



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii

Nowe podejście w analizie związków bioaktywnych dla potrzeb metabolomiki i lipidomiki

Autoreferat

dr Justyna Walczak-Skierska

Obszar nauk ścisłych

Dziedzina nauk chemicznych

Dyscyplina chemia

Toruń 2024

Spis treści

1. Imię i nazwisko	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	2
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	2
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2. Lista publikacji wchodzących w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe	3
4.3. Wprowadzenie	5
4.4. Cel osiągnięcia naukowego	7
4.5. Wyniki oraz omówienie osiągnięcia naukowego	8
4.6. Podsumowanie i wnioski	26
4.7. Plany badawcze	28
4.8. Bibliografia.....	29
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	33
5.1. Odbyte staże naukowe w jednostkach zagranicznych	33
5.2. Nawiązana współpraca naukowa	33
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	34
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne	34
6.2. Osiągnięcia organizacyjne	34
6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę	35
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.....	35
7.1. Nagrody i wyróżnienia	35
7.2. Odbyte kursy i szkolenia	36

Poniższy autoreferat został przygotowany w oparciu o wzór dokumentu zamieszczony na stronie Rady Doskonałości Naukowej, w zakładce Postępowanie habilitacyjne/Wymagania dokumentacyjne wniosków w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego (<https://www.rdn.gov.pl/postepowaniehabilitacyjne.wymagania-dokumentacyjne-wnioskow-w-sprawie-nadania-stopnia-doktora-habilitowanego.html>, dostęp z dnia 24 czerwca 2024 roku).

1. Imię i nazwisko.

Justyna Walczak-Skierska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- | | |
|-------------|--|
| 2017 | Doktor nauk chemicznych w dyscyplinie: chemia
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii
Tytuł rozprawy doktorskiej: „ <i>Lipidomika - separacja i identyfikacja frakcji biologicznie aktywnej wykorzystaniem sprzężonych technik separacyjnych</i> ”, praca obroniona z wyróżnieniem 11.01.2017 r.
Promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski
Promotor pomocniczy: dr hab. Szymon Bocian |
| 2012 | Magister chemii , specjalność: chemia analityczna
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii
Tytuł pracy magisterskiej: „ <i>Badanie metabolizmu leków z wykorzystaniem sprzężonych technik separacyjnych</i> ”, praca obroniona 20.06.2012 r.
Promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski |

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- | | |
|--------------------------|--|
| 07/2023 – obecnie | Adiunkt naukowy
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu |
| 05/2021 – 06/2023 | Adiunkt naukowy
Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu |
| 06/2020 – 05/2021 | Urlop macierzyński |
| 01/2020 – 06/2020 | Adiunkt naukowy
Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu |
| 04/2018 – 12/2019 | Pracownik naukowy
Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu |
| 02/2017 – 03/2019 | Adiunkt naukowy |

10/2016 – 11/2017

Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu

Asystent naukowy

Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

*Nowe podejście w analizie związków bioaktywnych dla potrzeb metabolomiki
i lipidomiki*

4.2. Lista publikacji wchodzących w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe

Osiągnięciem będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl 6 powiązanych tematycznie artykułów naukowych [H1-H6] opublikowanych w czasopismach indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). Publikacje te prezentują wyniki oryginalnych badań eksperymentalnych, koncentrujących się na zastosowaniu zaawansowanych technik analitycznych w badaniach metabolomicznych i lipidomicznych różnorodnych matryc biologicznych. Załącznik nr 6 zawiera oświadczenia współautorów, określające ich indywidualny wkład merytoryczny w powstanie każdej z wymienionych prac, natomiast w Załączniku nr 7 znajdują się pełne teksty publikacji. Dodatkowo, szczegółowy opis mojego osobistego wkładu w utworzenie poszczególnych publikacji został przedstawiony w Załączniku nr 4 (pkt I.2.) oraz w Załączniku nr 5.

Cykl publikacji obejmuje:

H1 E. Maślak, M. Złoch, A. Arendowski, M. Sugajski, I. Janczura, J. Rudnicka, **J. Walczak-Skierska**, M. Buszewska-Forajta, K. Rafińska, P. Pomastowski, D. Białczak, B. Buszewski, “*Isolation and Identification of Lactococcus lactis and Weissella cibaria strains from fermented beetroot and an investigation of their properties as potential starter cultures and probiotics*”, *Foods* 2022, 11, 1-26. DOI: 10.3390/foods11152257

IF = 5,2; MNiSW = 100 pkt

H2 K. Rafinska, O. Wrona, A. Krakowska-Sieprawska, **J. Walczak-Skierska**, A. Kielbasa, Z. Rafiński, M. Kolanowski, P. Pomastowski, B. Buszewski, “*Enzyme-assisted extraction of plant material – New functional aspects of the process on an example of Medicago sativa L.*”, *Industrial Crops and Products* 2022, 187(2): 115424. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115424

IF = 5,9; MNiSW = 200 pkt

H3 **J. Walczak-Skierska***, F. Monedeiro, E. Maślak, M. Złoch, “*Lipidomics characterization of the microbiome in people with diabetic foot infection using*

MALDI-TOF MS”, Analytical Chemistry 2023, 95: 16251-16262. DOI: 10.1021/acs.analchem.3c03071

IF = 6,7; MNiSW = 200 pkt

- H4 J. Walczak-Skierska***, A. Krakowska-Sieprawska, F. Monedeiro, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Cichorek, J. Olszewski, K. Głowacka, G. Gużewska, M. Szultka-Młyńska, “*Silicon’s influence on polyphenol and flavonoid profiles in pea (*Pisum sativum* L.) under cadmium exposure in hydroponics: a study of metabolomics, extraction efficacy, and antimicrobial properties of extracts*”, ACS Omega 2024, 9: 14899-14910. DOI: 10.1021/acsomega.3c08327

IF = 3,7; MNiSW = 70 pkt

- H5 J. Walczak-Skierska***, F. Monedeiro, J. Rudnicka, P. Pomastowski, “*Optimizing milk quality and shelf life: investigating refrigeration effects on fatty acid and protein profiles*”, ACS Food Science & Technology 2024, 4 (2): 382-391. DOI: 10.1021/acsfoodscitech.3c00468

IF = 2,6; MNiSW = 20 pkt

- H6 G. Gużewska, M. Monedeiro-Milanowski, A.B. Florkiewicz, I. Arendowska, J. Walczak-Skierska***, D. Białczak, P. Pomastowski, “*Analysis of the fatty acid profile in cream, buttermilk fractions, and anhydrous milk fat: influence of physicochemical and microbiological parameters on the fatty acid profile*”, Applied Sciences 2024, 14: 6117. DOI: 10.3390/app14146117

IF = 2,5; MNiSW = 100 pkt

(*) – autor korespondencyjny

Sumaryczny IF prac stanowiących cykl: 26,6 (średnio 4,443 na jedną pracę).

Suma punktów MNiSW prac stanowiących podstawę habilitacji: 690 (średnio 115 pkt na jedną pracę).

Badania naukowe przedstawione w publikacjach zostały sfinansowane przez:

- H1 Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 w ramach projektu Szybka ścieżka Agrotech nr 1/2020, POIR.01.01.01.-00-2294/20
- H2 Grant Miniatura 2 z Narodowego Centrum Nauki, nr NCN 2018/02/X/ST4/01351, *Wpływ struktury oraz kompozycji materiału roślinnego na ekstrakcję wybranych związków biologicznie aktywnych* (2018-2019)
- H3 Grant Sonatina 2 z Narodowego Centrum Nauki, nr NCN 2018/28/C/ST4/00434 *Wykorzystanie techniki MALDI-TOF/MS w monitorowaniu i szybkiej diagnostyce rozwoju zakażenia stopy cukrzycowej* (2018-2022)
- H4 Grant OPUS z Narodowego Centrum Nauki, nr NCN 2019/35/B/ST4/02791, *Nowe strategie otrzymywania związków bioaktywnych na bazie krzemu* (2019-2023)

- H5 Grant LIDER XIII z Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, nr DPWP/LIDER-XIII/6/2023, *Opracowanie preparatywnej metody izolacji biologicznej aktywnej laktoferyny* (2023-2026)
- H6 Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr DWD/6/0121/2022, *Fizykochemiczne oraz mikrobiologiczne czynniki wpływające na frakcjonowanie bezwodnego tłuszczu mlecznego (AMF) w procesie otrzymywania masła* (2022-2026)

4.3. Wprowadzenie

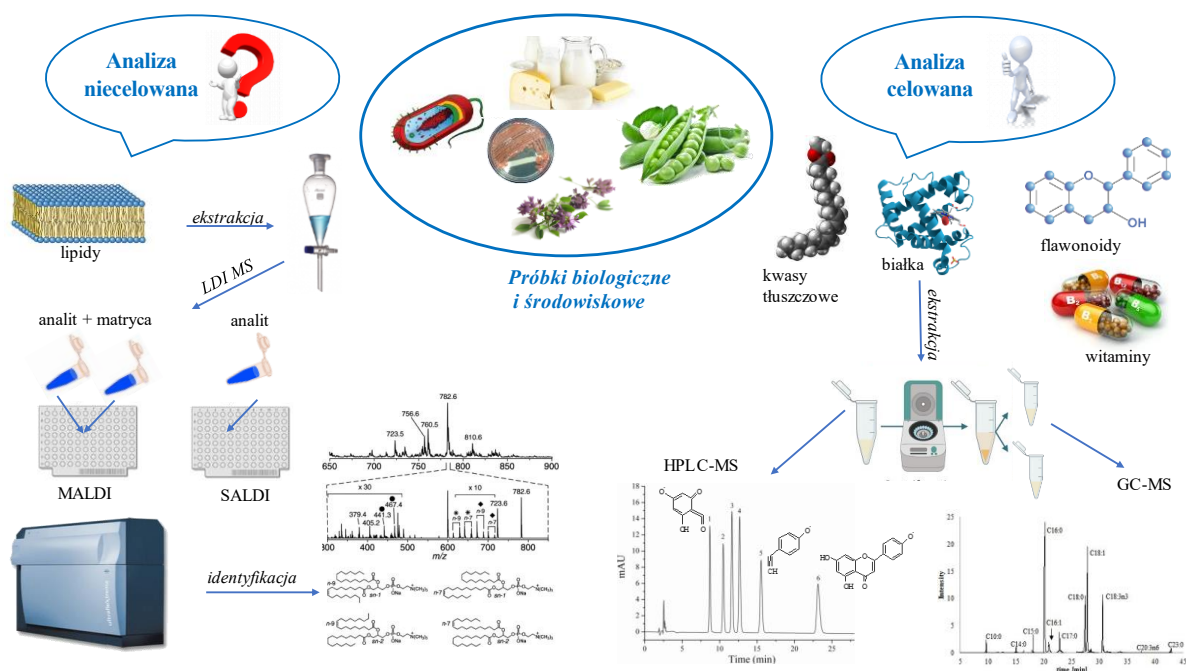
Interdyscyplinarność współczesnej chemii analitycznej, odgrywa kluczową rolę w rozwoju wielu dyscyplin naukowych. Jej znaczenie wynika nie tylko z wykorzystywania różnorodnych zjawisk fizykochemicznych w nowoczesnych technikach pomiarowych, ale przede wszystkim z praktycznych zastosowań w rozwiązywaniu złożonych problemów badawczych. W ostatnich latach obserwujemy dynamiczny rozwój zaawansowanych technik analitycznych, które umożliwiają coraz dokładniejszą i bardziej kompleksową analizę złożonych układów biologicznych.

Szczególne miejsce w tym obszarze zajmuje połączenie wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (ang. *high performance liquid chromatography-mass spectrometry*, HPLC-MS), które stało się narzędziem w badaniach metabolomicznych i lipidomicznych (Rosenberg i Krska, 2024). Wysokosprawna chromatografia cieczowa pozwala na efektywne rozdzielenie szerokiej gamy związków chemicznych, podczas gdy spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*, MS) umożliwia ich precyzyjną identyfikację i ilościowe oznaczenie. Połączenie tych technik oferuje niezrównaną czułość i selektywność, co jest szczególnie istotne w analizie złożonych matryc biologicznych, takich jak ekstrakty roślinne, próbki mleka czy izolaty bakteryjne.

W ramach prowadzonych badań szczególną uwagę poświęcono dwóm głównym metodom jonizacji w spektrometrii mas: elektrorozpylaniu (ang. *electrospray ionization*, ESI) oraz laserowej desorpcji/ionizacji (ang. *laser desorption/ionization*, LDI). Technika ESI, ze względu na swoją łagodność i efektywność w jonizacji związków polarnych, znalazła szerokie zastosowanie w połączeniu z HPLC (Kumar, 2017). Z kolei LDI, dzięki możliwości analizy związków o wysokich i niskich masach cząsteczkowych i minimalnej fragmentacji, okazała się niezastąpiona w badaniach lipidomicznych bakterii (Maślak i wsp., 2023). Kluczowym aspektem prowadzonych badań było zastosowanie zarówno celowanej (ang. *targeted analysis*), jak i niecelowanej analizy (ang. *untargeted analysis*) metabolomicznej. Analiza celowana koncentruje się na identyfikacji i ilościowym oznaczeniu wcześniej zdefiniowanych związków, co pozwala na zwiększenie czułości i specyficzności metody. Jest to szczególnie przydatne w badaniach nad konkretnymi grupami metabolitów, takimi jak witaminy czy specyficzne związki bioaktywne w roślinach. Z drugiej strony, analiza niecelowana umożliwia kompleksowe profilowanie metaboliczne bez wstępnych założeń co do składu próbki. Podejście to jest niezwykle cenne w odkrywaniu nowych biomarkerów, identyfikacji nieznanych metabolitów czy badaniu globalnych zmian metabolicznych w odpowiedzi na czynniki stresowe (Amer i wsp., 2023). Połączenie tych dwóch podejść analitycznych pozwoliło na uzyskanie

kompleksowego obrazu badanych układów biologicznych, od szczegółowej analizy konkretnych związków po globalne profilowanie metaboliczne.

W ramach cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszego wniosku habilitacyjnego zastosowano kompleksowe podejście analityczne, wykorzystując różnorodne techniki spektrometrii mas. Metoda HPLC-MS/MS (ang. *high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*) umożliwiła opracowanie skutecznych procedur separacji, charakteryzacji metabolitów roślinnych. Skupiono się na analizie polifenoli i flawonoidów w grochu i lucernie, a także na badaniu związków niskocząsteczkowych, takich jak witaminy czy cukry. Do separacji związków wysokocząsteczkowych, w szczególności białek mleka, wykorzystano układ HPLC-DAD (ang. *high performance liquid chromatography diode array detector*). Natomiast technika GC-MS (ang. *gas chromatography mass spectrometry*) posłużyła do analizy i identyfikacji kwasów tłuszczowych w produktach mlecznych. Zastosowanie technik laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganej matrycą (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) oraz - powierzchnią (ang. *surface-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, SALDI-TOF MS) umożliwiło przeprowadzenie niecelowanej analizy lipidów bakteryjnych. Dzięki temu udało się szczegółowo scharakteryzować profile lipidowe różnych szczepów bakterii, w tym zidentyfikować nieznane dotąd cząsteczki lipidowe. Badania objęły bakterie wyizolowane od osób z zakażeniem stopy cukrzycowej (ang. *diabetic foot infections*, DFI) oraz bakterie kwasu mlekowego (ang. *lactic acid bacteria*, LAB). Rysunek 1 przedstawia schemat podejścia analitycznego, które wykorzystałam podczas realizacji prac badawczych w cyklu publikacji **H1-H6**.



Rys. 1. Poglądowy schemat podejścia analitycznego wykorzystany podczas realizacji prac badawczych w cyklu publikacji **H1-H6**.

Badania te miały na celu nie tylko rozwój metodologii analitycznej, ale przede wszystkim dostarczenie nowych informacji o wpływie czynników środowiskowych na profile metaboliczne i lipidomiczne badanych organizmów. Analizowano m.in. wpływ suplementacji krzemem na profil metaboliczny grochu poddanego stresowi kadmowemu, zmiany w składzie lipidów bakteryjnych w odpowiedzi na warunki stresowe, zdolność wybranych szczepów bakteryjnych do syntezy ważnych metabolitów, czy wpływ warunków przechowywania na stabilność związków bioaktywnych w mleku. Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i praktyczne. Dostarczają nowych informacji o mechanizmach adaptacyjnych roślin i bakterii do różnych warunków stresowych, co może mieć zastosowanie w rolnictwie i przemyśle spożywczym. Ponadto, opracowane metody analityczne mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce medycznej, kontroli jakości żywności czy monitorowaniu środowiska.

4.4. Cel osiągnięcia naukowego

Nadrzędnym celem moich badań przedstawionych w cyklu prac [**H1-H6**] było rozwinięcie i zastosowanie zaawansowanych metod analitycznych opartych na spektrometrii mas do kompleksowej charakterystyki próbek biologicznych i środowiskowych. Skupiłam się szczególnie na technikach HPLC-MS, LDI-TOF MS, GC-MS oraz detekcji spektrometrycznej. Moje badania koncentrowały się na dwóch głównych aspektach. Po pierwsze, dążyłam do zrozumienia możliwości i ograniczeń różnych technik spektrometrii mas w analizie złożonych matryc biologicznych, co pozwoliło mi na optymalizację i rozszerzenie zastosowań tych technik, a w konsekwencji uzyskanie bardziej dokładnych i wiarygodnych wyników. Po drugie, starałam się pogłębić wiedzę na temat profili lipidomicznych i metabolomicznych w złożonych układach biologicznych.

Realizację głównej koncepcji badawczej osiągnęłam poprzez realizację celów szczegółowych, które można podzielić na dwie główne kategorie:

1. *Rozwój i zastosowanie zaawansowanych metod analitycznych w badaniach lipidomicznych i metabolomicznych opartych na HPLC-MS do identyfikacji i kwantyfikacji związków bioaktywnych w złożonych matrycach biologicznych.*

W ramach tego celu:

- Opracowałam metodę niecelowanej analizy lipidomicznej z wykorzystaniem techniki SALDI-TOF MS z nanocząsteczkami srebra oraz MALDI-TOF MS do charakterystyki profili lipidowych bakterii [**H1, H3**].
- Zidentyfikowałam i porównałam skład lipidowy bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii związanych z infekcjami stopy cukrzycowej, w celu określenia potencjalnych biomarkerów lipidowych specyficznych dla poszczególnych gatunków bakterii [**H3**].
- Stworzyłam podstawy do budowy bibliotek lipidowych dla celów identyfikacji bakterii [**H3**].
- Opracowałam celowaną analizę metabolomiczną z wykorzystaniem HPLC/MS-MS do identyfikacji i kwantyfikacji witamin, laktozy i kwasu mlekowego w bakteriach LAB [**H1**] oraz metabolitów wtórnych w roślinach [**H2, H4**].

- Oceeniłam wpływ enzymatycznej hydrolizy na efektywność ekstrakcji związków bioaktywnych z materiału roślinnego [H2] oraz porównałam efektywność różnych technik ekstrakcyjnych (ASE, SFE i maceracji) [H4].
 - Zoptymalizowałam warunki separacji chromatograficznej (HPLC-DAD) dla analizy białek wyizolowanych z mleka [H5].
 - Udoskonaliłam metodę GC-MS do kompleksowej analizy profilu kwasów tłuszczowych w produktach mlecznych [H5-H6].
2. *Adaptacja podejść celowanych i niecelowanych w analizie MS dla kompleksowej charakterystyki składu i właściwości żywności w kontekście jej wpływu na zdrowie człowieka.*

W ramach tego celu:

- Zastosowałam niecelowaną i celowaną analizę MS do kompleksowej charakterystyki bakterii kwasu mlekowego wyizolowanych z fermentowanych buraków, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjału probiotycznego i zastosowania jako kultury startowe w przemyśle mleczarskim [H1].
- Zbadałam wpływ suplementacji krzemem na profil metaboliczny grochu w warunkach normalnych i stresu kadmowego oraz oceeniłam rolę krzemu w łagodzeniu stresu wywołanego kadmem i jego wpływ na akumulację związków bioaktywnych w różnych częściach rośliny [H4].
- Przeanalizowałam zmiany w profilu kwasów tłuszczowych i składzie białkowym mleka podczas przechowywania w warunkach chłodniczych oraz zidentyfikowałam potencjalne markery świeżości mleka i oceeniłam stabilność składników odżywczych podczas przechowywania [H5].
- Oceeniłam wpływ różnych procesów technologicznych (np. homogenizacja, pasteryzacja, fermentacja) na profil kwasów tłuszczowych i związków bioaktywnych w produktach mlecznych w kontekście ich potencjalnego wpływu na zdrowie człowieka [H6].

4.5. Wyniki oraz omówienie osiągnięcia naukowego

Rozwój i zastosowanie zaawansowanych metod analitycznych w badaniach lipidomicznych i metabolomicznych opartych na HPLC-MS do identyfikacji i kwantyfikacji związków bioaktywnych w złożonych matrycach biologicznych

Lipidomika, jako dziedzina nauki zajmująca się kompleksową analizą lipidów w organizmach żywych, zyskuje coraz większe znaczenie w mikrobiologii (Li i wsp., 2024). Lipidy, będące kluczowymi składnikami komórek, pełnią różnorodne funkcje, takie jak tworzenie błon komórkowych, udział w sygnalizacji komórkowej, magazynowanie energii i rozpoznawanie komórkowe (Yang i Han, 2016). Ich wysoka różnorodność strukturalna i złożoność czyni je potencjalnymi biomarkerami do identyfikacji mikroorganizmów oraz dostarczania cennych informacji diagnostycznych i taksonomicznych. Analiza lipidów bakteryjnych stanowi kluczowy element w zrozumieniu fizjologii i patogenazy mikroorganizmów (Li i wsp., 2024; Han i Gross, 2022). W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania wykorzystaniem

lipidomiki w diagnostyce mikrobiologicznej, co wynika z ograniczeń tradycyjnych metod identyfikacji bakterii opartych na analizie białek (Mortier i wsp., 2021). Różnice w strukturze ściany komórkowej i składzie błon między bakteriami Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi, a także między gatunkami tego samego typu Gram, sprawiają, że analiza lipidów stała się cennym narzędziem w mikrobiologii (Silhavy i wsp., 2010; Sohlenkamp i Geiger, 2016). Mimo powszechnego stosowania w analizie białek metodą MALDI-TOF MS w laboratoriach klinicznych, technika ta ma pewne ograniczenia. Obejmują one trudności w różnicowaniu blisko spokrewnionych gatunków o wysokim podobieństwie genotypowym lub różnych fenotypów, pracochłonne procedury ekstrakcji białek (zwłaszcza dla mikroorganizmów z grubymi ścianami komórkowymi), oraz niską skuteczność w bezpośrednim wykrywaniu patogenów w próbkach klinicznych (Kostrzewa i wsp., 2019). Te wyzwania skłaniają badaczy do poszukiwania nowych celów molekularnych, wśród których analiza lipidomiczna jawi się jako szczególnie obiecujące podejście (Solntceva i wsp., 2021).

Technika MALDI-TOF MS zrewolucjonizowała dziedzinę mikrobiologii, oferując szereg korzyści w analizie lipidów bakteryjnych (Torres-Sangiao i wsp., 2021). Metoda ta, polegająca na jonizacji cząsteczek próbki za pomocą lasera w obecności matrycy, a następnie analizie powstałych jonów w analizatorze czasu przelotu, wyróżnia się szybkością i dokładnością, umożliwiając identyfikację szerokiego zakresu mikroorganizmów. Jej wysoka czułość pozwala na analizę nawet niewielkich ilości próbki, co jest szczególnie istotne w badaniach mikrobiologicznych. Ponadto, metoda ta umożliwia analizę złożonych mieszanin lipidowych bez konieczności wcześniejszego rozdzielenia chromatograficznego, co znacznie upraszcza i przyspiesza proces analityczny (Solntceva i wsp., 2021; Leung i wsp., 2017). Wszechstronność MALDI-TOF MS przejawia się w możliwości analize różnych klas lipidów, od prostych kwasów tłuszczowych po złożone glikolipidy i fosfolipidy. Ta cecha czyni ją niezwykle użyteczną w badaniach lipidomicznych, gdzie konieczne jest kompleksowe spojrzenie na profil lipidowy organizmu (Gerhardtova i wsp., 2024). Metody te umożliwiają szybką i dokładną identyfikację oraz różnicowanie mikroorganizmów, co uzupełnia tradycyjne podejścia oparte na analizie białek (Elbehiry i wsp., 2022).

Laserowa desorpcja/ionizacja wspomagana powierzchnią (SALDI MS) jest zaawansowaną metodą analityczną, która stanowi alternatywę dla klasycznej techniki MALDI MS. W SALDI MS, zamiast tradycyjnej organicznej matrycy, stosuje się nanostruktury, takie jak nanocząstki metali lub tlenki metali (np. srebra, złota, TiO_2 , ZnO). Te nanostruktury pełnią rolę powierzchni wspomagającej desorpcję i jonizację analitów, pochłaniając światło wiązki laserowej i przenosząc jej energię na substancję badaną. Dodatkowo chronią próbkę przed bezpośrednim uderzeniem lasera, zapobiegając fragmentacji analitu. SALDI-MS oferuje czystsze tło spektralne w porównaniu do tradycyjnej MALDI-MS, co jest szczególnie korzystne przy analizie małych cząsteczek (<1000 Da), takich jak metabolity i lipidy. Dzięki wysokiej absorpcji UV i interakcji między analitami a powierzchnią, nanomateriały skutecznie wspomagają jonizację i detekcję analitów, umożliwiając bardziej precyzyjną analizę (Yu i wsp., 2021; Wu i wsp., 2024).

W ramach mojego osiągnięcia naukowego, przedstawionego w publikacjach **H1** i **H3**, przeprowadziłam kompleksowe badania z wykorzystaniem spektrometrii mas z jonizacją

laserową wspomaganą powierzchnią i matrycą (SALDI MS, MALDI MS) w analizie lipidomicznej bakterii. Badania te mają istotne znaczenie dla zrozumienia fizjologii i patogenezы mikroorganizmów oraz potencjalnego zastosowania w diagnostyce mikrobiologicznej. Kluczowym elementem osiągnięcia było opracowanie przeze mnie innowacyjnej metody niecelowanej analizy lipidomicznej z wykorzystaniem MALDI MS i SALDI MS do charakterystyki profili lipidowych bakterii. W tym miejscu należy podkreślić, że zastosowanie związków lipidowych do charakterystyki mikrobiologicznej metodami LDI jest innowacyjne.

Przygotowanie próbek lipidomicznych do analizy LDI, w tym MALDI i SALDI, jest stosunkowo nieskomplikowane i efektywne w porównaniu do innych metod analitycznych (Kusano i wsp., 2014; Pati i wsp., 2016). Procedura rozpoczyna się od rozpuszczenia lipidów bakteryjnych w chloroformie. Następnie niewielką ilość próbki (około 0,5 µl) nanosi się na płytkę, dodając odpowiednią matrycę. Kluczowym etapem jest szybkie odparowanie rozpuszczalnika, najczęściej przy użyciu ciepłego powietrza, co prowadzi do utworzenia jednorodnych kryształów matrycy i analitu. W przypadku SALDI-MS, zamiast tradycyjnej organicznej matrycy, stosuje się nanostruktury, takie jak nanocząstki srebra, które ułatwiają proces desorpcji i jonizacji analitów. W LDI, przygotowanie próbek do analizy nie jest takie skomplikowane jak w przypadku LC-MS. LC-MS wymaga wstępnego rozdzału chromatograficznego, co wiąże się z koniecznością zastosowania złożonych procedur ekstrakcji i oczyszczania próbek. Przykładowo, ekstrakcja ciecz – ciało stałe (ang. *solid phase extraction*, SPE) jest znacznie bardziej czasochłonna (Züllig i wsp., 2019). Istotną zaletą analizy lipidów metodą LDI jest brak konieczności wcześniejszego rozdzału chromatograficznego, co znacząco upraszcza i przyspiesza proces analityczny. Co więcej, w przeciwieństwie do innych biomolekuł (np. białek), lipidy nie wymagają dodatkowego etapu oczyszczania (Schiller i wsp., 2004). LDI-TOF MS oferuje wysoką czułość i dokładność, umożliwiając identyfikację szerokiego zakresu lipidów nawet w bardzo małych ilościach próbki.

Opracowana przeze mnie metoda obejmowała zoptymalizowany protokół ekstrakcji lipidów bakteryjnych z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody Folcha, stosując mieszaninę chloroform/metanol (2:1, v/v) (Folch i wsp., 1957). Proces ekstrakcji został starannie zoptymalizowany, obejmując etapy sonikacji, wytrząsania i wirowania, co zapewniło efektywne wyodrębnienie lipidów z komórek bakteryjnych. W ramach przeprowadzonych badań w analizie SALDI-TOF MS nanocząstki srebra pełniły rolę matrycy. Zidentyfikowane lipidy występowały na widmie w postaci adduktów: $[M + H]^+$, $[M + K]^+$, $[M + Na]^+$, a także z dwoma izotopami Ag, tj. $[M + {}^{107}\text{Ag}]^+$ i $[M + {}^{109}\text{Ag}]^+$. Kationizacji srebra w analizowanych związkach na płytkach z nanocząsteczkami srebra jest dość powszechnym zjawiskiem (Arendowski i wsp., 2018). Natomiast w MALDI-TOF MS wykorzystano matrycę DHB (kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy) rozpuszczoną w mieszaninie acetonitrylu i 0,1% kwasu trifluorooctowego w wodzie, która w trybie jonizacji dodatkowo generuje widma lipidowe w postaci jonów $[M + H]^+$ lub $[M + Na]^+$ (Perry i wsp., 2022). Analiza LDI MS była przeprowadzana w trybie jonów dodatnich w zakresie m/z 80-2000, z zastosowaniem lasera Nd:YAG o długości fali 355 nm. Napięcie ekstrakcyjne wynosiło 25 kV, a globalny tłumik był ustawiony na 50%. Wszystkie widma masowe były kalibrowane przy użyciu klastra trijodku cezu w MALDI i jonów srebra

w SALDI. W celu identyfikacji lipidów, wykorzystano komercyjnie dostępną bibliotekę danych LIPID MAPS oraz przeprowadzono „ręcznie” analizę fragmentacyjną MS/MS, każdego z zarejestrowanego sygnału lipidowego. Analizę widm fragmentacyjnych sygnałów lipidowych przeprowadziłam wykorzystując tryb LIFT (ang. *laser ionisation fragmentation technology*). Metoda LIFT MS różni się od techniki CID (ang. *collision-induced dissociation*). W CID fragmentacja cząsteczek analitu zachodzi poprzez zderzenia jonów z cząsteczkami gazu obojętnego (np. argonu) w komorze kolizyjnej. Natomiast LIFT polega na bezkolizyjnej fragmentacji jonów prekursorowych przy użyciu energii lasera. W tym miejscu należy podkreślić, że podczas analizy i identyfikacji związków lipidowych w komórkach bakteryjnych "odkryto" nowe, nie zidentyfikowane wcześniej kombinacje kwasów tłuszczowych, które budują cząsteczki lipidów. Lipidy stanowią bardzo złożoną grupę związków, a ich różnorodność wynika z licznych kombinacji kwasów tłuszczowych, głów i ogonów lipidowych. Ponieważ lipidy są tak zróżnicowane, nie istnieje komercyjnie dostępna, kompleksowa biblioteka widm lipidowych, która mogłaby obejmować wszystkie możliwe warianty tych związków. W praktyce oznacza to, że identyfikacja lipidów często wymaga indywidualnych analiz i interpretacji wyników. W związku z tym uzyskane widma LDI-TOF MS stanowią "odcisk palca" (ang. *fingerprint*) badanych związków. Każde widmo, będące unikalnym zestawem pików masowych, może być używane do identyfikacji i charakterystyki specyficznych lipidów obecnych w próbkach.

W wyniku zastosowania opracowanej metody SALDI udało się zidentyfikować w bakteriach kwasu mlekowego (LAB) wyizolowanych z kiszonek, łącznie 42 cząsteczki lipidów w szczepie *L. lactis* oraz 33 sygnały należące do lipidów dla *W. cibaria*. Analiza SALDI wykazała obecność lipidów należących do wszystkich klas, w tym kwasów tłuszczowych, glicerolipidów, glicerofosfolipidów, sfingolipidów i steroidów. Zidentyfikowano kwasy tłuszczowe (ang. *fatty acid*, FA), które są kluczowymi składnikami błon komórkowych, oraz glicerolipidy, takie jak triacyloglicerole (ang. *triacylglycerols*, TAGs) i diacyloglicerole (ang. *diacylglycerols*, DAGs), pełniące funkcje zapasowe i energetyczne w komórkach bakteryjnych. Wśród wykrytych glicerofosfolipidów znalazły się fosfatydyloglicerole (ang. *phosphatidylglycerols*, PGs), fosfatydyloetanolaminy (ang. *phosphatidylethanolamines*, PEs), fosfatydyloinozytole (ang. *phosphatidylinositols*, PIs), fosfatydylocholina (ang. *phosphatidylcholine*, PC) i fosfatydyloseryna (ang. *phosphatidylserine*, PS), każdy pełniący specyficzne funkcje w strukturze i dynamice błony bakteryjnej. Analiza wykazała również obecność ceramidów i steroli, co podkreśla złożoność lipidowego profilu bakterii LAB [H1]. Natomiast w przypadku MALDI udało się zidentyfikować 108 różnych kombinacji kwasów tłuszczowych budujących cząsteczki lipidowe w 39 szczepach bakteryjnych (np. *E. faecalis*, *S. aureus*, *C. striatum*, *S. simulans*, *S. dysgalactiae*, *M. morgani*, *K. oxytoca*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*) wyizolowanych od osób z infekcją stopy cukrzycowej (DFI) [H3]. Wśród wykrytych lipidów były triacyloglicerole, fosfatydyloglicerole, fosfatydyloetanolaminy, fosfatydyloinozytole, fosfatydylocholina, fosfatydyloseryna oraz lizofosfolipidy (LPE, LPC) i kardiolipidy (ang. *cardiolipin*, CLP). Przeprowadzone badania wykazały, że najobficiej występującymi kwasami tłuszczowymi były: C16:0 (kwas palmitynowy), C16:1 (kwas palmitoleinowy), C18:0 (kwas stearynowy) i C18:3

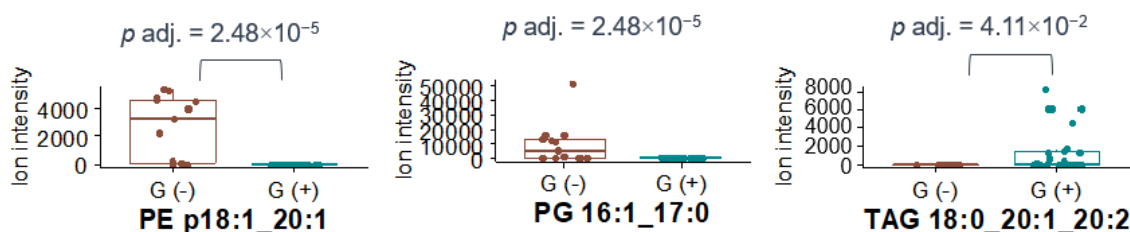
(kwas α -linolenowy). Dodatkowo, zidentyfikowano kwasy tłuszczowe omega-3 i omega-6, takie jak 18:2 ω -6 (kwas linolowy), 18:3 ω -3 (kwas α -linolenowy), 20:4 ω -6 (kwas arachidonowy) i C22:6 ω -3 (kwas dokozaheksaenowy).

Różnice w składzie kwasów tłuszczowych między tymi grupami bakterii wynikają z kilku czynników. Po pierwsze, bakterie LAB i DFI żyją w różnych środowiskach, co wpływa na ich adaptację metaboliczną. Po drugie, różnice te mogą być związane z funkcjami, jakie pełnią te bakterie - LAB są zazwyczaj korzystne dla zdrowia, podczas gdy bakterie DFI są patogenne. Bakterie LAB, jako organizmy probiotyczne, charakteryzują się zdolnością do produkcji kwasu mlekowego i innych metabolitów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, co znajduje odzwierciedlenie w ich profilu lipidowym. Co więcej, badania przeprowadzone przez nasz zespół wykazały, że dodanie *L. paracasei*, może modulować profil kwasów tłuszczowych w produktach mlecznych, zwiększając stosunek kwasów nienasyconych (ang. *unsaturated fatty acids*, UFA) do nasyconych (ang. *saturated fatty acids*, SFA), co może prowadzić do produkcji zdrowszych produktów, takich jak masło o lepszych właściwościach prozdrowotnych (Złoch i wsp., 2022). LAB wykazują szereg korzystnych efektów zdrowotnych, w tym modulację mikroflory jelitowej, potencjalne działanie przeciwolesterolowe i przeciwytyłościowe, oraz zdolność do syntezy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *short chain fatty acids*, SCFA). Z kolei bakterie DFI, będące patogenami, wykształciły specyficzne struktury lipidowe umożliwiające im przetrwanie w trudnych warunkach środowiska gospodarza i unikanie jego mechanizmów obronnych (Złoch i wsp., 2023). Ponadto, różnice w składzie kwasów tłuszczowych mogą wpływać na interakcje tych bakterii z układem odpornościowym człowieka - lipidy bakterii LAB mogą stymulować korzystne odpowiedzi immunologiczne, podczas gdy lipidy bakterii DFI często przyczyniają się do rozwoju stanu zapalnego i patogenezы infekcji. Patogenne bakterie wykształciły skomplikowane mechanizmy umożliwiające im manipulowanie lipidami komórkowymi gospodarza w celu ułatwienia inwazji, replikacji i unikania odpowiedzi immunologicznej (D'Avila i wsp., 2024). Lipidy, szczególnie te wchodzące w skład hydrofobowego metabolomu, stanowią atrakcyjne cele dla patogenów, które wykorzystują je do modulowania procesów komórkowych gospodarza. Manipulacja metabolizmem lipidów przez patogeny zwiększa ich zdolność do przeżycia i rozmnażania się w organizmie gospodarza, co podkreśla znaczenie badań lipidomicznych w zrozumieniu patogenezы infekcji (van der Meer-Janssen i wsp., 2010). Przeprowadzone badania wykazały również znaczną zmienność fenotypową w obrębie poszczególnych szczepów bakterii. Na przykład, w przypadku szczepu *E. coli* wyizolowanego od dwóch różnych pacjentów ze schorzeniem DFI, zidentyfikowano dwa różne potencjalne biomarkery lipidowe: TAG 20:2_20:2_21:2 i PG 16:0_15:0. Podobnie, szczep *C. striatum* wyizolowany od dwóch pacjentów wykazywał różnice w składzie kwasów tłuszczowych głównie w klasie kardiolipin: CLP 16:0_18:1_16:1_17:0, CLP 16:1_18:1_17:0_18:0, CLP 16:1_18:1_18:0_18:0, CLP 22:0_22:0_22:0_21:1 (DFI-2) i CLP 18:0_18:0_18:0_18:0, CLP 18:1_19:1_18:1_19:1, CLP 18:1_19:1_18:1_19:0, CLP 20:1_21:0_21:0_21:0 (DFI-5). W przypadku bakterii *P. vulgaris* (DFI-5) zidentyfikowano unikalne cząsteczki lipidowe, takie jak: PE 12:0_12:0, PE 16:1_16:1, PG 16:1_15:0, które mogą potencjalnie służyć jako biomarkery DFI związanej z tym konkretnym patogenem. Ta zmienność

fenotypowa jest wynikiem wysokiej plastyczności bakterii i ich zdolności do adaptacji do różnych warunków środowiskowych. Czynniki takie jak temperatura, ciśnienie, pH i dostępność składników odżywczych mogą wpływać na skład lipidów błonowych bakterii. Co zostało udowodnione w badaniach przeprowadzonych ramach pracy związanej charakterystyką bakterii LAB wyizolowanych z serwatki (Walczak-Skierska i wsp., 2022). Różnorodność lipidów bakteryjnych jest imponująca. W badaniach zidentyfikowano szeroki zakres klas lipidów, w tym fosfolipidy (PG, PE, PI, PC), triacyloglicerole i ceramidy. Na przykład, fosfatydyloetanolamina odgrywa rolę w architekturze błony i mobilności bakterii, a fosfatydylocholina jest kluczowa dla interakcji symbiotycznych i odporności na metale ciężkie.

W ramach moich badań nad identyfikacją i porównaniem bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, dokonałam szczegółowej analizy lipidomu tych mikroorganizmów. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowałam, że bakterie Gram-ujemne zawierają znacznie więcej fosfatydyloetanolaminy w porównaniu do bakterii Gram-dodatnich. Na przykład, w *E. coli* (bakteria Gram-ujemna) PE stanowiło 48% składu błony, podczas gdy w *S. aureus* (bakteria Gram-dodatnia) PE w ogóle nie występowało. Z kolei bakterie Gram-dodatnie charakteryzowały się większą zawartością fosfatydyloglicerolu i kardiolipiny. W *S. aureus* PG stanowiło 45% składu błony, a CLP 23%, podczas gdy w *E. coli* PG stanowiło tylko 4%, a CLP 28%. Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich jest gruba i składa się głównie z peptydoglikanu (mureiny) połączonego z kwasem teichojowym lub polimerem glicerolu, który jest składnikiem fosfatydyloglicerolu. Mureina może również łączyć się z białkami, tworząc wielowarstwową strukturę. W przeciwieństwie do tego, bakterie Gram-ujemne posiadają cieńszą warstwę peptydoglikanu, ale mają dodatkową zewnętrzną błonę komórkową. Ta zewnętrzna błona składa się z białek i lipopolisacharydu (LPS). LPS składa się z lipidu A, części rdzeniowej i łańcucha polisacharydowego (nazywanego antygenem O). Lipid A zawiera rdzeń cukrowy składający się z dwóch cząsteczek glukozaminy. Do jednego końca tego disacharydu przyłączona jest arabinoza, a do drugiego reszty fosforanowe i etanoloamina (która jest częścią fosfatydyloetanolaminy). Nowym odkryciem w badaniach lipidomicznych jest stwierdzenie, że różnice w składzie lipidów, zwłaszcza fosfatydyloetanolamin, mogą służyć jako potencjalne biomarkery do identyfikacji rodzaju Gram bakterii obecnych w próbce [H3].

W celu identyfikacji potencjalnych biomarkerów lipidowych specyficznych dla poszczególnych gatunków bakterii, przeprowadziłam wielowymiarową analizę statystyczną uzyskanych danych. Wykorzystując wykresy pudełkowe, wykazałam statystycznie istotne różnice między bakteriami Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi. Zgodnie z oczekiwaniami, bakterie Gram-ujemne charakteryzowały się znacznie wyższą zawartością kilku gatunków PE. Cząsteczki PE 16:1_17:0 i PE p18:1_20:1 okazały się najbardziej unikalnymi gatunkami lipidów różnicującymi te dwie grupy bakterii, co pozwala uznać je za molekularne wskaźniki charakterystyczne dla bakterii Gram-ujemnych. Z kolei cząsteczka TAG 18:0_20:1_20:2 wykazała znacznie większe odpowiedzi dla bakterii Gram-dodatnich (Rys. 2).



Rys. 2. Wykresy pudełkowe przedstawiające statystycznie istotne zmiany intensywności lipidów dla bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. PG – fosfatydyloglicerole, PE – fosfatydyloetanolamina, TAG – trójglicerydy.

Stosując metodę Benjamini-Hochberga do korekcji wielokrotnych porównań, udało się przeprowadzić statystyczne porównanie składu lipidów, biorąc pod uwagę pojedynczy gatunek szczepu bakteryjnego, w porównaniu do wszystkich pozostałych. W próbkach z zakażeniami stopy cukrzycowej najczęściej wykrywanymi gatunkami bakterii były: *E. faecalis* (10 próbek, 25,6%), *S. aureus* (7 próbek, 17,9%), *E. coli* (3 próbki, 7,7%), *C. striatum* (3 próbki, 7,7%) oraz *P. mirabilis* (3 próbki, 7,7%). Przeprowadzona analiza statystyczna ujawniła, że gatunki *E. coli* charakteryzowały się głównie większym stężeniem kilku wariantów cząsteczek PE, a także wyraźną obecnością TAG 20:2_20:2_21:2 i PG 16:0_15:0. Inna bakteria Gram-ujemna, *P. mirabilis*, również wykazywała podwyższone poziomy pochodnej PE (PE 18:3_20:4); dodatkowo w ich składzie lipidowym różnicowało się CLP 16:1_16:1_16:1_16:1. Szczepy *S. aureus* wyróżniały się zwiększonymi poziomami PG; natomiast *E. faecalis* wykazywały znacznie zwiększone stężenia wariantów TAG w składzie lipidowym. W końcu, skład lipidowy *C. striatum* był głównie oznaczony obecnością unikalnych gatunków CLP. Ponadto dla tych bakterii inne zróżnicowane lipidy obejmowały podwyższone pochodne TAG (TAG 16:0_19:1_20:1 – obecne wyłącznie w tych gatunkach – oraz TAG 20:2_20:2_21:1), a także PG 18:0_19:0.

Wykorzystanie wysokorozdzielczego spektrometru TOF oraz techniki MS/MS umożliwiło mi dokładną identyfikację lipidów komórkowych bakterii, w tym określenie długości podstawników acylowych, liczby wiązań podwójnych oraz identyfikację polarnej „głowy” fosfolipidowej (poprzez znajomość charakterystycznych fragmentów pochodzących od konkretnych klas lipidów). Na podstawie tych badań stworzyłam bibliotekę widm referencyjnych bakterii, co stanowi istotne osiągnięcie naukowe. Zgromadziłam kompleksowe dane o profilach lipidowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, wykazujących właściwości probiotyczne i patogeniczne, w tym szczepów dotychczas niescharakteryzowanych pod kątem lipidomicznym. Zidentyfikowałam charakterystyczne markery lipidowe dla poszczególnych gatunków bakterii, co może znaleźć zastosowanie w ich szybkiej identyfikacji oraz umożliwić selekcję potencjalnych biomarkerów specyficznych dla mikroorganizmów w bezpośredniej detekcji w próbkach klinicznych czy w różnicowaniu na poziomie podgatunku. Dodatkowo, moje podejście do wykorzystania techniki MALDI w budowaniu baz danych lipidowych jest zgodne z aktualnymi trendami naukowymi i może przyczynić się do dalszego rozwoju lipidomiki. Opracowane biblioteki

referencyjne stanowią cenne źródło informacji, które mogą być wykorzystane do identyfikacji gatunków oraz różnicowania szczepów w kontekście badań klinicznych.

Metabolomika to zaawansowana dziedzina biologii systemowej, koncentrująca się na kompleksowym badaniu metabolitów obecnych w organizmach żywych. Profil metaboliczny może ulegać zmianom w zależności od kondycji fizjologicznej, etapu rozwojowego lub występowania nieprawidłowości w funkcjonowaniu struktur biologicznych - od pojedynczych komórek po całe organizmy (Yang i wsp., 2019; Smith i wsp., 2018). Badania w dziedzinie metabolomiki umożliwiają ocenę składu próbek biologicznych zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym, pozwalając na odkrywanie powiązań między charakterystyką metaboliczną a konkretnymi stanami zdrowotnymi lub chorobowymi. Metabolom obejmuje szerokie spektrum niskocząsteczkowych związków, których masa cząsteczkowa zwykle mieści się w przedziale od 80 do 1500 daltonów. Ta różnorodna grupa zawiera m.in. cukry, tłuszcze, aminokwasy, krótkie peptydy, składniki mineralne, aminy biogenne, nukleotydy, kwasy organiczne, witaminy oraz hormony (Qiu i wsp., 2023).

W kontekście badań nad światem roślin, na szczególną uwagę zasługują flawonoidy - grupa wtórnych metabolitów powszechnie występujących w roślinach jadalnych, takich jak warzywa, owoce, zboża czy herbata. Te związki pełnią kluczowe funkcje w licznych procesach biologicznych roślin oraz w ich reakcjach na bodźce środowiskowe. Flawonoidy wpływają na procesy wzrostu i rozwoju roślin, a także zwiększają ich odporność na różnorodne czynniki stresowe, zarówno biotyczne, jak i abiotyczne. Co więcej, flawonoidy wykazują potencjalne korzyści zdrowotne dla ludzi, w tym działanie antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, regulujące poziom cholesterolu oraz antybakteryjne (Zhuang i wsp., 2023). Te właściwości czynią je obiektem intensywnych badań w kontekście profilaktyki i terapii różnych schorzeń.

W ramach mojego osiągnięcia naukowego, opracowałam celowaną analizę metabolomiczną, którą szczegółowo opisałam w publikacjach **H1**, **H2** i **H4**. W badaniach tych zastosowałam wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (HPLC/MS-MS) do identyfikacji i kwantyfikacji związków niskocząsteczkowych (witamin, laktozy i kwasu mlekowego) oraz metabolitów wtórnych w roślinach (flawonoidy i kwasy polifenolowe). Analiza celowana koncentrowała się na identyfikacji określonych metabolitów o znanym znaczeniu biologicznym. W opracowanej przeze mnie metodzie, HPLC służy do wstępnego rozdziału związków w próbce, po czym rozdzielone anality są wprowadzane do spektrometru mas, którym jest najczęściej potrójny kwadrupol (ang. *triple quadrupole*, QQQ). Zastosowałam jonizację metodą elektrorozpylania (ESI), która jest łagodną techniką pozwalającą na analizę nietrwałych związków bez ich fragmentacji, szczególnie skuteczną dla polarnych cząsteczek takich jak flawonoidy i kwasy fenolowe. W analizie celowanej kluczowym trybem pracy jest monitorowanie reakcji wielokrotnych (ang. *multiple reaction monitoring*, MRM) oraz monitorowania wybranych jonów (ang. *selected ion monitoring*, SIM). W tym trybie pierwszy kwadrupol (Q1) wybiera jon macierzysty (ang. *precursor ion*) o określonym stosunku masy do ładunku (m/z), drugi kwadrupol (Q2) służy jako komora kolizyjna, gdzie zachodzi fragmentacja jonu macierzystego, a trzeci kwadrupol (Q3) monitoruje

specyficzne jony potomne (ang. *product ion*). Ta technika zapewnia wysoką czułość i selektywność, umożliwiając precyzyjną identyfikację i kwantyfikację związków bioaktywnych nawet w złożonych matrycach biologicznych. Optymalizacja parametrów fragmentacji w komorze kolizji, zachodzi poprzez dysocjacje jonów indukowanych z cząsteczkami gazu obojętnego, zwanych jako dysocjacja indukowana zderzeniami (ang. *collision-induced dissociation*, CID) ma kluczowe znaczenie w analizie związków niskocząsteczkowych. Energia kolizji jest dobierana indywidualnie dla każdego związku, aby uzyskać charakterystyczne i powtarzalne widma fragmentacyjne. Dla flawonoidów typowe przejścia MRM obejmują utratę cząsteczek cukrów lub charakterystyczne fragmenty aglikonu (Yan i wsp., 2014). Identyfikację związków oparłam na specyficznych przejściach prekursor/produkt (tranzycjach) dla każdego metabolitu, w połączeniu ze znanym czasem retencji chromatograficznej (Roberts i wsp., 2012). Kwantyfikację przeprowadziłam poprzez porównanie intensywności sygnału analitu z sygnałem wewnętrznego standardu o znanym stężeniu.

W publikacji **H1** opracowałam celowaną analizę metabolomiczną z wykorzystaniem HPLC/MS-MS do identyfikacji i kwantyfikacji witamin z grupy B, laktozy i kwasu mlekowego określając zdolność szczepów bakteryjnych LAB do syntezy tych związków. Badania te miały na celu kompleksową charakterystykę profilu metabolicznego wybranych szczepów LAB (*Lactococcus lactis* i *Weissella cibaria*) wyizolowanych z fermentowanych buraków, pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako kultury startowe w przemyśle mleczarskim. Wybór witamin B (B2 - ryboflawiny, B3 - niacyny, B9 - kwasu foliowego), laktozy i kwasu mlekowego do analizy był podyktowany kilkoma istotnymi czynnikami. Witaminy z grupy B są kluczowe dla utrzymania homeostazy organizmu i odgrywają główną rolę w procesach metabolicznych, takich jak produkcja energii i tworzenie czerwonych krwinek. Są one łatwo usuwane lub niszczone podczas przetwarzania żywności, dlatego wykorzystanie bakterii do ich biosyntezy in situ stanowi dodatkową korzyść dla konsumentów (Hanna i wsp., 2022). Rosnący popyt na produkty zawierające składniki funkcjonalne o korzyściach zdrowotnych skłania do poszukiwania szczepów LAB zdolnych do wytwarzania lub zwiększania zawartości tych korzystnych związków w żywności. Kwas mlekowy, jako substancja o właściwościach konserwujących, jest istotnym produktem metabolizmu bakterii LAB, wpływającym na jakość i trwałość produktów fermentowanych (Santacroce i wsp., 2019). Laktoza, jako główny cukier mleka, jest kluczowym substratem dla bakterii LAB w produktach mlecznych, a jej metabolizm wpływa na właściwości organoleptyczne i funkcjonalne produktów. Wzbogacenie produktów mlecznych, takich jak sery, w witaminy z grupy B poprzez biosyntezę mikroorganizmów stanowi innowacyjne podejście, nieobecne dotychczas na rynku, co może znacząco zwiększyć wartość odżywczą produktów (LeBlanc i wsp., 2011).

W pierwszym etapie badań opracowałam i zoptymalizowałam metodę HPLC/MS-MS umożliwiającą jednoczesną analizę witamin B2, B3, B9, laktozy oraz kwasu mlekowego. Kluczowym elementem było dobranie odpowiednich warunków chromatograficznych i parametrów detekcji MS/MS dla każdego z badanych związków. Opracowana metoda umożliwiła jednoczesną analizę ilościową witamin B2, B3, B9, laktozy i kwasu mlekowego w próbkach bakteryjnych z wysoką czułością i selektywnością. Opracowana metoda ma kluczowe znaczenie dla funkcjonalizacji i wdrożeń m.in. w przemyśle

spożywczym. Umożliwia ona precyzyjną kontrolę jakości produktów, optymalizację procesów fermentacyjnych oraz rozwój nowych funkcjonalnych produktów mleczarskich o zwiększonej zawartości witamin. Ponadto, wspiera badania nad kulturami starterowymi, pozwalając na dokładną charakterystykę metaboliczną różnych szczepów bakterii kwasu mlekowego, co jest niezbędne przy wyborze odpowiednich kultur dla konkretnych zastosowań w przemyśle. Wysoka czułość i selektywność metody przyczynia się również do zapewnienia bezpieczeństwa żywności poprzez umożliwienie wykrycia ewentualnych nieprawidłowości w procesie produkcji lub przechowywania (Granato i wsp., 2020).

W kolejnym etapie badań opracowana metoda została wykorzystana do analizy profili metabolicznych szczepów *L. lactis* i *W. cibaria* hodowanych w różnych warunkach. Badałam wpływ temperatury (20°C i 30°C) oraz składu podłoża (MRS, TSB, M17, LAPTg) na produkcję witamin, laktozy i kwasu mlekowego. Wyniki badań wykazały istotne różnice w profilach metabolicznych między badanymi szczepami. *L. lactis* charakteryzował się wyższą zdolnością do syntezy witamin B2 i B3, podczas gdy *W. cibaria* produkowała więcej kwasu mlekowego. Jest to związane z różnicami w ścieżkach metabolicznych tych bakterii oraz heterofermentacyjnym metabolizmem *L. lactis*, który obejmuje produkcję dodatkowych metabolitów, takich jak etanol i CO₂. Ponadto, zaobserwowałam, że temperatura 30°C sprzyjała wyższej produkcji witamin i kwasu mlekowego w porównaniu do 20°C. Wyższa temperatura sprzyjała intensywniejszemu metabolizmowi bakterii, co prowadziło do zwiększonej syntezy metabolitów. Podłoże MRS okazało się najbardziej korzystne dla produkcji analizowanych związków przez oba szczepy. MRS zawiera bogaty zestaw składników odżywczych, takich jak pepton, ekstrakt drożdżowy i glukoza, które wspierają wzrost i metabolizm bakterii LAB (Leroy i De Vuyst, 2001). W porównaniu do innych podłoży, MRS zapewnia optymalne warunki do syntezy witamin i kwasu mlekowego, co przekłada się na wyższą wydajność produkcji tych metabolitów. Analiza zmian stężenia laktozy w czasie hodowli wykazała jej stopniowy spadek, który korelował ze wzrostem produkcji kwasu mlekowego. Obserwacja ta potwierdza zdolność badanych szczepów do efektywnej fermentacji laktozy.

W publikacji **H4** skoncentrowałam się na badaniu wpływu kadmu (Cd) i krzemu (Si) na profil polifenoli i flawonoidów w grochu (*Pisum sativum* L.) uprawianym w warunkach hydroponicznych. Przeprowadziłam kompleksową analizę metabolomiczną różnych części morfologicznych grochu, obejmującą pędy, korzenie i strąki. Rośliny poddałam różnym warunkom suplementacji krzemem (1 mM i 2 mM Si) oraz ekspozycji na kadm (50 µM Cd, 1 mM Si i 50 µM Cd, oraz 2 mM Si i 50 µM Cd). Ekstrakty z grochu uzyskano przy użyciu trzech różnych metod ekstrakcji: przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikami (ang. *accelerated solvent extraction*, ASE), ekstrakcji płynem nadkrytycznym (ang. *supercritical fluid extraction*, SFE) i tradycyjnej maceracji (ang. *maceration*, MAC). Ekstrakcje przeprowadzono dla trzech upraw grochu w różnych warunkach pH (4.0, 5.0 i 6.0). Wykorzystując celowane podejście profilowania metabolitów HPLC/MS, zidentyfikowałam 15 metabolitów, w tym 9 flawonoidów i 6 kwasów fenolowych. Do analizy chromatograficznej wykorzystałam kolumnę Kinetex F5, której mechanizm separacji opiera się na kombinacji oddziaływań hydrofobowych, polarnych i π - π , co czyni

ją szczególnie skuteczną w rozdzielaniu związków aromatycznych, takich jak flawonoidy i kwasy fenolowe. Kluczowym elementem analizy była technika monitorowania reakcji wielokrotnych (MRM), zapewniająca wysoką czułość i selektywność. Do jonizacji flawonoidów zastosowałam elektrorozpylanie (ESI), które jest łagodną techniką jonizacji pozwalającą na analizę nietrwałych związków bez ich nadmiernej fragmentacji. Flawonoidy zazwyczaj jonizowały w trybie ujemnym, tworząc jony $[M-H]^-$, choć w niektórych przypadkach obserwowałam również jonizację w trybie dodatnim $[M+H]^+$. Typowe przejścia MRM dla flawonoidów obejmowały utratę cząsteczek cukrów (np. -162 Da dla heksozy), charakterystyczne fragmenty aglikonu (np. -15 Da dla grupy metylowej) oraz rozpad pierścienia C (np. -152 Da dla fragmentu RDA) (Cuyckens i Claeys, 2004). W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowałam, że najwyższą liczbę związków bioaktywnych można zidentyfikować przy pH 5 i 6, podczas gdy najmniejszą przy pH 4. W korzeniu grochu zidentyfikowałam obecność 14 związków bioaktywnych, w tym 9 flawonoidów i 5 kwasów fenolowych. Zaobserwowałam, że suplementacja krzemem miała znaczący wpływ na zawartość specyficznych związków bioaktywnych, powodując zmniejszenie poziomu niektórych związków (np. flawonu, kwasu ferulowego) i zwiększenie innych (np. kwasu chlorogenowego, hesperydyny). W pędzie grochu zidentyfikowałam również 14 związków bioaktywnych. Badania wykazały, że suplementacja krzemem zwiększyła stężenie wielu z tych związków, ale miała hamujący wpływ na zawartość kwasu salicylowego. Istotnym wynikiem moich badań było wykazanie, że ekspozycja na kadm znacząco wpływa na profil metaboliczny grochu, zmieniając zawartość poszczególnych polifenoli i flawonoidów. Co ważne, zaobserwowałam, że suplementacja krzemem łagodzi negatywne skutki kadmu, wpływając na akumulację i dystrybucję związków bioaktywnych w roślinach. Wyniki analizy metabolomicznej przyczyniły się do identyfikacji znacznej akumulacji metabolitów odgrywających kluczową rolę we wzroście, utrzymaniu i rozwoju roślin w niekorzystnych warunkach stresu abiotycznego. Zidentyfikowałam flawon, hesperydynę, kwas chlorogenowy, kwas ferulowy i kwercetynę jako metabolity, których stężenie wzrasta w odpowiedzi na Si, przyczyniając się do łagodzenia negatywnego wpływu stresorów abiotycznych na rośliny. Badania wykazały, że obecność i ilość zidentyfikowanych związków bioaktywnych różniła się między różnymi częściami rośliny, zarówno w grupie suplementowanej krzemem, jak i w grupie kontrolnej. Różnice te wynikają głównie z procesów metabolizmu wtórnego, akumulacji węgla podczas fotosyntezy, metabolizmu fenyloalaniny i aminokwasów. W korzeniach zaobserwowano, że różnice metabolomiczne są wynikiem metabolizmu puryn, aminokwasów i biosyntezy metabolitów wtórnych. Badania metabolomiczne pozwoliły lepiej zrozumieć, jak różne części rośliny reagują na suplementację Si, co wpływa na rodzaj i ilość obecnych w nich związków bioaktywnych, odgrywających istotną rolę w funkcjonowaniu rośliny i jej zdolności do adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych. Wyniki tych badań mogą mieć zastosowanie w przemyśle rolniczym. Formułacja ukierunkowanych strategii optymalizacji suplementacji Si może przyczynić się do zrównoważonych praktyk rolniczych, minimalizując akumulację metali ciężkich w uprawach i poprawiając jakość plonów. Zrozumienie mechanizmów, poprzez które krzem wpływa na produkcję związków bioaktywnych, jest kluczowe dla zapewnienia bezpieczeństwa i jakości systemów

produkcji żywności. Dalsze badania w tym kierunku powinny stanowić podstawę dla przyszłych innowacji w rolnictwie, mających na celu zwiększenie wydajności upraw przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości i bezpieczeństwa żywności.

W publikacji **H4** przeprowadziłam również porównanie efektywności różnych metod ekstrakcji związków bioaktywnych z materiału roślinnego, w tym przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem (ASE), ekstrakcji płynem nadkrytycznym (SFE) i tradycyjnej maceracji. Badania przeprowadziłam na różnych częściach morfologicznych grochu (*Pisum sativum* L.), poddanych suplementacji krzemem (Si) oraz ekspozycji na kadm (Cd). Ekstrakcje wykonano w trzech różnych warunkach pH (4.0, 5.0 i 6.0), co pozwoliło na kompleksowe profilowanie metabolomiczne grochu.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że wybór metody ekstrakcji ma kluczowe znaczenie dla jakościowego i ilościowego składu izolowanych związków fenolowych. Tradycyjna maceracja, polegająca na moczeniu próbek w 96% metanolu przez 24 godziny w ciemności i temperaturze pokojowej, okazała się najmniej efektywna spośród badanych metod. Wykazała ona najniższą zawartość związków bioaktywnych zarówno przy pH 5, jak i 6, szczególnie w przypadku kwasu chlorogenowego. Niska efektywność procesu maceracji wynika z różnych czynników, takich jak skład chemiczny ekstrahowanych związków fenolowych, liczba i pozycja grup hydroksylowych, wielkość cząsteczek oraz interakcje z innymi składnikami żywności. Ponadto, proces maceracji jest czasochłonny i wymaga znacznego nakładu pracy, a użycie dużej ilości rozpuszczalników organicznych może być toksyczne i może pozostawiać śladowe ilości w ekstraktach.

W porównaniu do maceracji, ekstrakcja płynem nadkrytycznym (SFE) wykazała znacznie lepsze rezultaty dla kwasu chlorogenowego i kwasu salicylowego. Metoda ta pozwoliła na uzyskanie wyższych stężeń tych związków w porównaniu do maceracji. Efektywność SFE wynika z unikalnych właściwości płynów nadkrytycznych, które łączą cechy gazów i cieczy, umożliwiając lepszą penetrację materiału roślinnego i efektywniejsze rozpuszczanie związków bioaktywnych.

Interesujące wyniki uzyskałam również stosując przyspieszoną ekstrakcję rozpuszczalnikiem (ASE). Metoda ta okazała się szczególnie skuteczna w ekstrakcji flawonoidów, zwłaszcza w przypadku roślin uprawianych przy pH 5 i poddanych działaniu kadmu oraz suplementacji krzemem, jak również polifenoli, szczególnie tych o wyższej polarności. ASE charakteryzuje się wysoką efektywnością dzięki zastosowaniu podwyższonej temperatury i ciśnienia, co zwiększa rozpuszczalność związków bioaktywnych i przyspiesza proces ekstrakcji. Ponadto, ASE jest mniej czasochłonna i wymaga mniejszej ilości rozpuszczalników w porównaniu do tradycyjnych metod.

W publikacji **H2** rozszerzyłam badania o ocenę wpływu enzymatycznej hydrolizy na efektywność ekstrakcji związków bioaktywnych z materiału roślinnego, ze szczególnym uwzględnieniem *Medicago sativa* (lucerny). Ekstrakcja enzymatyczna (ang. *enzyme-assisted extraction*, EAE), którą zastosowano, jest zaawansowaną techniką mającą na celu zwiększenie efektywności pozyskiwania związków bioaktywnych z materiału roślinnego. Metoda ta wykorzystuje enzymy do hydrolizy poszczególnych składników ścian komórkowych roślin, co prowadzi do poprawy wydajności ekstrakcji. Ściany komórkowe roślin mają złożoną strukturę składającą się z wielu różnych polimerów, takich jak

celuloza, pektyny i białka. Zastosowanie enzymów powoduje zmiany w tych komponentach, co wpływa na porowatość ściany komórkowej oraz rodzaj i ilość grup funkcyjnych, które mogą wchodzić w interakcje z analitami i rozpuszczalnikami (Nadar i wsp., 2018).

Kluczowym elementem przeprowadzonego badania było porównanie skuteczności wybranych enzymów i preparatów enzymatycznych w ekstrakcji związków bioaktywnych z lucerny. Zastosowano różne enzymy, w tym pektynazę, celulazę, Viscozyme L, proteazę i kemzym, aby ocenić ich wpływ na wydajność ekstrakcji fenolokwasów i flawonoidów. Wykorzystując technikę HPLC/MS-MS, przeprowadziłam szczegółową analizę ilościową i jakościową ekstraktów. Wyniki moich badań wykazały, że enzymatyczna hydroliza znacząco zwiększa wydajność ekstrakcji związków bioaktywnych. Dla wszystkich zastosowanych enzymów poziom związków bioaktywnych był wyższy niż w ekstrakcie kontrolnym. Najskuteczniejszym enzymem okazała się pektynaza, która pozwoliła na ponad trzykrotne zwiększenie sumarycznej zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów. Zaobserwowano, że ekstrakty lucerny uzyskane po obróbce pektynazą były bogate w apigeninę, kwas salicylowy i ferulowy - związki szczególnie ważne dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego. Ponadto, zaobserwowano znaczące zmiany w profilu metabolicznym ekstraktów przed i po hydrolizie enzymatycznej. Udowodniłam, że proces ten prowadzi do uwalniania związków związanych z matrycą roślinną, w tym form rozpuszczalnych fenolokwasów i flawonoidów z ich form nierozpuszczalnych. Na przykład, poziom rozpuszczalnej formy kwercetyny wzrósł z 24,1 mg/100 g suchej masy do 312,8 mg/100 g suchej masy, podczas gdy poziom formy związanej nierozpuszczalnej spadł poniżej granicy wykrywalności. Przeprowadzone badania przyczyniły się do lepszego zrozumienia mechanizmów uwalniania związków bioaktywnych z matrycy roślinnej pod wpływem obróbki enzymatycznej. Wykazałam, że enzymatyczna hydroliza nie tylko zwiększa wydajność ekstrakcji, ale także prowadzi do zmian jakościowych w profilu metabolicznym, uwalniając związki wcześniej niedostępne w formie rozpuszczalnej.

W ramach mojego osiągnięcia naukowego, przedstawionego w publikacjach **H5** i **H6**, przeprowadziłam kompleksowe badania nad optymalizacją warunków separacji chromatograficznej (HPLC-DAD) dla analizy białek oraz zoptymalizowałam metodę chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC-MS) do kompleksowej analizy profilu kwasów tłuszczowych w produktach mlecznych. Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem diodowym (HPLC-DAD) jest techniką analityczną, którą zastosowałam do rozdzielania, identyfikacji i ilościowego oznaczania związków chemicznych w złożonych mieszaninach. W przypadku celowanej analizy metabolomicznej, metoda ta pozwoliła mi na selektywne wykrywanie i kwantyfikację określonych metabolitów lub grup związków bioaktywnych. Białka są kluczowymi składnikami odżywczymi i funkcjonalnymi w żywności, szczególnie w produktach mlecznych. W mleku krowim główne frakcje białkowe to kazeiny (α 1-, α 2-, β - i κ -kazeina) oraz białka serwatkowe (β -laktoglobulina, α -laktoalbumina). Białka są kluczowymi składnikami odżywczymi i funkcjonalnymi w żywności, szczególnie w produktach mlecznych (Miciński i wsp., 2013). Białka mleka pełnią różnorodne funkcje

biologiczne, w tym wspomaganie układu odpornościowego, działanie przeciwbakteryjne oraz regulację procesów fizjologicznych (Rizzoli, 2022). Analiza profilu białkowego mleka jest istotna dla oceny jego jakości, wartości odżywczej oraz monitorowania zmian zachodzących podczas przetwarzania i przechowywania. Kwasy tłuszczowe w mleku pełnią kluczowe role zarówno pod względem żywieniowym, jak i funkcjonalnym. Są one głównym źródłem energii, wpływają na teksturę i smak produktów mlecznych, a także wykazują właściwości bioaktywne (Hanusz i wsp., 2018). Na przykład, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe mają działanie przeciwzapalne i wspierają zdrowie jelit, podczas gdy sprzężony kwas linolowy (ang. *conjugated linoleic acid*, CLA) wykazuje potencjalne działanie przeciwnowotworowe i wspomaga redukcję tkanki tłuszczowej.

W publikacji **H5** skoncentrowałam się na analizie zmian profilu białkowego i kwasów tłuszczowych w mleku podczas przechowywania w warunkach chłodniczych. Główne osiągnięcia naukowe w tym zakresie obejmowały: i) opracowanie zoptymalizowanej metody ekstrakcji białek z mleka, wykorzystującej ultrawirowanie i precypitację acetonem; ii) Optymalizacja warunków separacji chromatograficznej RP-HPLC z detekcją UV przy 214 nm, używając kolumny Zorbax 300SB-C8 i gradientowej elucji z fazą ruchomą składającą się z 0,1% TFA w wodzie i acetonitrylu; iii) Identyfikacja i monitorowanie zmian w profilu 38 różnych kwasów tłuszczowych w mleku podczas przechowywania.

Wyniki moich badań wykazały, że podczas przechowywania mleka w warunkach chłodniczych zachodzą istotne zmiany w profilu białkowym i składzie kwasów tłuszczowych. Zaobserwowałam stopniowy spadek liczby wykrywanych kwasów tłuszczowych oraz zmianę proporcji między kwasami nasyconymi i nienasyconymi. W przypadku białek, zauważyłam zmiany w relatywnych proporcjach poszczególnych frakcji białkowych, co może być związane z procesami proteolitycznymi zachodzącymi podczas przechowywania. Te odkrycia mają znaczące implikacje dla oceny jakości i trwałości produktów mlecznych.

Opracowana przeze mnie metoda oznaczania białek z mleka za pomocą HPLC poprzez zastosowanie ultrawierwienia i precypitacji acetonem, pozwala na skuteczniejsze wydzielenie białek z próbek mleka. Dodatkowo, zastosowanie kolumny Zorbax 300SB-C8 i gradientowej elucji z fazą ruchomą składającą się z 0,1% TFA w wodzie i acetonitrylu zapewnia wysoką czułość i selektywność analizy. Podczas przechowywania mleka zaobserwowano zmiany w zawartości głównych białek serwatkowych, takich jak β -laktoglobulina (β -LG) i α -laktoalbumina (α -LA), które wykazywały tendencję do zmniejszania się, co może być związane z tworzeniem kompleksów z κ -kazeiną lub bezpośrednim wiązaniem z kuleczkami tłuszczu. Na przykład, zawartość β -LG zmniejszyła się o 0,3950 mg/mL, a α -LA o 0,0781 mg/mL w ciągu 7 dni przechowywania. W zakresie kwasów tłuszczowych, przechowywanie mleka prowadziło do spadku liczby wykrywanych kwasów tłuszczowych z 38 do 16 po 4 dniach. Zmiany te obejmowały spadek zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak kwas palmitynowy (C16:0) i kwas elaidynowy (trans-C18:1n-9), które stanowiły znaczną część składu kwasów tłuszczowych w świeżym mleku.

W publikacji **H6** wykorzystałam metodę GC-MS do kompleksowej analizy profilu kwasów tłuszczowych w produktach mlecznych, w tym kremach, maślanie i bezwodnym

tłuszczu mlecznym (ang. *anhydrous milk fat*, AMF). Badania te miały na celu dokładną charakterystykę składu lipidowego różnych frakcji mlecznych, co jest kluczowe dla zrozumienia ich właściwości odżywczych i potencjalnego wpływu na zdrowie konsumentów. Śmietana, maślanka i bezwodny tłuszcz mleczny (AMF) są kluczowymi produktami mlecznymi o istotnym znaczeniu dla zdrowia człowieka. Śmietana jest produkowana przez mechaniczne oddzielenie frakcji tłuszczowej od surowego mleka przez wirowanie z podgrzewaniem. Jest bogata w tłuszcze, które są doskonałym źródłem energii i mają wysoką biodostępność (Chandan i wsp., 2011). Maślanka, będąca wodną fazą ekstrahowaną po ubiciu śmietany na masło, zawiera wyższy udział składników błony kuleczek tłuszczowych mleka, co czyni ją wartościowym źródłem lipidów (Gauvin i wsp., 2017). AMF, pozbawiony wody i składników rozpuszczalnych w wodzie, jest skoncentrowanym źródłem tłuszczu mlecznego, który jest łatwo przyswajalny przez organizm (Illingworth i wsp., 2009). Te produkty są ważne z punktu widzenia zdrowia człowieka głównie ze względu na zawartość kwasów tłuszczowych, które mają różnorodne właściwości prozdrowotne. Na przykład, kwas masłowy wykazuje działanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe, a sprzężony kwas linolowy (CLA) obniża poziom tkanki tłuszczowej i ma właściwości antynowotworowe.

W toku badań analiza GC-MS ujawniła obecność różnorodnych kwasów tłuszczowych, w tym kwasu palmitynowego, oleinowego, stearynowego, laurynowego i mirystynowego. Szczególną uwagę zwróciłam na różnice w składzie kwasów tłuszczowych między poszczególnymi próbkami, co może wynikać z odmiennych warunków przetwarzania i przechowywania produktów. Nowatorskim aspektem moich badań było skupienie się na analizie różnych frakcji mlecznych, w tym frakcji β -serum light, która okazała się najbogatsza zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym w porównaniu do innych próbek. Wykazałam, że frakcja ta zawierała znaczące ilości kwasów tłuszczowych obecnych również w próbce AMF, co sugeruje, że może być ona cennym źródłem tych związków. Istotnym elementem badań było wykazanie wpływu metody przechowywania produktów mlecznych na właściwości przeciwutleniające, profil kwasów tłuszczowych i utlenianie lipidów. Zaobserwowałam, że temperatura, światło i czas przechowywania mają znaczący wpływ na utrzymanie jakości tłuszczów w produktach mlecznych, a ich niewłaściwe przechowywanie może prowadzić do utleniania kwasów tłuszczowych.

Adaptacja podejść celowanych i niecelowanych w analizie MS dla kompleksowej charakterystyki składu i właściwości żywności w kontekście jej wpływu na zdrowie człowieka

W publikacji **H1** przeprowadziłam kompleksową charakterystykę profilu metabolicznego i lipidomicznego bakterii kwasu mlekowego (LAB) wyizolowanych z fermentowanych buraków, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjału probiotycznego i zastosowania jako kultury startowe w przemyśle mleczarskim. Badania te miały na celu identyfikację i ocenę właściwości szczepów LAB, które mogłyby znaleźć zastosowanie w produkcji żywności funkcjonalnej o korzystnym wpływie na zdrowie człowieka.

W toku badań wyizolowano i zidentyfikowano dwa szczepy bakterii: *Lactococcus lactis* i *Weissella cibaria*, które następnie poddałam szczegółowej analizie pod kątem ich właściwości probiotycznych i technologicznych. Kluczowe aspekty przeprowadzonych

badania obejmowały ocenę zdolności wyizolowanych szczepów do syntezy witamin z grupy B (B2, B3, B9) oraz kwasu mlekowego. Wykazałam, że badane szczepy posiadają zdolność do produkcji tych związków, co ma istotne znaczenie dla wzbogacania żywności w naturalne witaminy i substancje bioaktywne.

Szczególną uwagę poświęciłam kompleksowej analizie profili lipidowych szczepów *L. lactis* i *W. cibaria*, która pozwoliła na identyfikację unikalnych kombinacji lipidów i kwasów tłuszczowych. Zidentyfikowałam fosfolipidy, triacyloglicerole i ceramidy, których specyficzne proporcje w poszczególnych szczepach mogą przyczyniać się do korzystnych efektów zdrowotnych obserwowanych przy spożyciu kiszonek. Obecność kwasów omega-3 i omega-6 w profilach lipidowych LAB sugeruje potencjalne działanie przeciwzapalne i immunomodulacyjne tych bakterii, co może mieć pozytywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy.

Wyniki badań wskazują, że wyizolowane szczepy *L. lactis* i *W. cibaria* posiadają cechy pożądane zarówno dla kultur startowych, jak i probiotyków. Ich zdolność do syntezy witamin z grupy B może przyczynić się do poprawy wartości odżywczej produktów fermentowanych, co jest szczególnie istotne w kontekście niedoborów tych witamin w diecie. Produkcja kwasu mlekowego przez badane szczepy nie tylko wpływa na właściwości organoleptyczne i trwałość produktów, ale także może przyczyniać się do regulacji pH w jelitach, wspierając rozwój korzystnej mikroflory jelitowej.

Wykazałam, że niektóre z lipidów bakteryjnych, zwłaszcza fosfolipidy i sfingolipidy, mogą odgrywać rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej w jelitach, przyczyniając się do utrzymania homeostazy układu odpornościowego. Zidentyfikowane kwasy tłuszczowe o krótkich łańcuchach mogą służyć jako źródło energii dla komórek nabłonka jelitowego, wspierając integralność bariery jelitowej. Wykazana adaptacyjność składu lipidowego LAB do warunków środowiskowych może mieć znaczenie dla ich przeżywalności w przewodzie pokarmowym i efektywności jako probiotyków.

W kontekście jakości mleka, moje badania podkreślają znaczenie doboru odpowiednich szczepów LAB jako kultur starterowych w produkcji fermentowanych produktów mlecznych. Specyficzne profile lipidowe LAB mogą wpływać na właściwości organoleptyczne, teksturę i trwałość produktów mlecznych, a także na ich potencjał prozdrowotny. Wyizolowane szczepy LAB z fermentowanych buraków mogą stanowić cenne źródło kultur startowych i probiotyków dla przemysłu mleczarskiego. Ich zastosowanie w produkcji żywności funkcjonalnej może przyczynić się do poprawy zdrowia konsumentów poprzez wzbogacenie diety w naturalne witaminy z grupy B, wspomaganie trawienia i wchłaniania składników odżywczych, potencjalne wzmocnienie odporności organizmu oraz poprawę równowagi mikroflory jelitowej.

Celem badań w ramach publikacji **H4**, była ocena roli krzemu w łagodzeniu stresu kadmowego oraz jego wpływu na akumulację związków bioaktywnych w różnych częściach grochu, co ma istotne znaczenie dla wartości odżywczej grochu jako ważnego składnika diety człowieka. Wykorzystując HPLC-MS, zidentyfikowałam i scharakteryzowałam profil metaboliczny korzeni, pędów i strąków grochu. Badania wykazały, że suplementacja krzemem istotnie wpływa na zawartość specyficznych związków bioaktywnych w różnych częściach rośliny grochu. W korzeniach

zaobserwowałam zwiększenie zawartości kwasu chlorogenowego, hesperydyny i kwercetyny, podczas gdy w pędach suplementacja krzemem zwiększyła stężenie flawonu, kwasu chlorogenowego, kwasu ferulowego, kwasu synapinowego i kwercetyny. Co szczególnie istotne z punktu widzenia zdrowia człowieka, udało mi się wykazać, że suplementacja krzemem łagodzi negatywne skutki stresu kadmowego. W roślinach poddanych stresowi kadmowemu i suplementowanych krzemem zaobserwowałam wyższy poziom związków o właściwościach przeciwutleniających, takich jak kwas salicylowy, kwercetyna i kwas chlorogenowy, w porównaniu do roślin traktowanych samym kadmem. Ponadto, badania wykazały, że suplementacja krzemem wpływa na akumulację i dystrybucję związków bioaktywnych w różnych częściach rośliny. Zaobserwowałam, że w warunkach stresu kadmowego, rośliny suplementowane krzemem wykazywały lepszą zdolność do akumulacji korzystnych metabolitów w częściach jadalnych, co ma bezpośrednie przełożenie na wartość odżywczą grochu.

Moje badania przyczyniły się do lepszego zrozumienia mechanizmów, dzięki którym suplementacja krzemem może poprawiać wartość odżywczą grochu. Zwiększona zawartość flawonoidów i kwasów fenolowych w grochu suplementowanym krzemem może przekładać się na wyższe właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne i potencjalnie przeciwnowotworowe produktów spożywczych zawierających groch. Ponadto, wykazałam, że suplementacja krzemem może być skuteczną strategią w uprawie grochu na terenach zanieczyszczonych metalami ciężkimi, w szczególności kadmem, co ma istotne znaczenie dla bezpieczeństwa żywności. Krzem nie tylko łagodzi stres wywołany kadmem, ale również przyczynia się do zwiększenia zawartości korzystnych dla zdrowia związków bioaktywnych w roślinach grochu, jednocześnie zmniejszając akumulację toksycznego kadmu w częściach jadalnych rośliny. Wyniki tych badań mają istotne implikacje dla produkcji żywności o wysokiej wartości odżywczej i funkcjonalnej, szczególnie w kontekście rosnącego zainteresowania żywnością roślinną i jej wpływem na zdrowie człowieka.

W pracy **H5** przeprowadziłam kompleksową analizę zmian w profilu kwasów tłuszczowych i składzie białkowym mleka podczas przechowywania w warunkach chłodniczych, co ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia wpływu przechowywania na wartość odżywczą i właściwości prozdrowotne mleka. Moje badania wykazały, że w świeżym mleku występuje 38 różnych kwasów tłuszczowych, z czego 20 to nasycone, a 18 nienasycone. Główne kwasy tłuszczowe to kwas palmitynowy (28,2%) i kwas elaidynowy (20,8%). Podczas przechowywania mleka w lodówce zaobserwowałam stopniowy spadek liczby wykrywanych kwasów tłuszczowych, co może służyć jako potencjalny marker świeżości mleka. Najbardziej znaczący spadek nastąpił po 3 dniach przechowywania, gdy liczba wykrywanych kwasów tłuszczowych zmniejszyła się z 38 do 16. Istotnym odkryciem jest zmiana proporcji kwasów nasyconych do nienasyconych w czasie przechowywania, z 53:47 w świeżym mleku do 62:38 po 7 dniach. Ta zmiana ma znaczący wpływ na wartość odżywczą mleka, gdyż kwasy tłuszczowe nienasycone, szczególnie omega-3 i omega-6, są korzystne dla zdrowia sercowo-naczyniowego i funkcji poznawczych.

W kontekście białek mleka, zaobserwowałam znaczące zmiany w ich profilu podczas przechowywania. Zawartość β -laktoglobuliny, α -laktoalbuminy, albuminy surowicy bydlęcej, laktoferyny i κ -kazeiny zmniejszyła się, podczas gdy zawartość α -kazeiny wzrosła. Ogólne straty w analizowanych białkach wyniosły około 40%, co może wpływać na wartość odżywczą mleka i jego właściwości funkcjonalne. Zidentyfikowane zmiany w profilu kwasów tłuszczowych i składzie białkowym mogą służyć jako potencjalne markery świeżości mleka. Na przykład, stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych oraz poziom specyficznych białek, takich jak β -laktoglobulina czy laktoferyna, mogą być wykorzystane do oceny świeżości i jakości mleka. Ocena stabilności składników odżywczych podczas przechowywania wykazała, że kwasy tłuszczowe nienasycone są bardziej podatne na utlenianie, co może prowadzić do obniżenia wartości odżywczej mleka. Jednocześnie, względna stabilność kwasów tłuszczowych o nieparzystej liczbie atomów węgla i rozgałęzionych, pochodzących głównie od bakterii żwaczowych, może mieć pozytywny wpływ na zdrowie jelitowe konsumentów. Zmiany w profilu białkowym, w tym rozkład białek na mniejsze peptydy, mogą mieć zarówno pozytywne, jak i negatywne skutki dla zdrowia. Niektóre peptydy powstałe w wyniku proteolizy mogą wykazywać właściwości bioaktywne, takie jak działanie przeciwnadciśnieniowe czy immunomodulujące. Jednakże, nadmierna proteoliza może prowadzić do obniżenia wartości odżywczej mleka i powstawania niepożądanych smaków. Na jakość mleka wpływają różne czynniki, w tym temperatura przechowywania, ekspozycja na światło i tlen, oraz aktywność mikroorganizmów. Zanik badanych związków, szczególnie kwasów tłuszczowych nienasyconych, jest prawdopodobnie spowodowany procesami utleniania i lipolizy. Lipoliza prowadzi do uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych i trójglicerydów, co negatywnie wpływa na jakość sensoryczną produktów mlecznych, prowadząc do rozwoju niepożądanych smaków, takich jak gorzki czy zjełczały.

Schładzanie przez okres 7 dni doprowadziło do zauważalnej 47% redukcji pierwotnej różnorodności kwasów tłuszczowych i 12,5% spadku całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych. Te zmiany w składzie kwasów tłuszczowych są związane głównie z procesami utleniania, które dotyczą głównie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Konkretnie kwasy tłuszczowe mogą służyć jako wskaźniki do monitorowania świeżości mleka; na przykład kwas dekanowy wykazywał niezwykłą stabilność, wykazując silną korelację z czasem przechowywania. Mikrobiota żwacza znacząco wpływa na profil kwasów tłuszczowych mleka, przy czym ponad 30% zidentyfikowanych kwasów tłuszczowych jest prawdopodobnie syntetyzowane przez mikroorganizmy, w tym gatunki nieparzyste i/lub rozgałęzione. Kwas pentadekanowy (C15:0) i kwas heptadekanowy (C17:0) pozostały stosunkowo stabilne przez cały okres przechowywania. Po 7 dniach przechowywania zaobserwowano znaczące zmiany ilościowe w białkach serwatkowych mleka, podczas gdy zawartość niezbędnych składników odżywczych pozostała stosunkowo stała. Badane białka, w tym β -laktoglobulina (β -LG), α -laktoalbumina (α -LA), albumina surowicy bydlęcej (BSA), laktoferyna (LTF) i κ -kazeina (κ -CN), odnotowały straty wynoszące około 40%. Straty te można przypisać proliferacji bakterii psychrotroficznnych, które wytwarzają proteiny zdolne do degradacji białek.

W moich badaniach zidentyfikowałam kluczowe markery świeżości mleka podczas przechowywania. Należą do nich: wzrost stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych,

spadek liczby wykrywanych kwasów tłuszczowych z 38 do 16 po trzech dniach, zmniejszenie poziomu β -laktoglobuliny, α -laktoalbuminy i laktoferyny, stabilność kwasu dekanowego, wzrost stosunku α -kazeiny do innych białek oraz zwiększenie poziomu peptydów. Kwas dekanowy wykazał szczególną stabilność i silną korelację z czasem przechowywania. Te markery tworzą kompleksowe narzędzie do oceny świeżości mleka, potencjalnie użyteczne w przemyśle mleczarskim do kontroli jakości produktów.

Wyniki badań przedstawione w publikacji **H6** wykazały, że procesy technologiczne, takie jak homogenizacja, pasteryzacja i fermentacja, mają istotny wpływ na skład i właściwości produktów mlecznych. Badania te mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia, jak te procesy wpływają na wartość odżywczą produktów mlecznych i ich potencjalny wpływ na zdrowie konsumentów.

Wyniki moich badań wykazały, że homogenizacja i pasteryzacja znacząco wpływają na rozkład wielkości kuleczek tłuszczowych, co ma istotne znaczenie dla biodostępności kwasów tłuszczowych. Homogenizacja prowadzi do zmniejszenia wielkości kuleczek tłuszczowych, co zwiększa ich powierzchnię i ułatwia wchłanianie w organizmie. Pasteryzacja, z kolei, ma na celu eliminację patogenów, ale może również wpływać na skład lipidowy, w tym na zawartość korzystnych dla zdrowia kwasów tłuszczowych, takich jak sprzężony kwas linolowy (CLA), który wykazuje działanie przeciwnowotworowe i wspomaga redukcję tkanki tłuszczowej (Ozturk i wsp., 2024; Wang i Jones, 2004).

Fermentacja z udziałem bakterii kwasu mlekowego prowadzi do zmian w profilu kwasów tłuszczowych, co może skutkować wzrostem zawartości korzystnych dla zdrowia kwasów. Bakterie te nie tylko wpływają na smak i teksturę produktów, ale także mogą zwiększać biodostępność niektórych składników odżywczych (Widyastuti i Febrisiantosa, 2014). Dodatkowo, proces fermentacji sprzyja powstawaniu bioaktywnych peptydów, które mogą mieć działanie przeciwzapalne i immunomodulujące (González-González i wsp., 2022). W toku badań zaobserwowałam również, że warunki przechowywania, takie jak temperatura i ekspozycja na światło, mają znaczący wpływ na stabilność kwasów tłuszczowych i związków bioaktywnych. Niewłaściwe przechowywanie może prowadzić do utleniania kwasów tłuszczowych oraz degradacji witamin, co obniża wartość odżywczą produktów. Obecność bakterii o właściwościach proteolitycznych i lipolitycznych może znacząco wpływać na profil kwasów tłuszczowych poprzez hydrolizę tłuszczów i destabilizację emulsji. Te zmiany mogą mieć zarówno pozytywne, jak i negatywne skutki dla wartości odżywczej i właściwości prozdrowotnych produktów mlecznych. Podsumowując, moje badania podkreślają istotny wpływ procesów technologicznych na profil kwasów tłuszczowych i zawartość związków bioaktywnych w produktach mlecznych, co ma kluczowe znaczenie dla ich wartości odżywczej i potencjalnych korzyści zdrowotnych.

4.6. Podsumowanie i wnioski

Przedstawiony cykl publikacji stanowi kompleksowe studium zastosowania zaawansowanych technik analitycznych w badaniach metabolomicznych i lipidomicznych różnorodnych matryc biologicznych. Badania te łączą innowacyjne podejścia metodologiczne z głębokim zrozumieniem procesów biologicznych, dostarczając cennych

informacji o wpływie czynników środowiskowych na profile metaboliczne i lipidomiczne badanych organizmów.

Kluczowym aspektem prac było wykorzystanie zarówno celowanej, jak i niecelowanej analizy metabolomicznej, co pozwoliło na uzyskanie holistycznego obrazu badanych układów biologicznych. Zastosowanie technik takich jak MALDI-TOF MS, SALDI-TOF MS, HPLC-MS/MS, GC-MS oraz HPLC-DAD umożliwiło nie tylko szczegółową charakterystykę profili lipidowych bakterii, identyfikację metabolitów roślinnych oraz składników produktów mlecznych, ale także otworzyło nowe perspektywy w zrozumieniu mechanizmów adaptacyjnych organizmów do różnych warunków stresowych.

Badania te wpisują się w aktualny trend rozwoju chemii analitycznej jako dziedziny interdyscyplinarnej, łączącej zaawansowane techniki pomiarowe z praktycznymi zastosowaniami w rozwiązywaniu złożonych problemów badawczych. Szczególnie istotne jest wykorzystanie połączenia chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas, które stało się potężnym narzędziem w badaniach metabolomicznych i lipidomicznych, oferując niezrównaną czułość i selektywność w analizie złożonych matryc biologicznych.

Najważniejsze wnioski i osiągnięcia:

1. Opracowanie innowacyjnej metody charakterystyki profili lipidowych bakterii z wykorzystaniem technik LDI-TOF MS:

Po raz pierwszy opracowałam metodę niecelowanej analizy lipidomicznej z wykorzystaniem techniki SALDI-TOF MS z nanocząsteczkami srebra oraz MALDI-TOF MS. Ta metoda umożliwiła mi identyfikację nieznanych cząsteczek lipidowych w różnych szczepach bakterii, zarówno w patogenach jak i probiotykach. Udało się zidentyfikować nowe związki lipidowe, które stanowią czynnik różnicujący wśród lipidów bakteryjnych.

2. Budowa bibliotek lipidowych dla identyfikacji bakterii:

Stworzyłam podstawy do budowy bibliotek lipidowych, które mogą być używane do identyfikacji bakterii. To osiągnięcie otwiera nowe możliwości w diagnostyce mikrobiologicznej, umożliwiając szybszą i bardziej precyzyjną identyfikację mikroorganizmów na podstawie ich profili lipidowych. Moje podejście do wykorzystania techniki MALDI w budowaniu baz danych lipidowych jest zgodne z aktualnymi trendami naukowymi i może przyczynić się do dalszego rozwoju lipidomiki. Opracowane biblioteki referencyjne stanowią cenne źródło informacji, które mogą być wykorzystane do identyfikacji gatunków oraz różnicowania szczepów w kontekście badań klinicznych.

3. Celowana analiza metabolomiczna z wykorzystaniem HPLC/MS-MS:

Opracowałam celowaną analizę metabolomiczną z wykorzystaniem HPLC/MS-MS, co pozwoliło mi na identyfikację i kwantyfikację witamin, laktozy i kwasu mlekowego w bakteriach LAB oraz metabolitów wtórnych w roślinach. Dzięki temu podejściu mogłam dokładniej scharakteryzować skład i właściwości badanych próbek.

4. Wpływ suplementacji krzemem na profil metaboliczny grochu:

Po raz pierwszy zbadałam wpływ suplementacji krzemem na profil metaboliczny grochu w warunkach normalnych i stresu kadmowego. Oceniałam rolę krzemu w łagodzeniu stresu wywołanego kadmem i jego wpływ na akumulację związków bioaktywnych w różnych częściach rośliny, co dostarczyło nowych informacji na temat mechanizmów

adaptacyjnych roślin. Ponadto, przeprowadzone badania wykazały, że ekstrakcja płynem nadkrytycznym (SFE) była najskuteczniejszą metodą izolacji związków polifenolowych z grochu.

5. Optymalizacja warunków separacji chromatograficznej dla analizy białek z mleka:

Zoptymalizowałam warunki separacji chromatograficznej (HPLC-DAD) dla analizy białek wyizolowanych z mleka. To osiągnięcie przyczyniło się do lepszego zrozumienia zmian zachodzących w produktach mlecznych podczas przechowywania i może mieć zastosowanie w kontroli jakości mleka.

6. Udoskonalenie metody GC-MS do analizy profilu kwasów tłuszczowych w różnych produktach mlecznych:

Udoskonałam metodę GC-MS do kompleksowej analizy profilu kwasów tłuszczowych w produktach mlecznych. Dzięki temu mogłam ocenić wpływ różnych procesów technologicznych na skład i właściwości tych produktów, co ma znaczenie dla przemysłu spożywczego. Ponadto, uzyskane wyniki badań zostały wykorzystane podczas walidacji metody mającej na celu jej zaadoptowanie do przemysłu spożywczego, w szczególności mleczarskiego (kontrola jakości).

7. Kompleksowa charakterystyka bakterii kwasu mlekowego z fermentowanych buraków:

Zastosowałam niecelowaną i celowaną analizę MS do kompleksowej charakterystyki bakterii kwasu mlekowego wyizolowanych z fermentowanych buraków. Oceeniłam ich potencjał probiotyczny i możliwości zastosowania jako kultury startowe w przemyśle mleczarskim, co może przyczynić się do rozwoju nowych produktów probiotycznych. Na podstawie uzyskanych wyników opracowano i wdrożono technologię wykorzystującą wyselekcjonowane szczepy LAB do syntezy biologicznie ważnych związków, takich jak ryboflawina, niacyna i kwas foliowy.

Przedstawiony cykl publikacji stanowi kompleksowe studium zastosowania zaawansowanych technik chromatograficznych i spektrometrycznych w analizie złożonych układów biologicznych. Łączy on rozwój metodologii analitycznej z badaniami nad wpływem czynników środowiskowych na profile metaboliczne i lipidomiczne organizmów, dostarczając cennych informacji o ich funkcjonowaniu i adaptacji do zmiennych warunków.

4.7. Plany badawcze

W ramach mojej dalszej pracy naukowej na uczelni, zamierzam kontynuować i rozszerzyć badania z zakresu lipidomiki i metabolomiki, wykorzystując zaawansowane techniki analityczne oparte na spektrometrii mas. Moje plany badawcze obejmują kilka kluczowych obszarów:

1. Pogłębiona analiza lipidomiczna drożdży:

Planuję rozszerzyć obszar badań o szczegółową analizę związków lipidowych w drożdżach. To pozwoli na lepsze zrozumienie metabolizmu lipidów w tych ważnych mikroorganizmach, co może mieć istotne implikacje dla przemysłu biotechnologicznego i spożywczego.

2. Wpływ związków fenolowych na profilowanie lipidów w liniach komórkowych:
Zamierzam zbadać, jak różne związki fenolowe wpływają na profile lipidowe w wybranych liniach komórkowych. To badanie może dostarczyć cennych informacji na temat interakcji między składnikami bioaktywnymi a metabolizmem lipidów na poziomie komórkowym, co może mieć znaczenie w kontekście chorób cywilizacyjnych, takich jak nowotwory czy choroby sercowo-naczyniowe.
3. Pogłębiona analiza metabolomiczna produktów żywnościowych:
Kontynuując moje dotychczasowe badania nad produktami mlecznymi, planuję rozszerzyć analizę metabolomiczną na szerszy zakres produktów żywnościowych. Szczególną uwagę zamierzam poświęcić identyfikacji biomarkerów jakości i świeżości żywności oraz badaniu wpływu procesów technologicznych na profile metaboliczne produktów.
4. Kontynuacja współpracy z sektorem gospodarczym:
Planuję dalszy rozwój współpracy z partnerami przemysłowymi, takimi jak PKN Orlen, Smart Agro Solutions, Fortuna i Polmlek Grudziądz. Ta współpraca umożliwi mi nie tylko prowadzenie badań o bezpośrednim znaczeniu praktycznym, ale także przyczyni się do transferu wiedzy między środowiskiem akademickim a przemysłem.
5. Analiza lipidomiczna w kontekście chorób nowotworowych:
Bazując na badaniach nad profilami lipidowymi w liniach komórkowych Caco-2, planuję rozszerzyć te analizy na inne typy linii. Celem będzie identyfikacja specyficznych markerów lipidowych dla różnych podtypów nowotworów, co może mieć potencjalne zastosowanie w diagnostyce i personalizacji terapii.
6. Analiza związków niskocząsteczkowych z wykorzystaniem technik LDI
Planuję zastosować techniki MALDI, NALDI, SALDI z różnymi pokryciami nanocząstek metali lub tlenków metali w badaniach nad związkami niskocząsteczkowymi, np. kwasy tłuszczowe, witaminy, aminokwasy, kompleksy metali d-elektronowych.

4.8. Bibliografia

- (1) Amer B., Deshpande R.R., Bird S.S., Simultaneous quantitation and discovery (SQUAD) analysis: Combining the best of targeted and untargeted mass spectrometry-based metabolomics. *Metabolites* **2023**, 13(5): 648.
- (2) Arendowski A., Nizioł J., Ossolinski K., Ossolinska A., Ossolinski T., Dobrowolski Z., Ruman T., Laser desorption/ionization MS imaging of cancer kidney tissue on silver nanoparticle-enhanced target. *Bioanalysis* **2018**, 10: 83–94.
- (3) Chandan R.C. Dairy ingredients for food processing: An overview. In dairy ingredients for food processing; Blackwell Publishing: Hoboken, NJ, USA, **2011**; pp. 3–33.
- (4) Cuyckens F., Claeys M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **2004**, 39: 1–15.
- (5) D'Avila H., Lima C.N.R., Rampinelli P.G., Mateus L.C.O., Sousa Silva R.V., Correa J.R., Almeida P.E. Lipid metabolism modulation during SARS-CoV-2 infection: a spotlight on extracellular vesicles and therapeutic prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25(1): 640.

- (6) Elbehiry A., Aldubaib M., Abalkhail A., Marzouk E., ALbeloushi A., Moussa I., Ibrahim M., Albazie H., Alqarni A., Anagreyah S., Alghamdi S., Rawway M. How MALDI-TOF mass spectrometry technology contributes to microbial infection control in healthcare settings. *Vaccines (Basel)*. **2022**, 10(11): 1881.
- (7) Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, 226(1): 497–509.
- (8) Gauvin M.-P., Pouliot Y., Britten M. Characterization of buttermilk serum fractions and their effect on rennet-induced coagulation of casein micelle dispersions. *Int. Dairy J.* **2017**, 76: 10–17.
- (9) Gerhardtova I., Jankech T., Majerova P., Piestansky J., Olesova D., Kovac A., Jampilek J. Recent analytical methodologies in lipid analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25(4): 2249.
- (10) González-González F., Delgado S., Ruiz L., Margolles A., Ruas-Madiedo P. Functional bacterial cultures for dairy applications: Towards improving safety, quality, nutritional and health benefit aspects. *J Appl Microbiol.* **2022**, 133(1): 212-229.
- (11) Granato D., Barba F.J., Bursać Kovačević D., Lorenzo J.M., Cruz A.G., Putnik P. Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annu Rev Food Sci Technol.* **2020**, 11: 93-118.
- (12) Han X., Gross R.W., The foundations and development of lipidomics. *J. Lipid Res.* **2022**, 63(2): 100164.
- (13) Hanna M., Jaqua E., Nguyen V., Clay J. B Vitamins: functions and uses in medicine. *Perm. J.* **2022**, 26(2): 89-97.
- (14) Hanuš O., Samková E., Křížová L., Hasoňová L., Kala R., Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability-a review. *Molecules.* **2018**, 23(7): 1636.
- (15) Illingworth D., Patil G.R., Tamime A.Y. Anhydrous milk fat manufacture and fractionation. In *Dairy Fats and Related Products*; Blackwell Publishing: Hoboken, NJ, USA, **2009**; pp. 108–166.
- (16) Kostrzewa M., Nagy E., Schröttner P., Pranada A.B., How MALDI-TOF mass spectrometry can aid the diagnosis of hard-to-identify pathogenic bacteria—the rare and the unknown. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2019**, 19(8): 667-682.
- (17) Kumar B.R., Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *J Pharm Anal.* **2017**, 7(6): 349-364.
- (18) Kusano M., Kawabata S., Tamura Y., Mizoguchi D., Murouchi M., Kawasaki H., Arakawa R., Tanaka K. Laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) of lipids with iron oxide nanoparticle-coated targets. *Mass Spectrom.* **2014**, 3(1): A0026.
- (19) LeBlanc J.G., Laiño J.E., del Valle M.J., Vannini V., van Sinderen D., Taranto M.P., de Valdez G.F., de Giori G.S., Sesma F. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria—Current knowledge and potential applications. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, 111: 1297–1309.
- (20) Leroy F., De Vuyst L., Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **2001**, 67(10):4407-13.

- (21) Leung L.M., Fondrie W.E., Doi Y., Johnson J.K., Strickland D.K., Ernst R.K., Goodlett D.R., Identification of the ESKAPE pathogens by mass spectrometric analysis of microbial membrane glycolipids. *Sci. Rep.* **2017**, 7(1): 6403.
- (22) Li M., Kopylova E., Mao J., Namkoong J., Sanders J., Wu J., Microbiome and lipidomic analysis reveal the interplay between skin bacteria and lipids in a cohort study. *Front. Microbiol.* **2024**, 15, 1383656.
- (23) Maślak E., Arendowski A., Złoch M., Walczak-Skierska J., Radtke A., Piszczek P., Pomastowski P., Silver nanoparticle targets fabricated using chemical vapor deposition method for differentiation of bacteria based on lipidomic profiles in laser desorption/ionization mass spectrometry. *Antibiotics (Basel)*. **2023**, 12(5): 874.
- (24) Miciński J., Kowalski I.M., Zwierzchowski G., Szarek J., Pierożyński B., Zabłocka E., Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. *Pol. Annal. Med.* **2013**, 20: 69-76.
- (25) Mortier T., Wieme A.D., Vandamme P., Waegeman W., Bacterial species identification using MALDI-TOF mass spectrometry and machine learning techniques: A large-scale benchmarking study. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, 19: 6157–6168.
- (26) Nadar, S.S., Rao, P., Rathod, V.K., Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: a review. *Food Res. Int.* **2018**, 108: 309–330.
- (27) Ozturk G., Paviani B., Rai R., Robinson R.C., Durham S.D., Baller M.I., Wang A., Nitin N., Barile D. Investigating milk fat globule structure, size, and functionality after thermal processing and homogenization of human milk. *Foods*. **2024**, 13(8): 1242.
- (28) Pati S., Nie B., Arnold R.D., Cummings B.S. Extraction, chromatographic and mass spectrometric methods for lipid analysis. *Biomed Chromatogr.* **2016**, 30(5): 695-709.
- (29) Perry W.J., Patterson N.H., Prentice B.M., Neumann E.K., Caprioli R.M., Spraggins J.M., Uncovering matrix effects on lipid analyses in MALDI imaging mass spectrometry experiments. *J Mass Spectrom.* **2020**, 55(4): e4491.
- (30) Qiu S., Cai Y., Yao H., Lin C., Xie Y., Tang S., Zhang A., Small molecule metabolites: discovery of biomarkers and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* **2023**, 8(1): 132.
- (31) Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol.* **2012**.
- (32) Rosenberg E., Krska R., Analytical chemistry in front of the curtain! *Anal. Bioanal. Chem.* **2024**, 416(2): 1787–1795.
- Rizzoli R. Dairy products and bone health. *Aging: Clin. Exp. Res.* **2022**, 34 (1): 9–24.
- (33) Santacroce L., Charitos I.A., Bottalico L., A successful history: Probiotics and their potential as antimicrobials. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2019**, 17: 635–645.
- (34) Schiller J., Süß R., Arnhold J., Fuchs B., Lessig J., Müller M., Petković M., Spalteholz H., Zschörnig O., Arnold K. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog. Lipid Res.* **2004**, 43(5), 449-488.
- (35) Silhavy T.J., Kahne D., Walker S., The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2010**, 2(5): a000414.

- (36) Smith R.L., Soeters M.R., Wüst R.C.I., Houtkooper R.H., Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. *Endocr Rev.* **2018**, 39(4): 489-517.
- (37) Sohlenkamp C., Geiger O., Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, 40(1): 133–159.
- (38) Solntceva V., Kostrzewa M., Larrouy-Maumus G., Detection of species-specific lipids by routine MALDI–TOF mass spectrometry to unlock the challenges of microbial identification and antimicrobial susceptibility testing. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2021**, 10: 914.
- (39) Torres-Sangiao E., Leal Rodriguez C., García-Riestra C., Application and perspectives of MALDI–TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories. *Microorganisms.* **2021**, 9(7): 1539.
- (40) van der Meer-Janssen Y.P., van Galen J., Batenburg J.J., Helms J.B. Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog. Lipid Res.* **2010**, 49(1): 1-26.
- (41) Walczak-Skierska J., Złoch M., Pauter K., Pomastowski P., Buszewski B., Lipidomic analysis of lactic acid bacteria strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* **2020**, 103(12): 11062–11078.
- (42) Wang Y., Jones P.J. Dietary conjugated linoleic acid and body composition. *Am J Clin Nutr.* **2004**, 79(6 Suppl): 1153S-1158S.
- (43) Widyastuti Y., Febrisiantosa A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food Nutr. Sci.* **2014**, 5: 435–442.
- (44) Wu Q., Yu J., Zhang M., Xiong Y., Zhu L., Wei B., Wu T., Du Y., Serum lipidomic profiling for liver cancer screening using surface-assisted laser desorption ionization MS and machine learning. *Talanta* **2024**, 268: 125371.
- (45) Yan Z., Lin G., Ye Y., Wang Y., Yan R., A generic multiple reaction monitoring based approach for plant flavonoids profiling using a triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2014**, 25(6): 955-965.
- (46) Yang K., Han X., Lipidomics: Techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, (11): 954-969.
- (47) Yang Q., Zhang A., Miao J., Sun H., Han Y., Yan G., Wua F.-F., Wang X., Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review. *RSC Adv.* **2019**, 9: 37245-37257.
- (48) Yu J., Kang Y., Zhang H., Yang F., Zhen H., Zhu X., Wu T., Du Y., a polymer-based matrix for effective SALDI analysis of lipids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2021**, 32: 1189-1195.
- (49) Zhuang W.-B., Li Y.-H., Shu X.-C., Pu Y.-T., Wang X.-J., Wang T., Wang Z., The classification, molecular structure and biological biosynthesis of flavonoids, and their roles in biotic and abiotic stresses. *Molecules.* **2023**, 28(8): 3599.
- (50) Złoch M., Rafinska K., Sugajski M., Buszewska-Forajta M., Walczak-Skierska J., Railean V., Pomastowski P., Białczak D., Buszewski B., *Lactocaseibacillus paracasei* as a modulator of fatty acid compositions and vitamin D3 in cream. *Foods.* **2022**, 11: 1659.

(51) Złoch M., Maślak E., Kupczyk W., Pomastowski P., Multi-Instrumental analysis toward exploring the diabetic foot infection microbiota. *Current Microbiology* **2023**, 80: 271.

(52) Züllig T., Trötszmüller M., Köfeler H.C. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, 412(5): 1-19.

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

5.1. Odbyte staże naukowe w jednostkach zagranicznych

W trakcie mojej kariery naukowej uczestniczyłam w trzech stażach zagranicznych – dwóch przed doktoratem i jednym po doktoracie. Staże te miały kluczowy wpływ na rozwój mojej wiedzy i umiejętności badawczych.

Podczas stażu w Pardubicach u śp. profesora Pavla Jandery, światowej sławy specjalisty w dziedzinie chromatografii cieczowej, poszerzyłam swoją wiedzę w tym zakresie. Dzięki intensywnej pracy nad nowoczesnymi technikami chromatograficznymi, zdobyłam cenne doświadczenie w analizie złożonych mieszanin chemicznych. Efektem tego stażu był komunikat na międzynarodowej konferencji, który spotkał się z dużym zainteresowaniem środowiska naukowego. Natomiast dwutygodniowy staż naukowy w ośrodku badawczym w Brasov umożliwił mi poszerzenie wiedzy z zakresu analizy związków bioaktywnych za pomocą technik chromatograficznych.

Kolejny staż odbyłam w Bolonii u dr Carli Ferreri, która specjalizuje się w badaniach lipidomicznych. Ten staż umożliwił mi udoskonalenie oraz poszerzenie wiedzy z zakresu charakterystyki związków lipidowych w różnych układach biologicznych. Dzięki precyzyjnemu przygotowaniu próbek, udało mi się przeprowadzić szczegółową analizę i charakterystykę błony komórkowej oraz określić jej profil lipidowy przy wykorzystaniu różnorodnych metod analitycznych. Staż ten przyczynił się do znacznego wzbogacenia mojego doświadczenia w pracy z lipidami, co ma istotne znaczenie w badaniach nad biomembranami i metabolizmem lipidów.

03/2013 – 05/2013	Staż międzynarodowy programu CEEPUS III (CIII-PL-0706-01-1213-M-64290) na Uniwersytecie w Pardubicach (Czechy)
07/2014	Staż międzynarodowy programu CEEPUS III (CIII-RO-0313-06-1314-M-76711) na Transilvania University w Brasov (Rumunia)
09/2023	Staż międzynarodowy w Instytucie Syntezy Organicznej i Fotoreaktywności w Bolonii (Włochy)

5.2. Nawiązana współpraca naukowa

W trakcie mojej kariery naukowej aktywnie uczestniczę w rozwoju zawodowym poprzez współpracę z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi. Skupiam się na zastosowaniu i rozwijaniu nowych metodyk HPLC-MS/MS, spektrometrii mas w analizie związków biologicznie aktywnych. Współpraca ta w szczególności obejmuje:

1. Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii (3 wspólne publikacje naukowe)

2. Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Technologii Produktów Zwierzęcych i Zarządzania Jakością (2 wspólne publikacje naukowe, 2 wspólne wystąpienia konferencyjne)
3. Uniwersytet Narodowy Pukyoung Korea Południowa, Wydział Inżynierii Chemicznej (2 wspólne publikacje naukowe)
4. Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Nowych Syntezy Chemicznych (3 wspólne publikacje naukowe, 2 wspólne wystąpienia konferencyjne)
5. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin (2 wspólne publikacje naukowe)
6. Uniwersytet Tasmania, Australijskie Centrum Badań nad Separacją (ACROSS) (1 wspólna publikacja naukowa, 1 rozdział w monografii naukowej)
7. POLMLEK Grudziądz Sp. z o. o. (2 wspólne publikacje naukowe)

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

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

a) Promotorstwo

Istotnym elementem mojej działalności naukowej na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika jest opieka nad studentami przygotowującymi prace dyplomowe. Obecnie pełnię funkcję promotora pomocniczego przy realizacji pracy doktorskiej mgr Dominiki Błońskiej, zatytułowanej *„Opracowanie nowych metod elektroforetycznych połączonych z detekcją spektralną oraz spektrometryczną w identyfikacji mikroorganizmów”*. Równocześnie wspieram mgr Pawła Fijałkowskiego w realizacji jego pracy doktorskiej zatytułowanej *„Receptory laktoferyny jako nowa droga suplementacji mikroelementów”*.

Ponadto pełniłam i nadal pełnię rolę opiekuna naukowego dla 6 prac magisterskich i 2 licencjackich. Moja opieka nad studentami obejmuje nie tylko pomoc w realizacji badań, ale również wsparcie merytoryczne, konsultacje naukowe oraz przygotowanie ich do obrony pracy dyplomowej.

b) Prowadzenie zajęć

W latach 2017 – 2022 prowadziłam wykład oraz zajęcia laboratoryjne w ramach Podyplomowego Studium Analityki w Ochronie Środowiska na Wydziale Chemii.

6.2. Osiągnięcia organizacyjne

Byłam członkiem komitetu organizacyjnego zarówno krajowych, jak i międzynarodowych konferencji naukowych:

1. Udział w komitecie organizacyjnym 29 Międzynarodowego Sympozjum nt. Chromatograficznego oraz 18 Międzynarodowego Sympozjum nt. Technik Rozdzielania w Toruniu (09.09.2012 – 13.09.2012)
2. Udział w komitecie organizacyjnym 3 Konferencji Naukowej pt.: "Monitoring i analiza wody. Chromatograficzne metody oznaczania substancji o charakterze jonowym" w Toruniu (07.04.2013)

3. Udział w Komitecie organizacyjnym 8 Międzynarodowej Konferencji nt. Badań Oddechu i Diagnostyki Chorób Nowotworowych w Toruniu (6-9.07.2014)
4. Udział w Komitecie organizacyjnym konferencji Humboldt-Kolleg Etyka w Nauce i Życiu, Toruń (10-13.05.2015)
5. Udział w Komitecie organizacyjnym 18 International Symposium on Advanced in Extraction Technologies & 22 International Symposium on Separation Science w Toruniu (3-6.07.2016)
6. Członek komitetu organizacyjnego 5 Międzynarodowej Konferencji, Metabolomics Circle, Przysiek k. Torunia, Polska (2018)

6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

1. W ramach popularyzacji nauki, w latach 2014-2017 aktywnie uczestniczyłam w przygotowaniach oraz organizacji Toruńskiego Festiwalu Nauki i Sztuki. Moja praca przy festiwalu obejmowała koordynację wydarzeń, przygotowywanie materiałów edukacyjnych oraz prowadzenie warsztatów i pokazów. Dzięki temu festiwalowi, udało mi się dotrzeć do szerokiej publiczności i promować naukę w przystępny i interesujący sposób.
2. Ponadto, brałam czynny udział w chemicznych pokazach i warsztatach skierowanych do dzieci i młodzieży. Działalam w ramach programu Amicus oraz pod patronatem Polskiego Towarzystwa Chemicznego, organizując wydarzenia edukacyjne dla szkół w naszym mieście i okolicach pt. „Spotkania z chemią”. Te inicjatywy miały na celu zainspirowanie młodych ludzi do zainteresowania się chemią poprzez interaktywne i angażujące zajęcia. Moje zaangażowanie w te projekty nie tylko przyczyniło się do popularyzacji nauki, ale także umożliwiło mi rozwijanie umiejętności komunikacji naukowej i pracy z różnorodną grupą odbiorców.
3. W ramach warsztatów organizowanych przez ICNT w Toruniu pt. *"Technika MALDI w rutynowej diagnostyce klinicznej - warsztaty z identyfikacji patogenów klinicznych i detekcji antybiotykooporności"* w ramach Centrum Doskonałości "W kierunku medycyny spersonalizowanej" wygłosiłam wykład na temat „Metody przygotowania próbek do identyfikacji MALDI” (18-20.03.2024).

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1. Nagrody i wyróżnienia

1. Projekt "Krok w przyszłość - stypendia dla doktorantów edycja IV oraz V" realizowany przez Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko-Pomorskiego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki; 2013/2014; 2014/2015; 2016
2. Nagroda Rektora UMK za zespołowe osiągnięcia naukowo-badawcze w roku 2016, 2017, 2018
3. Wyróżnienie Rektora UMK za zespołowe osiągnięcia naukowo-badawcze w roku 2017
4. Nagroda Komitetu Chemii Analitycznej PAN w kategorii najlepszy doktorat 2017 (Leco)

5. Nagroda Rektora UMK za zespołowe osiągnięcia w dziedzinie organizacyjnej w roku 2023

7.2. Odbyte kursy i szkolenia

1. szkolenie z zakresu „Cutting-edge solutions in breath analysis”, Toruń (6.07.2014)
2. szkolenie z zakresu „Spektrometrii mas czasu przelotu (TOF MS) w analizie żywności”, Łódź (6.11.2014)
3. szkolenie z zakresu „Design Thinking jako narzędzie skutecznego poszukiwania rozwiązań problemów” współfinansowanego ze środków UE w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, Bydgoszcz (21-23.05.2014)
4. szkolenie z zakresu zarządzania projektem B+R (od poszukiwania źródeł finansowania, poprzez realizację projektu) współfinansowanego ze środków UE w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, Bydgoszcz (23-24.06.2014)
5. szkolenie w obsługi spektrometru Orbitrap ID-X z UHPLC, Thermo Scientific, Toruń (07-09.05.2019)

.....
Justyna Walczak-Skierska
(podpis wnioskodawcy)