



**WYDZIAŁ  
NAUK O ŻYWNOŚCI  
I BIOTECHNOLOGII**

dr Monika Karaś  
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.....	22
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych .....	25
6. Zestawienie dorobku .....	41

## 1. Dane osobowe

---

Imię i nazwisko: Monika Karaś

Miejsce pracy: Katedra Biochemii i Chemii Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

## 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

---

- **2004** dr nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia – specjalność: biochemia i chemia żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Rolniczy.
- **1996** mgr chemii, specjalność: ochrona środowiska, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Chemii.

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

---

**2004 – obecnie** adiunkt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Katedra Biochemii i Chemii Żywności

**1996–2004** 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 ośmiu publikacji naukowych ujętych pod wspólnym tytułem:

**„Hydrolizaty białkowe wybranych roślin i owadów jako źródło bioaktywnych peptydów w żywieniu człowieka”**

### 4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia

---

**O1. Karaś M., Jakubczyk A., Baraniak B. (2010):** Antiradical and antihypertensive activity of peptides obtained from proteins pea sprouts (*Pisum Sativum* L.) by enzymatic hydrolysis, *Annales UMCS, Sectio DDD, Pharmacia*, 23(3), 115-121.

**(MNiSW= 9 pkt; liczba cytowań wg WoS=0, Scopus=4)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących wyhodowania kielków nasion grochu, przeprowadzenia*

procesu hydrolizy, oznaczeniu zawartości peptydów, wykonaniu rozdziału chromatograficznego oraz części oznaczeń dotyczących właściwości przeciwdrobnikowych wobec ABTS<sup>+</sup> i inhibitorowych wobec enzymu konwertującego angiotensynę I, analizie i interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

**O2.** Jakubczyk A., Karaś M., Baraniak B. (2011): Antihypertensive and antioxidative activity of peptides derived from pea sprouts (*Pisum sativum* L.) protein hydrolysates, *Annales, Sectio DDD, Pharmacia*, 24(3), 175-182.

**(MNiSW= 7 pkt; liczba cytowań wg WoS=0, Scopus=3)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących wyhodowania kielków nasion grochu, przeprowadzenia procesu hydrolizy, oznaczeniu zawartości peptydów, wykonaniu rozdziału chromatograficznego oraz części oznaczeń dotyczących właściwości przeciwutleniających (aktywności przeciwrodnikowej wobec ABTS<sup>+</sup>, chelatowania jonów Fe<sup>2+</sup>) inhibitorowych wobec enzymu konwertującego angiotensynę I, analizie i interpretacji wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

**O3.** Karaś M., Jakubczyk A., Paczos-Grzęda E. (2013): Właściwości przeciwutleniające hydrolyzatów białek z ziarna uprawnych i dzikich gatunków owsa (*Avena* L.). *Żywność. Nauka Technologia. Jakość*, 6 (91), 106-117.

**(MNiSW= 15 pkt; IF= 0,311\*, 0,295\*\*; liczba cytowań wg WoS=1, Scopus=1)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących hydrolizy enzymatycznej, przeprowadzenia rozdziału białek techniką SDS-PAGE i analizie mas cząsteczkowych białek, oznaczeniu zawartości peptydów, wykonaniu części oznaczeń dotyczących właściwości przeciwutleniających (aktywności przeciwrodnikowej wobec ABTS<sup>+</sup>, chelatowania jonów Fe<sup>2+</sup>), analizie i interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

**O4.** Karaś M., Jakubczyk A., Szymanowska U., Materska M., Zielińska E. (2014): Antioxidant activity of protein hydrolysates from raw and heat-treated yellow string beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(4), 385-391.

**(MNiSW= 10 pkt; liczba cytowań wg WoS=0, Scopus=5)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących hydrolizy enzymatycznej, przeprowadzenia oznaczeniu zawartości peptydów, właściwości przeciwutleniających (aktywności przeciwrodnikowej wobec ABTS<sup>+</sup> i DPPH<sup>\*</sup>, chelatowania jonów Fe<sup>2+</sup>), analizie i interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

**O5. Karaś M.,** Baraniak B., Rybczyńska K., Gmiński J., Gawel-Bęben K., Jakubczyk A. (2015): The influence of heat treatment of chickpea seeds on antioxidant and fibroblast growth stimulating activity of peptide fractions obtained from proteins digested under simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 50 (9), 2097–2103.

**(MNiSW= 25 pkt., IF= 1,504\*, 1,655\*\*; liczba cytowań wg WoS=8, Scopus=10)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących przeprowadzenia hydrolizy białek nasion ciecierzycy w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka, oznaczenia zawartości peptydów, części oznaczeń dotyczących właściwości przeciwutleniających (aktywności przeciwrodnikowej wobec ABTS<sup>+</sup> i DPPH<sup>•</sup>, chelatowania jonów Fe<sup>2+</sup>, siły redukcji), analizie i interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

**O6. Zielińska E., Karaś M.,** Jakubczyk, A. (2017): Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *International Journal of Food Science and Technology*. 52(2), 306-312.

**(MNiSW= 25 pkt; IF: 2,383\*; liczba cytowań wg WoS=7, Scopus=8)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonaniu części doświadczeń dotyczących przeprowadzenia hydrolizy białek wybranych owadów w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka, oznaczenia zawartości peptydów, części oznaczeń dotyczących właściwości antyoksydacyjnych (aktywności przeciwrodnikowej wobec ABTS<sup>+</sup> i DPPH<sup>•</sup>, przeprowadzeniu analizy danych, interpretacji wyników, napisaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%.*

**O7. Karaś M.** (2018). Influence of physiological and chemical factors on the absorption of bioactive peptides. *International Journal of Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14054>

**(MNiSW= 25 pkt; IF: 2,383\*; liczba cytowań wg WoS=0, Scopus=0)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu danych bibliograficznych, przeprowadzeniu analizy danych, opracowaniu tabel, schematów, napisaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 100%.*

**O8. Karaś M.,** Jakubczyk A., Szymanowska U., Jęderka K., Lewicki S., Złotek U. (2019). Different temperature treatments of millet grains affect the biological activity of protein hydrolyzates and peptide fractions, *Nutrients*, 11(3), 550. <https://doi.org.10.3390/nu11030550>

**(MNiSW= 35 pkt., IF= 4,196\*, 4,603\*\*; liczba cytowań wg WoS=0, Scopus=0)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na, wykonaniu części doświadczeń dotyczących, oznaczeniu zawartości peptydów i wyznaczeniu stopnia hydrolizy białek, oznaczeniu potencjalnych właściwości inhibitorowych wobec enzymu konwertującego angiotensynę I,  $\alpha$ -glukozydazy,  $\alpha$ -amylazy, określeniu potencjalnej biodostępności i bioprzyswajalności, interpretacji wyników, pisaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

Łącznie:

**Impact Factor – 10,777\*, 11,335\*\***

**Punkty MNiSW – 151**

\*obowiązujące w roku wydania publikacji

\*\*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 w centrum zainteresowania wielu ośrodków naukowych na całym świecie znajdują się badania zależności pomiędzy stylem życia i odżywianiem a występowaniem chorób tzw. cywilizacyjnych, do których zalicza się m.in. otyłość, cukrzycę, nowotwory, choroby sercowo-naczyniowe i neurodegeneracyjne. Prowadzone prace w zakresie technologii żywności i dietetyki dotyczą opracowania receptur i badania właściwości takich środków spożywczych, które mogą zapobiegać chorobom dietozależnym, poprawiać jakość życia oraz łagodzić proces starzenia się organizmu. W aspekcie znaczenia środków spożywczych w profilaktyce tych chorób istotną rolę odgrywa znajomość potencjału prozdrowotnego, zarówno składników żywności jak i produktów ich hydrolizy w przewodzie pokarmowym oraz możliwości zmian bioaktywności wynikających z oddziaływań pomiędzy składnikami żywności i/lub produktami ich enzymatycznego rozkładu.

Kluczową rolę w patogenezie wielu chorób odgrywają wolne rodniki, których nadmiar w organizmie przyczynia się do powstawania niekorzystnych zmian wynikających z zaburzenia równowagi przeciwutleniającej organizmu wywołanej czynnikami stresogennymi (Brownlee, 2001; Kandola i in., 2015; Furukawa i in., 2017).

W organizmach tlenowych wolne rodniki są stale wytwarzane podczas przebiegu procesów metabolicznych. Jednak nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) i zmniejszenie zdolności przeciwutleniających organizmu może przyczyniać się do rozwoju wielu chorób, w tym

nowotworowych, udaru, zawału mięśnia sercowego lub stanów zapalnych. RFT odgrywają również istotną rolę w starzeniu się ludzkich komórek skóry i tym samym przyczyniają się do patologii skórnych (Stadtman, 2006; Umachigi i wsp., 2007). Szkodliwe działanie wolnych rodników ma również wpływ na patofizjologię otyłości, nadciśnienia, nieprawidłowego funkcjonowania śródbłonna, co sugeruje, że stres oksydacyjny może być podstawowym mechanizmem tego dysfunkcyjnego obrazu metabolicznego u osób z zespołem wielu chorób (Furukawa i in., 2017). W stanie cukrzycowym stres oksydacyjny upośledza wychwyt glukozy w mięśniach i tkance tłuszczowej oraz zmniejsza wydzielanie insuliny z trzustkowych komórek  $\beta$  (Maddux i in, 2001). Zwiększony stres oksydacyjny również leży u podstaw patofizjologii nadciśnienia i miażdżycy, bezpośrednio wpływając na komórki ściany naczyń krwionośnych (Ohara, 1993). Nieprawidłowości te obejmują dysfunkcję śródbłonna, która charakteryzuje się zmniejszoną biodostępnością leków rozszerzających naczynia krwionośne, w szczególności tlenku azotu (NO), oraz wzrostem kurczliwych czynników pochodzących z śródbłonna, sprzyjających chorobie miażdżycowej (Fernández-Sánchez i in., 2011).

Organizm ludzki posiada endogenne systemy ochrony, tj. przeciwutleniające enzymy i związki o niskiej masie cząsteczkowej, ale poszukiwane są naturalne związki, które chroniłyby komórki przed mutacjami i przedwczesnym starzeniem się oraz zapobiegały wielu chorobom (Lobo i wsp., 2010). Dodatkowy system wzmacniający i naturalną obronę ustroju stanowią fizjologicznie aktywne związki dostarczane w diecie, do których zaliczane są również peptydy. Białka pochodzenia roślinnego i zwierzęcego zawierają sekwencje peptydowe o znacznej aktywności biologicznej. Sekwencje te mogą być uwalniane na drodze procesów trawiennych białek w przewodzie pokarmowym, w wyniku hydrolizy *in vitro*, *ex vivo* lub w wyniku procesów technologicznych (Giron-Calle i in., 2010, Borawska i in, 2015). Bioaktywne peptydy pochodzące z białek żywności są szczególnie interesujące z uwagi na ich korzystne właściwości przeciwnadciśnieniowe, przeciwnowotworowe, hipocholesterolemiczne, przeciwzapalne oraz przeciwutleniające, a to może mieć istotne znaczenie zarówno w żywieniu ludzi jak i technologii żywności (Zhang i in., 2012; Chakrabarti i in., 2018; Li-Chan, 2015; Borawska i in, 2016). Wiele peptydów oraz hydrolizatów białkowych może obniżać szybkość procesu autoutleniania lipidów, chelatować jony metali ciężkich, usuwać wolne rodniki poprzez pełnienie funkcji promotora rozkładu nadtlenków czy brać udział w procesach przeciwzapalnych (Ruiz-Ruiz i in., 2013, Borawska i in, 2015). Co więcej, badania *in vitro* wykazały, że peptydy przeciwutleniające chronią fibroblasty przed uszkodzeniem komórek wywołanym przez RFT (Zhang i Falla, 2009). Peptydy przeciwutleniające otrzymywane z białek żywności są badane pod kątem ich aktywności fizjologicznej i znaczenia w profilaktyce wielu chorób (Lorenzo i in, 2018). Według danych literaturowych peptydy hamują stany zapalne, regulują syntezę białek macierzy pozakomórkowej i stymulują proliferację komórek, co może mieć pozytywne działanie immunomodulacyjne, jeśli celem są komórki lub układ odpornościowy (Giron-Calle i in., 2010; Espinosa-Moncada i in, 2018). Biologicznie aktywne peptydy wykazują także zdolności modyfikowania działania enzymów, które przyczyniają się do rozwoju nietolerancji glukozy,

nadciśnienia, otyłości lub stanu zapalnego (Iwaniak i in., 2018). Współistnienie wielu czynników ryzyka miażdżycy, w tym hiperglikemii, dyslipidemii i nadciśnienia tętniczego u tej samej osoby określa się terminem tzw. zespołu metabolicznego (z ang. metabolic syndrome) lub zespołem wielu czynników ryzyka (Furukawa i in., 2017). Dotychczas ta jednostka chorobowa była charakterystyczna wyłącznie dla osób powyżej 50 roku życia, natomiast obecnie jest diagnozowana u coraz młodszych pacjentów, w tym u otyłych dzieci. Według aktualnych statystyk zespół metaboliczny dotyczy 25% populacji na całym świecie, co w konsekwencji pozwala na stwierdzenie, że jest to obecnie globalny problemem zdrowotny (Pituch-Zdanowska i in., 2016).

Pojawienie się choroby metabolicznej jako głównego problemu zdrowotnego na świecie doprowadziło do opracowania środków, które są ukierunkowane na receptory peptydów żołądkowo-jelitowych związane z apetytem (GLP-1), wydzielaniem insuliny i równowagą energetyczną (Clemmensen i in., 2017). Dokładna patogeneza zespołu metabolicznego nie została poznana, ale wiadomo, że rozwój choroby związany jest z nadmierną aktywnością enzymów odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi zawartości glukozy we krwi, nadciśnienia, dyslipidemii i otyłości (Cornier i in., 2008). Głównymi enzymami zaangażowanymi w patogenezę zespołu metabolicznego są te, które uczestniczą w procesach związanych z generowaniem otyłości (lipaza trzustkowa), cukrzycy typu 2 ( $\alpha$ -amylaza i  $\alpha$ -glukozydaza) i nadciśnienia (enzym konwertujący angiotensynę I –ACE z ang. Angiotensin Converting Enzyme) (Fernandez-Gomez i in., 2016). Jedną z metod zapobiegania hiperglikemii poposiłkowej jest zahamowanie wchłaniania węglowodanów po posiłkach. W pierwszym etapie polisacharydy w przewodzie pokarmowym ulegają hydrolizie przy udziale  $\alpha$ -amylazy do dekstryn lub oligosacharydów, które są substratem dla działania  $\alpha$ -glukozydazy, co prowadzi do uwalniania dużej ilości glukozy. Dlatego hamowanie enzymów biorących udział w degradacji polisacharydów może zmniejszyć hiperglikemię poposiłkową (Yu i in., 2012; Kunyanga i in., 2012). Długotrwałe wysokie ciśnienie krwi może prowadzić do rozwoju nadciśnienia i chorób sercowo-naczyniowych, takich jak udar, choroba wieńcowa i choroby tętnic obwodowych. Główną rolę w utrzymaniu prawidłowego ciśnienia krwi odgrywa enzym konwertujący angiotensynę (ACE). Jego nadmierna aktywność powoduje rozrost mięśni naczyniowych, zmniejszenie światła naczyniowego i rozwój nadciśnienia (Garcia i in., 2015). Obecnie na szeroką skalę w leczeniu farmakologicznym hiperglikemii, nadciśnienia i niewydolności serca stosowane są syntetyczne inhibitory enzymów katalizujących hydrolizę polisacharydów (np. akarboza) czy ACE (kaptopryl lub enalapryl), ale mogą one powodować wiele działań niepożądanych (Rosas-Peralta i Jiménez-Genchi, 2018). Wiadomo, że związki bioaktywne, w tym peptydy, pochodzące z pożywienia, zapobiegają rozwojowi chorób sercowo-naczyniowych poprzez modulację procesu angiogenezy. Ze względu na duże znaczenie angiogenezy w tworzeniu tkanek, gojeniu się ran oraz w stanach patologicznych, takich jak rak czy choroby autoimmunologiczne, identyfikacja czynników wpływających na tworzenie naczyń krwionośnych ma duże znaczenie.



W związku z powyższym wzrosło zainteresowanie badaczy żywnością, która nie tylko dostarcza podstawowych składników odżywczych, ale również jest źródłem biologicznie aktywnych związków, które mogłyby zapobiegać wielu chorobom (Martirosyan i Mille, 2018).

Nasiona roślin są cennym źródłem białka, które jest zasobne we fragmenty bioaktywnych peptydów uwalnianych podczas procesu trawienia w przewodzie pokarmowym lub w procesie technologicznym w wyniku enzymatycznej hydrolizy (Toldrá i in., 2018). Wiele roślin, w tym fasola (Ruiz-Ruiz i in., 2013), groch (Olagunju i in., 2018), słodkie ziemniaki (Zhang i wsp., 2012) i ciecierzycy (Kou i wsp., 2013) okazały się dobrym źródłem hydrolizatów białkowych o właściwościach przeciwutleniających. Białka pochodzenia roślinnego i zwierzęcego mogą być również źródłem bioaktywnych peptydów, które mogą wykazywać różnorodne właściwości m.in. przeciwutleniające, przeciwnadciśnieniowe czy immunomodulacyjne (Darewicz i in., 2014; Darewicz i in., 2017; Chakrabarti i in., 2018).

Na szczególną uwagę zasługują nasiona roślin strączkowych, a zwłaszcza ciecierzycy, fasoli i grochu, będące interesującym materiałem badawczym w procesie otrzymywania biologicznie aktywnych peptydów (Torres-Fuentes i in., 2011; Kou i in., 2013, Olagunju i in., 2018).

Konieczność przetwarzania nasion roślin strączkowych w celu bezpiecznej konsumpcji wymaga stosowania różnych procesów technologicznych. Podczas produkcji żywności surowce najczęściej poddawane są procesom termicznym, które prowadzą do poprawy wartości odżywczej poprzez usunięcie składników antyżywnościowych, zwiększenie biodostępności prozdrowotnych związków oraz polepszenia właściwości technologicznych produktu. Na redukcję czynników antyodżywczych, zwiększenie biodostępności makro- i mikroelementów, poprawę strawności oraz dostępności bioaktywnych składników wpływa także poddawanie nasion procesowi kiełkowania (Khyade i Jagtap, 2016).

Kolejną grupą roślin, która zdobywa coraz większe uznanie wśród konsumentów, z uwagi na unikatowe wartości odżywcze i prozdrowotne, są ziarniaki zbóż takich jak proso i owies. Proso (*Panicum miliaceum*) podobnie jak i owies (*Avena sativa*) jest zbożem, którego ziarniaki są źródłem białka (10-14%; 13-16,5%, odpowiednio) o dużym potencjale odżywczym oraz prozdrowotnym. Ponadto, ze wszystkich zbóż, ziarno owsa i proso jest dobrym źródłem egzogennych aminokwasów siarkowych (metioniny i cysteiny) oraz związków wykazujących działanie kardioprotekcyjne, przeciwrzodowe, przeciwrakowe, przeciwhiperlipidemiczne oraz przeciwutleniające (Rasane i in., 2015; Agrawal i in., 2016; Chen i in., 2016; Kumar i in., 2016; Perrelli i in., 2018).

Niekonwencjonalnym źródłem białka i bioaktywnych peptydów są jadalne owady, które wprawdzie nie wzbudzają wciąż jeszcze powszechnej akceptacji w wielu krajach, w tym w Polsce, ale są promowane przez Komisję Europejską z uwagi na ich wartość odżywczą i ekologiczną. O wartości odżywczej i prozdrowotnej owadów decyduje wysoka zawartość białka o pożądanym profilu aminokwasowym, kwasów tłuszczowych i składników mineralnych oraz witamin (Rettore, 2016).

Badania naukowe dotyczące owadów jadalnych głównie określają ich wartość odżywczą, natomiast wciąż brakuje wiedzy w zakresie ich strawności i potencjału prozdrowotnego.

Świadomość konsumentów dotycząca znaczenia udziału składników prozdrowotnych w komponowaniu diety jest coraz większa i może to stworzyć korzystne perspektywy dla nowych produktów otrzymanych na bazie zbóż i roślin strączkowych czy owadów.

#### 4.3.2. Cel naukowy oraz omówienie wyników badań

---

Hipoteza badawcza przeprowadzonych badań zakłada, że peptydy uwalniane w procesie proteolizy białek żywności posiadają ukierunkowaną aktywność, która może być modyfikowana przez wybrane procesy technologiczne.

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 aktywności prozdrowotnej peptydów uwalnianych w trakcie proteolizy białek żywności i ich zmian zachodzących pod wpływem wybranych procesów technologicznych.

---

Szczegółowe cele pracy obejmują:

1. Ocenę wpływu wybranych zabiegów technologicznych (obróbka termiczna i kiełkowanie) na aktywność peptydów uwolnionych w procesie proteolizy izolatów białkowych otrzymanych z ziarniaków owsa, fasoli szparagowej i kiełków nasion grochu.
  2. Omówienie warunków biodostępności i bioprzyswajalności peptydów.
  3. Określenie aktywności peptydów uwalnianych w trakcie symulowanego procesu trawienia:
    - izolatów białka i ich frakcji otrzymanych z surowych i poddanych obróbce termicznej nasion ciecierzycy i owsa,
    - białka wybranych gatunków jadalnych owadów.
  4. Ocenę wpływu hydrolizatów i frakcji peptydowych uwalnianych w trakcie symulowanego procesu trawienia izolatów białkowych otrzymanych z surowych i poddanych obróbce termicznej nasion ciecierzycy i owsa na stymulację wzrostu fibroblastów oraz komórek śródbłonna mysiego.
-

**Ad 1.** W ostatnich latach białka dostarczane w diecie człowieka traktowane są nie tylko jako podstawowy składnik odżywczy, ale także jako źródło aktywnych peptydów o ukierunkowanym działaniu fizjologicznym. Rośnie także popularność wykorzystania w technologii żywności surowców niekonwencjonalnych, stosowanych dotychczas w niewielkim stopniu lub wcale w diecie człowieka. W nasionach roślin strączkowych i ziarnach zbóż obok składników wykazujących pozytywny wpływ na organizm człowieka występują także substancje przeciwwyżwieniowe, których pozbawione są izolaty lub/i koncentraty białkowe z nich otrzymane. W większości prac, wchodzących w skład osiągnięcia, przedmiotem badań były peptydy uwalniane w procesie proteolizy izolatów białkowych otrzymanych z różnorodnych surowców roślinnych. W pracy **O3** poddawano 2 godzinnej proteolizie z udziałem alkalazy z *Bacillus licheniformis* (2,4 U) izolaty białkowe otrzymane z ziaren owsa - 12 odmian (genotypów) uprawnych i dzikich heksa- i tetraploidalnych gatunków z rodzaju *Avena* L. Otrzymane hydrolizaty posiadały różną zawartość peptydów, uwarunkowaną genotypem ziarniaków, z których otrzymano izolaty, niemniej jednak więcej peptydów posiadały preparaty z form dzikich a wśród nich najwięcej (1,37 mg/ml) hydrolizat izolatu z *Avena maroccana* 5222. Również właściwości przeciwutleniające, oznaczone jako zdolności do neutralizowania wolnych rodników (DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup>) i chelatowania jonów Fe<sup>2+</sup>, były wyższe dla hydrolizatów izolatów białka otrzymanych z form dzikich. I tak: najwyższą zdolność do neutralizowania wolnych rodników generowanych z ABTS (87,27 %) oraz DPPH (46%) wykazał hydrolizat izolatu z owsa *Avena maroccana* CN 43136, a największą zdolność do chelatowania jonów Fe<sup>2+</sup> (90,12 %) oznaczono dla preparatu z *Avena sterilis* AVE 2116. Krzyżowanie międzygatunkowe podwyższa więc właściwości przeciwutleniające hydrolizatów białek owsa, a w konsekwencji korzystnie wpływa na właściwości prozdrowotne ziarna.

Elektroforetyczny rozdział izolatów białkowych techniką SDS-PAGE wykazał, że dominującymi frakcjami były białka o masie cząsteczkowej w zakresach 16 – 23 kDa oraz 35 – 38 kDa we wszystkich badanych genotypach owsa. Największa liczba polimorficznych frakcji białkowych wystąpiła w genotypie *Avena maroccana* CN 43136, a peptydy uwolnione w wyniku proteolizy izolatu otrzymanego z jego ziaren charakteryzowała najwyższa zdolność neutralizowania wolnych rodników.

Analiza otrzymanych elektroforegramów wykazała, że zawartość polimorficznych frakcji białkowych jest największa w formach tetraploidalnych *Avena maroccana* i *Avena murphyi*, które reprezentują najstarsze ewolucyjnie gatunki.

Aktywność przeciwutleniająca składników żywności uzależniona jest, obok jej rodzaju, także od przeprowadzanych zabiegów technologicznych. Obróbka termiczna należy do jednej z najstarszych metod utrwalania żywności, która dodatkowo przyczynia się do zmniejszenia zawartości naturalnie występujących składników przeciwodżywczych. Ponadto, pod wpływem wysokiej temperatury zniszczeniu ulega struktura wtórna białek, co zwiększa dostępność wiązań peptydowych dla enzymów proteolitycznych, a tym samym poprawia strawność tych białek. W pracy **O4** przebadano wpływ

obróbki cieplnej na właściwości przeciwutleniające peptydów uzyskanych w wyniku hydrolizy pepsyną izolatów białkowych otrzymanych ze strąków żółtej fasoli szparagowej.

Hydrolizaty izolatów otrzymanych z surowca poddanego obróbce termicznej odznaczały się lepszymi właściwościami przeciwutleniającymi niż otrzymane z surowych strąków fasoli. Oznaczona dla nich zdolność do neutralizowania wolnych rodników DPPH<sup>•</sup> wyniosła 46,12% a ABTS<sup>•+</sup> 92,32%, podczas gdy dla hydrolizatów izolatów białkowych z fasoli surowej uzyskano odpowiednio: 38,02% i 88,24%. Otrzymane hydrolizaty wykazały zdolność do chelatowania jonów Fe<sup>2+</sup>, która także była największa dla hydrolizatu białek wyizolowanych z fasoli po obróbce termicznej (wartość IC<sub>50</sub> wyniosła 0,19 mg/ml). Wyniki badań otrzymane w tej pracy wykazały, że obróbka cieplna fasoli szparagowej powoduje wzrost zarówno zawartości peptydów w otrzymanych hydrolizatach jak również ich właściwości przeciwutleniających.

Kolejnym zabiegiem wykorzystywanym do modyfikacji składu i właściwości żywności pochodzenia roślinnego jest poddawanie nasion procesowi kiełkowania. Od szeregu lat kiełki roślinne polecane są w diecie jako źródło łatwo przyswajalnych odżywczych i prozdrowotnych składników. Ich skład chemiczny jest istotnie zmodyfikowany przemianami metabolicznymi zachodzącymi w trakcie kiełkowania. W pierwszych etapach następuje intensywne mobilizacja substancji zapasowych, co powoduje zwiększenie ich biodostępności.

W pracy **O2** i **O1** badano aktywność peptydów otrzymanych w wyniku pepsynowej i trypsynowej hydrolizy izolatów białkowych otrzymanych z kiełków grochu. Proces hydrolizy zarówno pepsyną jak i trypsyną spowodował uwalnianie mieszaniny peptydów, które wykazywały zbliżoną aktywność przeciwrodnikową wobec ABTS<sup>•+</sup> (99,57% i 98,29%, odpowiednio) pomimo ponad dwukrotnie wyższej zawartości peptydów w trypsynowym hydrolizacie. Otrzymana aktywność przeciwrodnikowa hydrolizatów była prawie pięciokrotnie wyższa od aktywności wyjściowego izolatu białkowego. Również zdolność do hamowania aktywności enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE), co może potencjalnie przeciwdziałać nadciśnieniu, była wyższa dla hydrolizatów, przy czym w przypadku tej właściwości hydrolizat pepsynowy okazał się ponad dwukrotnie aktywniejszy od hydrolizatu trypsynowego (IC<sub>50</sub> = 1,59 mg/ml i 3,44 mg/ml, odpowiednio).

W wyniku rozdziału obydwu hydrolizatów z zastosowaniem jonowymiennej chromatografii na złożu DEAE–celuloza otrzymano osiem frakcji – wszystkie wykazały aktywność przeciwrodnikową, a największą frakcja pierwsza zarówno po trawieniu trypsyną (100 %) jak i po trawieniu pepsyną (60,95 %).

Aktywność inhibitorową wobec ACE wykazało pięć frakcji trypsynowego hydrolizatu i tylko dwie frakcje z hydrolizatu otrzymanego w wyniku działania pepsyną. Najbardziej aktywna po hydrolizie trypsyną była pierwsza frakcja (IC<sub>50</sub> = 0,24 mg/ml), a po hydrolizie pepsyną – szósta (IC<sub>50</sub> = 0,38 mg/ml). Obie te frakcje zostały rozdzielone z zastosowaniem techniki sączenia molekularnego na złożu Sephadex G-10. Chromatogram uzyskany z frakcji po trypsynowej hydrolizie uwidoczniał 21 pików, wszystkie te frakcje wykazały aktywność przeciwrodnikową, a tylko sześć aktywność

inhibitorową wobec ACE. Frakcja czwarta otrzymana po hydrolizie trypsyną w najwyższym stopniu hamowała ACE ( $IC_{50} = 0,007$  mg/ml). Natomiast po rozdziale frakcji uzyskanej po pepsynowej hydrolizie otrzymano tylko 1 pik, który odznaczał się zarówno zdolnościami przeciwrodnikowymi wobec ABTS<sup>+</sup> (60,95 %) jak i inhibitorowymi wobec ACE (0,69 mg/ml). Dodatkowo stwierdzono, że peptydy otrzymane po trawieniu pepsyną odznaczały się lepszymi zdolnościami przeciwrodnikowymi wobec ABTS<sup>+</sup> (60,95 %) oraz chelatującymi jony Fe<sup>2+</sup> (75,38 %) niż peptydy otrzymane po trawieniu trypsyną (28,68 % neutralizowania ABTS<sup>+</sup>) (**O2 i O1**).

Uzyskane wyniki wskazują, że aktywność peptydów uwalnianych z izolatów białkowych uzależniona jest zarówno od gatunku surowca jak i metod zastosowanych do jego technologicznej obróbki, jak również od rodzaju enzymu, a ściślej specyficzności danej proteazy wykorzystanej w procesie enzymatycznej hydrolizy.

**Ad. 2** Pochodzące z żywności bioaktywne peptydy mogą być uwalniane podczas trawienia i mają potencjalnie korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Wiadomo, że penetracja peptydów przez jelito cienkie może odbywać się na kilka sposobów i że na proces ten wpływa wiele czynników. Badania związane z biodostępnością peptydów rozwijają się dynamicznie, ale wciąż budzą wiele wątpliwości dotyczących ich pobierania tkankowego oraz odpowiedniej odpowiedzi fizjologicznej. Ponadto istnieje niewiele opracowań, które w sposób syntetyczny przedstawiają informacje na temat najnowszych badań *in vitro* i *in vivo*, dotyczących absorpcji peptydów i ich aktywności w narządach docelowych.

W pracy przeglądowej **O7** omówiono procesy trawienia i wchłaniania peptydów oraz modyfikujące je czynniki fizjologiczne i chemiczne. W pracy tej zebrano i przeanalizowano także najnowsze badania *in vitro* i *in vivo* dotyczące biodostępności oraz bioprzyswajalności peptydów. Bioaktywność badanego związku definiuje się jako specyficzny efekt uzyskany po ekspozycji na ten związek i można ją ocenić *in vivo*, *ex vivo* lub *in vitro*. Obejmuje ona zarówno pobieranie tkankowe, jak i odpowiednią odpowiedź fizjologiczną (przeciwutleniającą, przeciwzapalną, przeciwalergiczną, przeciwbakteryjną lub przeciwnowotworową) organizmu. Termin bioprzyswajalność (bioavailability) związków obejmuje trawienie w przewodzie pokarmowym (uwalnianie), wchłanianie, dystrybucję do tkanek, metabolizm oraz wydalanie i jest określany *in vivo* u zwierząt lub ludzi (LADME z ang. Liberate, Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion).

Z kolei biodostępność (bioaccessibility) obejmuje kilka etapów: uwalnianie z matrycy żywnościowej, konwersję w warunkach symulujących trawienie i absorpcję przez komórki nabłonka jelitowego, metabolizm, rozmieszczenie w tkankach oraz aktywność biologiczną i jest określana za pomocą procedury trawienia *in vitro*.

Termin ten ma kilka znaczeń w zależności od obszaru badań - z farmakologicznego punktu widzenia, biodostępność jest szybkością i zakresem, w jakim ugrupowanie terapeutyczne jest wchłaniane i staje się dostępne w miejscu działania leku. Z żywieniowego punktu widzenia

biodostępność odnosi się do frakcji składnika odżywczego (np. peptydu), która jest magazynowana lub jest dostępna i wykazuje fizjologiczne funkcje. Jest to kluczowe określenie skuteczności żywieniowej, ponieważ nie wszystkie ilości związków bioaktywnych są skutecznie wykorzystywane przez organizm. Zanim bioaktywny składnik stanie się biodostępny, musi zostać uwolniony z matrycy żywnościowej i zmodyfikowany w przewodzie pokarmowym. Na proces biodostępności aktywnego związku wpływa więc wiele czynników.

Pierwszą barierę wchłaniania peptydów stanowią proteazy i peptydazy znajdujące w przewodzie pokarmowym, kolejnym są mucyny - glikoproteiny, które tworzą hydrożelową (komórki nabłonkowe) warstwę śluzu wzdłuż wewnętrznych ścian jelit. Wewnętrzna powierzchnia jelita cienkiego jest pokryta mikrokosmkami wyłożonymi monowarstwą komórek nabłonkowych (w ponad 80% enterocytami) mającymi na celu zwiększenie powierzchni chłonnej. Nabłonek jelitowy stanowi selektywnie przepuszczalną barierę, która wspomaga wchłanianie składników odżywczych i stanowi barierę dla szkodliwych substancji. Po dotarciu do nabłonka peptydy mogą zostać rozłożone, przekształcone lub wchłonięte w zależności od ich właściwości. Peptydy muszą przeniknąć przez dwie warstwy wyściółki jelita cienkiego - jednej luźno, a drugiej mocno przylegającej. Szczelne połączenia (TJ) są kompleksami wielobiałkowymi, których główną funkcją jest ograniczenie przepływu międzykomórkowego wody, jonów i substancji rozpuszczonych. Są one użyteczne w utrzymywaniu barier nabłonkowych i śródłonkowych, jak również polaryzacji komórek. Szczelne połączenia zapobiegają przechodzeniu substancji przez przestrzeń między błonami plazmatycznymi sąsiadujących komórek. Ponadto TJ zlokalizowane między komórkami nabłonkowymi ograniczają proces penetracji polarnych makrocząsteczek. Dlatego peptydy przechodzące przez nabłonek jelitowy przedostają się do komórek w wyniku dyfuzji lub aktywnego transportu. Aktywny transport obejmuje ruch peptydów przeciwie do gradientu stężenia przez białka transbłonowe, podczas gdy pasywny transport obejmuje dyfuzję cząsteczek peptydów w kierunku gradientu stężenia. Istnieje kilka możliwych ścieżek aktywnego lub pasywnego wchłaniania peptydów w jelicie: (i) szlaki okołokomórkowe, tj. pasywny transport przez połączenia międzykomórkowe mające zastosowanie do absorpcji hydrofilowych oligopeptydów o niskiej masie cząsteczkowej; (ii) szlaki transkomórkowe, tj. bierna dyfuzja przez enterocyty - peptydy penetrujące komórki są zdolne do transportowania aktywnego peptydu; oraz (iii) systemy transportowe za pośrednictwem nośnika (PepT1) w jelicie.

Wyznacznikiem procesu transportu przeznabłonkowego peptydu i jego absorpcji są właściwości fizykochemiczne cząsteczki peptydu, takie jak: wielkość peptydu, jego struktura pierwotna i wtórna, lipofilowość i ładunek lub podatność na degradację przez proteazy jelitowe, podczas gdy hydrofobowość peptydów prawdopodobnie nie wpływa na ten proces. Peptydy, które mogą przenikać przez nabłonek jelita cienkiego, są transportowane przez krwiobieg i wywierają określony efekt w miejscu docelowym. Jednak funkcja immunologiczna organizmu, ciśnienie krwi, interakcje z innymi związkami spożywczymi przenoszonymi w krwiobiegu oraz poziom insuliny i glukozy również mogą modulować niektóre właściwości peptydu.

Biodostępność aktywnych peptydów uzależniona jest również od rodzaju matrycy żywnościowej. Peptydy mogą tworzyć połączenia ze składnikami matrycy z racji obecności w ich strukturze grup funkcyjnych takich jak: aminowa (lizyna), karboksylowa (kwas asparaginowy i glutaminowy), iminowa (prolina), sulfhydrylowa (cysteina) oraz hydroksylowa (seryna i treonina). Dlatego peptydy mogą tworzyć szereg wiązań, np. wodorowych i disiarczkowych, hydrofobowych czy van der Waalsa ze składnikami matrycy. Mogą ulegać reakcjom kondensacji i sieciowania z cukrami redukującymi lub innymi peptydami, co może prowadzić do zmian w ich natywnej strukturze, a przez to modyfikować ich aktywność. Niektóre badania wskazują, że matryca żywnościowa chroni bioaktywne peptydy przed strawieniem w jelicie cienkim oraz zwiększa ich absorpcję. Ponadto zaobserwowano, że skład aminokwasowy białka i obecność błonnika są głównymi czynnikami zwiększającymi biodostępność peptydów pochodzących z żywności. Brakuje jednak badań wyjaśniających mechanizm jelitowego przenikania peptydów uwzględniających wpływ innych szlaków metabolicznych na ten proces.

Oznaczona aktywność wyizolowanych z żywności peptydów musi być zachowana podczas procesu trawienia i wchłaniania. Biodostępność aktywnych peptydów pochodzących z żywności jest zwykle oceniana za pomocą trawienia oraz wchłaniania *in vitro* w warunkach symulujących trawienie w przewodzie pokarmowym człowieka.

**Ad. 3.** Białka dostarczane w diecie ulegają trawieniu w układzie pokarmowym, a uwolnione w tym procesie aktywne peptydy mogą potencjalnie w ukierunkowany sposób oddziaływać na organizm człowieka. Dlatego szczególnie ważne jest przeprowadzenie proteolizy w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka. W pracach wchodzących w skład **Osiągnięcia** oceniano wpływ obróbki cieplnej nasion ciecierzycy (*Cicer arietinum* L.) - praca **O5** oraz prosa (*Panicum miliaceum* L.) - praca **O8** na zawartość i aktywność peptydów uwolnionych podczas trawienia *in vitro* izolatów białkowych z nich otrzymanych.

Spśród roślin strączkowych na uwagę zasługują nasiona ciecierzycy, ze względu na wysoką jakość odżywczą białka i niski poziom składników przeciwżywnościowych. Nasiona ciecierzycy poddano procesowi gotowania przez jedną godzinę w temperaturze 100°C. Wyniki badań wykazały, iż obróbka cieplna nasion zwiększyła podatność izolatów białkowych na działanie enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego człowieka. Stopień hydrolizy (DH) dla tego izolatu wynosił 20,49%, podczas gdy dla izolatu z surowych nasion osiągnął wartość 13,88%.

Peptydy otrzymane w wyniku trawienia białka muszą zostać wchłonięte do krwioobiegu i dostarczone do docelowych miejsc ich wykorzystania. O ich bioprzyswajalności decyduje wiele czynników, wśród których najważniejszy to masa cząsteczkowa. Dlatego hydrolizaty izolatów białek nasion ciecierzycy rozfrakcjonowano według masy cząsteczkowej stosując membrany o odcięciu 7, a następnie 3,5 kDa, otrzymując w ten sposób trzy frakcje o masie cząsteczkowej < 7 kDa, 3,5-7 kDa oraz <3,5 kDa.

W celu określenia aktywności fizjologicznej hydrolizatów i ich frakcji peptydowych oznaczono zdolność do neutralizowania wolnych rodników ABTS<sup>•+</sup> i DPPH<sup>•</sup>, chelatowania jonów Cu<sup>2+</sup> i Fe<sup>2+</sup> oraz zdolność do redukcji jonów Fe<sup>3+</sup>. Najwyższe właściwości przeciwrodnikowe wobec ABTS<sup>•+</sup> wykazała frakcja peptydowa o masie cząsteczkowej 3,5-7 kDa otrzymana z białek ciecierzycy gotowanej (IC<sub>50</sub> = 41,01 µg/ml). Natomiast ta sama frakcja otrzymana z białek ciecierzycy niegotowanej wykazała najwyższą aktywność przeciwrodnikową wobec DPPH<sup>•</sup> oraz zdolność do chelatowania Fe<sup>2+</sup> (wartości IC<sub>50</sub>: 20,94 µg/ml i 52,53 µg/ml, odpowiednio).

Z kolei frakcja peptydów o masie <3,5 kDa otrzymanych po hydrolizie białek ciecierzycy gotowanej wykazała najwyższą zdolność do chelatowania jonów Cu<sup>2+</sup> (IC<sub>50</sub> = 56,60 µg/ml) i najwyższą siłę redukcji (0,362 A<sub>700</sub>/µg•ml<sup>-1</sup>). Uzyskane wyniki wskazują, że proces obróbki cieplnej nasion ciecierzycy nie powodował wzrostu aktywności przeciwrodnikowej wobec DPPH<sup>•</sup>, a w przypadku zdolności do chelatowania jonów metali efekt uzależniony był od masy cząsteczkowej frakcji peptydowych otrzymanych w wyniku trawienia *in vitro* izolatów.

Udział w diecie prosa i produktów z niego otrzymanych, podobnie jak owsa, spotyka się ze stale wzrastającą akceptacją wśród konsumentów, z uwagi na duży potencjał odżywczy i prozdrowotny ziarna tych zbóż. Zawartość białka w ziarnach prosa jest porównywalna z pszenicą, ale udział niezbędnych aminokwasów (leucyny, izoleucyny i metioniny) jest znacznie wyższy w prosie.

Celem pracy **O8** 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°C i 100°C) ziarniaków prosa na aktywność biologiczną i biodostępność hydrolizatów otrzymanych po trawieniu *in vitro* frakcji białkowych (albumin, globulin 7S, globulin 11S, prolamin i glutelin) wyizolowanych z ziarniaków prosa.

Wpływ obróbki termicznej ziarniaków prosa na stopień hydrolizy poszczególnych frakcji białkowych był zróżnicowany w zależności od działającego enzymu i rodzaju frakcji białkowej. Pod wpływem α-amylazy i pepsyny najwyższy stopień hydrolizy (69,24% i 85,36, odpowiednio) uzyskano dla frakcji albumin z nasion ogrzewanych w 65°C, natomiast końcowy etap, po działaniu pankreatyny, był najbardziej skuteczny dla globulin 7S z nieogrzanego ziarna prosa. Stopień hydrolizy w tym przypadku wynosił 98,33% i była to najwyższa wartość ze wszystkich oznaczonych. Porównując podatność poszczególnych frakcji na symulowane trawienie okazało się, że w największym stopniu hydrolizie uległy albuminy i prolaminy wyizolowane z białka ziaren ogrzewanych w 65°C; gluteliny z ogrzewanych w 100°C a globuliny 7S z ziaren nieogrzewanych. W przypadku frakcji globulin 11S stopień hydrolizy na poszczególnych etapach był zróżnicowany, a najwyższy (47,68%) po końcowym (działanie pankreatyną) uzyskano dla ogrzewanych w 100°C.



Dla hydrolizatów frakcji białkowych otrzymanych w procesie symulowanego trawienia obliczono wskaźniki biodostępności i bioprzyswajalności peptydów. Wszystkie analizowane próby charakteryzowały się dobrą biodostępnością, ponieważ posiadały wskaźnik biodostępności powyżej 1, a w przypadku peptydów otrzymanych z globulin 11S ziaren prosa ogrzewanych w 100°C jego wartość była najwyższa i wyniosła aż 23,89. Natomiast najwyższym wskaźnikiem bioprzyswajalności (2,12) charakteryzowały się peptydy uzyskane z globulin 11S ziarniaków prosa ogrzewanego w 65°C. Jednakże w celu potwierdzenia oznaczonych aktywności w organizmie należy zbadać ich właściwości podczas procesu trawienia i wchłaniania *in vivo*.

Przebadano potencjalną przydatność hydrolizatów frakcji białkowych w profilaktyce zespołu metabolicznego. Z uwagi na fakt, że rozwój schorzeń zaliczanych do tego zespołu związany jest z aktywnością enzymów odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi zawartości glukozy we krwi oraz nadciśnieniem, oznaczono ich wpływ na aktywność enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) i aktywność  $\alpha$ -amylazy oraz  $\alpha$ -glukozydazy. Hydrolizat otrzymany w wyniku trawienia *in vitro* glutelin ziarniaków prosa poddanego obróbce termicznej w temperaturze 100°C wyróżniał się najwyższą zdolnością do hamowania aktywności  $\alpha$ -amylazy ( $IC_{50} = 0,12\text{mg/ml}$ ), a następnie hydrolizat prolamin kontrolnych ( $IC_{50} = 0,77\text{mg/ml}$ ). Natomiast spośród hydrolizatów otrzymanych z białek ziarniaków prosa po obróbce w 65°C tylko hydrolizat albumin wykazywał zdolność do hamowania aktywności tego enzymu ( $IC_{50} = 1,37\text{mg/ml}$ ).

Badając wpływ hydrolizatów białek prosa na aktywność  $\alpha$ -glukozydazy stwierdzono, iż hydrolizat prolamin 65°C ( $IC_{50} = 0,06\text{mg/ml}$ ) wykazywał dwukrotnie wyższe właściwości inhibitorowe wobec tego enzymu w porównaniu do hydrolizatu globulin 11S z nasion kontrolnych 100°C ( $IC_{50} = 0,12\text{ mg/ml}$ ) i prawie sześciokrotne w stosunku do globulin 11S z nasion ogrzewanych w 100°C ( $IC_{50} = 0,35\text{ mg/ml}$ ). Najmniej aktywne okazały się peptydy uwolnione z globulin 7S z nasion kontrolnych ( $IC_{50} = 1,46\text{ mg/ml}$ ).

Najwyższą zdolność do hamowania aktywności enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) wykazał hydrolizat globulin 11S białka z ziaren prosa po obróbce termicznej w 65°C oraz prolamin po obróbce w 65°C i 100°C ( $IC_{50}$  odpowiednio: 0,44 mg/ml, 1,24 mg/ml i 1,38mg/ml). W przypadku ziarniaków nasion prosa obróbka termiczna spowodowała wzrost zdolności inhibitorowej hydrolizatów poszczególnych frakcji białek, wśród których najmniej aktywne okazały się albuminy.

W kolejnym etapie badań ze wszystkich hydrolizatów frakcji białkowych ziarniaków prosa wydzielono frakcje peptydowe o masie cząsteczkowej poniżej 3,0 kDa, a następnie zbadano ich wpływ na aktywność ACE,  $\alpha$ -glikozydazy i  $\alpha$ -amylazy. Frakcja otrzymana z hydrolizatu prolamin ziarniaków prosa po obróbce w 100°C w największym stopniu hamowała aktywność enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) ( $IC_{50} = 0,33\text{ mg/ml}$ ). Natomiast frakcje peptydowe otrzymane z hydrolizatu albumin, globulin 11S i glutelin (po obróć w 65°C) w największym stopniu hamowały aktywność  $\alpha$ -glukozydazy ( $IC_{50} = 0,05\text{ mg/ml}$ ,  $0,05\text{ mg/ml}$  i  $0,06\text{ mg/ml}$ , odpowiednio). Analizując wpływ frakcji peptydowych na aktywność  $\alpha$ -amylazy, stwierdzono iż wszystkie frakcje otrzymane

z białek prosa kontrolnego i tylko jedna z albumin prosa po obróbce w 100°C wykazywały inhibitorowy charakter wobec tego enzymu. Frakcja peptydowa otrzymana z hydrolizatu prolamin kontrolnych w największym stopniu hamowała  $\alpha$ -amylazę ( $IC_{50} = 0,11$  mg/ml).

Należy zauważyć, że w porównaniu z hydrolizatami nie wszystkie frakcje peptydowe o masie cząsteczkowej poniżej 3,0 kDa hamowały aktywność enzymów, które mają znaczenie w patogenezie zespołu metabolicznego. Mechanizm ten można tłumaczyć synergistycznym działaniem mieszaniny peptydów znajdujących się w hydrolizacie.

Kolejnym etapem badań w pracy **O8** było oczyszczenie peptydów o najwyższych właściwościach inhibitorowych wobec enzymów, które potencjalnie mogą przeciwdziałać zespołowi metabolicznemu, z zastosowaniem różnych technik chromatograficznych (sączenie molekularne i HPLC) oraz ich identyfikacja z użyciem techniki LC-MS/MS. Do oczyszczenia wybrano trzy frakcje peptydowe otrzymane z: prolamin prosa kontrolnego, z globulin11S prosa po obróbce w 65°C i prolamin prosa po obróbce w 100°C. Po rozdziale na złożu Sephadex G10 otrzymano po dwie frakcje, z których wybrano z każdego wariantu jedną, posiadającą wysokie zdolności hamowania aktywności ACE,  $\alpha$ -amylazy i  $\alpha$ -glukozydazy. W przypadku prolamin z prosa kontrolnego była to frakcja 1 ( $IC_{50}$ : 4,82; 43,56 i 91,38  $\mu$ g/ml), dla globulin11S po obróbce w 65°C frakcja 2 ( $IC_{50}$ : 13,28; 68,24 i 36,20  $\mu$ g/ml) a dla prolamin po obróbce w 100°C również frakcja 2 ( $IC_{50}$ : 31,27; 118,12 i 107, 01 $\mu$ g/ml). Frakcje te poddano analizie przy użyciu spektrometrii masowej w celu identyfikacji peptydów. W każdej z wybranych frakcji zidentyfikowano po dwa peptydy o następującej sekwencji aminokwasów: GQLGEHGGAGMG i GEHGGAGMGGGQFQPV – prolamina z prosa kontrolnego; EQGFLPGPEESGR i RLARAGLAQ - globulina11S po obróbce w 65°C; YGNPVGGVGH i GNPVGGVGHGTTGT – prolamina po obróbce w 100°C. Na podstawie bazy danych sekwencji białkowych (NCBI, UniProt) oraz przy pomocy programu MASCOT stwierdzono, że otrzymane sekwencje peptydów pochodziły z niescharakteryzowanego białka *Panicum hallii* (**O8**).

W większości prowadzonych badań, dotyczących powiązania sekwencji aminokwasów w peptydach z ich aktywnością pod uwagę brana jest zazwyczaj ich ukierunkowane działanie. Uważa się, że peptydy posiadające zdolność hamowania aktywności ACE posiadają na C-końcu reszty aminokwasów aromatycznych (prolina, tryptofan, fenyloalanina) lub na N-końcu reszty aminokwasów alifatycznych (glicyna, walina, leucyna, izoleucyna); aktywność  $\alpha$ -amylazy hamowana jest przez peptydy posiadające w swoim składzie histydynę, prolinę i metioninę, a hamujące aktywność  $\alpha$ -glukozydazy posiadają sekwencję glutamina, prolina, glicyna, arginina. Otrzymane wyniki nie wyjaśniają jednoznacznie związku pomiędzy strukturą peptydów a ich kilkukierunkową aktywnością – w dalszych badaniach należy poszukiwać oddziaływań synergistycznych i antagonistycznych, jak również oddziaływań na organizmy zwierzęce w badaniach *in vivo*.

Do niekonwencjonalnych źródeł białka pochodzenia nieroślinnego zaliczane są owady, a ich spożywanie przez człowieka jest popularne w wielu krajach świata i staje się coraz bardziej znane

również w Europie. Najważniejszym składnikiem odżywczym obecnym w owadach jest pełnowartościowe białko, które również może być prekursorem bioaktywnych peptydów. Niewiele jest badań na temat wartości odżywczej owadów hodowanych przez europejskich dostawców handlowych, a prace związane z oznaczaniem aktywności biologicznej ich składników są nowatorskimi badaniami w tym zakresie. W pracy **O6** poddano analizie pięć gatunków owadów: szarańczę wędrowną (*Locusta migratoria*), karaczany argentyńskie (*Blaptica dubia*), karaczany madagaskarskie (*Gromphadorhina portentosa*), drewnojady (*Zophobas morio*) i świerszcze kubańskie (*Amphiacusta annulipes*). Gatunki te należą do różnych rodzin, są dobrze znane i łatwe do rozmnażania w Europie. Celem pracy było zbadanie aktywności przeciwutleniającej hydrolyzatów otrzymanych po trawieniu *in vitro* wyżej wymienionych owadów jadalnych. Największą zawartością peptydów charakteryzowała się szarańcza, zarówno przed jak i po trawieniu (odpowiednio 3,13 i 5,88 mg/ml), a stopień hydrolizy wynosił 36,29%. Zasobne w peptydy były także hydrolyzaty karaczanów madagaskarskich (5,62 mg/ml) i karaczanów argentyńskich (5,21 mg/ml). Najmniej peptydów oznaczono w świerszczach kubańskich i w ich hydrolyzatach (odpowiednio 0,15 i 1,68 mg/ml). Potencjał przeciwutleniający hydrolyzatów jadalnych owadów określono jako aktywność przeciwrodnikową, zdolność do chelatowania jonów metali ( $Fe^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ ) oraz redukcji jonów  $Fe^{3+}$ . Stwierdzono, iż hydrolyzaty otrzymane po trawieniu *in vitro* świerszczy kubańskich odznaczały się najwyższą aktywnością przeciwrodnikową wobec DPPH<sup>•</sup> ( $IC_{50} = 19,1 \mu g/ml$ ), natomiast hydrolyzaty otrzymane po trawieniu drewnojadów (*Zophobas morio*) w najwyższym stopniu neutralizowały wolne rodniki ABTS<sup>•+</sup> ( $IC_{50} = 4,6 \mu g/ml$ ). Najniższą zdolność neutralizowania wolnych rodników ABTS<sup>•+</sup> wykazał hydrolyzaty białka szarańczy wędrownej ( $IC_{50} = 25,9 \mu g/ml$ ), a rodników DPPH<sup>•</sup> - hydrolyzaty białka karaczanów argentyńskich ( $IC_{50} = 76,3 \mu g/ml$ ). Generalnie hydrolyzaty białka wszystkich analizowanych owadów jadalnych posiadały znacznie wyższą zdolność neutralizowania wolnych rodników ABTS<sup>•+</sup> niż DPPH<sup>•</sup>. Hydrolyzaty otrzymane ze świerszczy kubańskich posiadały najwyższą zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  (58,82%) i redukcji jonów  $Fe^{3+}$  (0,652). Natomiast najwyższą zdolność do chelatowania jonów  $Cu^{2+}$  wykazywał hydrolyzaty szarańczy wędrownej (86,05%). Uzyskane wyniki wykazały, że jadalne gatunki owadów stanowią wartościowe źródło przeciwutleniających peptydów, co jest powodem do popularyzowania wykorzystania tego typu niekonwencjonalnego źródła bioaktywnych peptydów bezpośrednio w żywieniu człowieka lub jako dodatków do żywności specjalnego przeznaczenia żywieniowego.

**Ad 4.** Według danych literaturowych w warunkach stresu oksydacyjnego nadmierna ilość reaktywnych form tlenu może prowadzić do powstawania patologicznych zmian skórnych, w tym zakłócać proces gojenia się ran, powodować przedwczesne starzenie się skóry czy jej przewlekłe choroby. Peptydy jako bioaktywne składniki hamują stany zapalne, regulują syntezę białek macierzy pozakomórkowej i stymulują proliferację komórek, co może mieć pozytywne działanie immunomodulacyjne, jeśli celem są komórki lub układ odpornościowy. W pracach wchodzących

w skład osiągnięcia określano wpływ wybranych hydrolizatów i frakcji peptydowych na wzrost ludzkich fibroblastów skóry BJ (ATCC CRL-2522) (**O5**) oraz komórek mysiego śródbłónka (HECa10) (**O8**).

Komórki ludzkich fibroblastów skóry hodowano na 96-studzienkowej płytce w pożywce EMEM (ang. Eagle's minimal essential medium) z 1% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (FBS z ang. fetal bovine serum) i zawierających 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 µg/ml analizowanych frakcji peptydowych (**O5**). Dodanie 1% FBS pozwoliło na utrzymanie zdrowych komórek bez znaczącej stymulacji proliferacji komórek i pomogło ocenić efekt biologiczny analizowanych peptydów. Po 48 godzinach hodowli komórek w obecności i nieobecności peptydów, oceniano liczbę żywych fibroblastów. Wyniki otrzymane w pracy **O5** wskazują, że frakcje peptydowe 3,5 - 7 kDa otrzymane w wyniku trawienia *in vitro* izolatów z surowych i poddanych obróbce cieplnej (100°C) nasion ciecierzycy znacząco stymulowały proliferację fibroblastów skóry, podczas gdy frakcje <7 i <3,5 kDa nie powodowały wzrostu komórek. Najbardziej znaczącą stymulację proliferacji fibroblastów zaobserwowano, gdy komórki hodowano w obecności frakcji peptydowej 3,5-7 kDa otrzymanej w wyniku symulowanego trawienia izolatów białkowych z gotowanej ciecierzycy. Ta frakcja zwiększyła liczbę żywych fibroblastów o około 30-40% w zakresie stężeń od 12,5 do 100 µg/ml, podczas gdy efekt biologiczny frakcji peptydowej 3,5 – 7 kDa uzyskanej z hydrolizatu izolatu białkowego z ciecierzycy surowej był istotny (30%) tylko dla najwyższego analizowanego stężenia peptydu (100 µg/ml). Jest to bardzo ważne dla konsumenta z uwagi na fakt, że nasiona ciecierzycy spożywane są zazwyczaj po ich obróbce cieplnej.

W przypadku badań dotyczących wpływu frakcji białkowych wyizolowanych i poddanych trawieniu *in vitro* z ogrzewanych i nieogrzewanych ziarniaków prosa na żywotność komórek mysiego śródbłónka z linii HECa10 wybrano trzy hydrolizaty (prolamin prosa kontrolnego, globulin I S prosa po obróbce w temperaturze 65°C i prolamin prosa po obróbce w temperaturze 100°C), które wykazały najlepsze zdolności do hamowania aktywności enzymów, które potencjalnie mogą przeciwdziałać zespołowi metabolicznemu oraz wyodrębnione z nich frakcje peptydów o masie cząsteczkowej poniżej 3,0 kDa.

W celu określenia żywotności komórek HECa10 zastosowano dwa testy (MTT i NR), które mierzyły różne parametry metaboliczne komórek. Test MTT jest oparty na zdolności dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania pomarańczowej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy) do nierozpuszczalnego formazanu, będącego ciemnoniebieskim produktem powyższej reakcji. Test ten może być też używany do określania żywotności komórek w populacjach komórek już nie dzielących się, ale aktywnych metabolicznie. Natomiast w teście NR żywotność komórki określa się przez wychwytywanie komórkowy neutralnego czerwonego barwnika (NR) włączanego do ich lizosomów. Badanie to pozwala odróżnić komórki żywe i nieuszkodzone od martwych lub uszkodzonych, poprzez określenie liczby komórek żywych. W teście proliferacji (testy MTT i NR) zarówno hydrolizat prolamin prosa kontrolnego

jak i frakcja peptydowa z niego otrzymana wykazały podobne zależności. Niskie stężenia obu prób (0,1 i 1  $\mu\text{g/ml}$ ) spowodowały znaczące zmniejszenie liczby komórek po 24 godzinach inkubacji, natomiast wyższe stężenia badanych prób (50 i 100  $\mu\text{g/ml}$ ) spowodowały wzrost liczby komórek. W obu testach (MTT i NR) stężenia 5 i 10  $\mu\text{g/ml}$  były punktem odcięcia między negatywnym i pozytywnym wpływem analizowanych prób na liczbę komórek HECa10. Nie zaobserwowano znaczących zmian w odsetku żywych komórek w obu badanych próbach. Obserwowane zmiany liczby komórki były związane z aktywacją apoptozy. Dodanie hydrolizatu prolamin prosa kontrolnego w stężeniu 0,1 i 10  $\mu\text{g/ml}$  spowodowało największy wzrost odsetka apoptotycznych komórek w porównaniu do kontroli. Wykazano także, że przy niskim stężeniu (0,1  $\mu\text{g/ml}$  i 10  $\mu\text{g/ml}$ ) hydrolizat ten posiada aktywność przeciwnekrotyczną. W przeciwieństwie frakcja peptydowa z niego otrzymana powodowała wzrost apoptozy niezależnie od stężenia (0,1, 10 i 100  $\mu\text{g/ml}$ ), natomiast nie wykazywała aktywności przeciwnekrotycznej. Podczas 24 godzinnej inkubacji komórek HECa10 z hydrolizatem globulin11S prosa po obróbce w temperaturze 65°C nie uzyskano znaczących zmian w liczbie komórek mierzonych za pomocą testów MTT i NR. Podobne wyniki uzyskano dla wyizolowanej z tego hydrolizatu frakcji peptydowej w teście NR, jednakże w teście MTT zaobserwowano nieznaczny wzrost liczby komórek HECa10 w porównaniu z wartościami uzyskanymi w warunkach kontrolnych. Nie zaobserwowano również znaczących zmian w żywotności apoptotycznych i nekrotycznych komórek po 24-godzinnej ich inkubacji z frakcją peptydową hydrolizatu globulin11S prosa po obróbce w temperaturze 65°C. Natomiast inkubacja z hydrolizatem tych globulin spowodowała znaczne zmniejszenie odsetka żywych komórek w połączeniu ze wzrostem odsetka komórek apoptotycznych (głównie we wczesnej fazie apoptozy komórek). Nie stwierdzono również istotnych zmian w liczbie komórek mierzonych za pomocą testów MTT i NR zarówno w obecności hydrolizatu prolamin otrzymanych z prosa poddanego obróbce cieplnej w 100°C jak i frakcji peptydowej z niego wyizolowanej w zakresie badanych stężeń (0,1–100  $\mu\text{g/ml}$ ). Jedynie w teście NR frakcja peptydowa przy stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  spowodowała istotny statystycznie spadek liczby komórek w porównaniu z wartościami kontrolnymi. Największy dodatek (100  $\mu\text{g/ml}$ ) hydrolizatu oraz frakcji peptydowej uzyskanych z prosa poddanego obróbce termicznej w 100°C przyczynił się do wzrostu liczby komórek apoptotycznych. Pewne niewielkie różnice w żywotności komórek w obecności analizowanych hydrolizatów i peptydów, obserwowane w testach MTT i NR, mogą wynikać z różnych parametrów metabolicznych komórek mierzonych za pomocą tych testów lub modulacji metabolizmu komórek przez badane związki (tj. wpływu stanu metabolicznego komórki). Pomimo, iż zaobserwowano wpływ hydrolizatów i frakcji peptydowych na komórki HECa10, to nie zaobserwowano wyraźnej zależności między stężeniami próbek i ich efektem biologicznym (zwłaszcza w przypadku ziaren prosa poddanych obróbce temperaturowej).

### 4.3.3. Podsumowanie

Przedstawiony jako **Osiągnięcie** cykl prac stanowi połączenie zagadnień z zakresu peptydomiki, technologii żywności oraz biochemii. Uzyskane wyniki badań stanowią wartościowe źródło informacji, które poszerzają już istniejącą wiedzę na temat składników żywności będących potencjalnym źródłem bioaktywnych peptydów, które mogą zapobiegać rozwojowi chorób cywilizacyjnych. Przeprowadzone badania wykazały, iż nasiona roślin strączkowych, ziarniaki zbóż i wybrane gatunki jadalnych owadów mogą stanowić wartościowe źródło nie tylko składników odżywczych ale również biologicznie aktywnych peptydów, które mogą potencjalnie zapobiegać rozwojowi zespołu metabolicznego. Udowodniono bowiem ich działanie przeciwtłeniające, przeciwnadciśnieniowe, przeciwcukrzycowe oraz stymulujące wzrost fibroblastów, a proces obróbki termicznej czy też kiełkowania nasion modyfikuje ich uwalnianie, co różnicuje ich aktywności fizjologiczne. Uzyskane wyniki sugerują, że rodzaj użytych enzymów oraz warunki procesu hydrolizy oraz procesy technologiczne mogą mieć znaczący wpływ na aktywność i dostępność peptydów. Wyizolowane i zidentyfikowane peptydy mogą znaleźć wykorzystanie w projektowaniu żywności specjalnego przeznaczenia żywieniowego.

### Literatura

- Agrawal, H.; Joshi, R.; Gupta, M. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate. *Food Chem.* 2016, 204, 365–372.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414, 813-820.
- Borawska J., Darewicz M., Vegarud G. E., Iwaniak A., & Minkiewicz P. (2015). *Ex vivo* digestion of carp muscle tissue—ACE inhibitory and antioxidant activities of the obtained hydrolysates. *Food & Function*, 6(1), 210-217.
- Borawska J., Darewicz M., Vegarud G. E., & Minkiewicz P. (2016). Antioxidant properties of carp (*Cyprinus carpio* L.) protein *ex vivo* and in vitro hydrolysates. *Food Chem.* 194, 770-779.
- Chakrabarti S., Guha S., & Majumder K. (2018). Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients*, 10(11), 1738.
- Chen J., Duan W., Ren X., Wang C., Pan Z. (2016). Effect of foxtail millet protein hydrolysates on lowering blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Nutr.*, 56, 2129–2138.
- Clemmensen C., Müller T.D., Woods S.C., Berthoud H.R., Seeley R.J., Tschöp M.H. (2017). Gut-brain cross-talk in metabolic control *Cell*, 168, 758-774.
- Cornier, M. A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., ... & Eckel, R. H. (2008). The metabolic syndrome. *Endocrine reviews*, 29(7), 777-822.
- Darewicz M., Borawska-Dziadkiewicz J., E Vegarud G., & Minkiewicz P. (2017). European Carp (*Cyprinus carpio* L.) Protein-derived *ex vivo* digests and in vitro hydrolysates differ in the ACE I inhibitory activity and composition of released ACE inhibitory peptides. *Protein Pep. Lett.* 24(2), 156-164.

- Darewicz M, Borawska J, Vegarud GE, et al. (2014) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and ACE inhibitory peptides of salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysates obtained by human and porcine gastrointestinal enzymes. *Int J Mol Sci*, 15: 14077-14101.
- Espinosa-Moncada, J., Marín-Echeverri, C., Galvis-Pérez, Y., Ciro-Gómez, G., Aristizábal, J., Blesso, C., ... & Barona-Acevedo, J. (2018). Evaluation of Agraz Consumption on Adipocytokines, Inflammation, and Oxidative Stress Markers in Women with Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 10(11), 1639.
- Fernandez-Gomez, B., Lezama A., Amigo-Benavent M., Ullate M., Herrero M., Martín M. Á., (2016) Insights on the health benefits of the bioactive compounds of coffee silverskin extract, *J Funct Foods*, 25, 197–207.
- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, et al. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 12:3, 117-32.
- Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y.,... Shimomura I. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 114(12), 1752-1761.
- Garcia V., Joseph G., Shkolnik B., Ding Y., Zhang F.F., Gotlinger K., Falck J.R., Dakarapu R., Capdevila J.H., Bernstein K.E., et al. (2015). Angiotensin II receptor blockade or deletion of vascular endothelial ACE does not prevent vascular dysfunction and remodeling in 20-HETE-dependent hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 309, 71-8.
- Girón-Calle J., Alaiz M. & Vioque J. (2010). Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and in vitro bioavailability. *Food Res Int.* 43, 1365–1370.
- Iwaniak A., Darewicz M., & Minkiewicz P. (2018). Peptides derived from foods as supportive diet components in the prevention of metabolic syndrome. *Compr Rev Food Sci F*, 17(1), 63-81.
- Kandola K., Bowman A., & Birch - Machin M. A. (2015). Oxidative stress—a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *Int J Cosmetic Sci*, 37, 1-8.
- Khyade V. B., & Jagtap S. G. (2016). Sprouting exert significant influence on the antioxidant activity in selected pulses (Black Gram, Cowpea, Desi Chickpea and Yellow Mustard). *World Scientific News*, 35, 73-86.
- Kou X., Gao J., Xue X., Zhang Z., Wang H. & Wang X. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT - Food Sci Tech*, 50, 591-598.
- Kumar A., Metwal M., Kaur S., Gupta A. K. Puranik S., Singh S., Yadav R. (2016). Nutraceutical value of finger millet [*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.], and their improvement using omics approaches. *Front Plant Sci*, 7, 934.
- Kunyanga C.N., Imungi J.K., Okoth M.W., Biesalski H.K., Vadivel V. (2012). Total phenolic content, antioxidant and antidiabetic properties of methanolic extract of raw and traditionally processed Kenyan indigenous food ingredients. *LWT - Food Sci. Technol.*, 45, 269–276.
- Li-Chan E. C. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28-37.

- Lobo V., Patil A., Phatak A. & Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118–126.
- Lorenzo J. M., Munekata P. E., Gomez B., Barba F. J., Mora L., Perez-Santaescolastica C., & Toldra F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends Food Sci Technol*.
- Maddux BA, et al. (2001). Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of  $\alpha$ -lipoic acid. *Diabetes*. 50, 404-410.
- Martirosyan D., & Miller E. (2018). Bioactive compounds: The key to functional foods. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 1(3), 36-39.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 91, 2546-2551.
- Olagunju A. I., Omoba O. S., Enujiugha V. N., Alashi A. M., & Aluko R. E. (2018). Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An in vitro study. *LWT- Food Sci Tech*, 97, 269-278.
- Perrelli A., Goitre L., Salzano A. M., Moglia A., Scaloni A., & Retta S. F. (2018). Biological activities, health benefits, and therapeutic properties of avenanthramides: from skin protection to prevention and treatment of cerebrovascular diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Pituch-Zdanowska A., Banaszkiwicz A., Dziekiewicz M., Łazowska-Przeorek I., Gawrońska A., Kowalska-Duplaga K., Albrecht P. (2016). Overweight and obesity in children with newly diagnosed inflammatory bowel disease, *Adv Med Sci*. 61, 28–31.
- Rasane P., Jha A., Sabikhi L., Kumar A., & Unnikrishnan V. S. (2015). Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods-a review. *Journal of food science and technology*, 52(2), 662-675.
- Rettore A. (2016). *Insects: A Protein Revolution for the Western Human Diet*.
- Rosas-Peralta M.; Jiménez-Genchi G.M. (2018). New Challenges for Treatment in Hypertension. *Arch Med Res.*, in press, <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.11.005>
- Ruiz-Ruiz J., Dávila-Ortíz G., Chel-Guerrero L. & Betancur-Ancona D. (2013). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. *J Food Biochem*. 37, 26-35.
- Stadtman E. R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radic Res*. 40, 1250-1258.
- Toldrá F., Reig M., Aristoy M. C., & Mora L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chem*. 267, 395-404.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M. & Vioque, J. (2011). Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chem*. 129, 485–490.



- Umachigi S.P., Kumar G.S., Jayaveera K., Kishore K.D., Ashok C.K. & Dhanapal R. (2007). Antimicrobial, wound healing and antioxidant activities of *Anthocephalus cadamba*. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 4, 481-487.
- Yu Z., Yin Y., Zhao W., Liu J. i Chen F. (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase. *Food Chem.* 135, 2078–2085.
- Zhang L., Falla T. J. (2009). Cosmeceuticals and peptides. *Clin. Dermatol.* 27(5), 485-494.
- Zhang M., Mu T.-H., Wang Y.-B. & Sun M.-J. (2012). Evaluation of free radical-scavenging activities of sweet potato protein and its hydrolysates as affected by single and combination of enzyme systems, *Int J Food Sci Technol.* 47 (4), 696-702.
- Zhu L., Chen J., Tang X. & Xiong YL. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2714–2721.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

---

Po rozpoczęciu pracy jako asystent zostałam włączona w prace Zespołu Katedry Biochemii i Chemii Żywności kierowanej przez prof. dr hab. Barbarę Baraniak, zajmującego się szeroko pojętymi zagadnieniami związanymi z chemią i biochemią żywności pochodzenia roślinnego, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości otrzymywania roślinnych preparatów białkowych, badaniach proteomu nasion roślin strączkowych oraz chromatograficznymi metodami rozdziału peptydów, w tym chromatografii powinowactwa na unieruchomionych jonach metalu (IMAC). Efektem są prace: **D1-1** opublikowana w *Journal of Animal and Feed Sciences* dotycząca właściwości przeciwutleniających koncentratów chloroplastycznych koagulowanych z soku z lucerny różnymi metodami; **D1-3** opublikowana w *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, dotycząca właściwości funkcjonalnych koncentratów chloroplastycznych koagulowanych z soku z lucerny różnymi metodami; **D1-2** opublikowana w *Annales UMCS sec. E Agricultura*, dotycząca wpływu wybranych substancji na aktywność kwaśnej fosfatazy lucerny i liści słonecznika; **D1-4** opublikowana w *Agri-Food Quality II, Quality Management of Fruits and Vegetables*, dotycząca wpływu temperatury na aktywność enzymów proteolitycznych wyizolowanych z frakcji albumin zielonego groszku.

Badania te wzbudziły moje zainteresowanie enzymami proteolitycznymi i peptydami, produktami ich działania. Prace związane z analizą struktury oraz właściwościami białek i peptydów jako fizjologicznie aktywnych składników diety miały wówczas charakter nowatorski i podejmowane były przez nieliczne światowe i krajowe ośrodki naukowe. Istotnym problemem w tego typu badaniach jest wyizolowanie peptydów i przeprowadzenie ich charakterystyki. W skomplikowanym procesie rozdziału postanowiłam ocenić skuteczność wykorzystania chromatografii powinowactwa na unieruchomionych jonach metali – IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography), metody

nie testowanej w procesie rozdzielania peptydów z białek spożywczych. Chromatografia powinowactwa wykorzystuje specyficzne oddziaływania między aminokwasami oraz ich reaktywnymi ugrupowaniami w peptydach a jonami metali immobilizowanymi na kolumnach z odpowiednim nośnikiem. Jako obiekt badań wybrałam fasolę szparagową, warzywo zasobne w białko, popularne w Polsce zarówno w uprawie jak i konsumpcji. Tematyka ta stanowiła zakres badań dysertacji doktorskiej pt.: "Izolowanie i charakterystyka peptydów fasoli szparagowej", wykonanej pod kierunkiem dr hab. prof. Barbary Baraniak. Na wniosek Recenzentów praca ta została wyróżniona nagrodą JM Rektora.

W procesie izolowania peptydów wykorzystałam różne metody: ekstrakcję 1% roztworem TCA (kwas trichlorooctowy), wydzielenie z mieszaniny po ekstrakcji buforem Tris-HCl o pH = 7,5; poprzez wytrącenie białek metanolem, acetonem, 20% kwasem trichlorooctowym oraz kationowym flokulantem Magnafloc M-22S. Testowałam przydatność jonów metali ( $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$ ) i czynnika chelatującego (iminodiocyan - IDA i o-fosfoseryna - OPS) w procesie rozdzielania peptydów (otrzymanych także z fasolki poddawanej obróbce termicznej) na kolumnach wypełnionych żelem Sephadex G-25. W celu scharakteryzowania frakcji peptydowych przeprowadzony został rozdział elektroforetyczny, identyfikacja peptydów przy użyciu spektrometrii mas ESI-MS/MS oraz ich właściwości przeciwutleniające. Otrzymane wyniki opublikowałam w czasopiśmie *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, Protein and Peptide Letters, Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* oraz *Journal of Elementology* (prace **D2-23**, **D2-1**, **D2-22**, **D2-2** i **D2-3**).

Wykazano, że peptydy wyizolowane 1% kwasem trichlorooctowym (TCA) z ogrzewanej fasoli szparagowej charakteryzowały się zbliżonym powinowactwem do jonów miedzi i niklu unieruchomionych poprzez kwas iminodiocyan na żelu Sephadex G-25. Powinowactwo przebiegało w kolejności  $\text{Cu} > \text{Ni}$ , natomiast selektywność układała się w kolejności  $\text{Ni} > \text{Cu}$ . Ogrzewanie fasoli szparagowej spowodowało obniżenie zawartości peptydów w ekstraktach w zależności od czasu trwania procesu i rodzaju zastosowanej techniki grzewczej – mikrofała czy blanszowanie (**D2-2**). Natomiast peptydy wydzielone z mieszaniny wyekstrahowanej buforem Tris-HCl ze strąków fasoli, po usunięciu frakcji wysokocząsteczkowych białek (metanolem, acetonem, 20% kwasem trichlorooctowym oraz kationowym flokulantem Magnafloc M-22S) wykazały zbliżone powinowactwo do jonów miedzi immobilizowanych na żelu Sephadex G-25 poprzez o-fosfoserynę. Wykazano również, że rozdział peptydów w niewielkim stopniu zależał od właściwości czynnika zastosowanego podczas usuwania białek z ekstraktu (**D2-3**). Stwierdzono natomiast, iż czynnik zastosowany do usuwania związków wysokocząsteczkowych różnicuje zawartość peptydów w pozostałych ekstraktach i ich właściwości przeciwrodnikowe (wyrażone jako % neutralizowania wolnych rodników DPPH). Przeprowadzony rozdział elektroforetyczny wykazał, że zdolność neutralizowania rodników DPPH przez te peptydy jest determinowana wielkością ich molekuł, natomiast nie zależy od ich zawartości (**D2-23**).

Z kolei w pracy (D2-1) peptydy wyekstrahowane z fasolki szparagowej 1% TCA rozdzielono wykorzystując złożę Sephadex G-25 z unieruchomionymi poprzez iminodioctan i o-fosfoserynę jonami miedzi. Stwierdzono, że zdolność do neutralizowania wolnych rodników DPPH przez otrzymane frakcje peptydowe zależy od wykorzystanego związku chelatującego (OPS, IDA) i kolejności w jakiej frakcje wymywano z kolumny. Niezależnie jednak od zastosowanego czynnika chelatującego w największym stopniu właściwości przeciwrodnikowe wykazały frakcje 2-6 i 36-41, w najniższym zaś frakcje 17-19 (IDA) i 7-11 (OPS). Przeprowadzona w najaktywniejszej frakcji identyfikacja peptydów przy użyciu spektrometrii mas ESI-MS/MS wykazała, że najprawdopodobniej jest to zmodyfikowany di- lub tripeptyd.

Stwierdzono, że chromatografia powinowactwa z wykorzystaniem unieruchomionych jonów metali na schelatowanym kwasem iminodioctowym (IDA) lub o-fosfoseryną żelu Sephadex G-25 może być z powodzeniem stosowana do rozdziału peptydów z fasoli szparagowej.

Dodatkowo przeprowadzono badania podatności enzymów proteolitycznych związanych z frakcją albumin fasoli szparagowej na działanie wybranych inhibitorów: glutation, Tris(hydroksymetylo)aminometan, PMSF (fluorek fenylometrylosulfonowy), EDTA (sól sodowa etylenodiaminooctanu), wybrane jony metali, diaminy, inhibitor trypsyny oraz inhibitory wyekstrahowane z fasoli szparagowej (D2-22). Stwierdzono, że spośród przebadanych substancji jony srebra i rtęci w największym stopniu hamowały aktywność proteaz wyekstrahowanych z fasoli szparagowej. Natomiast spośród inhibitorów organicznych najsilniejsze działanie hamujące wykazywał zredukowany glutation i PMSF. Analizowane diaminy wykazywały najmniejszą aktywność hamującą nawet stosowane w stężeniu dziesięciokrotnie większym niż w przypadku jonów rtęci i jonów srebra dawały stosunkowo niski procent hamowania. Natomiast wyizolowane z fasoli szparagowej inhibitory proteaz również wykazywały hamujące działanie w stosunku do trypsyny i pepsyny oraz enzymów proteolitycznych wyekstrahowanych z fasoli buforem Tris-HCl (pH =7,5) ale za to aktywowały działanie bromelainy.

Przeprowadzone badania wykazały, że zielona fasola szparagowa (*Phaseolus vulgaris* L, cv. Fana) jest źródłem przeciwutleniających peptydów, które z powodzeniem mogą być rozdzielane przy wykorzystaniu techniki chromatografii powinowactwa na unieruchomionych jonach metali.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora kontynuowałam zespołowe prace dotyczące biologicznie aktywnych peptydów z żywności, jak również badania aktywności innych składników wybranych środków spożywczych.

Wiele niskocząsteczkowych peptydów występujących naturalnie w komórkach roślin, bakterii i zwierząt wykazuje różnorodną aktywność fizjologiczną. Należą do nich między innymi peptydy przeciwutleniające (glutation), opioidowe (enkefaliny, endorfiny), neuropeptydy (substancja P) jak również toksyczne (m.in. toksyny grzybów, jady węży, niektóre antybiotyki). Związki te zwykle w swojej cząsteczce zawierają elementy nie aminokwasowe (np. hydroksykwasy) oraz aminokwasy

nie białkowe (np.  $\beta$ -alaninę, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy, D-aminokwasy), które powodują, że takie peptydy są odporne na działanie proteaz przewodu pokarmowego człowieka. Po procesie wchłaniania przedostają się do krwioobiegu i mogą wykazywać różnorodną aktywność fizjologiczną.

Właściwości biologicznie aktywnych peptydów wciąż budzą zainteresowanie wielu naukowców nad wykorzystaniem ich jako farmaceutyków w zwalczaniu bólu, hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych, w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych czy też nadciśnienia, co opisano w monografii „Odżywcze i funkcjonalne składniki żywności” (D2-29) oraz pracy przeglądowej (D2-38).

Część biologicznie aktywnych peptydów, naturalnie występujących w przyrodzie należy do związków, które są ważnym elementem układu odpornościowego oraz obronnego organizmów zwierzęcych i roślinnych. W pracy (D2-33) opublikowanej w monografii „Toksyczne substancje spożywcze” opisano toksyczne peptydy pochodzące z jadu pszczelego (melityna), osowatych (wespina), płazów (bombina), gadów ( $\alpha$ -kobratoksyna), mięczaków ( $\omega$ -conotoksyna) oraz grzybów (fallotoksyny), które w wielu przypadkach znalazły zastosowanie jako lekarstwa. Przykładem może być wykorzystanie  $\omega$ -conotoksyny jako głównego składnika nieopiodowego leku przeciwbólowego (Prialt) stosowanego u osób cierpiących na choroby nowotworowe. Ze względu na duże powinowactwo i selektywność toksyn peptydowych, są one wykorzystywane jako leki lub są testowane w badaniach klinicznych.

Obok wielu dobrze poznanych głównych składników żywności, takich jak białka, tłuszcze, węglowodany i błonnik pokarmowy oraz mikroelementy, żywność może zawierać także substancje o właściwościach toksycznych. Należą do nich niewątpliwie alkaloidy pirolizydynowe opisane w pracy opublikowanej w *Przemysle Spożywczym* (D2-25) oraz peptydy, które są uwalniane podczas procesu trawienia glutenu przez osoby z nietolerancją tego składnika (celiakia) (D2-34). Niektóre peptydy uwalniane z mieszaniny białek (glutenu), występujących w pszenicy, życie i jęczmieniu, mogą być szczególnie niebezpieczne dla zdrowia, zwłaszcza u osób cierpiących na celiakię. Z uwagi na dużą różnorodność białek glutenu i brak odpowiednich testów, dokładny mechanizm toksyczności i przyczyn występowania choroby jest wciąż niejasny, a liczne badania *in vitro* i *in vivo* dotyczące peptydów uwalnianych z prolamin pochodzących z pszenicy, nie wyjaśniają jednoznacznie mechanizmu ich toksyczności. Wiadomo jednak, że ze względu na wysoką zawartość proliny w glutenie, która zmniejsza aktywność enzymów proteolitycznych dochodzi do niepełnego jego trawienia w przewodzie pokarmowym człowieka, w wyniku czego uwalniane są peptydy, które biorą udział w patogenezie celiakii (D2-34).

W pracach eksperymentalnych uczestniczyłam w badaniach wpływu różnych procesów technologicznych, którym poddawane są nasiona roślin strączkowych oraz ziarniaki zbóż, na aktywność hydrolizatów oraz frakcji peptydowych otrzymanych z ich białek w wyniku procesu trawienia i wchłaniania w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka.

Fermentacja jest jedną z najstarszych biotechnologicznych metod stosowanych w przetwórstwie żywności w celu poprawy strawności nasion roślin strączkowych. Ponadto proces ten może przyczyniać się do generowania funkcjonalnych składników żywności, jakimi są między innymi peptydy. Liczne badania wykazały, że biologicznie aktywne peptydy hamują aktywność enzymów takich jak: enzym konwertujący angiotensynę (ACE), lipaza,  $\alpha$ -amylaza i  $\alpha$ -glukozydaza, lipooksygenaza (LOX) czy też cyklooksygenaza (COX). Enzymy te uczestniczą w procesach związanych z zagrożeniem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych (miażdżyca, nadciśnienie), cukrzycy typu 2, otyłości oraz stanów zapalnych. Zespół metaboliczny to grupa powiązanych ze sobą elementów, mogących zwiększać ryzyko zachorowalności na wyżej wymienione jednostki chorobowe. Jedną z metod zapobiegania tego typu chorobom jest zahamowanie aktywności enzymów biorących udział w patogenezie zespołu metabolicznego.

Prace opublikowane w *Food Chemistry* (**D2-4**), *Food Research International* (**D2-11**) i *LWT - Food Science and Technology* (**D2-20**) dotyczyły wpływu procesu fermentacji (z użyciem monokultury *Lactobacillus plantarum* 299v) nasion grochu (*Pisum sativum* L.), fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) i bobu (*Vicia faba* L.) na uwalnianie peptydowych inhibitorów enzymów zaangażowanych w patogenezę zespołu metabolicznego, podczas trawienia symulującego warunki w układzie pokarmowym człowieka. Nasiona wyżej wymienionych roślin poddano procesowi fermentacji z użyciem monokultury *Lactobacillus plantarum* 299v. Proces fermentacji prowadzony był w różnych warunkach czasu (3h, 3dni i 7dni) i temperatury (22°C, 30°C i 37 °C), a produkty fermentacji poddano procesowi trawienia w warunkach symulujących przewód pokarmowy człowieka (hydroliza pepsyną i pankreatyną). Z otrzymanych hydrolizatów wyodrębniono peptydy o masie cząsteczkowej < 7,0 kDa i oznaczono ich biologiczne aktywności. Najaktywniejsze mieszaniny rozdzielono na żelu Sephadex G-10, a w otrzymanych, najbardziej aktywnych frakcjach zidentyfikowano metodą LC-MS/MS (po rozdziale HPLC) obecne w nich peptydy.

Fermentowane nasiona grochu nie wykazywały zdolności do hamowania aktywności ACE, natomiast hydrolizaty z nich otrzymane taką zdolność już posiadały (**D2-4**). Pomimo, że najwyższy stopień hydrolizy białek (DH = 68,62%) otrzymano dla próby kontrolnej, to najlepsze potencjalne właściwości przeciwnadciśnieniowe, wyrażone jako wartość  $IC_{50}$  (0,19 mg/ml), otrzymano w przypadku nasion fermentowanych przez 7 dni w 22 °C. Po jego rozdziale na złożu Sephadex G-10 otrzymano dwie frakcje peptydów. Najwyższą zdolność hamowania ACE ( $IC_{50}$  = 64,04  $\mu$ g/ml) oznaczono dla pierwszej frakcji, w której zidentyfikowano peptyd o następującej sekwencji aminokwasowej: KEDDEEEQEEEE.

Z kolei wyniki pracy **D2-11** wykazały, że najbardziej skuteczne w hamowaniu aktywności ACE i lipazy były frakcje peptydowe o masie cząsteczkowej 3,5–7,0 kDa, otrzymane po 3 dniach fermentacji w 30°C ( $IC_{50}$  = 1,19 mg/ml i 0,28 mg/ml, odpowiednio), które na żelu Sephadex G-10 uległy rozdzielaniu na cztery frakcje. W czwartej, w największym stopniu hamującej aktywność enzymów mających znaczenie w patogenezie zespołu metabolicznego ( $IC_{50}$ : dla ACE = 0,36  $\mu$ g/ml;

dla lipazy = 0,11  $\mu\text{g/ml}$ ; dla  $\alpha$ -amylazy = 0,69  $\mu\text{g/ml}$ ), zidentyfikowano peptydy o następującej sekwencji aminokwasowej: INEGSLLLPH, SGGGGGGVAGAATASR, GSGGGGGGGFGGPRR, GGYQGGGYGGNSGGGYGNRG, FVVAEQAGNEEGFE, GSGGGGGSSSGRRP i GDTVTVEFDTFSLR. Z kolei we frakcji trzeciej otrzymanej po rozdziale peptydów o masie cząsteczkowej 3,5–7,0 kDa hydrolizatu nasion fasoli fermentowanej w 22°C przez 3 godziny zidentyfikowano dwa peptydy: INEGSLLLPH i FVVAEQAGNEEGFE. Frakcja ta wykazała również wysokie zdolności hamowania aktywności badanych enzymów, w szczególności  $\alpha$ -amylazy ( $\text{IC}_{50}$ : dla ACE = 0,20  $\mu\text{g/ml}$ ; dla lipazy = 1,15  $\mu\text{g/ml}$ ; dla  $\alpha$ -amylazy = 0,038  $\mu\text{g/ml}$ ).

W przypadku bobu (**D2-20**) peptydy o masie cząsteczkowej < 3,0 kDa wyodrębnione z hydrolizatów uzyskanych po symulowanym trawieniu nasion fermentowanych w różnych warunkach wykazały wysoką aktywność dla poddawanych temu procesowi przez 3 dni w 30°C ( $\text{IC}_{50}$ : dla ACE = 1,01 mg/ml; dla lipazy 2,11 mg/ml; dla lipooksygenazy = 0,80 mg/ml; dla ABTS<sup>++</sup> = 0,99 mg/ml). Z wyjątkiem zdolności do hamowania aktywności lipazy były to wartości najwyższe ze wszystkich analizowanych mieszanin peptydów potencjalnie przenikających do krwiobiegu i dlatego ta mieszanina została poddana dalszemu rozfrakcjonowaniu na żelu Sephadex G-10. Wszystkie uzyskane trzy główne frakcje posiadały wysokie zdolności inhibitowania aktywności enzymów potencjalnie zaangażowanych w choroby zespołu metabolicznego i właściwości przeciwnadciśnieniowe, a peptydy zidentyfikowane w pierwszej, najbardziej aktywnej frakcji ( $\text{IC}_{50}$ : dla ACE=0,05 mg/ml; dla lipazy 0,46 mg/ml; dla lipooksygenazy = 0,1 mg/ml; dla ABTS<sup>++</sup> = 0,02 mg/ml) posiadały następującą sekwencję aminokwasową: DALEPDNRIESEGLIETWNPNNRQ, FEPPQQSEQGEGR, RGEDEDDKEKRHSQKGES, WMYNDQDIPVINNQLDQMPR, GSRQEEDDEDEDE i RLNIGSSSSPDIYNPQAGR.

Otrzymane wyniki dokumentują, że fermentowane nasiona roślin strączkowych stanowią źródło biologicznie czynnych peptydów, których ukierunkowana aktywność i potencjalna skuteczność determinowana jest gatunkiem rośliny i warunkami prowadzenia procesu. Wykorzystanie ich jako funkcjonalnych składników diety musi więc być poprzedzone badaniami optymalizacji zabiegów biotechnologicznych.

Coraz większa popularność ziarniaków prosa i surowców z nich otrzymanych wynika zarówno z ich dużej wartości odżywczej, jak i obecności substancji prozdrowotnych. Gotowanie jest jedną z najpopularniejszych technik stosowanych podczas przygotowywania potraw, które nie tylko zwiększa strawność ale również przyczynia się do usunięcia składników antyodżywczych. Stosowane procesy przetwórcze ziarniaków mogą powodować zmiany w strawności białek co w konsekwencji może prowadzić do otrzymywania nowych związków (peptydów) o zaprojektowanej aktywności prozdrowotnej. W celu uzyskania lepszego potencjału prozdrowotnego surowca poszukuje się różnych alternatywnych metod obróbki termicznej, do których zaliczamy ogrzewanie niskotemperaturowe.

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, którego byłam wykonawcą, określono wpływ temperatury ogrzewania (65 i 100°C) ziarniaków prosa na profil frakcji białkowych (albumin, globulin 7S, globulin 11S, prolamin i glutelin) oraz zawartość i aktywność peptydów otrzymanych z nich po trawieniu *in vitro*. Wyniki tego etapu badań opublikowano w czasopiśmie *Cyta- Journal* (**D2-21**).

Na podstawie rozdziału frakcji albumin, globulin 7S i 11S, glutelin oraz prolamin uzyskanego przy użyciu techniki SDS-PAGE stwierdzono, że obróbka termiczna znacząco zmodyfikowała profil analizowanych białek. Najwięcej prążków uzyskano z frakcji albumin próby kontrolnej (ziarniaki nie poddawane obróbce termicznej), najmniej ze wszystkich frakcji białkowych uzyskanych z ziarniaków prosa po ogrzaniu w 100°C. Najwyższą zawartość peptydów (2,03 mg/ml) oznaczono w hydrolizacie otrzymanym po trawieniu albumin próby kontrolnej w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka, a najniższą (0,09 mg/ml) w hydrolizacie otrzymanym po trawieniu globulin 11S ziarniaków prosa po ogrzaniu w 65°C.

Frakcje peptydowe o masie cząsteczkowej < 3,0 kDa wyodrębnione z hydrolizatów uzyskanych po symulowanym trawieniu białek prosa, odznaczały się lepszymi zdolnościami do hamowania aktywności cyklooksygenaz (COX I i COX II) lipooksygenazy (LOX) oraz lipazy niż hydrolizaty. Najwyższą zdolność do hamowania COX I i II wykazywała frakcja peptydowa wyizolowana z hydrolizatu globulin 7S ziarniaków prosa po ogrzaniu w 65°C (IC<sub>50</sub> = 0,08 mg/ml i 0,12 mg/ml, odpowiednio); LOX – z hydrolizatu prolamin ziarniaków prosa po ogrzaniu w 100°C (IC<sub>50</sub> = 0,14 mg/ml). Natomiast lipaza trzustkowa w największym stopniu była hamowana przez peptydy otrzymane z hydrolizatu prolamin ziarniaków prosa po ogrzaniu w 65°C (IC<sub>50</sub> = 0,03 mg/ml).

Kolejnym obszarem badawczym, związanym z rolą promotora pomocniczego dysertacji doktorskiej mgr inż. Eweliny Zielińskiej, były owady jako niekonwencjonalne źródło białka oraz wielu innych cennych składników w żywieniu człowieka. Owady obok białka, które jest także prekursorem bioaktywnych peptydów, są zasobne w niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe, są źródłem witamin – głównie witamin z grupy B oraz w mniejszych ilościach witamin E, A i C, a także składników mineralnych takich jak: żelazo, wapń, magnez, cynk, potas, fosfor, czy selen, co omówiono w pracach przeglądowych **D2-36** i **D2-4** oraz badawczej **D2-7**.

Przeprowadzone prace eksperymentalne dotyczyły przede wszystkim charakterystyki białek wybranych gatunków owadów w aspekcie możliwości wykorzystania ich w diecie człowieka bezpośrednio, (w tym jako źródła bioaktywnych peptydów) lub otrzymanych z nich izolatów białkowych jako funkcjonalnych dodatków do środków spożywczych. Otrzymane wyniki opublikowano w: *Food Research International* (**D2-7**); *Nutrients* (**D2-13**); *LWT – Food Science and Technology* (**D2-14**) i *International Journal of Food Science and Technology* (**D2-15**).

Materiał badawczy stanowiły trzy gatunki owadów: dorosłe świerszcze bananowe (*Grylloides sigillatus*), dorosłe szarańcze pustynne (*Schistocerca gregaria*) oraz larwy mącznika młynarka

(*Tenebrio molitor*), które poddawano obróbce termicznej (gotowane i pieczone) oraz otrzymywano z nich preparaty białkowe.

W celu potwierdzenia zasadności zastosowania owadów w przemyśle spożywczym w pracy **D2-14** wyżej wymienione gatunki owadów i otrzymane z nich preparaty białkowe przeanalizowano w aspekcie określenia ich właściwości funkcjonalnych (rozpuszczalność białek, zdolność absorpcji wody i tłuszczu, wydajność pienienia i stabilność piany oraz aktywność emulgowania i stabilność emulsji). Najwyższą zdolność absorpcji wody (3,95 g/g), oznaczono dla preparatu białkowego otrzymanego z larw mącznika (*T. molitor*), natomiast oleju dla preparatu białkowego z świerszcza bananowego (*G. sigillatus*) (3,33 g/g). Preparat białkowy otrzymany z świerszcza wykazał również najwyższą zdolność pienienia, stabilność piany i aktywność emulgowania (odpowiednio: 99,0%, 92,0% i 72,62%), podczas gdy preparat białkowy z szarańczy pustynnej (*S. gregaria*) wykazywał najwyższą stabilność emulsji (51,31%). Białko świerszcza bananowego (*G. sigillatus*) odznaczało się dobrą rozpuszczalnością w szerokim zakresie pH, a zarówno jego mączka jak i preparat białkowy charakteryzowały się najlepszymi właściwościami funkcjonalnymi spośród wszystkich przebadanych gatunków (**D2-14**). Ocena organoleptyczna wykazała, że preparat białkowy z szarańczy jest najbardziej akceptowalny przez potencjalnych konsumentów. Generalnie, preparaty białkowe wykazywały lepsze właściwości funkcjonalne i były lepiej ocenione organoleptycznie niż mączki z owadów, co czyni je bardziej przydatnymi z punktu widzenia technologii żywności (**D2-14**).

Ocena jakości odżywczej wykazała, że analizowane owady są dobrym źródłem białka (52,35 - 76%), a profil aminokwasowy badanych gatunków był porównywalny do białka wzorcowego WHO / FAO / UNU. Najwyższy stopień strawności (DH) białka odnotowano dla pieczonego świerszcza (37,76%). Ponadto zawartość tłuszczu badanych owadów mieściła się w przedziale 12,97–24,7%, a kaloryczność wahała się od 1821 do 1896 kJ/100 g. Wszystkie analizowane gatunki owadów były zasobne w mikro- i makroelementy takie jak: magnez, miedź, żelazo i cynk zgodne z zalecanymi dziennymi dawkami (mg/dzień) (**D2-7**).

Kolejną korzyścią, uzyskaną z obecności w diecie białek owadów, jest aktywność biologiczna peptydów, powstających w wyniku ich hydrolizy. W pracy **D2-7** oznaczono wpływ obróbki termicznej owadów na cytotoksyczność wobec fibroblastów ludzkiej skóry hydrolizatów otrzymanych po ich trawieniu *in vitro*. Otrzymane wyniki wykazały, że proces obróbki termicznej analizowanych owadów gwarantuje ich bezpieczeństwo zdrowotne.

W pracach **D2-13** i **D2-15** badano właściwości prozdrowotne hydrolizatów i frakcji peptydowych otrzymanych w wyniku trawienia *in vitro* ( $\alpha$ -amylaza, pepsyna, pankreatyna, roztwór żółci) analizowanych gatunków owadów jadalnych poddanych obróbce cieplnej oraz otrzymanych z nich izolatów. Właściwości przeciwutleniające hydrolizatów, wyrażone jako zdolność do neutralizowania wolnych rodników generowanych z ABTS i DPPH, chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  oraz redukcji  $Fe^{3+}$ , były przede wszystkim uzależnione od gatunku owadów i od rodzaju oznaczanej aktywności. Obróbka termiczna spowodowała wzrost zdolności neutralizowania wolnych rodników:



ABTS w przypadku szarańczy pustynnej, a DPPH w przypadku mącznika młynarka; zdolność chelatowania jonów żelaza w przypadku świerszcza bananowego i mącznika młynarka, a siłę redukcji w przypadku świerszcza bananowego i szarańczy pustynnej. Generalnie hydrolizaty izolatów białkowych wykazały lepsze aktywności przeciwutleniające niż surowce, z których je otrzymano (z wyjątkiem mącznika młynarka wobec ABTS<sup>+</sup>). Obróbka termiczna na ogół (z wyjątkiem świerszcza bananowego) nie spowodowała wzrostu właściwości przeciwzapalnych (wyrażonych jako zdolność hamowania aktywności lipooksygenazy - LOX i cyklooksygenazy - COX). Gotowanie i pieczenie poprawiło natomiast zdolności przeciwutleniające frakcji peptydowych potencjalnie przenikających do krwiobiegu (o masie cząsteczkowej do 3,5 kDa) wyizolowanych z hydrolizatów (z wyjątkiem zdolności redukcyjnych świerszcza bananowego). Te frakcje otrzymane z izolatów białkowych posiadały w większości przypadków niższe właściwości przeciwutleniające w porównaniu z frakcjami uzyskanymi z hydrolizatów owadów surowych i poddawanych działaniu temperatury (**D2-13**). Frakcje o masie cząsteczkowej do 3,5 kDa na żelu Sephadex G-10 uległy rozdziałowi na kolejne – w zależności od gatunku owada i rodzaju zastosowanej obróbki termicznej - uzyskano od trzech do ośmiu frakcji. W posiadających najwyższą aktywność przeciwrodnikową oznaczono pozostałe aktywności przeciwutleniające i przeciwzapalne oraz zidentyfikowano metodą LC-MS/MS obecne w nich peptydy, a następnie przeprowadzono ich syntezę chemiczną (**D2-15**). Wykazano, że peptydy wyizolowane z hydrolizatów po procesie trawienia owadów i rozdzielone za pomocą Sephadex G-10 wykazują lepsze właściwości przeciwutleniające i inhibitorowe wobec LOX i COX niż peptydy zsintetyzowane zgodnie ze zidentyfikowaną sekwencją aminokwasową.

Najlepszymi właściwościami przeciwutleniającymi i przeciwzapalnymi odznaczał się hexapeptyd o sekwencji FDPFPK (**D2-15**). Badania przedstawione w pracach (**D2-13-15**) częściowo wykonane zostały w ramach projektu badawczego **2014/15/N/NZ9/04045 (PRELUDIUM 8)** finansowanego z Narodowego Centrum Nauki, którego byłam wykonawcą.

Badania biologicznych aktywności peptydów uwalnianych z jadalnych owadów są nowatorskie i wnoszą znaczący wkład w rozwój technologii żywności i żywienia.

Wzrost świadomości konsumentów spowodował, iż coraz częściej poszukują oni żywności zawierającej naturalne biologicznie aktywne składniki wykazujące pozytywny wpływ na organizm ludzki. Przykładem takich składników są między innymi związki fenolowe, które stanowią dość liczną, zróżnicowaną grupę. Profilaktyczno- lecznicze właściwości związków fenolowych polegają na zmniejszeniu ryzyka chorób serca, naczyń krwionośnych oraz nadciśnienia tętniczego, a także na aktywności przeciwzapalne, antybiotyczne, przeciwnowotworowe.

W związku z powyższym podjęłam także współpracę z innymi pracownikami Katedry Biochemii i Chemii Żywności realizującymi taką tematykę badawczą.

Prace związane z wpływem wybranych abiotycznych elicytorów na zawartość i aktywność antocyjanów i związków fenolowych purpurowej bazylii i kielków fasoli Adzuki, realizowano

w ramach projektu badawczego Iuventus Plus pt. "Badanie czynników indukujących syntezę antocyjanów i aktywność enzymów przeciwutleniających w wybranych roślinach i procesie inhibitowania aktywności lipooksygenazy i cyklooksygenazy przez otrzymane produkty" nr IP2010 042070, którego byłam wykonawcą. Efektem badań otrzymanych w ramach wyżej wymienionego projektu są prace opublikowane w *Food Chemistry* (D2-8), *International Journal of Food Science and Technology* (D2-10), *Annales UMCS, Sectio DDD* (D2-24) oraz *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* (D2-26).

Antocyjany są bardzo ważną i cenną frakcją związków polifenolowych z uwagi na ich wartość prozdrowotną. Udokumentowano, że związki te wykazują pozytywny wpływ na zdrowie człowieka z uwagi na ich silne właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe, przeciwnowotworowe czy też przeciwcukrzycowe. Ponadto antocyjany przeciwdziałają kruchości naczyń krwionośnych, zwłaszcza naczyń włosowatych oraz stymulują syntezę rodopsyny, przez co poprawiają proces widzenia. Obok antocyjanów ważną grupę związków fenolowych bazylii purpurowej stanowią kwasy fenolowe i inne flawonoidy, których charakterystyka została przedstawiona w pracy D2-10.

Wykazano, że elicytacja z użyciem kwasu arachidonowego (AA) jasmonowego (JA) i  $\beta$ -aminomasłowego (BABA) indukuje wzrost zawartości antocyjanów w liściach bazylii purpurowej (*Ocimum basilicum* L. cv. Dark Opal) oraz poprawia ich właściwości przeciwzapalne, ale nie wpływa na wzrost aktywności przeciwrodnikowej ekstraktów antocyjanowych otrzymanych z liści tej rośliny. Zaobserwowano również, że zdolność antocyjanów otrzymanych z liści elicytowanej bazylii do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  znacząco zmniejszyła się (o 50 %) w porównaniu do kontroli. Jako elicytor najbardziej efektywny okazał się kwas arachidonowy, który przyczynił się do ponad dwukrotnego wzrostu zawartości antocyjanów w liściach elicytowanej rośliny. Ponadto ekstrakty antocyjanowe otrzymane z liści bazylii elicytowanej kwasem arachidonowym znacząco hamowały aktywność cyklooksygenazy oraz lipooksygenazy, enzymów biorących udział w patogenezie stanu zapalnego (D2-8). Frakcja związków fenolowych została oddzielona od frakcji antocyjanowej techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE). W pracy D2-10 i D2-24 wykazano, że proces elicytacji przy użyciu AA, JA i BABA stymulująco wpływa na zawartość i aktywność związków fenolowych w liściach bazylii w porównaniu do kontroli, a najlepsze efekty uzyskano po zastosowaniu kwasu jasmonowego i arachidonowego jako elicytorów (D2-24).

Analizowano także wpływ abiotycznych czynników stresogennych (osmotycznego, temperaturowego i oksydacyjnego) na zawartość i właściwości przeciwutleniające frakcji fenolowych nasion fasoli Adzuki w procesie ich kiełkowania. Kiełkowanie wpływa pozytywnie na redukcję czynników antyodżywczych, zwiększa biodostępność makro i mikroelementów, a także modyfikuje poziom związków fitochemicznych, dlatego kiełki od szeregu lat stanowią cenny składnik diety. Otrzymane wyniki wykazały, że wszystkie zastosowane warunki stresowe (z wyjątkiem stresu termicznego) spowodowały zmniejszenie zawartości analizowanych frakcji fenolowych. Najmniejszą

zawartością związków fenolowych charakteryzował się ekstrakt kiełków hodowanych w warunkach stresu oksydacyjnego. Najwyższą zdolność do neutralizowania wolnych rodników generowanych z ABTS i DPPH wykazywał ekstrakt z kiełków hodowanych w warunkach stresu termicznego, odpowiednio: 39,94 i 13,20  $\mu\text{mol TEAC/g s.m.}$ , natomiast najniższą - ekstrakty z kiełków hodowanych w warunkach stresu oksydacyjnego (18,2 i 9,72  $\mu\text{mol TEAC/g s.m.}$ ). Najwyższą zdolnością do chelatowania jonów  $\text{Fe}^{2+}$  odznaczał się ekstrakt z kiełków fasoli adzuki hodowanych w warunkach stresu termicznego (7,06%), a najniższą ekstrakt kiełków kontrolnych (3,08%).

Źródłem biologicznie aktywnych związków fenolowych są również inne produkty wykorzystywane w produkcji żywności i stosowane w diecie takie jak zioła, przyprawy czy kawa i herbata.

Celem badań pracy **D2-35** była ocena i porównanie aktywności przeciwrodnikowej naparów sześciu rodzajów herbat owocowych różniących się składem, a więc zawartością związków fenolowych oraz barwą. Wszystkie napary wykazywały zdolność do neutralizowania wolnych rodników generowanych z ABTS i DPPH, co było dodatnio skorelowane z zawartością związków fenolowych w ich składzie. Natomiast nie wykazano zależności pomiędzy barwą naparów a zawartością w nich związków fenolowych. Napary z herbat Lipton oraz Saga odznaczały się najlepszymi właściwościami przeciwrodnikowymi wobec  $\text{ABTS}^{++}$  (98,42 i 98,92%) oraz największą zawartością związków fenolowych ogółem w przeliczeniu na kwas galusowy (156,2 i 159 mg GAE/100ml).

Wyniki badań dotyczących charakterystyki czosnku jako źródła bioaktywnych związków przeciwdziałających występowaniu różnych chorób, prowadzonych we współpracy z Wyższą Szkołą Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie, zostały opublikowane w *Polish Journal of Food and Nutrition Science* (**D2-16**). Oceniono aktywność biologiczną związków fenolowych (właściwości przeciwutleniające oraz wpływ na proliferację fibroblastów skóry) wodnych ekstraktów z dziewięciu odmian czosnku pochodzących z siedmiu krajów: Birmy, Chin, Hiszpanii, Polski, Portugalii, Tajlandii i Uzbekistanu. Wykazano, że zarówno odmiana rośliny jak i kraj pochodzenia mają znaczący wpływ na skład oraz właściwości ekstraktów. Ekstrakty z czosnku pochodzącego z Chin charakteryzowały się najwyższą zawartością pochodnych kwasów syringowych i p-hydroksybenzoesowych oraz wykazywały najlepsze właściwości przeciwutleniające. Wartość  $\text{IC}_{50}$  wyznaczone dla tych ekstraktów uzyskano oznaczając właściwości przeciwrodnikowe wobec  $\text{DPPH}^{\bullet}$ ,  $\text{ABTS}^{++}$  i zdolność chelatowania jonów  $\text{Cu}^{2+}$  (odpowiednio: 4,63; 0,43 i 14,90  $\mu\text{g/ml}$ ). Stwierdzono, że ekstrakty otrzymane z czosnku chińskiego oraz hiszpańskiej odmiany Morado znacząco zredukowały proliferację komórkową (70-90%), co wskazuje że były wysoce cytotoksyczne.

Zawartość związków fenolowych uzależniona jest od gatunku rośliny i sposobu jej uprawy, natomiast na ich ekstrahowalność ma wpływ, obok rodzaju matrycy z którą są związane, układ rozpuszczalników wykorzystanych w procesie ich izolowania.

W pracy **D2-28** wykorzystano wodę i metanol do ekstrakcji związków fenolowych i kofeiny z ziaren kawy (*Coffea arabica* L.) pochodzących z Brazylii, Kolumbii, Etiopii i Kenii prażonych techniką tradycyjną oraz ziarna kawy pochodzące z Brazylii prażone techniką przemysłową oraz zbadano ich zdolności przeciwutleniające oraz przeciwzapalne. Wykazano, że ekstrakt metanolowy kawy palonej techniką przemysłową odznaczał się największą zawartością związków fenolowych ogółem w przeliczeniu na kwas galusowy (650,96 mg GAE/s.m.). Ponadto wszystkie ekstrakty metanolowe w porównaniu z wodnymi charakteryzowały się wyższymi zawartościami kofeiny – najwyższą (339,39 mg/g s.m.) posiadał ekstrakt z kawy pochodzącej z Etiopii. Metanolowe ekstrakty w porównaniu do wodnych ekstraktów odznaczały się również znacząco wyższą zdolnością do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  (najwyższą wykazywał ekstrakt z kawy pochodzącej z Kolumbii,  $EC_{50}=1,79$  mg/ml), do redukcji  $Fe^{3+}$  (najwyższą posiadał ekstrakt z kawy pochodzącej z Kenii,  $EC_{50}=0,25$  mg/ml) oraz hamowania peroksydacji kwasu linolowego i lipooksygenazy (najwyższą uzyskano dla ekstraktu z kawy pochodzącej z Brazylii - prażonej techniką przemysłową,  $EC_{50}=1,07$ mg/ml i 1,57mg/ml, odpowiednio). Natomiast wodne ekstrakty kaw wykazywały lepsze właściwości przeciwrodnikowe w porównaniu do ekstraktów metanolowych - najwyższą (1,26 mg/ml) posiadał ekstrakt z kawy pochodzącej z Kolumbii.

Wpływ rozpuszczalnika na skład oraz przeciwutleniające właściwości ekstraktów z liści stewii (*Stevia rebaudiana*) oraz pietruszki zwyczajnej (*Petroselinum crispum* Mill) badano we współpracy z Wyższą Szkołą Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie, a otrzymane wyniki opublikowano w *Molecules* (**D2-6**) oraz *Żywność. Technologia. Jakość.* (**D2-27**). W pracach tych oceniono wpływ trzech rodzajów i układu rozpuszczalników: woda, etanol i glicerol-woda na jakość i ilość wyekstrahowanych związków z pietruszki oraz stewii. Wykazano, że najbardziej efektywnym ekstraktem związków fenolowych był rozpuszczalnik glikolowo-wodny. W przypadku stewii oznaczono w nim 15, 50 mg/g s.m. związków fenolowych a dla ekstraktów z liści pietruszki 2,63 mg/g s.m. i było to dwukrotnie więcej niż oznaczono w ekstraktach etanolowych. Ekstrakt z pietruszki uzyskany z udziałem rozpuszczalnika glikolowo-wodnego wykazał największą aktywność przeciwrodnikową oznaczoną wobec DPPH<sup>•</sup> ( $IC_{50} = 6,89$  µg/ml), a wobec ABTS<sup>•+</sup> - najlepszy okazał się ekstrakt wodny ( $IC_{50} = 31,44$  µg/ml). W przypadku ekstraktów otrzymanych ze stewii, najwyższą aktywność przeciwrodnikową wobec ABTS<sup>•+</sup> i DPPH<sup>•</sup> wykazywał ekstrakt etanolowy oraz glikolowo-wodny ( $IC_{50} = 0,38$  i 0,71 µg/ml). Dodatkowo stwierdzono, że rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika nie miał istotnego wpływu na zdolność ekstraktów z pietruszki do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  (**D2-27**), natomiast spośród ekstraktów otrzymanych ze stewii ekstrakt etanolowy wykazywał najwyższą zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  (**D2-6**). Najwyższą cytotoxycznosc w warunkach *in vitro* w stosunku do ludzkiej linii komórkowej BJ (ATCC CRL-2522) uzyskano w przypadku etanolowego i wodnego ekstraktu otrzymanego z liści pietruszki (**D2-27**) oraz etanolowego i glikolowo-wodnego otrzymanego z liści stewii (**D2-6**).

Moje zainteresowania badawcze związane z właściwościami biologicznymi żywności dotyczą również wpływu fortyfikacji na jej potencjał prozdrowotny. W pracy **D2-5** opublikowanej w *Food Technology and Biotechnology* analizowano możliwości wykorzystania produktu odpadowego jakim jest pulpa dyniowa do produkcji chleba o charakterze funkcjonalnym. Stwierdzono, że właściwości sensoryczne takie jak smak, aromat i ogólna akceptowalność chleba wzbogaconego dodatkiem pulpy nie uległy pogorszeniu w porównaniu z chlebem kontrolnym. Ponadto zwiększenie dodatku pulpy dyni w ilości 5 do 20% (w przeliczeniu na suchą masę) przyczyniło się do zmniejszenia objętości chleba i wzrostu twardości i spoistości mięksiszu. Dodatek pulpy dyni do chleba w ilości 10-15% spowodował wzrost potencjalnej biodostępności związków fenolowych oraz peptydów, oraz wzrost ich właściwości przeciwutleniających (z wyjątkiem zdolności do chelatowania jonów metali). Aktywności te znacznie wzrosły w ekstraktach uzyskanych w wyniku symulowanego trawienia. Po procesie trawienia *in vitro* bardzo znacząco wzrosła również zdolność do hamowania aktywności enzymu konwertującego angiotensynę ACE, czyli wzrosły potencjalne właściwości przeciwnadciśnieniowe. Otrzymane wyniki wskazują na przydatność pulpy dyni jako składnika fortyfikującego chleb, który dodany w odpowiednich ilościach zwiększa funkcjonalność otrzymanego produktu.

Istnieje wiele opracowań naukowych dotyczących określania zawartości i aktywności biologicznej związków występujących w żywności (peptydów i związków fenolowych). Nie jest to jednak wystarczające do określenia ich wpływu na organizm ludzki, ponieważ aktywność biologiczna związków zawartych w żywności zależy od wielu czynników determinujących ich biodostępność. Dlatego w pracy przeglądowej opublikowanej w *International Journal of Food Science & Technology* (**D2-12**) przedstawiono dane umieszczone w najnowszych publikacjach dotyczące procesu trawienia i bioprzyswajalności fitoskładników takich jak: peptydy, polifenole i witaminy.

Podczas trawienia żywności wiele czynników może modyfikować strukturę jej składników, co powoduje zmiany w ich wchłanianiu i bioaktywności.

Wiele fenolowych aglikonów jest hydrofilowych i mogą być absorbowane przez błony biologiczne w drodze dyfuzji. Większość polifenoli występuje jednak w postaci glikozydowej, co niewątpliwie wpływa na ich wchłanianie w jelicie. Natomiast oligopeptydy mogą być wchłaniane na drodze aktywnego transportu wykorzystującego gradient jonów wodorowych lub przez peptydowy transporter 1 (PepT1). Mechanizmy i czynniki wpływające na transport peptydów bardziej szczegółowo zostały opisane w pracy **O7**. Ponadto biodostępność fitoskładników zależy od ich masy cząsteczkowej, struktury chemicznej i matrycy żywności. W związku z tym w pracy **D2-12** przedstawiono najnowsze dane dotyczące wpływu wielu czynników na strawność, biodostępność i aktywność wybranych bioaktywnych związków pochodzenia roślinnego.

Wzrost zainteresowania żywnością o wydłużonym okresie przydatności do spożycia powoduje rozwój badań dotyczących powłok jadalnych otrzymanych z substancji naturalnych takich jak: białka,

polisacharydy i/lub tłuszcze. Powłoki/folie jadalne, które charakteryzują się dużą przepuszczalnością pary wodnej, znalazły zastosowanie w przetwórstwie owocowym, ponieważ hamują procesy ich dojrzewania, oraz w innych gałęziach przemysłu spożywczego np. powłoki zeinowe do orzechów włoskich i cukierków czy też osłonki na kielbasach. Powłoki skrobiowe używane są do powlekania żywności ponieważ są izotropowe, bezzapachowe, bezsmakowe, przezroczyste oraz nietoksyczne. Celem pracy opublikowanej w *Carbohydrate Polymers* (**D2-18**) było porównanie wpływu stężenia kwasu askorbinowego (AA) jak i askorbinianu sodu (SA) (0–100 mM) na właściwości skrobiowych folii jadalnych. Wykazano, że w foliach z dodatkiem SA reakcje brązowienia zachodziły szybciej niż w foliach z dodatkiem AA, ale kwas askorbinowy szybciej rekrystalizował niż askorbinian sodu (SA). Najwyższy dodatek SA zwiększył zdolność folii do przepuszczania pary wodnej. Natomiast wytrzymałość mechaniczna i sztywność folii stopniowo zmniejszały się wraz ze wzrostem zawartości jonu askorbinowego (AI) w powłokach. Widma otrzymane w wyniku analizy spektroskopowej w podczerwieni z transformacją Fouriera sugerują, że dodanie SA do folii wywołało bardziej intensywne zmiany strukturalne w porównaniu z dodatkiem AA. Zbadano również wpływ dodatku jonu askorbinowego do folii na stopień krystaliczności. Parametr ten wyznaczano stosując technikę szerokokątnej dyfrakcji promieni rentgenowskich (WAXD). Na podstawie otrzymanych krzywych WAXD wykazano, że 25 i 50 mM dodatek jonu askorbinowego do folii zwiększył stopień ich krystaliczności. Filmy z AA i SA nie różniły się pod względem rozpuszczalności w wodzie, zdolności uwalniania jonu askorbinowego a w konsekwencji aktywności przeciwutleniającej wyrażonej jako zdolność przeciwrodnikowa wobec ABTS<sup>+</sup> oraz siła redukcji.

Inną metodą stosowaną w przemyśle spożywczym służącą do przedłużania trwałości warzyw i owoców jest poddawanie ich ozonowaniu. Ozon w przemyśle spożywczym jest stosowany jako czynnik bakteriobójczy, który może ograniczyć stosowanie do tego celu tradycyjnych, szkodliwych dla środowiska naturalnego związków chemicznych, np. chloru. Zaletą stosowania ozonu to szybki rozpad tego związku do tlenu. Technologię ozonowania, którą wykorzystuje się w zakładach przemysłu spożywczego określa się jako bezpieczną i przyjazną dla środowiska naturalnego. W pracy opublikowanej w *Food Chemistry* (**D2-9**) po raz pierwszy przedstawiono wyniki badań dotyczących wpływu procesu ozonowania owoców czerwonej papryki oraz warunków przechowywania na ich jakość. Proces ozonowania przyczynił się do zaindukowania aktywności oksydazy polifenolowej i oksydazy gwajakolowej, co może świadczyć o udziale tych enzymów w odpowiedzi na stres oksydacyjny wywołany tym czynnikiem. Ponadto zaobserwowano, że aktywności amoniakolizy L-fenylalaninowej oraz amoniakolizy tyrozynowej w papryce traktowanej ozonem była niższa w porównaniu do kontroli. Stwierdzono, że zmiany w zawartości metabolitów wtórnych owoców papryki zaindukowane przez traktowanie ozonem wprawdzie nie były znaczne ale dostrzegalne. Najwyższą zawartość flawonoidów oznaczono w owocach papryki ozonowanych przez 3 godziny i przechowywanych przez 10 dni w warunkach chłodniczych, natomiast zawartość związków

fenolowych ogółem była najwyższa w owocach papryki ozonowanych przez 1 godzinę i przechowywanych przez 20 dni w warunkach chłodniczych. Dodatkowo stwierdzono, że owocnia zawierała więcej związków fenolowych i wykazywała lepsze właściwości przeciwrodnikowe wobec DPPH niż łożysko owoców papryki.

Równolegle we współpracy z pracownikami Zakładu Entomologii UP w Lublinie podjęłam badania dotyczące aktywności enzymów (peroksydaza, oksydaza polifenolowa, chitynaza,  $\beta$ -1,3 glukanaza) wytwarzanych w odpowiedzi roślin na biotyczne szkodniki owadzie. Wyniki pracy opublikowanej w *Bulletin of Entomological Research* (**D2-17**) wykazały, że owady z rodziny galaskówatych (*Cynips quercusfolii* L., *Neuroterus numismalis* (Fourc.) i *N. quercusbaccarum* L.) indukowały syntezę enzymów obronnych oraz związków fenolowych w liściach dębów przez nie atakowanych, a ich zawartość i aktywność była uzależniona od gatunku owada. Natomiast celem pracy **D2-19** było zbadanie wpływu owadów *Tetraneura ulmi* na syntezę enzymów (chitynazy i  $\beta$ -1,3 glukanazy), zawartość białka, cukrów redukujących oraz związków fenolowych po ataku na wiąz syberyjski (*Ulmus pumila*), na różnych etapach rozwoju wyrosli zwanych galasami powstających na liściach w reakcji obronnej. Otrzymane wyniki wykazały, że do zwiększonej syntezy białka dochodzi w początkowym etapie rozwoju galasów, zwiększoną biosyntezę związków fenolowych zaobserwowano podczas procesu galusowania, natomiast najwyższą aktywność enzymów takich jak chitynaza i  $\beta$ -1,3 glukanaza na etapie dojrzewania galasów. Ponadto stwierdzono, że galasy nie gromadziły cukrów redukujących na żadnym etapie rozwoju. Działanie indukujące tworzenie galasów przez *T. ulmi* wywołało reakcje obronne rośliny, co wykazuje iż owady te mają zdolność do kontrolowania i programowania wzrostu rośliny gospodarza dla własnych korzyści (**D2-19**).

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

- badania nasion roślin strączkowych i ziarniaków zbóż jako źródła białka i biologicznie aktywnych peptydów,
- oznaczenia biologicznych aktywności hydrolyzatów i peptydów otrzymanych z białek nasion wybranych roślin,
- charakterystykę wybranych owadów jadalnych jako źródła białka i aktywnych peptydów w żywieniu człowieka,
- badania właściwości preparatów białkowych otrzymanych z roślin i owadów,
- ocenę przydatności różnych technik chromatograficznych (IMAC, SEC, SPE, HPLC) do rozdzielania białek i peptydów oraz związków fenolowych,
- badania wpływu procesów technologicznych na zawartość i aktywność biologicznie aktywnych składników żywności,

- ocenę wpływu wybranych składników żywności na aktywność enzymów mających znaczenie w powstawaniu stanów chorobowych,
- badanie wpływu procesu elicytacji i stresu na syntezę roślinnych metabolitów wtórnych,
- badania zależności pomiędzy składem jadalnych powłok a ich właściwościami fizykochemicznymi i przeciwutleniającymi.

Mój dorobek naukowy, łącznie z pracami uwzględnionymi w cyklu publikacji powiązanych tematycznie stanowiących **Osiągnięcie** naukowe, obejmuje autorstwo lub współautorstwo **37** oryginalnych prac naukowo-badawczych, **2** opracowania przeglądowe, **3** rozdziały w podręczniku akademickim, **1** monografię naukową, **9** rozdziałów w monografii oraz **54** 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 **892** pkt, IF: **62,236**. Łączna suma punktów prac wchodzących w skład **Osiągnięcia** wynosi **151** pkt; IF: **10,777**.

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 <sup>a</sup>	Punkty MNiSW <sup>b</sup>	
		Przed doktoratem	Po doktoracie	Ogółem			
		Prace indeksowane w bazie JCR	1	26	27	62,236	739
1	Oryginalne prace twórcze	Prace opublikowane w czasopiśmie nieindeksowanych w bazie JCR	2	10	12	-	97
2		Monografie naukowe	0	1	1	-	20
3		Publikacje niepuktowane	0	1	1	-	-
4		Rozdziały w monografiach naukowych	1	8	9	-	36
5		Rozdziały w podręcznikach	0	3	3	-	-
6	Komunikaty naukowe	Konferencje zagraniczne i międzynarodowe	2	11	13	-	-
		Konferencje Krajowe	9	32	41	-	-
Dorobek publikacyjny ogółem			15	92	107	62,236	892

**W tym oryginalne prace twórcze wchodzące w skład Osiągnięcia**

			<b>8</b>	<b>10,777</b>	<b>151</b>
--	--	--	----------	---------------	------------

<sup>a</sup>- obowiązujący w roku opublikowania

<sup>b</sup>- zgodnie z listą czasopism punktowanych z roku opublikowania

Liczba cytowań publikacji według bazy:

- Web of Science (na dzień 14.04.2019): 205 (bez autocytowań: 174)

- Scopus (na dzień 14.04.2019): 267 (bez autocytowań: 227)

Indeks Hirscha według bazy:

- Web of Science: 8 (na dzień 14.04.2019)

- Scopus: 10 (na dzień 14.04.2019)

Lp.	Nazwa czasopisma	Liczba prac	Impact factor	Pkt. MNiSW
1	Acta Scientarum Polonorum Hortorum Cultus	1	0,448	20
2	Acta Scientarum Polonorum, Technologia Alimentaria	3	0	40
3	Annales UMCS s. DDD	3	0	23
4	Annales UMCS s. E Agriculture	1	0	2
5	Bromatologia i Chemia Toksykologiczna	1	0	4
6	Bulletin of Entomological Research	1	1,721	35
7	Carbohydrate Polymers	1	5,158	40
8	Cyta-Journal of Food	1	1,371	20
9	Electronic Journal of Polish Agricultural Universities	1	0	4
10	Food Chemistry	3	11,84	120
11	Food Research International	2	6,702	80
12	Food Technology and Biotechnology	1	0,920	25
13	International Journal of Food Science and Technology	6	12,676	150
14	Journal of Animal Feed Science	1	0,472	11
15	Journal of Elementology	2	0,708	18
16	LWT – Food Science and Technology	2	6,258	80
17	Molecules	1	2,465	30
18	Nutrients	2	8,392	70
19	Polish Journal of Food and Nutrition Sciences	2	1,697	21
20	Protein and Peptide Letters	1	1,097	10
21	Przemysł Spożywczy	1	0	5
22	Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.	2	0,311	28
23	Monografie naukowe	1	0	20
24	Rozdziały w monografiach	9	0	36
25	Rozdziały w podręcznikach akademickich	3	0	0
<b>Suma</b>		<b>52</b>	<b>62,236</b>	<b>892</b>

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. 15.04.2019 r.

