

dr inż. Anna Jakubczyk
Katedra Biochemii i Chemii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Załącznik II
Autoreferat w języku polskim

Lublin, 2019

Spis treści

1. Dane osobowe	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.).....	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia	3
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	6
4.3.1. Wprowadzenie	6
4.3.2. Cel naukowy oraz omówienie wyników badań	10
4.3.3. Podsumowanie.....	19
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych	22
6. Zestawienie dorobku	30

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Anna Maria Jakubczyk

Miejsce pracy: Katedra Biochemii i Chemii Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2011 dr nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia – specjalność: biochemia żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

2007 mgr inżynier biotechnologii, specjalność: biotechnologia żywności, Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2013–obecnie adiunkt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Katedra Biochemii i Chemii Żywności

2011–2013 asystent, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Katedra Biochemii i Chemii Żywności

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie będące podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego stanowi cykl siedmiu publikacji naukowych ujętych pod wspólnym tytułem:

”Wybrane środki spożywcze pochodzenia roślinnego jako źródło związków o potencjalnych właściwościach hamujących patogenezę zespołu metabolicznego”.

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia

O1. Jakubczyk A., Karaś M., Baraniak B., Pietrzak M. (2013). The impact of fermentation and *in vitro* digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. Food Chemistry, 141 (4), 3774-80.

(MNiSW= 40 pkt., IF= 3.259*, 4.879; liczba cytowań wg WoS=30, Scopus=36)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących przeprowadzeniu fermentacji nasion grochu w różnych warunkach czasu i temperatury, oznaczaniu aktywności inhibitorowej enzymu konwertującego

angiotensynę I otrzymaniu hydrolizatów, oznaczeniu zawartości peptydów oraz analizie wyników identyfikacji peptydów technika LC-MS/MS; interpretacji wyników, udział w napisaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

O2. Durak A., Baraniak B., **Jakubczyk A.**, Świeca M. (2013). Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. Food Chemistry, 141(3), 2177-2183.

(MNiSW= 40 pkt., IF= 2.259*, 4.879**; liczba cytowań wg WoS=40, Scopus=41)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących przeprowadzenia hydrolizy frakcji białkowych nasion fasoli adzuki w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka, oznaczeniu zawartości peptydów, wykonaniu części oznaczeń dotyczących właściwości antyoksydacyjnych (aktywność przeciwrodnikowa wobec ABTS, chelatowanie jonów żelaza (II)), analizie i interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

O3. **Jakubczyk, A.**, Karaś, M., Złotek, U., Szymanowska, U. (2017). Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. Food Research International 100, 489-496.

(MNiSW= 40 pkt., IF= 4.520*, 4.196**; liczba cytowań wg WoS=9, Scopus=6)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących przeprowadzenia procesu fermentacji nasion w różnych warunkach czasu i temperatury, rozdzieleniu białek techniką SDS-PAGE i analizie mas cząsteczkowych białek, oznaczeniu zawartości peptydów i wyznaczeniu stopnia hydrolizy białek, oznaczeniu potencjalnych właściwości hamujących patogenezę zespołu metabolicznego (właściwości inhibitujące aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I i lipazy trzustkowej), interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

O4. **Jakubczyk, A.**, Świeca, M., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D. (2018). Nutritional potential and inhibitory activity of bread fortified with green coffee beans against enzymes involved in metabolic syndrome pathogenesis. LWT – Food Science and Technology, 95, 78-84

(MNiSW= 40 pkt., IF= 3.129*, 3.455**; liczba cytowań wg WoS=0, Scopus=0)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących przygotowania hydrolizatów chleba fortyfikowanego

zieloną kawą, oznaczeniu potencjalnych właściwości hamujących patogenezę zespołu metabolicznego (właściwości inhibujące aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I, lipazy trzustkowej, α -amylazy i α -glukozydazy), analizie i interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

O5. Jakubczyk A. (2018). Effect of addition of fermented bean seed flour on the content of bioactive components and nutraceutical potential of wheat wafers. *LWT – Food science and Technology* 98, 245-251

(MNiSW= 40 pkt., IF= 3.129*, 3.455; liczba cytowań wg WoS=0, Scopus=0)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu wszystkich doświadczeń, analizie i interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

O6. Jakubczyk A., Szymanowska U., Karaś M., Złotek U., Kowalczyk D. (2019). Potential anti-inflammatory and lipase inhibitory peptides generated by in vitro gastrointestinal hydrolysis of heat treated millet grains. *CyTA - Journal of Food*, *CyTA - Journal of Food* <http://doi.org/10.1080/19476337.2019.1580317>

(MNiSW= 20 pkt., IF= 1.371*, 1.371; liczba cytowań wg WoS=0, Scopus=0)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących otrzymania frakcji białkowych z nasion prosa poddanych obróbce w różnej temperaturze, oznaczeniu masy cząsteczkowej białek techniką SDS-PAGE przeprowadzeniu hydrolizy frakcji białkowych, oznaczeniu właściwości hamujących aktywność lipazy trzustkowej, analizie wyników dotyczących składu aminokwasowego frakcji peptydowych, analizie i interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

O7. Jakubczyk A., Karaś M., Złotek U., Szymanowska U., Baraniak B., Bochnak J. (2019). Peptides obtained from fermented faba bean seeds (*Vicia faba*) as potential inhibitors of an enzyme involved in the pathogenesis of metabolic syndrome. *LWT - Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.009>

(MNiSW= 40 pkt., IF= 3.129*, 3.455; liczba cytowań wg WoS=0, Scopus=0)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących przeprowadzenia procesu fermentacji nasion bobu w różnych warunkach czasu i temperatury, rozdzielu białek techniką SDS-PAGE i analizie mas cząsteczkowych białek, oznaczeniu zawartości peptydów i wyznaczeniu stopnia hydrolizy białek,

oznaczeniu potencjalnych właściwości hamujących patogenezę zespołu metabolicznego (właściwości inhibitujące aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I i lipazy trzustkowe), interpretacji wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

Łącznie:

Impact Factor – 20.796*, 22.122**

Punkty MNiSW – 260

*obowiązujące w roku wydania publikacji (w przypadku publikacji z lat 2018-2019 przyjęto wartość IF wyliczoną dla 2018 roku)

**średni pięcioletni Impact Factor

Oświadczenia współautorów prac, określające ich indywidualny wkład w powstanie publikacji
– **Załącznik IV**

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. Wprowadzenie

W ostatnich latach żywność stała się przedmiotem badań nie tylko jako źródła podstawowych składników odżywczych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, ale także jako źródła bioaktywnych związków. Obecnie wzrasta także zainteresowanie konsumentów żywnością, która może korzystnie wpływać na poprawę zdrowia poprzez zapobieganie występowaniu wielu chorób, w tym także tzw. chorób cywilizacyjnych (Farhud, 2015; Ditlevsen, Sandøe i Lassen, 2019). Jedną z nich jest zespół metaboliczny (z ang. metabolic syndrome, zwany także zespołem X lub Raevena), którego kryteria rozpoznania spełnia coraz więcej mieszkańców państw wysokorozwiniętych, a także dzieci, co staje się współczesnym globalnym problemem zdrowotnym.

Zespół metaboliczny (ZM) to współwystępowanie czynników ryzyka pochodzenia metabolicznego o podłożu miażdżycowym, sprzyjającym rozwojowi cukrzycy typu 2, otyłości, stanów prozakrzepowych i prozapalnych oraz chorób sercowo-naczyniowych, takich jak nadciśnienie tętnicze, dysfunkcje naczyniowe, udar czy zawał serca (Srikanthan i in., 2016). Niektóre badania naukowe wskazują także na dużą zależność pomiędzy występowaniem zespołu metabolicznego i rozwojem różnego rodzaju nowotworów (Bitzur i in., 2016). Ze względu na jego złożoność oraz wciąż pojawiające się wątpliwości diagnostyczne, dokładna patogenezą zespołu metabolicznego nie została poznana. Wiadomo, że rozwój choroby związany jest z nadmierną aktywnością enzymów odpowiedzialnych za występowanie nietolerancji glukozy, nadciśnienia tętniczego czy stanów zapalnych, a insulinooporność i otyłość uznawane są za główne czynniki ryzyka.

W początkowej fazie rozwoju cukrzycy typu 2 występuje zmniejszona zdolność insuliny do pobierania glukozy we krwi, co może przyczyniać się do rozwoju insulinooporności i nieprawidłowego poziomu glukozy. Jedną z metod zapobiegania występowania cukrzycy jest hamowanie aktywności enzymów biorących udział w uwalnianiu w przewodzie pokarmowym glukozy z żywności czyli α -amylazy (EC 3.2.1.1), produkowanej głównie przez ślinianki i trzustkę oraz α -glukozydazy (EC 3.2.1.20) związanej z błoną komórkową jelita cienkiego, katalizującą reakcję hydrolizy di- i oligosacharydów do glukozy, która następnie transportowana jest do krwioobiegu. Hamowanie aktywności tych enzymów, także przez spożywanie naturalnych inhibitorów pochodzących z żywności, jest ważnym czynnikiem wspomagającym leczenie poposiłkowej hiperglikemii (Yu i in., 2012).

Otyłość związana jest z brakiem równowagi pomiędzy zapotrzebowaniem organizmu na kalorie a dostarczaniem ich wraz z pożywieniem. Prowadzi to do nieproporcjonalnego gromadzenia tkanki tłuszczowej, nadmiernej jej aktywności oraz zaburzeń w metabolizmie tłuszczów (Maqsood i in., 2017). Jedną z metod zapobiegania występowania i leczenia tej choroby jest zmniejszenie hydrolizy lipidów w przewodzie pokarmowym. W tym celu hamowana jest aktywność lipazy trzustkowej (lipazy triacyloglicerolowej, EC 3.1.1.3), głównego enzymu zaangażowanego w hydrolizę lipidów, który odpowiedzialny jest za trawienie 50% -70% tłuszczów spożywanych wraz z dietą (Birari i Bhutani, 2007). Metodą leczenia otyłości jest stosowanie przez pacjentów Orlistatu, leku który hamuje aktywność lipazy trzustkowej (Sahebkar i in., 2018), który może jednak powodować poważne skutki uboczne, przyczyniając się głównie do rozwoju chorób nerek (Buyschaert i in., 2016), dlatego też poszukuje się inhibitorów tego enzymu występujących w produktach spożywczych, które jednocześnie charakteryzują się niską kalorycznością, co w konsekwencji może przyczynić się do zwiększenia skuteczności dietoterapii otyłości. Choroba ta związana jest nie tylko z nadmierną ilością tkanki tłuszczowej, która może wpływać na nieprawidłowe funkcjonowanie organizmu, ale także z przewlekłym stanem zapalnym, który stymuluje wzrost poziomu krążących prozapalnych cytokin, takich jak: leptyna, rezystyna, czynnik martwicy nowotworów (TNF)- α czy interleukina (IL) - 6, które przyczyniają się do rozwoju insulinooporności i dysfunkcji śródbłonna (Ellulu i in., 2017).

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) ze względu na ich właściwości przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe są lekami powszechnie stosowanymi na całym świecie w leczeniu bólu oraz różnych chorób np. reumatyzmu czy zapaleniu stawów. Niemniej jednak mogą one powodować działania niepożądane, takie jak reakcje alergiczne, zaburzenia czynności przewodu pokarmowego lub nerek, dlatego ich stosowanie jest często ograniczone. W związku z powyższym poszukuje się nowych strategii leczniczych, do których należy hamowanie aktywności cylooksygenazy (COX, EC 1.14.99.1) i lipooksygenazy (LOX, EC. 1.13.11.12), enzymów katalizujących biosyntezę metabolitów biorących udział w odpowiedziach zapalnych i odpornościowych. Oba enzymy odgrywają kluczową rolę w katalizie kaskady kwasu arachidonowego, najczęściej występującego wielonienasyconego kwasu tłuszczowego znajdującego się w fosfolipidach

błon komórkowych (Charlier i Michaux, 2003). Cyklooksigenazy są ważnymi enzymami katalizującymi biosyntezę prostaglandyny H_2 , która jest głównym prekursorem produkcji eikozanoidów: prostaglandyn, tromboksanów i prostacyklin. Istnieją dwie izoformy COX: cyklooksigenaza-1 (COX-1) i cyklooksigenaza 2 (COX-2). Obydwie formy katalizują zasadniczo tę samą reakcję, różnią się jednak strukturą, ekspresją i funkcją. Pierwsza z nich jest konstytutywną izoformą odpowiedzialną głównie za regulację agregacji płytek i syntezę prostaglandyn, które działają cytoochronnie na przewód pokarmowy, regulują nerkowy przepływ krwi oraz kontrolują czynności nerek. Natomiast COX-2 aktywowana jest przez mediatory prozapalne i ułatwia uwalnianie prostaglandyn zaangażowanych w proces zapalny, onkogenezę i występowanie bólu (Hansen i in., 2012; El i in., 2018). Lipooksygenazy (LOX) należą do enzymów z klasy oksydoreduktaz, które są niehemowymi dioksygenazami wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Lipooksygenazy ssaków zostały podzielone na cztery rodziny: 5-lipooksygenazy (5-LOX), 8 -lipooksygenazy (8 -LOX), 12-lipooksygenazy (12-LOX) i 15-lipooksygenazy (15-LOX). Przekształcają one kwas arachidonowy, linolowy i inne wielonienasycone kwasy tłuszczowe w wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych i inne biologicznie aktywne metabolity, m.in. leukotrieny (LT) (Schneider i in., 2009; Ribeiro i in., 2014). Związki te biorą udział w procesach zapalnych, a ich aktywność prowadzi do rozwoju chorób takich jak miażdżycę tętnic, reumatoidalne zapalenie stawów, alergię, astmę, otyłość czy nowotwory (Werz i Steinhilber, 2005; Gunderson i in., 2016). Dlatego działanie inhibitorów aktywności COX i LOX może przyczyniać się do zahamowania rozwoju procesu zapalnego oraz wielu chorób o podłożu zapalnym. W literaturze znaleźć można informacje na temat peptydów (Montoya-Rodríguez i de Mejía, 2015) czy związków fenolowych (Ribeiro i in., 2014) pochodzących z żywności o właściwościach inhibitujących aktywność tych enzymów i jednocześnie stanowiących alternatywę w zapobieganiu chorobom sercowo-naczyniowym takim jak miażdżycę i niewydolność serca.

Innym ważnym, niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych jest nadciśnienie tętnicze. Związane jest ono z nadmierną aktywnością enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE, EC 3.4.15.1), który odgrywa główną rolę w regulacji ciśnienia krwi oraz regulacji wodno-elektrolitowej organizmu. ACE przekształca nieaktywną angiotensynę I (dekapeptyd) w angiotensynę II (oktapeptyd) o silnym działaniu kurczącym naczynia krwionośne. Ponadto enzym ten inaktywuje bradykininę, która wykazuje właściwości rozszerzające naczynia krwionośne i wpływa na produkcję aldosteronu (Russo i in., 2018). Dlatego też inhibitory tego enzymu wykazują właściwości przeciwnadciśnieniowe i w konsekwencji chronią naczynia krwionośne oraz serce. Syntetyczne inhibitory ACE, takie jak kaptopril, enalapryl lub lizynopryl powszechnie stosowane są w leczeniu nadciśnienia tętniczego, także w przypadku występowania cukrzycy typu 2. Powodują jednak poważne skutki uboczne, takie jak kaszel, obrzęk naczynioruchowy, zaburzenia smaku lub wysypki skórne, nie mogą być także stosowane u kobiet w ciąży ze względu na ryzyko rozwoju niewydolności nerek, zahamowania wzrostu płodu, nieprawidłowym rozwojem kości oraz płuc dziecka (Garcia i in., 2015). Z związku z powyższym, zidentyfikowanie i opracowanie mechanizmu działania nowych

inhibitorów ACE wykazujących działanie terapeutyczne bez wywołania skutków ubocznych staje się nowym wyzwaniem dla naukowców oraz diagnostów.

W patogenezie zespołu metabolicznego, chorób nowotworowych czy choroby Alzheimera ważną rolę odgrywa stres oksydacyjny - stan, w którym dochodzi do zaburzenia równowagi między produkcją a neutralizowaniem wolnych rodników, a przede wszystkim reaktywnych form tlenu (ROS) czyli wysoce reaktywnych cząsteczek, krótkotrwałych pochodnych zredukowanego tlenu wytwarzanych w sposób ciągły we wszystkich układach biologicznych. ROS odgrywają dwojaką rolę: z jednej strony ich nadmiar może prowadzić do rozwoju wielu chorób (Roberts i Sindhu, 2009), z drugiej zaś niskie poziomy ROS wymagane są w wielu procesach biochemicznych, do których należy obrona przed mikroorganizmami (Lee i in., 2008), różnicowanie komórek, odporność na apoptozę, zahamowanie wzrostu i wewnątrzkomórkowe przesyłanie sygnału (Tohyama i Yamamura, 2004; Roberts i Sindhu, 2009). Wiele wyników badań wskazuje na główną rolę stresu oksydacyjnego i wolnych kwasów tłuszczowych w przewlekłym zapaleniu, patogenezie insulinooporności, rozwoju powikłań cukrzycowych i otyłości (Houstis i in., 2006; García i in., 2014). Stres oksydacyjny występuje podczas zaburzenia równowagi pomiędzy ilością wytwarzanych ROS, a zdolnością przeciwutleniającą mechanizmów enzymatycznych (obniżona aktywność enzymów o właściwościach przeciwutleniających) lub nieenzymatycznych (zmniejszona zawartość związków o właściwościach przeciwutleniających). W związku z powyższym poszukuje się nowych związków dostarczanych z żywnością wykazujących właściwości przeciwutleniające oraz obniżające aktywność niektórych enzymów, co może przyczyniać się do zahamowania patogenezy zespołu metabolicznego.

Do produktów zawierających liczne bioaktywne związki, które mogą wpływać pozytywnie na organizm, zaliczane są ziarna kawy. Uzyskany z nich napar jest jednym z najczęściej spożywanych napojów w Europie i Ameryce. Jego smak i aromat jest powszechny i specyficzny, dlatego kawa często wykorzystywana jest w produkcji różnych środków spożywczych. Wyniki badań wskazują, że związki polifenolowe zawarte w ziarnach kawy mogą hamować aktywność LOX (Gawlik-Dziki i in., 2016) i wykazywać właściwości przeciwutleniające (Liang i in., 2016). Stad też zasadne jest wykorzystanie ziaren kawy jako dodatek do produktów często spożywanych przez konsumentów, do których należy pieczywo.

Nasiona prosa charakteryzują się wysoką wartością odżywczą, a ponadto są szczególnie rekomendowana w żywieniu osób cierpiących na celiakię. Bezglutenowe białka prosa zawierają niezbędne aminokwasy egzogenne, także te zawierające siarkę: metioninę i cysteinę. Wykazano wiele dodatkowych korzyści zdrowotnych wynikających ze spożywania prosa m.in. regulowanie ciśnienia krwi, zmniejszenie ryzyka występowania chorób serca czy regulowanie poziomu cholesterolu (Gupta i Pandey, 2012).

Rośliny strączkowe są ważnym elementem prawidłowo zbilansowanej diety, ze względu na ich wartość odżywczą, wysoką zawartość białka, błonnika pokarmowego oraz witamin. Wykazano także, iż spożywanie strączkowych powoduje zmniejszenie ryzyka chorób sercowo-naczyniowych,

insulinooporności i niektórych rodzajów nowotworów (García-Lafuente i in., 2014; Cassan i Holopainen-Mantila, 2016). Jednym z głównych aspektów ograniczających spożywanie roślin strączkowych są zawarte w nich związki antyodżywcze takie jak lektyny, glikozydy cyjanogenne, fityniany czy inhibitory proteaz. Istnieje jednak wiele sposobów technologicznych, do których należy obłuskiwanie, moczenie, gotowanie w różnych temperaturach, ogrzewanie mikrofalowe, autoklawowanie czy fermentacja (Luo i Xie, 2013; Ilwefah i in., 2014; Marston, Khouryeh i Aramouni, 2016), które powodują zmniejszenie ich zawartości. Procesy te mogą także powodować poprawę wartości odżywczej produktów spożywczych lub zwiększać biodostępność związków o właściwościach prozdrowotnych.

Rozwój technologiczny oraz wciąż zwiększające się tempo życia sprawiło, że konsumenci nie mają wystarczająco dużo czasu na przygotowanie pełnowartościowego posiłku, dlatego sięgają po półprodukty lub produkty gotowe do spożycia (tzw. ready to eat lub ready to use) czy przekąski. Jednak wiedza i świadomość konsumentów dotycząca wpływu żywności na zdrowie i samopoczucie wciąż wzrasta, dlatego coraz częściej spożywają oni produkty bogate w składniki bioaktywne lub produkty fortyfikowane. W związku z powyższym podjęto badania dotyczące wpływu procesów technologicznych takich jak fermentacja czy gotowanie w różnych temperaturach, na środki spożywcze o właściwościach potencjalnie hamujących patogenezę zespołu metabolicznego oraz określeniu biologicznej aktywności związków otrzymanych z produktów fortyfikowanych.

4.3.2. Cel naukowy oraz omówienie wyników badań

Hipoteza badawcza przeprowadzonych badań zakłada, że potencjalna aktywność fizjologiczna związków uwolnionych w procesie symulowanego trawienia ze środków spożywczych może być modyfikowana poprzez wybrane procesy technologiczne, a w produktach fortyfikowanych poprzez zawartość wybranych dodatków.

Głównym celem prac stanowiących osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.) jest określenie wpływu wybranych procesów technologicznych na aktywność związków uwalnianych w procesie trawienia środków spożywczych w warunkach *in vitro*, posiadających potencjalne właściwości przeciwdziałających występowaniu zespołu metabolicznego oraz możliwości wykorzystania ich w procesie otrzymywania środków spożywczych o ukierunkowanym oddziaływaniu na organizm człowieka.

Szczegółowe cele pracy obejmują:

1. Określenie wpływu warunków fermentacji nasion grochu, fasoli i bobu na aktywność peptydów uwolnionych po trawieniu *in vitro* posiadających potencjalne właściwości przeciwdziałania występowaniu zespołu metabolicznego.
2. Charakterystyka frakcji białkowych oraz ich ocena jako prekursorów biologicznie aktywnych peptydów otrzymanych z ziarna prosa z uwzględnieniem obróbki termicznej nasion oraz nasion fasoli adzuki.
3. Badanie wpływu suplementacji chleba mąką z ziaren zielonej kawy i wafli mąką z fermentowanych nasion fasoli na potencjał odżywczy produktów oraz aktywność biologiczną hydrolizatów otrzymanych w wyniku trawienia *in vitro*.

Ad 1. Fermentacja jest jedną z najstarszych metod konserwowania żywności pochodzenia roślinnego, która pozwala na zachowanie wartości odżywczej produktów, poprawia ich strukturę, smak i aromat, strawność składników odżywczych, a także zmniejsza zawartość naturalnie występujących składników toksycznych lub antyodżywczych. W procesie tym stosowane są bakterie, grzyby i drożdże, jednak najczęściej są to bakterie kwasu mlekowego. Oprócz doboru odpowiedniego mikroorganizmu do otrzymania produktu o najwyższych wartościach odżywczych oraz wysokiej zawartości i biodostępności składników funkcjonalnych bardzo istotne są warunki przeprowadzenia procesu. W pracach wchodzących w skład **Osiągnięcia** oceniano wpływ warunków fermentacji nasion grochu (*Pisum sativum*) - praca **O1**, fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) - praca **O3** oraz bobu (*Vicia faba*) - praca **O7** na zawartość peptydów uwolnionych podczas trawienia w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka, badano właściwości biologiczne peptydów oraz określono ich sekwencję aminokwasową. Do procesu fermentacji wybrano bakteryjny probiotyczny szczep *Lactobacillus plantarum* 299v. W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących badania wpływu warunków fermentacji na właściwości otrzymanych produktów z udziałem tego szczepu. Jako czynniki determinujące proces fermentacji przyjęto czas trwania procesu (3 godziny, 3 dni i 7 dni) oraz temperaturę (22 °C, 30 °C i 37 °C). Próbę odniesienia (kontrolę) stanowiły nasiona niepoddane fermentacji. Wszystkie nasiona przed procesem fermentacji moczone przez 12 godzin w wodzie destylowanej, a następnie obłuszczone.

Uzyskane wyniki w pracach **O1**, **O3** i **O7** wskazują, że warunki fermentacji determinują zawartość białek w otrzymanych produktach, co stwierdzono poprzez porównanie intensywności prążków otrzymanych po rozdziale białek nasion fermentowanych i białek nasion kontrolnych. Białka otrzymane w wyniku fermentacji nasion grochu (**O1**) oraz fasoli (**O3**) charakteryzowały się masą

cząsteczkową w zakresie od 14,4 do 116,0 kDa, natomiast białka nasion bobu (**O7**) w zakresie 6,5 do 97 kDa. Zarówno temperatura, jak i czas przeprowadzenia procesu fermentacji różnicowały zawartość białek o masach cząsteczkowych w przedziale 45,0 - 62,0 kDa, a wraz ze wzrostem czasu procesu fermentacji zwiększała się ilość białek niskocząsteczkowych. Wpływ zastosowanych parametrów (czasu i temperatury fermentacji) na zawartość białka w otrzymanych produktach uzależniony był od gatunku rośliny: w nasionach grochu, niezależnie od temperatury, trzygodzinny proces spowodował nieznaczny, nieróżniący się istotnie statystycznie wzrost poziomu białka, a wydłużanie czasu trwania tego procesu spowodowało zmniejszanie ilości tego składnika (**O1**); natomiast dla nasion fasoli niezależnie od warunków fermentacji uzyskano spadek zawartości białka (**O3**). Największy spadek w porównaniu z próbą kontrolną (o 6,00 mg/ml) uzyskano dla nasion fermentowanych w temperaturze 22°C przez 7 dni. W przypadku nasion bobu (**O7**) nie wykazano jednoznacznej zależności pomiędzy czasem trwania procesu, a zawartością białka. Najwyższy spadek (o 3,59 mg/ml) zawartości tego składnika w porównaniu z próbą kontrolną uzyskano dla nasion fermentowanych w temperaturze 22 °C przez 3 dni; natomiast najwyższy wzrost (o 3,09 mg/ml) uzyskano dla nasion fermentowanych w temperaturze 37 °C przez 3 dni. Obniżenie poziomu białka nie we wszystkich przypadkach związane było ze wzrostem poziomu oznaczonych peptydów. W przypadku nasion grochu wykazano zależność między stężeniem peptydów a czasem trwania procesu fermentacji tylko dla prób otrzymanych po fermentacji przeprowadzonej w temperaturze 37°C.

Wyniki uzyskane w pracy **O1** wskazują, że najwyższe stężenie peptydów w produktach otrzymanych po procesie fermentacji nasion grochu oznaczono dla prób uzyskanych po 7 dniach trwania procesu w 30°C, a wartość ta wyniosła 2,06 mg/ml. Wykazano zależność między stężeniem peptydów a czasem trwania procesu fermentacji tylko dla prób otrzymanych po fermentacji w temperaturze 37°C, w których zawartość peptydów malała wraz ze wzrostem czasu procesu. Należy podkreślić, iż stężenie peptydów dla wszystkich prób w pierwszych trzech godzinach trwania procesu wzrosło w porównaniu z próbą kontrolną, a następnie po 3 dniach zmalało. Może wynikać to z faktu, że mikroorganizmy produkują oligopeptydy, a następnie enzymy, które katalizują reakcję hydrolizy tych związków, a kolejno związki te są zużywane przez mikroorganizmy do ich wzrostu.

Natomiast w przypadku fermentacji nasion fasoli (**O3**) wszystkie otrzymane produkty charakteryzowały się wyższą zawartością peptydów w porównaniu do próby kontrolnej. Nie wyznaczono wyraźnej zależności między zawartością peptydów, a czasem i temperaturą trwania procesu. Dla prób otrzymanych w 22°C, zawartość peptydów malała wraz z czasem fermentacji, natomiast dla prób fermentowanych w temperaturze 37°C zawartość peptydów rosła wraz z czasem prowadzenia procesu. Najwyższą zawartość peptydów (2,27 mg/ml) oznaczono dla próby otrzymanej po 7 dniach trwania procesu fermentacji w temperaturze 37°C, która jest optymalną temperaturą do rozwoju *Lactobacillus plantarum*. Otrzymane wyniki wskazują, że warunki te są optymalnymi warunkami do otrzymania peptydów z produktów fermentowanej fasoli.

Po przeprowadzonym procesie fermentacji nasion bobu (**O7**) w temperaturze 22°C i 30°C wykazano, że wraz ze wzrostem czasu prowadzonego procesu zawartość peptydów wzrastała. Natomiast najwyższe stężenie peptydów (1,46 mg/ml) oznaczono dla produktu otrzymanego po fermentacji nasion w temperaturze 37°C przez 3 dni.

Wyniki otrzymane po przeprowadzeniu hydrolizy fermentowanych nasion grochu (**O1**), fasoli (**O3**) oraz bobu (**O7**) w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka (z zastosowaniem α -amylazy, pepsyny oraz pankreatyny) wykazały, że na każdym etapie hydrolizy zawartość peptydów wzrastała, niezależnie od czasu i temperatury procesu fermentacji. Fakt uzyskania wyższego poziomu peptydów po hydrolizie α -amylazą dowodzi połączenia niektórych białek z polisacharydami, a uwolnienie z kompleksów zwiększa ich biodostępność w układzie pokarmowym. Najwyższe stężenie peptydów (3,01 mg/ml) otrzymano w hydrolizatach nasion grochu fermentowanych przez 7 dni w temperaturze 30°C; dla fasoli w hydrolizatach nasion fermentowanych przez 3 godziny w temperaturze 37°C i przez 7 dni w temperaturze 22°C (odpowiednio 3,69 i 3,57 mg/ml); a dla bobu w hydrolizatach nasion fermentowanych przez 7 dni w temperaturze 30°C oraz 3 dni w temperaturze 37°C (odpowiednio 4,78 i 4,65 mg/ml).

Otrzymane wyniki wskazują, że ilość peptydów uwolnionych w procesie trawienia *in vitro* z fermentowanych nasion roślin strączkowych uzależniona jest zarówno od gatunku rośliny jak i warunków przeprowadzenia procesu fermentacji. Gatunek rośliny i warunki procesu fermentacji różnicują także podatność białek nasion na działanie enzymów proteolitycznych. W przypadku hydrolizatów białek nasion grochu (**O1**) najwyższy stopień hydrolizy (DH) oznaczono dla nasion kontrolnych (68,62%), a najmniejszy (17,03%) po hydrolizie produktu po 7 dniach fermentacji w temperaturze 37°C. Natomiast zawartość peptydów o masie cząsteczkowej poniżej 7,0 kDa była najniższa dla próby kontrolnej (19,48 mg/ml). Proces fermentacji obniża więc strawność białek nasion grochu. Natomiast w przypadku nasion fasoli i bobu (**O3** i **O7**) proces fermentacji zwiększył strawność białka. Najwyższy stopień hydrolizy (98,38%) oznaczono dla fasoli po 7 dniach fermentacji w 37 °C, podczas gdy w próbach niefermentowanych wartość ta wyniosła 74,62%. Dla nasion bobu wystarczyła 3- godzinna fermentacja w temperaturze 22°C by uzyskać najwyższy stopień hydrolizy (98,72%). Wydłużanie czasu i podwyższenie temperatury procesu nie powodowało istotnych statystycznie zmian tej wartości. Dla nasion niepoddanych fermentacji stopień hydrolizy białka po procesie ich trawienia wyniósł 58,41%.

Peptydy otrzymane w wyniku trawienia białka muszą zostać wchłonięte do krwiobiegu i dostarczone do celowych miejsc ich wykorzystania. O ich bioprzyswajalności decyduje masa cząsteczkowa, dlatego z otrzymanych hydrolizatów wydzielono peptydy o masie cząsteczkowej mniejszej od 7 kDa w przypadku hydrolizatów otrzymanych z nasion grochu (**O1**) i fasoli (**O3**) oraz masie cząsteczkowej mniejszej od 3,0 kDa w przypadku nasion bobu (**O7**), a ich biologiczne znaczenie wyrażono poprzez oznaczenie zdolności hamowania aktywności enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE), w przypadku fasoli także lipazy i α -amylazy, w przypadku bobu lipazy i

lipooksygenazy. Wykazano, że na te aktywności ma wpływ przeprowadzony proces fermentacji analizowanych nasion. Wyniki zawarte w pracy **O1** wskazują, że najbardziej aktywna jest frakcja peptydowa otrzymana z hydrolizatu nasion grochu fermentowanego przez 7 dni w temperaturze 22°C, dla której uzyskano najniższą wartość IC_{50} peptydowych inhibitorów ACE (0,19 mg/ml). W przypadku nasion fasoli (**O3**) najbardziej korzystna okazała się fermentacja przeprowadzona w temperaturze 30°C przez 3 dni (IC_{50} = 0,28 mg/ml). Ta sama frakcja okazała się najbardziej efektywnym inhibitorem aktywności lipazy IC_{50} = 1,19/ml. Natomiast najsilniejsze właściwości inhibitorowe wobec α -amylazy wykazywała frakcja uzyskana po fermentacji w 22°C przez 3 godziny (IC_{50} = 1,94 mg/ml). Z kolei w przypadku nasion bobu (**O7**) najwyższą zdolność hamowania aktywności enzymu konwertującego angiotensynę I wykazała frakcja uzyskana po fermentacji przez 3 dni w temperaturze 30°C (IC_{50} = 1,01 mg/ml); ta sama frakcja najefektywniej neutralizowała wolne rodniki ABTS (IC_{50} = 0,99 mg/ml). Natomiast frakcja uzyskana z nasion fermentowanych przez 3 godziny w temperaturze 22°C była najaktywniejszym inhibitorem lipooksygenazy (IC_{50} = 0,54 mg/ml), a lipazy (IC_{50} = 0,92 mg/ml) frakcja nasion fermentowanych przez 3 dni w temperaturze 37°C.

Kolejnym etapem badań było oczyszczanie peptydów o najwyższych właściwościach potencjalnie przeciwdziałających występowaniu zespołu metabolicznego z zastosowaniem różnych technik chromatograficznych (sączenia molekularnego, HPLC) oraz ich identyfikacja z zastosowaniem techniki LC-MS/MS. Po rozdziale na złożu Sephadex G10 najaktywniejszej frakcji peptydowej z grochu otrzymano dwie frakcje, z których pierwsza wykazywała silniejsze właściwości inhibitorowe wobec ACE (IC_{50} = 64,04 μ g/ml). Zidentyfikowano w niej peptyd o sekwencji KEDDEEEQGE i masie cząsteczkowej 1593,58 Da (**O1**). Frakcja peptydowa najbardziej aktywna wobec ACE i lipazy otrzymana z nasion fasoli (**O3**) uległa rozdziałowi na cztery frakcje. Czwarta wykazała największe właściwości inhibitujące, a zidentyfikowane w niej peptydy posiadały sekwencję aminokwasową INEGSLLLPH oraz FVVAEQAGNEEGFE. Peptydy te skutecznie hamowały także aktywność α -amylazy, czego nie wykazano dla ich mieszaniny. Rozdziałowi i identyfikacji został poddany także hydrolizat otrzymany z fasoli po 3-godzinnej fermentacji w temperaturze 22°C. Z czterech otrzymanych frakcji trzecia okazała się najbardziej aktywna i zawierała peptydy o następującej sekwencji aminokwasowej: INEGSLLLPH, SGGGGGGVAGAATASR, GSGGGGGGGFGGPRR, GGYQGGGYGG, NSGGGYGNRG, GSGGGGGSSSGRRP oraz GDTVTVFEFDTFLSR (**O3**). Z kolei po rozdziale najbardziej aktywnego hydrolizatu otrzymanego z nasion bobu (fermentowanego przez 3 dni w temperaturze 30°C) uzyskano trzy frakcje peptydowe. Frakcja pierwsza wykazała największy efekt inhibitujący wobec ACE i lipooksygenazy, a także posiadała największe właściwości przeciwdrobnikowe i zawierała peptydy o następującej sekwencji aminokwasowej: DALEPDRIESEGLIETWNPNNRQ, FEEPQQSEQGEGR, GSRQEEDEDEDE, WMYNDQDIPVINNQLDQMPR, RGEDEDDKEKRHSQKGES i RLNIGSSSSPDIYNPQAGR (**O7**).

W dobie stale wzrastającego zainteresowania żywnością jako źródłem substancji aktywnych fizjologicznie, które mają znaczenie w profilaktyce występowania chorób przewlekłych, a także zespołu metabolicznego, wiele badań skierowanych jest na opracowanie receptur otrzymywania środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego i badaniu ich prozdrowotnych właściwości. Jednym z bioaktywnych czynników są peptydy, zarówno obecne w środkach spożywczych jak i powstające w trakcie trawienia pokarmu, szczególnie zasobnego w białko. Poszukiwane są więc nowe możliwości zwiększania potencjału prozdrowotnego żywności. Przedstawione prace udowodniły, że proces fermentacji nasion roślin strączkowych za pomocą *Lactobacillus plantarum* wpływa korzystnie na proces uwolnienia *in vitro* peptydów hamujących aktywność enzymów zaangażowanych w patogenezę zespołu metabolicznego. Wykazano, że czas i temperatura fermentacji determinują ten proces, dlatego należy zoptymalizować jego warunki zgodnie ze specyficzną aktywnością peptydów. Fermentowane nasiona lub otrzymane z nich frakcje peptydowe mogą być wykorzystywane do produkcji żywności funkcjonalnej, takiej jak przekąski co zostało przetestowane (**O5**), a wyniki otrzymanych eksperymentów zostaną omówione w dalszej części autoreferatu.

Ad. 2. Właściwości prozdrowotne żywności uzależnione są od właściwości surowca, metody jego obróbki oraz sposobu i czasu przechowywania produktu. Gotowanie jest jedną z głównych i najpopularniejszych technik stosowanych w technologii żywności, a obecnie coraz częściej wykorzystywane są metody ogrzewania niskotemperaturowego w nowoczesnych technikach gotowania i projektowaniu żywności. Warunki przygotowania produktu, takie jak czas, temperatura czy wartość pH, mają istotny wpływ na wartość odżywczą i właściwości żywności, jednak wiele opracowań naukowych poświęconych jest głównie badaniu wpływu temperatury na jakość przygotowania różnego rodzaju mięsa. Generalnie brak jest danych dotyczących wpływu temperatury na profil białkowy oraz właściwości hydrolizatów otrzymanych po trawieniu w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka żywności pochodzenia roślinnego zasobnej w białko.

Ziarna prosa są zbożem używanym do przygotowania żywności w wielu kulturach na całym świecie. Proso należy do zbóż bezglutenowych, jest dobrym źródłem białka zawierającego wysoką zawartość niezbędnych aminokwasów, zwłaszcza aminokwasów siarkowych takich jak metionina i cysteina oraz kwasów tłuszczowych, błonnika pokarmowego i witamin. Spożywane jest najczęściej w postaci kaszy jaglanej lub mąki dodawanej do dań lub wypieków. Badania wskazują, że spożywanie prosa wpływa na regulację ciśnienia krwi i poziom cholesterolu, zapobiega występowaniu chorób serca i układu krążenia.

Celem pracy **O6** realizowanej w ramach projektu nr **IP2015 026174** pt.: „Charakterystyka peptydów uwalnianych z prekursorowych białek prosa w aspekcie ich aktywności fizjologicznej w chorobach zespołu metabolicznego” finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach konkursu Iuventus Plus V, było określenie wpływu temperatury ogrzewania (65 i

100°C) ziarniaków prosa na profil poszczególnych frakcji białkowych (albumin, globulin 7S, globulin 11S, prolamin i glutelin) oraz zawartość peptydów w hydrolizatach otrzymanych po ich trawieniu *in vitro*. Próbę kontrolną stanowiły ziarna prosa niepoddane obróbce termicznej.

Analiza elektroforegramu białek prosa (wykonanego techniką SDS-PAGE) wykazała, że temperatura obróbki nasion miała wpływ na profil białkowy, co obrazowane było ilością i intensywnością prążków. Najwięcej prążków uzyskano dla frakcji albumin próby kontrolnej, najmniej dla wszystkich frakcji białkowych otrzymanych z ziaren prosa poddanych obróbce w temperaturze 100°C. Globuliny 7S (niezależnie od temperatury obróbki) posiadały masę cząsteczkową w zakresie od 6,5 do 70,0 kDa, a globuliny 11S z ziaren nieogrzewanych i poddanych ogrzewaniu w 65°C - od 6,5 do 70 kDa, a ogrzewanych w 100°C w zakresie 6,5 do 20,0 kDa. Prolaminy natomiast scharakteryzowano jako białka o niskiej masie cząsteczkowej - poniżej 20,0 kDa. Oznaczanie masy cząsteczkowej gluteliny było utrudnione z uwagi na brak wyraźnych prążków na elektroforegramie. Zaobserwowano białko o masie cząsteczkowej około 45 kDa tylko dla próby kontrolnej i próbach z obróbki ziarna w temperaturze 65°C.

Wyniki hydrolizy otrzymanych frakcji białkowych w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka wykazały, że najwyższą zawartość peptydów uzyskano po hydrolizie albumin, w tym z nasion niepoddanych obróbce termicznej (2,03 mg/ml). Z kolei najuboższe w peptydy były hydrolizaty globulin 11S, a wśród nich najmniejszą zawartość peptydów (0,09 mg/ml) oznaczono w otrzymanych z ziaren ogrzewanych w 65°C. W celu określenia aktywności fizjologicznej oznaczono zdolność hamowania aktywności cyklooksygenazy (formy 1 i 2), lipooksygenazy i lipazy pankreatynowej, enzymów biorących udział w powstawaniu stanów zapalnych i otyłości organizmu. Obróbka termiczna nasion owsa spowodowała wzrost zdolności inhibitorowej hydrolizatów poszczególnych frakcji białka owsa, wśród których najmniej aktywna okazała się frakcja albumin. Po oddzieleniu ze wszystkich hydrolizatów frakcji peptydowej o masie cząsteczkowej poniżej 3,0 kDa udokumentowano, że otrzymana frakcja z globuliny 7S ziaren ogrzewanych w 65 °C charakteryzowała się najwyższą aktywnością hamującą COX-1 i COX-2 (wartości IC₅₀ wyniosły odpowiednio 0,08 i 0,12 mg/ml), a otrzymana z prolamin nasion ogrzewanych w 100°C okazała się najaktywniejsza wobec LOX (IC₅₀ = 0,14 mg/ml). Natomiast najwyższą aktywnością hamowania lipazy trzustkowej (IC₅₀ = 0,03 mg/ml) charakteryzowała się frakcja z prolaminy nasion ogrzewanych w 65°C. Analiza składu aminokwasowego tych najbardziej aktywnych frakcji wykazała, że zawierają one wysokie poziomy glicyny. Największe różnice zawartości uzyskano dla kwasu asparaginowego i asparaginy - we frakcji prolamin otrzymanej po obróbce ziaren w 100°C otrzymana wartość była ponad dwu- i czterokrotnie wyższa, natomiast frakcja ta zawierała ok. 2-krotnie mniej glicyny (**O7**).

Jako źródło aktywnych peptydów przebadano także frakcje białka fasoli odm. adzuki (**O2**), otrzymane z nich hydrolizaty w warunkach symulujących przewód pokarmowy oraz wyizolowane z nich potencjalnie bioprzyswajalne peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 7,0 kDa. Najwyższą zawartość peptydów uzyskano po każdym etapie trawienia albumin, najniższą w trakcie

symulowanego trawienia prolamin. Również poziom bioprzyswajalnych peptydów był najwyższy we frakcji wyizolowanej z albumin (50,69 mg/ml), natomiast stopień hydrolizy był najwyższy (47,04 %) dla frakcji glutein. Stwierdzono, że peptydy otrzymane z frakcji prolamin charakteryzowały się najwyższą aktywnością inhibitorową wobec ACE ($IC_{50} = 0,17$ mg/ml) oraz przeciwrodnikową - wartość IC_{50} wobec ABTS dla tej frakcji wynosiła 0,06mg/ml, wobec DPPH 0,02 mg/ml, wartość IC_{50} dla chelatowania jonów żelaza (II) - 2,52 mg/ml, natomiast chelatowania jonów miedzi (II) - 0,85 mg/ml. Dobre właściwości przeciwutleniające wykazały peptydy otrzymane po trawieniu globulin i surowego ekstraktu. Te ostatnie wykazały najsłabsze działanie hipotensyjne ($IC_{50} = 21,18$ mg/ml).

Uzyskane wyniki dokumentują, że w wyniku hydrolizy białek zbóż czy roślin strączkowych uwalniane są peptydy o specyficznej aktywności biologicznej, która może mieć znaczenie w profilaktyce chorób zespołu metabolicznego. Dlatego istotny jest wybór takiego źródła białka, które po hydrolizie w przewodzie pokarmowym dostarczy organizmowi peptydów bioprzyswajalnych, a jednocześnie wykazujących ukierunkowaną aktywność fizjologiczną.

Ad.3. W dobie stale wzrastającej świadomości konsumenta o znaczeniu diety dla prawidłowego funkcjonowania organizmu przy jednoczesnym wzroście tempa życia poszukiwana jest żywność wygodna, ale zawierająca jednocześnie fizjologicznie czynne składniki, taka jak pieczywo, batony, herbatniki czy wafle wzbogacane w składniki bioaktywne. Wychodząc naprzeciw tym oczekiwaniom opracowano recepturę otrzymywania wafli pszennych wzbogaconych mąką fermentowanych nasion fasoli (**O5**) oraz chleba pszennego mąką z ziaren zielonej kawy (**O4**).

Nasiona fasoli fermentowane były przez 3 dni w temperaturze 30 °C z udziałem *Lactobacillus plantarum* 299v, które to warunki zoptymalizowano w pracy **O3**. Wafle pszenne przygotowano z dodatkiem 10%, 20%, 30%, 40%, 50% lub 100% mąki z fermentowanych nasion fasoli (BF), a produktem kontrolnym były wafle bez żadnego dodatku (WF). Wykazano, że wafle przygotowane w 100% BF posiadały najwyższą zawartość bioaktywnych związków takich jak: peptydy (0,79 mg/ml), polifenole (0,46 mg/ml) i białko (0,086 mg/ml) i z tych wafli po procesie hydrolizy w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka została uwolniona największa ilość peptydów. Dla tego wariantu uzyskano również najwyższy stopień hydrolizy (32,81%). Natomiast najwyższą aktywność przeciwrodnikową wobec $ABTS^{++}$ oznaczono dla hydrolizatów wafli z 40% dodatkiem ($IC_{50} = 17,81$ µg/ml), a wobec DPPH[•] w przypadku hydrolizatów z wafli z 30% BF ($IC_{50} = 34,43$ µg/ml). Z kolei hydrolizaty z wafli z dodatkiem 40% i 50% BF wykazały najwyższą aktywność chelatującą Fe^{+2} (4,28 i 4,32 µg/ml - odpowiednio) istotną statystycznie w porównaniu do próby kontrolnej (4,57 µg/ml). Natomiast wartości IC_{50} otrzymane dla tych prób nie wykazywały istotnych różnic statystycznych. Najwyższą aktywność inhibitorową wobec α -glukozydazy wykazały hydrolizaty wafli z 40%, 50% i 100%, a otrzymana dla nich wartość IC_{50} była taka sama i wynosiła 0,14 mg/ml. Aktywność lipazy trzustkowej i ACE najsukuteczniej hamowały frakcje otrzymane po hydrolizie wafli wzbogaconych w 50% i 100% mąki z fasoli osiągając takie same wartości IC_{50} - odpowiednio 0,24 mg/ml i 0,19 mg/ml.

Produkty piekarnicze, szczególnie chleb, są najczęściej spożywaną żywnością na świecie. Charakteryzują się wysoką zawartością błonnika pokarmowego i składników mineralnych oraz niską soli, cukru i tłuszczu. Chleb jest jednym z najbardziej dostępnych na rynku i często podstawowym produktem dla konsumentów, a dostępny jego szeroki asortyment posiada zróżnicowany skład chemiczny. Stanowi więc bardzo dobry obiekt do przeprowadzania modyfikacji jego składu poprzez wzbogacanie w surowce zasobne w bioaktywne składniki. Tak otrzymane produkty wychodzą naprzeciw oczekiwaniom konsumentów świadomych wpływu diety na jakość ich życia i zdrowia

W pracy **O4** oceniano wpływ dodatku sproszkowanych ziaren kawy (w ilości 1, 2, 3, 4 lub 5 g/100g mąki) do chleba pszennego na potencjał odżywczy otrzymanych produktów oraz zdolność hamowania aktywności wybranych enzymów zaangażowanych w patogenezę zespołu metabolicznego. Badania te prowadziłam jako wykonawca projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Opus 5 nr **2013/09/B/NZ9/01801** pt.: „Interakcje i biodostępność kwasu chlorogenowego i ferulowego jako kluczowe czynniki warunkujące aktywność biologiczną wybranych surowców roślinnych”. Zastąpienie mąki pszennej mąką z ziaren kawy znacząco zmniejszyło całkowitą zawartość białka tylko po wprowadzeniu jej w ilości 4 g. Wyróżniki jakości skrobi takie jak: całkowita zawartość skrobi, zawartość skrobi odpornej i strawność skrobi nie różniły się istotnie statystycznie w porównaniu do chleba kontrolnego. Natomiast biodostępność skrobi była znacząco niższa dla chlebów fortyfikowanych 4g i 5 g kawy (odpowiednio: 311,84 i 325,34 mg/g suchej masy), podczas gdy dla chleba kontrolnego wynosiła 392,67 mg/g suchej masy. Chleb wzbogacony mąką z ziaren kawy posiadał wyższy wskaźnik hydrolizy skrobi i potencjalny indeks glikemiczny niż chleb bez ich dodatku, ale zmiany te nie wykazywały różnic statystycznych. W hydrolizatach otrzymanych po przeprowadzeniu procesu trawienia w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego oznaczono zdolność hamowania aktywności enzymów zaangażowanych w patogenezę zespołu metabolicznego takich jak: enzym konwertujący angiotensynę I (ACE), lipaza trzustkowa, α -amylaza oraz α -glukozydaza. Hydrolizaty chlebów wzbogaconych w 4g i 5 g kawy posiadały wyższe zdolności hamowania aktywności ACE, o czym świadczą niższe wartości wskaźnika EC_{50} (w zakresie 1,6-7,77 mg/ml, podczas gdy dla chleba kontrolnego wartość ta wyniosła 17,96 mg/ml). Wszystkie hydrolizaty chleba fortyfikowanego mąką z ziaren kawy wykazywały właściwości hamujące aktywność lipazy trzustkowej, której nie posiadał hydrolizat otrzymany z chleba kontrolnego. Pozwala to stwierdzić, że wzbogacanie chleba o ziarna kawy zwiększa potencjalne właściwości przeciwołyściowe otrzymanego produktu, który może być wykorzystywany w dietach stosowanych przy redukcji masy ciała. Natomiast dodanie ziaren kawy do chleba pszennego nie spowodowało zmian zdolności hamowania aktywności α -amylazy i α -glukozydazy badanych hydrolizatów.

4.3.3. Podsumowanie

Przedstawiony jako **Osiągnięcie** cykl prac stanowi połączenie zagadnień z zakresu peptydomiki, biochemii oraz technologii żywności. Uzyskane wyniki dostarczają nową wiedzę i poszerzają już istniejącą na temat bioaktywnych właściwości środków spożywczych, które mogą być źródłem związków hamujących rozwój zespołu metabolicznego. Przeprowadzone badania wskazały, iż białka roślin poddanych fermentacji lub obróbce cieplnej mogą być prekursorem bioaktywnych peptydów uwalnianych w organizmie w procesie trawienia, ponieważ po przeprowadzeniu takiego procesu w warunkach *in vitro* udowodniono ich zdolność do hamowania aktywności enzymów zaangażowanych w powstawanie tego typu schorzeń.

Biologicznie aktywne peptydy mogą być otrzymywane z różnych źródeł białka, a jak wynika z prac wchodzących w skład **Osiągnięcia** istotny jest wybór takich, z których (po ewentualnej celowej obróbce technologicznej) w wyniku proteolitycznej hydrolizy uwolnione zostaną peptydy posiadające ukierunkowane oddziaływanie fizjologiczne. Wyizolowane i zidentyfikowane peptydy mogą zatem znaleźć wykorzystanie w projektowaniu żywności specjalnego przeznaczenia żywieniowego czy dietetycznej.

Literatura

- Birari, R. B. i Bhutani, K. K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential, *Drug Discovery Today*, 12, 879–889. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.024>
- Bitzur, R., Brenner, R., Maor, E., Antebi, M., Ziv-Baran, T., Segev, S., Sidi, Y. i Kivity, S. (2016). Metabolic syndrome, obesity, and the risk of cancer development. *European Journal of Internal Medicine*, 34, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.08.019>
- Buysschaert, B., Aydin, S., Morelle, J., Hermans, M. P., Jadoul, M. i Demoulin, N. (2016). Weight loss at a high cost: Orlistat-induced late-onset severe kidney disease. *Diabetes and Metabolism*, 42, 62–64. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2015.08.006>
- Cassan, D. i Holopainen-Mantila, U. (2016). Effect of bioprocessing and fractionation on the structural, textural and sensory properties of gluten-free faba bean pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 67, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.032>
- Charlier, C. i Michaux, C. (2003). Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 645–659. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(03\)00115-6](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00115-6)
- Ditlevsen, K., Sandøe, P. i Lassen, J. (2019). Healthy food is nutritious, but organic food is healthy because it is pure: The negotiation of healthy food choices by Danish consumers of organic food. *Food Quality and Preference*, 71, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.06.001>

- El, M. T., El-sharief, M. A. M. S., Zarie, E. S., Morsy, N. M., Elsheakh, A. R., Voronkov, A., Berishvili, V. i Hassan, G. S. (2018). Design, synthesis, anti-inflammatory activity and molecular docking of potential novel antipyrine and pyrazolone analogs as cyclooxygenase enzyme (COX) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28, 952–957. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.01.043>
- Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza, H., Rahmat, A. i Abed, Y. (2017). State of the art paper Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of Medical Science*, 13, 851-863. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>.
- Farhud, D. D. (2015). Impact of Lifestyle on Health. *Iradian Journal of Public Health*, 44(11), 1442–1444.
- García, B. J., Zafrilla Rentero, P., Mulero Cánovas, J., Gómez Jara, P., Leal Hernández, M. i Abellán Alemán, J. (2014). Biochemical and nutritional markers and antioxidant activity in metabolic syndrome. *Endocrinol Nutr*, 61, 302–308. <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-124456>
- García-Lafuente, A., Moro, C., Manchón, N., Gonzalo-Ruiz, A., Villares, A., Guillamón, E., Rostagno, M. i Mateo-Vivaracho, L. (2014). *In vitro* anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chemistry*, 161, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.004>
- Garcia, V., Joseph, G., Shkolnik, B., Ding, Y., Zhang, F. F., Gotlinger, K., Bernstein, K.E. i Schwartzman, M. (2015). Angiotensin II receptor blockade or deletion of vascular endothelial ACE does not prevent vascular dysfunction and remodeling in 20-HETE-dependent hypertension. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309, 71-85. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00039.2015>
- Gawlik-Dziki, U., Durak, A., Jamioł, M. i Świeca, M. (2016). Interactions between antiradical and anti-inflammatory compounds from coffee and coconut affected by gastrointestinal digestion - *In vitro* study. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.076>
- Gunderson, C. C., Ding, K., Dvorak, J., Moore, K. N., McMeekin, D. S. i Benbrook, D. M. (2016). The pro-inflammatory effect of obesity on high grade serous ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 143, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.07.103>
- Gupta, N., Srivastava A. K. i Pandey V. N. (2012). Biodiversity and nutraceutical quality of some Indian millets. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 82, 265–273. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0035-z>
- Hansen, F. K., Khankischpur, M., Tolaymat, I., Mesaros, R., Dannhardt, G. i Geffken, D. (2012). Efficient synthesis and 5-LOX/COX-inhibitory activity of some 3-hydroxybenzo[b]thiophene-2-carboxylic acid derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22, 5031–5034. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.012>
- Houstis, N., Rosen, E.D., i Lander E.S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, 440, 944-948. <http://doi:10.1038/nature04634>
- Ilowefah, M., Chinma, C., Bakar, J., Ghazali, H., Muhammad, K. i Makeri, M. (2014). Fermented brown rice flour as functional food ingredient. *Foods*, 3, 149–159. <https://doi.org/10.3390/foods3010149>

- Lee, I. H., Hung, Y. H. i Chou, C. C. (2008). Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.008>
- Liang, N., Xue, W., Kennepohl, P. i Kitts, D. D. (2016). Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food Chemistry*, 213, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.041>
- Luo, Y. i Xie, W. (2013). Effect of different processing methods on certain antinutritional factors and protein digestibility in green and white faba bean (*Vicia faba* L.). *CyTa- Journal of food*, 11, 43–49. <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.681705>
- Maqsood, M., Ahmed, D., Atique, I. i Malik, W. (2017). Lipase inhibitory activity of *Lagenaria siceraria* fruit as a strategy to treat obesity. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10, 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.010>
- Marston, K., Khouryieh, H. i Aramouni, F. (2016). Effect of heat treatment of sorghum flour on the functional properties of gluten-free bread and cake. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.063>
- Montoya-Rodríguez, A. i de Mejía, E. G. (2015). Pure peptides from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) proteins inhibit LOX-1 receptor and cellular markers associated with atherosclerosis development *in vitro*. *Food Research International*, 77, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.032>
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé, S. M., Silva, A. M. S., Porto, G., Cabrita, E. J., Marques, M.B. i Fernandes, E. (2014). Inhibition of LOX by flavonoids: A structure-activity relationship study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 72, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.030>
- Roberts, C. K. i Sindhu, K. K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, 84, 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.02.026>
- Russo, V., Papa, A. A., Williams, E. A., Rago, A., Palladino, A., Politano, L. i Nigro, G. (2018). ACE inhibition to slow progression of myocardial fibrosis in muscular. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 28, 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2017.12.006>
- Sahebkar, A., Simental-mend, L. E., Kovanen, P. T., Pedone, C., Simental-Mend, M. i Cicero, A. F. G. (2018). Effects of orlistat on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of 27 randomized controlled clinical trials. *Journal of the American Society of Hypertension*, 12, 80–96. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2017.12.002>
- Schneider, C., Pratt, D., Porter, N. i Brash, A. R. (2009). Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chemistry & Biology*, 14, 473–488. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.04.007>
- Srikanthan, K., Feyh, A., Visweshwar, H., Shapiro, J. I. i Sodhi, K. (2016). Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: a panel for early detection, management, and risk stratification in the West Virginian population. *International Journal of Medical Sciences*, 13, 25–38. <https://doi.org/10.7150/ijms.13800>

- Werz, O. i Steinhilber, D. (2005). Development of 5-lipoxygenase inhibitors - Lessons from cellular enzyme regulation. *Biochemical Pharmacology*, 70, 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.018>
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J. i Chen, F. (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase. *Food Chemistry*, 135, 2078–2085. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.088>

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Pracę magisterską dotyczącą charakterystyki esterazy kwasu ferulowego produkowanej przez różne szczepy bakterii *Lactobacillus* wykonałam w Katedrze Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności (obecnie Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka) Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie) pod kierunkiem dr hab. inż. prof. nadzw. Dominika Sz wajgiera. Otrzymane wyniki opublikowano w *Acta Scientiarum Polonorum* i *Technologia Alimentaria* (prace **D1-2**, **D1-5**).

Po rozpoczęciu studiów doktoranckich na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie zostałam włączona w prace Zespołu Katedry Biochemii i Chemii Żywności kierowanej przez prof. dr hab. Barbarę Baraniak (promotor dysertacji doktorskiej), zajmującego się m.in. badaniami z zakresu enzymologii żywności, proteomu nasion roślin strączkowych oraz właściwościami biologicznie czynnych składników żywności pochodzenia roślinnego, w tym (obok metabolitów wtórnych) peptydów. Efektem jest praca **D1-1** opublikowana w *Food Chemistry* dotycząca charakterystyki lipooksygenazy wyizolowanej z nasion grochu odm. Telefon. Równolegle podjęłam prace badawcze związane z charakterystyką biologicznie aktywnych peptydów pochodzących z hydrolizatów białek kielków grochu, których wyniki zostały umieszczone w pracach opublikowanych w *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska*, Sectio, DDD (**D1-3** i **D1-4**).

Tematykę badawczą dotyczącą bioaktywnych peptydów otrzymanych z białek nasion roślin strączkowych kontynuowałam w ramach dysertacji doktorskiej pt.: "Identyfikacja peptydowych inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE) otrzymanych w wyniku hydrolizy białek wybranych roślin", która na wniosek Recenzentów została wyróżniona nagrodą JM Rektora. Badania realizowane w ramach dysertacji doktorskiej były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu promotorskiego pt.: "Izolowanie i charakterystyka inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę I w angiotensynę II z nasion roślin strączkowych" (Nr N N312 234038), którego byłam głównym wykonawcą. Przeprowadzone badania wykazały, że nasiona wybranych roślin strączkowych (grochu, fasoli i soczewicy) stanowią źródło prekursorowych białek, z których w wyniku hydrolizy uwalniane są peptydy o właściwościach hamujących aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE). Wykazano, że frakcja peptydowa (5-F) otrzymana z

globulin soczewicy (praca **D2-3**), hydrolizowanych w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka wykazuje najsilniejsze właściwości hamujące aktywność ACE ($IC_{50} = 1,13$ mg/ml). W oparciu o wykresy Lineweavera-Burka wyznaczono dla niej parametry kinetyczne: K_m (1,24 mM), V_{max} (0,012 U/min), K_i (0,12 mg/ml) i określono typ inhibicji jako niekompetycyjny.

Z zastosowaniem techniki ESI-MS/MS we frakcji tej zidentyfikowano następujące sekwencje peptydów: KLRT, TLHGMV i VNRLM.

Z globulin grochu (praca **D2-6**) poddanych hydrolizie w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka otrzymano frakcję o najwyższych właściwościach hamujących aktywność ACE, dla której wartość IC_{50} wyniosła 73 μ g/ml. Na podstawie wykresów Lineweaver-Burk oznaczone parametry kinetyczne wynosiły: $K_m = 1,16$ mM, $K_i = 0,039$ mg/ml oraz $V_{max} = 0,012$ (U/min), a typ inhibicji określono jako niekompetycyjny. We frakcji tej zidentyfikowano za pomocą techniki ESI-MS/MS następujące peptydy: GGSGNY, DLKLP, GSSDNR, MRDLK i HNTPSR. Inne peptydowe inhibitory ACE pochodzące z białek żywności zostały opisane w pracy przeglądowej **D2-26** oraz w rozdziale monografii **D2-12**.

Biologicznie aktywne peptydy pełnią istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych jako ligandy receptorów, inhibitory enzymów, regulatory czynników wchłaniania jelitowego, antybiotyki czy antyoksydanty. Oprócz korzystnego wpływu na funkcjonowanie organizmu mogą one także wykazywać działanie toksyczne. Tego typu związki są najczęściej odporne na działanie enzymów układu pokarmowego i w niezmienionej formie transportowane przez komórki nabłonkowe dzięki czemu mogą niekorzystnie wpływać na funkcjonowanie organizmu. Peptydy te często różnią się strukturalnie od powstałych z prekursorów białkowych i zawierają aminokwasy niebiałkowe takie jak: β -alanina, kwas γ -aminomasłowy, D-aminokwasy oraz α -alkiloaminokwasy (**D2-22**). Niektóre peptydy uwalniane z glutenu, mieszaniny białek występujących w pszenicy, życie i jęczmieniu, mogą być szczególnie niebezpieczne dla zdrowia, zwłaszcza u osób cierpiących na celiakię, która związana jest z jego nietolerancją. Badania wskazują, że peptydy toksyczne dla osób cierpiących na celiakię uwalniane są z frakcji prolamin, głównie gliadyn. Ze względu na ogromną różnorodność białek glutenu i brak odpowiednich testów, dokładny mechanizm toksyczności i przyczyn występowania choroby jest wciąż niejasny. Wiadomo jednak, że w przewodzie pokarmowym człowieka w wyniku niepełnego trawienia glutenu, ze względu na wysoką zawartość proliny, zmniejszającej aktywność enzymów proteolitycznych, uwalniane są peptydy odporne na działanie enzymów układu pokarmowego biorące udział w patogenezie celiakii. Jednak liczne badania *in vitro* i *in vivo* dotyczące peptydów uwalnianych z prolamin pochodzących z pszenicy, nie wyjaśniają jednoznacznie mechanizmu ich toksyczności (**D2-23**).

Równolegle z powyższymi badaniami wraz z innymi pracownikami Katedry Biochemii i Chemii Żywności zajmowałam się określeniem właściwości przeciwutleniających środków spożywczych wykorzystując różne metody analityczne. Oznaczano zdolność do neutralizowania wolnych rodników z zastosowaniem modelowych związków DPPH i ABTS, chelatowania jonów

żelaza (II) (prace **D1-3**; **D1-4**; **D2-1**; **D2-7**; **D2-18**; **D2-20**; **D2-24**), dodatkowo badano hamowanie peroksydacji lipidów oraz hamowanie aktywności lipoksygenazy (**D2-20**).

W prowadzonych badaniach wykazano, że dobrym źródłem związków o właściwościach przeciwutleniających są napary ziarna kawy (**D2-20**) oraz herbaty (**D2-24**). W wodnych i metanolowych ekstraktach ziaren kawy (**D2-20**) (*Coffea arabica* L.) prażonych techniką tradycyjną pochodzących z Brazylii, Kolumbii, Etiopii i Kenii oraz ziaren kawy pochodzących z Brazylii palonych za pomocą techniki przemysłowej oznaczono zawartość fenoli i kofeiny oraz określono ich właściwości przeciwutleniające. Wyniki pracy wskazują, że ekstrakty metanolowe otrzymane z różnych rodzajów kawy wykazują potencjalne właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające. Natomiast najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazywały ekstrakty otrzymane z nasion kawy palonej tradycyjnie pochodzącej z Kolumbii i Etiopii.

Prowadzone badania zawartości związków polifenolowych wybranych naparów herbat producentów komercyjnych (praca **D2-24**) wskazują, że najwyższą zawartością związków polifenolowych w przeliczeniu na kwas galusowy charakteryzowały się napary otrzymane z herbaty „Saga” (159 mgGAE/100 ml). Jednocześnie napar ten wykazywał najlepszą aktywność przeciwrodnikową wobec DPPH[•] (67,96%) i ABTS^{•+} (98,92%). Nie stwierdzono zależności pomiędzy barwą naparów, a ich zdolnością przeciwrodnikową oraz zawartością związków polifenolowych.

W prawdzie wartość konsumencka świeżych warzyw oceniana jest głównie poprzez ich cechy wizualne, to większe znaczenie mają jej wartości odżywcze i obecność biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych. Na zawartość fitozwiązków wpływa szereg czynników, a do najważniejszych zaliczyć należy genotyp rośliny oraz warunki jej wzrostu. W pracy **D2-2** skoncentrowano się na określeniu wpływu gęstości siewek na zawartość bioaktywnych związków i zdolność przeciwutleniającą gotowych do spożycia trzy- i czterodniowych kielków soczewicy. Wyniki wskazują, że wraz ze wzrostem gęstości hodowli wzrastała zawartość tanin oraz flawonoidów, natomiast gęstość hodowli negatywnie wpływa na masę plonu oraz peroksydację lipidów, dlatego wyróżnik ten odgrywa ważną rolę w projektowaniu jakości gotowego produktu.

Wykazano także, że białka ziarna uprawnych i dzikich gatunków owsa (*Avena sativa* L.) stanowią źródło peptydów o aktywności przeciwutleniających (**D2-1**). Ziarniaki badanych genotypów owsa otrzymano w eksperymencie polowym, zlokalizowanym na polatkach Gospodarstwa Doświadczalnego UP w Lublinie, w Czesławicach koło Nałęczowa przeprowadzonym przez pracowników Instytutu Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin UP w Lublinie.

We współpracy z Wyższą Szkołą Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie prowadziłam także badania dotyczące charakterystyki czosnku jako źródła bioaktywnych związków przeciwdziałających występowaniu różnych chorób. Wykazano, że duże znaczenie ma nie tylko odmiana rośliny, ale także region z jakiego ona pochodzi. Celem pracy opublikowanej w *Polish Journal of Food and Nutrition Science* (**D2-15**) była ocena i porównanie aktywności biologicznej wodnych ekstraktów z dziewięciu odmian czosnku z różnych krajów (Polska, Hiszpania, Chiny, Portugalia, Birma, Tajlandia i

Uzbekistan). Badano właściwości przeciwutleniające oraz wpływ na proliferację fibroblastów skóry. Uzyskane wyniki wykazały, że ekstrakty czosnku pochodzącego z Chin zawierały najwyższą zawartość pochodnych kwasów syringowych i p-hydroksybenzoesowych. Dla ekstraktów tych wyznaczono najniższe wartości IC_{50} wobec DPPH[•], ABTS^{•+} i zdolność chelatowania Cu^{2+} (odpowiednio 4,63, 0,43 i 14,90 $\mu\text{g/ml}$). Ekstrakty z hiszpańskiej odmiany Morado i chińskiego czosnku były wysoce cytotoksyczne w stosunku do ludzkich fibroblastów skóry, ponieważ zmniejszyły proliferację komórkową o 70-90%.

W badaniach dotyczących związków otrzymanych z materiału roślinnego oprócz odmiany rośliny ważnym aspektem jest dobór odpowiednich rozpuszczalników do ekstrakcji bioaktywnych składników. Wyniki pracy (**D2-19**) opublikowanej w *Żywność. Technologia. Jakość* dotyczącej wpływu rozpuszczalnika na skład oraz wybrane biologiczne właściwości ekstraktów z liści pietruszki zwyczajnej (*Petroselinum crispum* Mill), dowodzą, że z testowanych rozpuszczalników (woda, etanol, glicerol-woda, glikol-woda) najbardziej efektywnym ekstrahentem związków fenolowych jest rozpuszczalnik glikolowo-wodny. Ten ekstrakt w największym stopniu neutralizował rodnik DPPH[•] ($IC_{50} = 6,89 \mu\text{g/ml}$), natomiast ekstrakt wodny – kationorodnik ABTS^{•+} ($IC_{50} = 31,44 \mu\text{g/ml}$). Zastosowanie rozpuszczalnika nie miało istotnego wpływu na zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} . Natomiast ekstrakty: etanolowy oraz wodny wykazywały najwyższą cytotoksyczność w warunkach *in vitro* w stosunku do ludzkiej linii komórkowej BJ (ATCC CRL-2522).

Innym obszarem badawczym realizowanym podczas mojej pracy jest badanie wpływu różnych procesów technologicznych, którym poddawane są nasiona roślin strączkowych, na aktywność przeciwutleniającą hydrolizatów oraz frakcji peptydowych otrzymanych z ich białek. Do najczęstszych metod obróbki nasion należy gotowanie. Jak wskazują wyniki badań opublikowanych w pracy **D2-7** gotowanie nasion ciecierzycy wpływa na aktywność biologiczną peptydów uzyskanych w wyniku trawienia *in vitro* w warunkach symulujących przewód pokarmowy poprzez zmiany ich właściwości przeciwutleniających oraz oddziaływanie na fibroblasty skóry. Badania te zostały zrealizowane we współpracy z Katedrą Zdrowia Publicznego, Dietetyki i Chorób Cywilizacyjnych Wyższej Szkoły Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie. Najwyższą aktywność przeciwrodnikową wobec ABTS^{•+} wyrażoną jako wartość IC_{50} obserwowano dla frakcji peptydowej o masie cząsteczkowej w zakresie 3,5- do 7-kDa otrzymanej z hydrolizatu nasion gotowanych (41,01 $\mu\text{g/ml}$). Frakcja ta wykazała również najwyższą aktywność stymulującą wzrost fibroblastów skóry BJ (ATCC CRL-2522).

Wpływ obróbki cieplnej na uwalnianie peptydów przeciwutleniających uzyskanych w wyniku hydrolizy żółtej fasoli szparagowej oraz hydrolizatów izolatów białkowych z niej otrzymanych było celem pracy **D2-18**. Wyniki pokazują, że obróbka cieplna powodowała zarówno zwiększoną zawartość peptydów, jak i ich aktywność przeciwutleniającą po hydrolizie pepsyną białka fasoli szparagowej. Hydrolizaty otrzymane z surowych i poddanych obróbce cieplnej ziaren wykazywały lepsze właściwości przeciwutleniające niż izolaty białkowe z nich otrzymane.

Na jakość produktu mają wpływ także warunki przechowywania żywności. W pracy opublikowanej w *Food Chemistry* (**D2-10**) po raz pierwszy przedstawiono wyniki badań wpływu traktowania ozonem owoców papryki oraz warunków przechowywania na ich jakość. Najwyższy udział głównych flawonoidów papryki: 3-O-ramnozydu kwercetyny i 3-O-ramnozydu 7-O-glukozydu kwercetyny oznaczono dla papryki traktowanej ozonem przez 3 godziny i przechowywanej przez 20 dni w warunkach chłodniczych. Traktowanie owoców ozonem spowodowało spadek aktywności amoniako-liazy L-feniloalaninowej oraz amoniako-liazy tyrozynowej z jednoczesnym zwiększeniem aktywności oksydazy polifenolowej i oksydazy gwajakolowej, co wskazuje na udział tych enzymów w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

Innym czynnikiem modyfikującym walory sensoryczne produktu roślinnego i metabolizm wtórny jest zastosowanie dodatkowych związków chemicznych podczas wzrostu rośliny. W pracy **D2-5** opublikowanej w *Food Chemistry* przedstawiono zmiany zawartości związków fitochemicznych, aktywności przeciwrodnikowej i jakości sałaty spowodowane zastosowaniem jako elicytorów kwasu arachidonowego (AA), kwasu jasmonowego (JA) i kwasu abscysynowego (ABA) w różnym stężeniu. Elicytacja spowodowała wzrost stężenia chlorofilu a (1 μM i 100 μM AA, 50 μM ABA); chlorofilu b (100 μM AA); karotenoidów (100 μM AA, 1 μM JA i 100 μM ABA) i witaminy C (100 μM AA, 100 μM JA), natomiast zastosowanie JA w stężeniu 1 μM i 100 μM indukował wzrost stężenia związków fenolowych, w tym flawonoidów i kwasów fenolowych. Najwyższą aktywność przeciwrodnikową wobec DPPH $\cdot$ odnotowano dla roślin otrzymanych po zastosowaniu 100 μM AA i 100 μM JA. Należy podkreślić, że elicytacja nie zmieniła jakości sensorycznej sałaty, dlatego metoda ta może być stosowana do poprawy właściwości produktu bez utraty jej jakości sensorycznej.

W tematykę dotyczącą wpływu różnych procesów technologicznych oraz indukcji metabolizmu roślin na jakość żywności wpisują się także badania zrealizowane we współpracy z Państwową Wyższą Szkołą Zawodową w Chełmie, Uniwersytetem Przyrodniczo-Humanistycznym w Siedlcach oraz Katedrą Eksploatacji Maszyn i Zarządzania UP w Lublinie czego wynikiem są prace **D2-11** oraz **D2-14** obejmujące ocenę wpływu zastosowania biostymulatorów roślin na wartość odżywczą fasoli. Badania dotyczyły uprawy dwóch odmian fasoli (Toska i Aura) z zastosowaniem preparatu Atonik opartego na związkach należących do grupy nitrofenoli (**D2-11**) oraz preparatu Kelpak (ekstrakt z alg *Ecklonia maxima*) – **D2-14**. Podwójna aplikacja 0,1% roztworu stymulatora spowodowała istotnie zwiększenie zawartości związków fenolowych w nasionach fasoli odmiany Toska, podczas gdy wszystkie zastosowane metody nie wywołały istotnych zmian w zawartości tych bioaktywnych związków w nasionach fasoli odmiany Aura (**D2-11**).

Podczas prac prowadzonych w ramach projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. ”Synbiotyki otrzymane na bazie kiełków roślin strączkowych - badania bezpieczeństwa, jakości odżywczej i prozdrowotnej w aspekcie biodostępności i bioprzyswajalności w modelowych układach *in vitro* oraz *in vivo*” (nr 2015/17/B/NZ9/0179), którego jestem wykonawcą, dokonano oceny wpływu wykorzystania żywych i martwych kultur *Lactobacillus rhamnosus* na

indukcję metabolizmu w kiełkach soczewicy jadalnej. Otrzymane wyniki wskazują (**D2-26**), że dodatek żywych i martwych bakterii *L. rhamnusus* spowodował istotne zwiększenie zawartości skrobi w 4-dniowych kiełkach oraz istotny spadek zawartości białka w 4 i 6-dniowych kiełkach. Natomiast dla wszystkich badanych prób nie wykazano istotnych różnic potencjału przeciwutleniającego i redukcyjnego w porównaniu do próby kontrolnej.

Moje zainteresowania badawcze dotyczące właściwości biologicznych żywności rozszerzyłam o problem fortyfikacji żywności w celu zwiększenia jej potencjału prozdrowotnego, czego wynikiem są prace wchodzące w skład **Osiągnięcia**, a także publikacja **D2-4**. W pracy tej przedstawiono nowe zastosowanie pulpy z dyni, często traktowanej jako produkt odpadowy, w produkcji chleba pszennego. Zwiększenie dodatku pulpy dyni od 5 do 20% (w przeliczeniu na suchą masę) spowodowało zmniejszenie objętości chleba i wzrost twardości i spoistości miękiszu. Właściwości sensoryczne chleba takie jak smak, aromat i ogólna akceptowalność z dodatkiem pulpy nie uległy zmianie w porównaniu z chlebem kontrolnym. Wyniki wskazują, że pulpa dyni zastosowana jako dodatek do chleba zwiększa potencjalną biodostępność związków fenolowych oraz peptydów, a produkty wzbogacone charakteryzują się wyższymi właściwościami inhibitorowymi ACE.

Żywność może być także źródłem składników, które mogą znaleźć zastosowanie w produkcji kosmetyków. Wyniki badań opublikowanych w *Molecules* (**D2-8**) wskazują na zastosowanie ekstraktów stewii nie tylko w przemyśle spożywczym, ale także kosmetycznym, ze względu na właściwości przeciwutleniające oraz korzystny wpływ na komórki fibroblastów skóry

Kolejnym moim obszarem badawczym jest wykorzystanie owadów jadalnych jako niekonwencjonalnego źródła białka oraz określenie biologicznie aktywnych peptydów pozyskanych z białek różnych gatunków owadów (**D2-9, D2-13, D2-25**).

Celem pracy **D2-9** opublikowanej w *Food Research International* było określenie wartości odżywczej jadalnych owadów: świerszcza bananowego (*Gryllodes sigillatus*), mącznika (*Tenebrio molitor*) i szarańczy (*Schistocerca gregaria*) surowych, poddanych pieczeniu i gotowaniu oraz określenie ich właściwości cytotoksycznych *in vitro*. Zawartość białka w zależności od gatunku wahała się od 52,35 do 76%, tłuszczu w zakresie 12,97-24,7%, a wartość energetyczna wynosiła od 1821 do 1896 kJ/100 g. Wszystkie badane gatunki były zasobne w magnez, miedź, żelazo i cynk, a zawartość minerałów była porównywalna do zalecanego dziennego spożycia (mg/dzień). Najwyższy stopień hydrolizy (DH) oznaczono dla hydrolizatu otrzymanego z pieczonego świerszcza (37,76%). Hydrolizaty z surowych, gotowanych i pieczonych owadów istotnie hamowały proliferację fibroblastów ludzkiej skóry CRL-2522.

Wykazano także, że niektóre gatunki owadów jadalnych w tym *Annulipes Amphiacusta* czy szarańcza wędrowna (*Locusta migratoria*) charakteryzują się wysokimi właściwościami przeciwutleniającymi (**D2-13**). Owady w diecie człowieka jako niekonwencjonalne źródło białka zostały scharakteryzowane w rozdziale monografii **D2-25**.

Badania dotyczące roli enzymów takich jak peroksydaza, oksydaza polifenolowa, chitynaza, β -1,3 glukanaza w reakcji obronnej roślin przed szkodnikami owadziemi prowadzono we współpracy z Zakładem Entomologii UP w Lublinie. Wyniki pracy opublikowanej w *Bulletin of Entomological Research* (D2-16) wskazują, iż szkodniki owadzie w zależności od gatunku owadów z rodziny galaskówatych (*Cynips quercusfolii* L., *Neuroterus numismalis* (Fourc.) i *N. quercusbaccarum* L.) indukowały produkcję enzymów obronnych oraz związków fenolowych w liściach dębów. Ponadto badano wpływ etapów rozwoju galasów na zawartość białka, cukrów redukujących, związków polifenolowych oraz aktywność chitynazy i β -1,3 glukanazy w reakcji obronnej wiązu syberyjskiego (*Ulmus pumila*), co może sugerować, iż owady *Tetraneura ulmi* z rodziny mszycowatych modulują metabolizm rośliny żywicielskiej. Wykazano znacznie wyższą zawartość białka w początkowym okresie powstawania galasów oraz wysoką aktywność enzymów ochronnych w dojrzałych galasach, co może sugerować, że *Tetraneura ulmi* może modulować procesy biochemiczne rośliny żywicielskiej dla własnych potrzeb (D2-17).

Istnieje wiele prac naukowych dotyczących oznaczenia zawartości i aktywności biologicznej związków znajdujących się w żywności, jednak nie zawsze odzwierciedlają one wpływ badanych związków na organizm ludzki. Podczas trawienia składników żywności może dochodzić do wielu zmian, które modyfikują ich strukturę przez co zmieniają ich biodostępność i bioprzyswajalność. Praca przeglądowa opublikowana w *International Journal of Food Science and Technology* (D2-12) przedstawia najnowsze dane dotyczące czynników determinujących strawność, biodostępność oraz aktywność biologiczną związków pochodzenia roślinnego.

Podsumowując, w okresie zatrudnienia w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie prowadzone przeze mnie badania dotyczą:

- wpływu procesów technologicznych na zawartość i aktywność biologicznie czynnych składników żywności,
- modyfikowania aktywności enzymów przez wybrane składniki żywności,
- oznaczenia właściwości biologicznych hydrolizatów otrzymanych z białek roślin,
- zastosowania fortyfikacji w celu zwiększenia jakości nutraceutycznej żywności,
- badanie owadów jadalnych jako alternatywnego źródła białka i biologicznie aktywnych peptydów.

Mój dorobek naukowy, łącznie z pracami uwzględnionymi w cyklu publikacji powiązanych tematycznie stanowiących **Osiągnięcie** naukowe, obejmuje autorstwo lub współautorstwo 31 oryginalnych prac naukowo-badawczych, 1 opracowanie przeglądowe, 1 rozdział w podręczniku akademickim, 1 monografię naukową, 5 rozdziałów w monografii oraz 37 komunikatów naukowych. Suma punktów wg list MNiSW za publikacje naukowe łącznie z osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, zgodna z rokiem opublikowania wynosi **864**

pkt, IF: **57,229**. Łączna suma punktów prac wchodzących w skład **Osiągnięcia** wynosi **260** pkt; IF: **20,796**.

Wszystkie szczegółowe informacje dotyczące wykazu opublikowanych prac naukowych przedstawiłam w załączniku V.

6. Zestawienie dorobku

Wskaźniki naukometryczne mojego dorobku naukowego (łącznie z osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego)

Lp.	Rodzaj publikacji	Liczba publikacji			IF ^a	Punkty MNiSW ^b	
		Przed doktoratem	Po doktoracie	Ogółem			
1	Oryginalne prace twórcze	Prace indeksowane w bazie JCR	1	24	25	57,229	754
		Prace opublikowane w czasopismach nieindeksowanych w bazie JCR	4	3	7	-	70
2		Monografie naukowe	0	1	1	-	20
3		Publikacje niepunktowane	0	1	1	-	-
4		Rozdziały w monografiach naukowych	0	5	5	-	20
5		Rozdziały w podręcznikach	0	1	1	-	-
6	Komunikaty naukowe	Konferencje zagraniczne i międzynarodowe	0	9	9	-	-
		Konferencje krajowe	4	24	28	-	-
Dorobek publikacyjny ogółem			9	68	77	57,229	864

W tym oryginalne prace twórcze wchodzące w skład Osiągnięcia

	7	20,796	260
--	---	--------	-----

^a- obowiązujący w roku opublikowania (w przypadku publikacji z 2019 przyjęto wartość IF wyliczoną dla roku 2018)

^b- zgodnie z listą czasopism punktowanych z roku opublikowania

Liczba cytowań publikacji według bazy:

- Web of Science (na dzień 20.02.2019): 301 (bez autocytowań: 269)

- Scopus (na dzień 20.02.2019): 387 (bez autocytowań: 345)

Indeks Hirscha według bazy:

- Web of Science: 9 (na dzień 20.02.2019)

- Scopus: 11 (na dzień 20.02.2019)

Lp.	Nazwa czasopisma	L-ba publikacji	IF	Pkt MNiSW
1	Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus	2	0,970	40
2	Acta Scientiarum Polonorum s. Technologia Alimentaria	4	0	43
3	Annales UMCS s. DDD	2	0	14
4	BioMed Research International	1	1,579	30
5	Bulletin of Entomological Research	1	1,721	35
6	CyTa – Journal of Food	1	1,371	20
7	Food Chemistry	5	17,584	184
8	Food Research International	2	6,702	80
9	Food Technology and Biotechnology	1	0,920	25
10	International Journal of Food Science and Technology	4	7,624	100
11	Molecules	1	2,465	30
12	LWT – Food Science and Technology	3	9,387	120
13	Polish Journal of Food and Nutrition Sciences	1	1,697	15
14	Saudi Journal of Biological Sciences	1	3,138	25
15	Scientia Horticulturae	1	1,760	35
16	Żywność. Nauka. Technologia. Jakość	2	0,311	28
17	Monografie naukowe	1	0	20
18	Rozdziały w monografiach naukowych	5	0	20
19	Rozdziały w podręcznikach akademickich	1	0	0
SUMA:		39	57,229	864

IF- wartość IF obowiązujące w roku opublikowania (w przypadku publikacji z lat 2018-2019 przyjęto wartość IF wyliczoną dla 2018 roku)

Pkt MNiSW - punkty zgodnie z rokiem publikacji

Lublin, dn. 20.02.2019 r.

