym we Wrocławiu

oraz członkiem Odwoławczej Komisji Dyscyplinarnej dla Studentów na kadencję 2016 - 2020. Od 2016 byłam przewodniczącą Komisji Egzaminacyjnej na egzaminie dyplomowym (inżynierskim i magisterskim), 111 studentów.

Wykonałam w sumie 24 recenzje prac naukowych, złożonych do czasopism z listy *Journal Citation Reports*, takich jak: *Plant Methods*, *Carbohydrate Polymers*, *European Journal of Lipid Science and Technology*, *Journal of the American Oil Chemists Society*, *Current Organic Synthesis*, *Research on Chemical Intermediates*, *Spectrochimica Acta: Part A*, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, *Journal of Molecular Structure*.

Zestawienie liczbowe mojego dorobku naukowego znajduje się w tabelach 1 i 2. Ponadto wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki dołączam do dokumentów jako Załącznik 3 i 4.

Tabela 1. Zestawienie dorobku publikacyjnego przed i po uzyskaniu stopnia doktora

Dorobek naukowy	Przed uzyskaniem stopnia doktora (szt.)	Po uzyskaniu stopnia doktora (szt.)	Dorobek całkowity (szt.)
Publikacje naukowe w czasopismach uwzględnionych w bazie JCR	2	30	32
Artykuły przeglądowe w czasopismach uwzględnionych w bazie JCR	-	1	1
Komunikaty naukowe na konferencjach:			
• międzynarodowych	2	12	14
• krajowych	-	2	2
Prace konferencyjne opublikowane w języku angielskim	-	2	2
Organizacja konferencji:			
• międzynarodowych	1	1	2
• krajowych	-	-	-
Recenzje artykułów naukowych	-	24	24
Sumaryczny IF	5,331	75,200	80,531
Punkty MNiSW	40	855	895

Tabela 2. Punktacja opublikowanych prac.

Rodzaj pracy	Liczba prac	Punktacja wg MNiSW *	Suma punktów wg MNiSW	IF**
Publikacje naukowe	32		865	77,608
Chemical Physics	1	20	20	1,805
Journal of Raman Spectroscopy	2	20 32	52	3,526 3,137
Biotechnology Progress	3	24 35	89	2,398 1,853

		30		2,149
Composites Science and Technology	1	24	24	2,901
Journal of Molecular Structure	5	15 20x4	95	1,551 1,602 2,011x3
Spectrochimica Acta Part A	5	20 25 30x3	135	1,566 2,098 2,353x2 2,653
BMC Biotechnology	2	30	60	2,349 2,592
Vibrational Spectroscopy	1	25	25	1,650
Journal of Biotechnology	1	30	30	3,183
Journal of Natural Products	1	35	35	3,947
BMC Plant Biology	2	40x2	80	3,813 3,964
Food Chemistry	1	40	40	3,391
Transgenic Research	1	20	20	2,054
Frontiers in Plant Science	1	40	40	4,291
Spectroscopy Letters	2	15 20	30	0,794 0,896
International Journal of Food Properties	1	25	25	1,845
Food Analytical Methods	1	30	30	2,245
Process Biochemistry	1	30	30	2,616
Artykuły przeglądowe:	1		30	2,923
Bioorganic and Medicinal Chemistry	1	30	30	2,923
Łącznie publikacje naukowe	33	-	895	80,531

Index Hirscha według bazy Web of Science **11**

liczba cytowań 288

liczba cytowań bez autocytowań 234 (wg bazy Web of Science)

* Punktacja wg komunikatu MNiSW w sprawie wykazu czasopism naukowych z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach (Oryginalne Prace Twórcze i Artykuły Przeglądowe) zgodnie z rokiem wydania

**Impact Factor (IF) zgodnie z rokiem wydania

Lucyna Dymińska
.....
podpis