

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Dyscyplina naukowa: Technologia żywności i żywienia

Katarzyna Garbacz

Rozprawa doktorska

**Opracowanie i optymalizacja procesu wytwarzania peptydów ze źródeł roślinnych
o potencjalnych właściwościach prozdrowotnych**

***Development and optimization of a plant-derived peptide production process
with potential health-promoting effects.***

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii,
Mikrobiologii i Żywienia Człowieka
oraz firmie Biolive Innovation Sp z o.o. w ramach Programu MNiSW (MEiN)
„Doktorat Wdrożeniowy” (DWD/487/2020)

Promotor: prof. dr hab. Adam Waśko
Opiekun zakładowy: dr Jacek Wawrzykowski

Lublin, 2025

Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi dr. hab. Adamowi Waśko za poświęcony czas, wnikliwe uwagi oraz cenne wskazówki merytoryczne, które przyczyniły się do podniesienia jakości rozprawy doktorskiej. Dziękuję również za życzliwą postawę oraz gotowość do dzielenia się doświadczeniem naukowym, stanowiące istotne wsparcie na kolejnych etapach pracy nad rozprawą.

Dziękuję także Panu dr. Jackowi Wawrzykowskiemu z firmy Biolive Innovation za zaangażowanie, otwartość na współpracę oraz dzielenie się doświadczeniem i wiedzą praktyczną, które wzbogaciły realizowane badania.

Wyrazy wdzięczności kieruję również do firmy Biolive Innovation za stworzenie sprzyjających warunków do prowadzenia prac badawczych, udostępnienie zaplecza oraz wsparcie organizacyjne, umożliwiające skuteczną realizację części wdrożeniowej doktoratu.

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

Podpis promotora

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora

* niepotrzebne skreślić

Wykaz prac naukowych oraz procedury technologicznej stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej:

PUBLIKACJA I:

Garbacz K., Wawrzykowski J., Czelej M., Czernecki T., Waśko A. (2023). Recent Trends in the Application of Oilseed-Derived Protein Hydrolysates as Functional Foods. *Foods*, 12, 3861.

Punkty MEiN: 140

IF: 4,7

PUBLIKACJA II:

Garbacz K., Wawrzykowski J., Czelej M., Waśko A. (2025). In Silico Proteomic Profiling and Bioactive Peptide Potential of Rapeseed Meal. *Foods*, 14, 2451.

Punkty MEiN: 140

IF: 5,1

NOTA TECHNOLOGICZNA:

Procedura technologiczna: „Wytwarzanie biologicznie aktywnych peptydów z makuchów roślin oleistych”.

Spis treści

STRESZCZENIE.....	9
SUMMARY	10
1. WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	11
1. WPROWADZENIE.....	15
3. UZASADNIENIE PODJĘTEJ TEMATYKI BADAWCZEJ – PRZEGLĄD LITERATURY	
17	
3.1. KONTEKST RYNKOWY I ŚRODOWISKOWY	17
3.2. WŁAŚCIWOŚCI BIAŁEK Z MAKUCHÓW OLEISTYCH	18
3.2.1. Rzepak (<i>Brassica napus</i> L.)	19
3.2.2. Słonecznik (<i>Helianthus annuus</i> L.)	20
3.2.3. Ostropest plamisty (<i>Silybum marianum</i> L. Gaertn.).....	22
3.2.4. Inne rośliny oleiste.....	23
3.3. METODY IZOLACJI BIAŁEK Z MAKUCHÓW OLEISTYCH	24
3.3.1. Ekstrakcja alkaliczna z wytrącaniem izoelektrycznym.	24
3.3.2. Modyfikacje procesu konwencjonalnego.	25
3.3.3. Metoda micelizacji.....	26
3.3.4. Łagodna ekstrakcja solna i ultrafiltracja.	26
3.3.5. Usuwanie polifenoli i substancji antyodżywczych.	27
3.3.6. Wspomaganie procesu nowoczesnymi technologiami.	28
3.3.7. Metody suchego frakcjonowania.	31
3.4. ENZYMY ROŚLINNE STOSOWANE DO HYDROLIZY BIAŁEK (PAPAINA, BROMELAINA, FICYNA) I	
ICH SPECYFIKA SUBSTRATOWA	33
3.4.1. Papaina (<i>Carica papaya</i> L.; EC 3.4.22.2).....	33
3.4.2. Bromelaina (<i>Ananas comosus</i> L.; EC 3.4.22.32)	35
3.4.3. Ficyna (<i>Ficus carica</i> L.; EC 3.4.22.3).....	37
3.5. BIOAKTYWNE PEPTYDY Z BIAŁEK ROŚLIN OLEISTYCH: WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE,	
HIPOTENSYJNE, IMMUNOMODULUJĄCE I INNE.....	39
3.5.1. Peptydy o aktywności antyoksydacyjnej	40
3.5.2. Peptydowe inhibitory ACE (hipotensyjne).....	42
3.5.3. Inne bioaktywne funkcje peptydów żywnościowych.....	43
3.5.3.1. Działanie immunomodulujące i przeciwnzapalne.....	43
3.5.3.2. Działanie neuroprotekcyjne	44
3.5.3.3. Działanie przeciwnowotworowe:	44
3.5.3.4. Działanie przeciwcukrzycowe.....	45
3.5.3.5. Działanie przeciwdrobnoustrojowe.....	46

3.6.	ZASTOSOWANIE HYDROLIZATÓW BIAŁKOWYCH Z NASION ROŚLIN OLEISTYCH.....	47
3.6.1.	<i>Żywność funkcjonalna</i>	47
3.6.2.	<i>Suplementy diety</i>	47
3.6.3.	<i>Farmaceutyki</i>	48
3.6.4.	<i>Kosmetyki</i>	49
3.6.5.	<i>Materiały do pakowania żywności</i>	50
4.	CEL I ZADANIA I HIPOTEZY BADAWCZE	52
4.1.	CEL PRACY	52
4.2.	ZADANIA BADAWCZE	53
4.3.	HIPOTEZA BADAWCZA	55
4.4.	SCHEMATY PRZEBIEGU BADAŃ	56
5.	MATERIAŁY I METODY	58
5.1.	MATERIAŁY	58
5.1.1.	<i>Makuchy roślin oleistych</i>	58
5.1.2.	<i>Enzymy proteolityczne</i>	58
5.1.3.	<i>Inne odczynniki</i>	58
5.2.	METODY LABORATORYJNE	59
5.2.1.	<i>Przygotowanie makuchów do analiz</i>	59
5.2.2.	<i>Ekstrakcja białka – optymalizacja metody</i>	60
5.2.3.	<i>Analiza składu chemicznego</i>	61
5.2.3.1.	Oznaczanie zawartości białka (metoda Kjeldahla).....	61
5.2.3.2.	Oznaczanie zawartości cukrów (metoda fenolowo-kwasowa).....	62
5.2.3.3.	Oznaczanie zawartości tłuszczu (metoda Soxhleta).....	62
5.2.3.4.	Oznaczanie suchej masy	62
5.2.3.5.	Obliczanie wydajności procesu.....	63
5.2.4.	<i>Elektroforeza</i>	63
5.2.5.	<i>Wycięcie plamek białkowych, przygotowanie próbek do spektrometrii mas</i>	63
5.2.6.	<i>Analiza MALDI-TOF/TOF</i>	64
5.2.7.	<i>Trawienie in silico i predykcja bioaktywności z wykorzystaniem bazy BIOPEP</i>	65
5.2.8.	<i>Hydroliza enzymatyczna</i>	65
5.2.9.	<i>Oznaczanie stopnia hydrolizy (DH)</i>	65
5.2.10.	<i>Przygotowanie hydrolizatów</i>	66
5.2.11.	<i>Oznaczanie właściwości antyoksydacyjnych</i>	66
5.2.11.1.	Metoda ABTS	66
5.2.11.2.	Metoda DPPH	66
5.2.11.3.	Metoda FRAP	67
5.2.12.	<i>Oznaczanie właściwości hipotensyjnych</i>	67

5.3.	METODY TECHNOLOGICZNE PRZESKALOWANIA	68
5.3.1.	Charakterystyka linii technologicznej	68
5.3.2.	Przygotowanie makuchów	69
5.3.3.	Ekstrakcja białka w skali przemysłowej	69
5.3.4.	Hydroliza enzymatyczna, zateżanie i suszenie hydrolizatów	70
5.3.5.	Oznaczanie składu chemicznego oraz właściwości bioaktywnych otrzymanych hydrolizatów	71
5.4.	ANALIZA STATYSTYCZNA	72
6.	WYNIKI	75
6.1.	PODSTAWOWY SKŁAD CHEMICZNY MAKUCHÓW	75
6.2.	OPTIMALIZACJA PROCESU EKSTRAKCJI BIAŁKA.....	76
6.2.1.	Rzepak.....	76
6.2.1.1.	Etap I.....	76
6.2.1.2.	Etap II.....	78
6.2.1.3.	Etap III i IV	81
6.2.2.	Słonecznik	82
6.2.2.1.	Etap I.....	82
6.2.2.2.	Etap II.....	84
6.2.2.3.	Etap III i IV	87
6.2.3.	Ostropest.....	87
6.2.3.1.	Etap I.....	87
6.2.3.2.	Etap II.....	90
6.2.3.3.	Etap III i IV	93
6.3.	ANALIZY <i>IN SILICO</i> WYEKSTRAHOWANYCH BIAŁEK	93
6.3.1.	Rzepak.....	93
6.3.2.	Słonecznik	94
6.3.3.	Ostropest.....	100
6.4.	OPTIMALIZACJA PROCESU HYDROLIZY ENZYMATYCZNEJ	105
6.4.1.	Rzepak.....	105
6.4.2.	Słonecznik	108
6.4.3.	Ostropest.....	111
6.5.	BADANIE WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNYCH I HIPOTENSYJNYCH.....	114
6.5.1.	Właściwości antyoksydacyjne.....	114
6.5.2.	Właściwości hipotensyjne	119
6.6.	PRZESKALOWANIE PROCESU EKSTRAKCJI BIAŁEK I OTRZYMYWANIA HYDROLIZATÓW	123
6.6.1.	Porównanie wydajności izolacji białka	123
6.6.2.	Porównanie składu chemicznego ekstraktów białkowych	124
6.6.3.	Porównanie stopnia hydrolizy	125

6.6.4.	<i>Porównanie składu chemicznego otrzymanych hydrolizatów.....</i>	127
6.6.5.	<i>Porównanie właściwości bioaktywnych otrzymanych hydrolizatów</i>	129
7.	DYSKUSJA	131
8.	WNIOSKI.....	141
9.	BIBLIOGRAFIA	144
10.	ZAŁĄCZNIKI.....	162

Streszczenie

Produkty uboczne przemysłu olejarskiego, w tym makuch z rzepaku, słonecznika oraz ostropestu, stanowią wartościowe, lecz wciąż niedostatecznie wykorzystywane źródło białka roślinnego w żywności dla ludzi. Równolegle w ostatnich latach intensywnie rozwijają się badania nad bioaktywnymi peptydami pochodzenia roślinnego, w tym pozyskiwanymi z nasion roślin oleistych. Celem niniejszej pracy było opracowanie i optymalizacja procesu otrzymywania peptydów z białek wybranych makuchów o potencjalnych właściwościach przeciwutleniających i hipotensyjnych, a także ocena możliwości przeniesienia opracowanej technologii do warunków przemysłowych.

W części doświadczalnej przeprowadzono charakterystykę makuchów pod względem składu chemicznego oraz opracowano procedurę izolacji białek obejmującą ekstrakcję alkaliczną, wytrącanie izoelektryczne i etap doczyszczania osadu białkowego. Uzyskano koncentraty o wysokiej zawartości białka w suchej masie. Potencjał bioaktywny oceniono w analizach *in silico* z wykorzystaniem bazy BIOPEP-UWM, a następnie zweryfikowano eksperymentalnie po enzymatycznej hydrolizie białek z zastosowaniem proteaz roślinnych: papainy, bromelainy i ficyny. Aktywność przeciwutleniającą oznaczano metodami ABTS, DPPH i FRAP, natomiast aktywność hipotensyjną określano na podstawie zdolności hamowania enzymu konwertującego angiotensynę (ACE), wyrażonej jako procent inhibicji oraz wartość IC_{50} .

Otrzymane hydrolizaty wykazały istotną aktywność przeciwutleniającą oraz zdolność inhibicji ACE we wszystkich badanych wariantach. Jednocześnie stwierdzono, że profil bioaktywności zależał od rodzaju surowca, zastosowanego enzymu oraz metody analitycznej, co wskazuje na konieczność doboru pary surowiec–enzym w zależności od oczekiwanego efektu biologicznego. Opracowany proces z powodzeniem przeniesiono do skali przemysłowej, uzyskując hydrolizaty o zbliżonym składzie i zachowanej bioaktywności w porównaniu ze skalą laboratoryjną.

Słowa kluczowe: aktywność przeciwutleniająca, właściwości hipotensyjne, hydrolizaty białkowe

Summary

By-products of the oil industry, including rapeseed, sunflower and milk thistle meals, represent a valuable yet still underutilized source of plant protein for human nutrition. In parallel, recent years have witnessed an intensive development of research on plant-derived bioactive peptides, including those obtained from oilseed crops. The aim of this study was to develop and optimize a process for producing peptides from proteins of selected press cakes with potential antioxidant and antihypertensive properties, and to assess the feasibility of transferring the developed technology to industrial conditions.

In the experimental part, the oilseed meals were characterized in terms of chemical composition, and a protein isolation procedure was developed consisting of alkaline extraction, isoelectric precipitation, and purification of the protein curd. The resulting concentrates exhibited high protein content on a dry-matter basis. Bioactivity potential was first assessed *in silico* using the BIOPEP-UWM database and subsequently verified experimentally after enzymatic hydrolysis of the proteins with plant proteases: papain, bromelain and ficin. Antioxidant activity was determined using ABTS, DPPH and FRAP assays, whereas antihypertensive activity was evaluated based on angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition, expressed as percentage inhibition and IC₅₀ value.

The obtained hydrolysates exhibited significant antioxidant activity and ACE-inhibitory capacity in all tested variants. At the same time, the bioactivity profile depended on the type of raw material, the enzyme used, and the analytical method applied, indicating the need to select the raw material–enzyme pair according to the desired biological effect. The developed process was successfully scaled up to industrial level, yielding hydrolysates with comparable composition and preserved bioactivity relative to the laboratory scale.

Keywords: antioxidant activity; antihypertensive properties; protein hydrolysates.

1. Wykaz używanych skrótów

°C	stopień Celsjusza
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ACE	konwertaza angiotensyny
ACN	acetonitryl
BCAA	aminokwasy rozgałęzione (Branched-Chain Amino Acids)
BIOPEP-UWM	baza danych peptydów bioaktywnych BIOPEP (UWM Olsztyn)
Caco-2	linia komórkowa ludzkiego raka okrężnicy
CAMPDE	fosfodiesteraza cyklicznych nukleotyd.w zależnych od kalmoduliny
CHAPS	(3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
CuSO ₄	siarczanu miedzi (II)
Da	Dalton
DH	stopień hydrolizy (Degree of Hydrolysis)
DPP-III	Dipeptydylopeptydaza III
DPP-IV	dipeptydylopeptydaza IV
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	ditiotreitrol
FDA	Agencja Żywności i Leków USA (Food and Drug Administration)
FeCl ₃ ·6H ₂ O	chlorek żelaza(III) sześciowodny
FRAP	zdolność redukcji jonów żelaza (Ferric Reducing Antioxidant Power)
g	gram
GBP	zasadowy polipeptyd pochodzący z białka soi (glycinin basic peptide)
GMO	organizmy modyfikowane genetycznie
GOZ	gospodarka o obiegu zamkniętym
GRAS	„ogólnie uznane za bezpieczne” (Generally Recognized As Safe – klasyfikacja FDA)
h	godzina/godziny (hour)
H ₂ SO ₄	kwask siarkowy (VI)
H ₃ BO ₃	kwask borowy

HCCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
HCl	kwask chlorowodorowy
HepG2	linia komórkowa ludzkiego raka wątroby
HHL	hippuryl-L-histidyl-L-leucine
HMG-CoA	3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzym A
HVED	wyładowania elektryczne wysokiego napięcia (High-Voltage Electrical Discharge)
IAA	iodoacetamide
IC50	stężenie hamujące 50% aktywności (half maximal inhibitory concentration)
IEF	ogniskowanie izoelektryczne (Isoelectric Focusing)
iNOS	indukowalna syntaza tlenu azotu
K ₂ SO ₄	siarczan potasu
kDa	kilodalton
kg	kilogram
kJ/L	kilodżule na litr
L	litr
LDL	lipoproteiny o małej gęstości (Low-Density Lipoprotein)
LPS	lipopolisacharyd
M	stężenie molowe
m/m	masa/masa
MALDI-TOF-TOF	spektrometria mas: MALDI, analizator TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-Flight/Time-of-Flight)
MCF-7	linia komórkowa raka piersi
mg	miligram
min.	minuta
mL	mililitr
mld	miliard
mln	milion
n	liczebność próby
NaCl	chlorek sodu
NADES	naturalne głębokie rozpuszczalniki eutektyczne (Natural Deep Eutectic Solvents)

NaOH	wodorotlenek sodu
NF-κB	czynnik transkrypcyjny NF-kappaB
NH ₄ HCO ₃	wodorowęglan amonu
nm	nanometr
non-GMO	niemodyfikowane genetycznie
Nrf2	czynnik transkrypcyjny Nrf2
obr./min	obroty na minutę
PAM	Białko związane z inhibitorem Myc
PEF	pulsacyjne pola elektryczne (Pulsed Electric Fields)
pH	odczyn/miara kwasowości
pI	punkt izoelektryczny
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
ROS	reaktywne formy tlenu (Reactive Oxygen Species)
s.m.	sucha masa
SD	odchylenie standardowe (Standard Deviation)
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (Sodium Dodecyl Sulfate–PAGE)
SHR	szczury spontanicznie nadciśnieniowe (Spontaneously Hypertensive Rats)
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa (Superoxide Dismutase)
t	tona
TCA	kwas trichlorooctowy
temp.	temperatura
TFA	kwas trifluorooctowy
TPTZ	2,4,6-tris(2-pirydylo)-s-triazyna; 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine
U	unit
UAE	ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (Ultrasound-Assisted Extraction)
USD	dolar amerykański
USDA	Departament Rolnictwa USA
v/v	objętość/objętość (volume/volume)
W/L	Watt na litr

w/w	masa/masa (weight/weight)
μg	mikrogram
μl	mikrolitr

1. Wprowadzenie

Produkty uboczne przemysłu olejarskiego, w tym makuchy i śruta nasion oleistych, przez wiele lat postrzegano głównie jako surowiec paszowy o ograniczonej wartości dodanej (Duan i in., 2025). Z technologicznego punktu widzenia są to jednak materiały bogate w białko o korzystnym profilu aminokwasowym oraz związki bioaktywne, które przy odpowiednim opracowaniu procesu – mogą stać się źródłem wysoko funkcjonalnych składników żywności (Garbacz i in., 2023). Kluczowym wyzwaniem jest przekształcenie tych technologicznie wymagających surowców w powtarzalne, bezpieczne i bioaktywne preparaty białkowe możliwe do zastosowania w przemyśle spożywczym i nutraceutycznym.

W ostatnich latach intensywnie rozwijają się badania nad bioaktywnymi peptydami pochodzenia roślinnego, w tym z nasion roślin oleistych. Udowodniono, że hydroliza enzymatyczna białek umożliwia uwolnienie krótkich sekwencji aminokwasowych o działaniu prozdrowotnym (Peres Fabbri i in., 2023). Jednocześnie większość dostępnych opracowań koncentruje się na skali laboratoryjnej, pojedynczych surowcach (często soi) oraz proteazach mikrobiologicznych lub zwierzęcych. Stosunkowo rzadko podejmuje się problem kompleksowy: od wyboru lokalnych makuchów jako surowca, przez izolację białek, projektowanie hydrolizy z użyciem proteaz roślinnych, aż po weryfikację możliwości przeskalowania procesu do warunków przemysłowych.

Niniejsza praca wpisuje się w tę lukę, łącząc perspektywę badań podstawowych z praktycznymi potrzebami przedsiębiorstwa. Punktem wyjścia jest założenie, że białka izolowane z makuchów rzepaku, słonecznika i ostropestu mogą stanowić wartościowy substrat do wytwarzania peptydów o istotnych właściwościach przeciwutleniających i hipotensyjnych, pod warunkiem odpowiedniego doboru metody izolacji oraz parametrów hydrolizy enzymatycznej.

Głównym celem pracy było opracowanie i optymalizacja procesu otrzymywania peptydów z białek roślin oleistych o potencjalnych właściwościach przeciwutleniających i hipotensyjnych, a następnie ocena możliwości przeskalowania tego procesu do warunków przemysłowych. Cel ten zrealizowano poprzez: wybór i charakterystykę makuchów jako surowców, opracowanie metody izolacji białka, analizy *in silico* w kierunku identyfikacji sekwencji bioaktywnych, optymalizację hydrolizy enzymatycznej z użyciem wybranych proteaz roślinnych, ocenę aktywności otrzymanych hydrolizatów oraz weryfikację procesu w skali przemysłowej zakończoną opracowaniem noty technologicznej. Szczególny nacisk położono na powiązanie wyników badań podstawowych z praktycznymi wymaganiami

przedsiębiorstwa wdrażającego technologię, tak aby opracowany proces mógł zostać opisany w formie noty technologicznej i zaimplementowany w warunkach rzeczywistej produkcji peptydów lub hydrolizatów na cele żywności funkcjonalnej i nutraceutycznej.

3. Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej – przegląd literatury

3.1. Kontekst rynkowy i środowiskowy

Globalny rynek żywności podlega dynamicznym przemianom pod wpływem rosnącej populacji, zmian klimatycznych i potrzeby zrównoważonego gospodarowania zasobami. W centrum uwagi znajdują się obecnie żywność funkcjonalna, produkcja zrównoważona oraz dieta roślinna. Żywność funkcjonalna definiowana jest jako żywność naturalna lub przetworzona, która spożywana regularnie wywiera udokumentowany, pozytywny wpływ na zdrowie – wykraczający poza podstawowe wartości odżywcze (Garbacz i in., 2023). Celem takiej żywności jest m.in. poprawa stanu zdrowia oraz zmniejszenie ryzyka chorób cywilizacyjnych (np. nowotworów, cukrzycy typu 2, udaru, chorób sercowo-naczyniowych) (Granato i in., 2020; Garbacz i in., 2023). Rosnąca prozdrowotna świadomość konsumentów przekłada się na szybki wzrost rynku żywności funkcjonalnej – globalnie jego wartość w 2023 r. szacowano na ok. 330 mld USD, z prognozami wzrostu do ponad 586 mld USD w 2030 r. (Grand View Research, 2024). Jednocześnie zrównoważony rozwój i koncepcja gospodarki obiegu zamkniętego (GOZ) zwracają coraz większą uwagę na wykorzystanie odpadów i produktów ubocznych przemysłu spożywczego jako surowców do produkcji żywności i nutraceutyków o wysokiej wartości dodanej (Duan i in., 2025).

W sektorze tłuszczowym powstają ogromne ilości produktów ubocznych w postaci makuchów (wytłoków poekstrakcyjnych). Przykładowo, w sezonie 2023/24 globalna produkcja rzepaku wyniosła ok. 90,0 mln t (USDA Foreign Agricultural Service, 2025a), co przełożyło się na wytworzenie ok 49,1 mln t śruty rzepakowej (USDA Foreign Agricultural Service, 2025b). Tradycyjnie śrutę stosowano głównie jako paszę lub nawóz, jednak obecnie coraz większe jest zainteresowanie ich waloryzacją na cele spożywcze i nutraceutyczne. Tendencja ta wynika z kilku czynników. Po pierwsze, makuchy są bogate w cenne składniki odżywcze, zwłaszcza białko, co czyni je atrakcyjnym roślinnym surowcem białkowym. Po drugie, ich wykorzystanie wpisuje się w ideę ograniczania marnotrawstwa i efektywnego zarządzania odpadami spożywczymi (niższe koszty utylizacji, mniejsza presja środowiskowa). Po trzecie, wzrost popytu na białka roślinne wynika z chęci ograniczenia konsumpcji mięsa ze względów etycznych i zdrowotnych

(Garbacz i in., 2023). Wykorzystanie makuchów w nowych zastosowaniach żywnościowych może więc łączyć cele ekonomiczne (tańszy surowiec), ekologiczne (mniej odpadów) oraz społeczne (zdrowsza, bardziej zrównoważona dieta).

Mimo wysokiej wartości odżywczej, makuchy nasion oleistych dotychczas były niedoceniane jako składnik żywności dla ludzi. Wynikało to m.in. z obecności czynników antyżywnościowych, niekorzystnych cech organoleptycznych oraz wysokiej zawartości włókna pokarmowego w tych surowcach. Jednak postępy w uprawie i technologii przetwórstwa znacząco zmniejszyły poziom niepożądanych związków w niektórych nasionach. Przykładem są odmiany podwójnie ulepszone rzepaku (canola), charakteryzujące się niską zawartością glukozyzolanów ($<30 \mu\text{mol/g}$) i kwasu erukowego ($<2\%$) (Ye i in., 2023). Dzięki temu białka rzepakowe stały się bezpieczniejsze i bardziej atrakcyjne do zastosowań spożywczych (Garbacz i in., 2025). Ponadto rozwój nowych metod obróbki (np. fermentacja, prażenie, deodoryzacja) pozwala poprawić smak i strawność białek roślinnych. Z drugiej strony, rośnie presja na poszukiwanie alternatyw dla wszechobecnej soi – podstawowej uprawy białkowej – ze względu na kontrowersje wokół alergenicności tej rośliny oraz powszechności upraw GMO (Teleszko i in., 2023). Białka pozyskiwane z makuchów rodzimych roślin oleistych (jak rzepak czy słonecznik) mogą częściowo zastąpić importowaną śrutę sojową, zwiększając bezpieczeństwo żywnościowe i poprawiając bilans ekologiczny (mniej transportu, zagospodarowanie lokalnych odpadów przemysłu olejarskiego). Wszystkie powyższe przesłanki stanowią silne uzasadnienie dla podjęcia prac badawczych nad opracowaniem procesu wytwarzania peptydów bioaktywnych z makuchów – wpisuje się to bowiem w aktualne trendy rynkowe (żywność funkcjonalna, „clean label”), potrzeby środowiskowe (upcykling odpadów) oraz cele naukowe (poszukiwanie nowych bioaktywnych składników prozdrowotnych).

3.2. Właściwości białek z makuchów oleistych

Makuchy będące pozostałością po tłoczeniu lub ekstrakcji oleju charakteryzują się wysoką zawartością białka roślinnego. Zawartość i skład aminokwasowy białek różnią się w zależności od gatunku rośliny oraz sposobu odtłuszczenia materiału. Poniżej scharakteryzowano trzy kluczowe dla przedsiębiorstwa surowce: makuch rzepakowy, słonecznikowy i ostropestowy, z odniesieniem do innych nasion oleistych.

3.2.1. Rzepak (*Brassica napus* L.)



Rycina 1. Kwiaty oraz nasiona rzepaku (*Brassica napus* L.).

Nasiona rzepaku zawierają ok. 40–50% tłuszczu i 20–30% białka (Chmielewska i in., 2021). Po ekstrakcji oleju pozostaje makuch, stanowiący ~ niemal połowę masy nasion i zawierający ~35–40% białka (Chew i in., 2020). Białko rzepakowe cechuje się wysoką wartością odżywczą dzięki korzystnemu profilowi aminokwasowemu – jest bogate w aminokwasy siarkowe (cysteinę i metioninę) oraz rozgałęzione (BCAA – Branched-Chain Amino Acids), ma także wysoki udział lizyny (~6% kompozycji aminokwasów) będącej limitującym aminokwasem zbóż (Di Lena i in., 2021; Wanasundara i in., 2016). Jego wartość biologiczna zbliża się do białka sojowego – badania wykazały, że izolaty/hydrolizaty białka rzepaku pod względem strawności, składu aminokwasów egzogennych i bilansu azotowego dorównują izolatowi sojowemu (Fleddermann i in., 2013). W przeszłości szersze wykorzystanie rzepaku w żywieniu ludzi ograniczała wysoka zawartość substancji antyżywnościowych (m.in. glukozynolany, polifenole jak synapina i taniny, kwas fitynowy), powodujących gorzki smak, ciemną barwę produktów, obniżenie rozpuszczalności i strawności białek oraz potencjalne reakcje alergiczne (Đermanović i in., 2025). Obecnie jednak dostępne są odmiany podwójnie ulepszone “00”, w których poziom tych związków (glukozynolany < 30 $\mu\text{mol/g}$, kwas erukowy < 2% w nasionach) zredukowano do śladowych ilości (Ye i in., 2023). Dzięki temu makuch rzepakowy jest dziś

obiecującym źródłem białka dla przemysłu spożywczego – tańszym i łatwiej dostępnym lokalnie niż soja (w Unii Europejskiej rośnie produkcja rzepaku, a Polska należy do czołowych producentów). Dominującymi białkami w nasionach rzepaku są globuliny zapasowe krucyferyna (hetero-hexamer 11–12S o masie ok. 300 kDa) oraz napina (albumina 2S ~14–16 kDa), stanowiące łącznie ~85–90% ogółu białek. Taki skład decyduje o właściwościach funkcjonalnych białek rzepakowych – krucyferyna i napina nadają im zdolność tworzenia emulsji olej-woda, piany oraz żeli, dając im ogromny potencjał zastosowania w produktach spożywczych (Karabulut i in., 2025). W ostatnich latach prowadzone są intensywne prace nad wykorzystaniem białek rzepaku w żywności (izolaty białkowe, koncentraty) oraz nad otrzymywaniem z nich peptydów o aktywności biologicznej. Liczne badania wykazały, że hydrolizaty białek rzepakowych mogą uwalniać krótkie peptydy bioaktywne o różnorodnych właściwościach prozdrowotnych – m.in. antyoksydacyjnych, przeciwnadciśnieniowych (inhibitory ACE), przeciwcukrzycowych (hamowanie DPP-IV), przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych; hipolipidemicznych (He i in., 2012; Duan i in., 2023; He i in., 2019; Yang i in., 2023).

3.2.2. Słonecznik (*Helianthus annuus* L.)



Rycina 2. Kwiaty oraz nasiona słonecznika (*Helianthus annuus* L.).

Słonecznik jest kolejną ważną rośliną oleistą; światowa produkcja nasion w ostatnich sezonach wynosiła ok. 52–56 mln t (USDA, 2025a). Nasiona słonecznika zawierają około 40–45% tłuszczu i 20–30% białka. Po ekstrakcji oleju ze słonecznika powstaje makuch zawierający przeciętnie około 35% białka w suchej masie, przy czym wartość ta zależy od stopnia odłuszczenia i usunięcia łuski (González-Pérez i Vereijken, 2007). Makuch słonecznikowy odznacza się jednak wyższą zawartością włókna (pozostałość łuski) oraz niższą zawartością lizyny, co obniża wartość odżywczą jego białka w porównaniu z soją czy rzepakiem (González-Pérez i Vereijken, 2007). Niemniej jednak białko słonecznika jest stosunkowo bogate w aminokwasy siarkowe (metioninę i cysteinę) w porównaniu z innymi śrutami oleistych oraz zawiera korzystne ilości aminokwasów aromatycznych (Žilić i in., 2010). Ponadto słonecznik nie zawiera typowych silnych alergenów pokarmowych – alergię na jego białko należą do rzadkości (Ukleja-Sokołowska i in., 2016). Dzięki temu, a także statusowi upraw non-GMO, białko słonecznika stanowi bezpieczny zamiennik w produktach dla alergików oraz konsumentów poszukujących roślinnych alternatyw. W porównaniu z innymi śrutami roślinnymi, białko słonecznika charakteryzuje się brakiem istotnych wewnętrznych czynników antyżywnościowych wymagających inaktywacji termicznej – w nasionach nie występują bowiem związki takie jak glukozynolany, a aktywność inhibitorów proteaz jest stosunkowo niska (Ermis, 2024). Jednocześnie w makuchu obecne są związki fenolowe, głównie kwas chlorogenowy, które mogą nadawać produktom ciemną barwę i gorzki posmak (Shchekoldina i Aider, 2014). Dominującymi białkami zapasowymi nasion słonecznika są globuliny 11S (helianthinin) i albuminy 2S, które łącznie stanowią ~85% ogółu białek. Globuliny 11S to heksamery o masie 300–350 kDa, a 2S-albuminy to małe, zasadowe polipeptydy (~10–15 kDa) (Žilić i in., 2010). Taki profil białkowy decyduje o funkcjonalności – globuliny 11S i albuminy 2S wykazują zdolność do tworzenia emulsji olej-woda, pian i żeli, porównywalną z właściwościami białek sojowych czy nawet białka jaja (González-Pérez i Vereijken, 2007; Shchekoldina i Aider, 2012). Białka słonecznika stosowano m.in. w pieczywie, makaronach bezglutenowych i przetworach mięsnych, gdzie zwiększały zawartość białka, poprawiały konsystencję i profil aminokwasowy, nie obniżając akceptowalności sensorycznej (Shchekoldina i Aider, 2014; Zaky i in., 2022; Grasso i in., 2020). W ostatnich latach prowadzone są intensywne prace nad otrzymywaniem z białek słonecznika hydrolizatów o aktywności biologicznej. Badania potwierdzają, że enzymatyczna hydroliza uwalnia peptydy o działaniu przeciwzapalnym, immunomodulującym oraz przeciwutleniającym (Velliquette i in., 2020; Ospina-Quiroga

i in., 2022). Te badania potwierdzają, że pomimo pewnych ograniczeń, białka słonecznika są wartościowym surowcem do otrzymywania funkcjonalnych peptydów i mogą znaleźć zastosowanie w żywności o podwyższonych walorach prozdrowotnych.

3.2.3. Ostropest plamisty (*Silybum marianum* L. Gaertn.)



Rycina 3. Kwiaty oraz nasiona ostropestu (*Silybum marianum* L.).

Ostropest jest rośliną znaną głównie z zawartości związków sylimarynowych o właściwościach prozdrowotnych (hepatoprotekcyjnych) (Opyd i Jurgoński, 2021). Nasiona ostropestu zawierają około 20–30% białka i 25–30% tłuszczu (Teleszko i in., 2023). Makuch ostropestowy stanowi wartościowy, lecz wymagający surowiec do dalszego wykorzystania. Zawiera on przeciętnie 25–30% białka oraz wyjątkowo wysoką ilość błonnika, sięgającą do ~58% s.m. (~580 g/kg). Taka zawartość frakcji włóknistych z jednej strony stanowi zaletę – makuch jest źródłem włókna pokarmowego i polifenoli – z drugiej natomiast ogranicza jego strawność i przyswajalność składników odżywczych (Lambo i in., 2024). Dodatkowym problemem technologicznym pozostaje obecność twardej łuski nasiennej oraz gorzkich flawonolignanów, które obniżają akceptowalność sensoryczną produktów. Profil aminokwasowy białek ostropestu porównywany jest do białek roślin strączkowych – zawartość aminokwasów egzogennych jest wysoka, a szczególnie wyróżnia

się duża ilość aminokwasów siarkowych (metioniny i cysteiny) oraz tryptofanu (Teleszko i in., 2023). Dotychczas ograniczone wykorzystanie białek ostropestu w żywności wynikało głównie z trudności technologicznych, jednak rosnące zainteresowanie lokalnymi źródłami białka sprawia, że surowiec ten staje się obiektem nowych badań. Szczególnie perspektywiczne wydaje się zastosowanie hydrolizatów białek ostropestu jako źródła peptydów bioaktywnych. Wstępne badania wskazują, że produkty ich hydrolizy mogą wykazywać silne właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne, przy czym synergistyczne działanie peptydów i towarzyszących flawonolignanów może zwiększać efekt biologiczny (Opyd i in., 2021). Z tego względu ostropest plamisty należy uznać za interesujące, lokalnie dostępne źródło białka i bioaktywnych peptydów, które może znaleźć zastosowanie w żywności funkcjonalnej i nutraceutykach. Z uwagi na lokalną dostępność ostropestu w Polsce oraz ograniczoną znajomość bioaktywnych peptydów z jego białek, roślina ta stanowi interesujący obiekt dalszych badań, które mogą dostarczyć nowych informacji naukowych i umożliwić opracowanie innowacyjnych produktów prozdrowotnych.

3.2.4. Inne rośliny oleiste

Oprócz rzepaku, słonecznika i ostropestu, potencjał do wykorzystania w produkcji peptydów bioaktywnych wykazują także inne rośliny oleiste. Należą do nich m.in. konopie siewne, dynia oleista, czarnuszka siewna, a także klasyczne gatunki referencyjne, takie jak soja czy len. Makuchy tych surowców zawierają znaczące ilości białka o korzystnym profilu aminokwasowym i po enzymatycznej hydrolizie stają się źródłem peptydów o wysokiej aktywności biologicznej. W licznych badaniach opisano przede wszystkim działanie antyoksydacyjne oraz inhibicję ACE, ale także efekty przeciwzapalne, hepatoprotekcyjne, przeciwdrobnoustrojowe i potencjalnie przeciwnowotworowe (Girgih i in., 2014; Vastag i in., 2011; Nkosi i in., 2005; Nourmohammadi i in., 2017; Zaky i in., 2021; Karamać i in., 2016; Nwachukwu i in., 2014; Liu i in., 2022; Lammi i in., 2015; Puchalska i in., 2014).

Przytoczone przykłady wyraźnie pokazują, że nasiona oleiste i powstające z nich makuchy – dotąd traktowane głównie jako pasze – stanowią wartościowe źródła białek i bioaktywnych peptydów. Choć niniejsza praca koncentruje się na trzech wybranych rodzimych surowcach oleistych (rzepaku, słoneczniku oraz ostropeście), uzyskane wnioski mają charakter uniwersalny i mogą znaleźć zastosowanie także w odniesieniu do innych

roślin oleistych. W dobie poszukiwania zrównoważonych i innowacyjnych źródeł bioaktywnych składników żywności, białka pozostałe po ekstrakcji oleju stanowią obiecującą bazę do pozyskiwania nowych peptydów o korzystnym działaniu na zdrowie człowieka.

3.3. Metody izolacji białek z makuchów oleistych

3.3.1. Ekstrakcja alkaliczna z wytrącaniem izoelektrycznym.

Najczęściej stosowaną metodą izolacji białek z makuchów (odtłuszczonych wyłoków nasion oleistych) jest klasyczny dwuetapowy proces ekstrakcji alkalicznej z następczym wytrącaniem izoelektrycznym białek (Kalaydzhiev i in., 2020; Singh i in., 2022). Polega on na rozpuszczeniu białek w wodnym roztworze o odczynie zasadowym (zwykle w NaOH, pH 8-12), oddzieleniu nierozpuszczalnych pozostałości (włókna, skrobi itp.) przez wirowanie, a następnie zakwaszeniu otrzymanego supernatantu do punktu izoelektrycznego (pH 4–5) w celu strącenia rozpuszczonych białek. Wytrącone białko odzyskuje się przez kolejną sedymentację/wirowanie i neutralizuje do pH obojętnego (Kalaydzhiev i in., 2020). Metoda ta została opracowana już w latach 50. XX w. (patent Anson i Pader, 1955) i do dziś jest wzorcem w produkcji izolatu sojowego oraz badaniach nad białkami roślinnymi. Zapewnia ona wysoki stopień izolacji – otrzymywany izolat białkowy cechuje się zwykle bardzo dużą czystością (>90% białka w suchej masie). Wykazano, że wydajność odzysku białka tą metodą z wielu makuchów (soja, rzepak, konopie, słonecznik) może dochodzić do 50–60% zawartego białka, choć zależy od surowca i warunków procesu (Singh i in., 2022). Z technologicznego punktu widzenia proces alkalicznej ekstrakcji i strącania jest stosunkowo prosty do wdrożenia – opiera się na standardowych operacjach mieszania, regulacji pH i wirowania. Wymaga jednak użycia znacznych ilości odczynników oraz generuje ścieki o wysokiej zawartości rozpuszczalnych substancji (cukrów, soli, niektórych polifenoli). Ponadto ekstremalne pH mogą powodować częściową denaturację białek i pogorszenie niektórych ich właściwości funkcjonalnych, a także sprzyjać niepożądanym reakcjom chemicznym (np. ciemnieniu wskutek reakcji Maillarda) – dlatego często poszukuje się kompromisu między wysokim uzyskiem a łagodnością warunków. Mimo tych ograniczeń, klasyczna metoda alkaliczna pozostaje punktem wyjścia w pracach nad izolacją białek z nowych surowców, ze względu na swoją

skuteczność i sprawdzenie w skali przemysłowej (np. wytwarzanie izolatu sojowego tą metodą jest już realizowane na świecie).

3.3.2. Modyfikacje procesu konwencjonalnego.

Istnieje szereg modyfikacji powyższego procesu, których celem jest poprawa właściwości produktu lub uproszczenie technologii. Jedną z nich jest zastosowanie odmiennego odczynu podczas ekstrakcji – zamiast środowiska silnie zasadowego testowano ekstrakcję w warunkach kwaśnych (np. pH ~2) lub nawet w czystej wodzie bez dodatku kwasów/zasad (Alli i in., 1993; Klamczynska i in., 2001). Ekstrakcja kwaśna bywa stosowana np. do wyizolowania specyficznych frakcji (w przypadku rzepaku pozwala preferencyjnie ekstrahować białka drobne – napiny) i również prowadzi do otrzymania preparatu o wysokiej czystości białkowej (Alli i in., 1993). Z drugiej strony ekstrakcja wyłącznie wodą (pH naturalne surowca) daje znacznie niższe wydajności rozpuszczania białka, dlatego rzadko sprawdza się jako samodzielna metoda izolacji (Klamczynska i in., 2001). Inną modyfikacją jest zmiana sposobu zateżniania/odzyskiwania białka z roztworu: zamiast wytrącania izoelektrycznego można zastosować proces ultrafiltracji membranowej w celu odfiltrowania i zagęszczenia rozpuszczonych białek (Singh i in., 2022). Metodę ultrafiltracji opracowano już w latach 70. (Olsen i Hinge, 1978) i wykazano, że otrzymane tą drogą izolaty zachowują wyższą rozpuszczalność oraz lepsze właściwości funkcjonalne (np. emulgowanie, żelowanie) niż białka strącane kwasem. Z perspektywy przemysłowej, zastąpienie etapu strącania procesem membranowym eliminuje konieczność dodawania kwasu i późniejszej neutralizacji, co upraszcza gospodarkę odczynnikami i może zmniejszyć zasolenie ścieków. Wadą są jednak wyższe koszty inwestycyjne (instalacja systemu filtracji membranowej o odpowiedniej wydajności) oraz potrzeba precyzyjnego oczyszczania ekstraktu przed filtracją, aby uniknąć zatykania membran. Niemniej jednak, technologia membranowa jest już z powodzeniem stosowana na skalę przemysłową w produkcji koncentratów białek serwatkowych czy grochowych, więc jej implementacja w przypadku białek z makuchów jest realna.

3.3.3. Metoda micelizacji.

Ciekawą alternatywą dla zakwaszania białek jest tzw. metoda micelizacji, oparta na kontrolowanej zmianie siły jonowej środowiska (Paredes-López i in., 1991). W metodzie tej białka najpierw ekstrahuje się w roztworze o podwyższonym stężeniu soli (np. NaCl), co zwiększa rozpuszczalność niektórych frakcji białkowych w fazie ciekłej. Następnie roztwór białek o wysokiej jonowości rozcieńcza się dużą objętością wody, gwałtownie obniżając siłę jonową, co indukuje precypitację białek z powrotem. Powstające w ten sposób agregaty białkowe określa się mianem miceli, a proces umożliwia odzyskanie białka bez użycia kwasów – wystarczy separacja przez sączenie lub odwirowanie strąconych miceli i ich suszenie (Boye i in., 2010). Zaletą tej metody jest łagodniejsze traktowanie białek (brak ekstremalnego pH) oraz możliwość uzyskania koncentratu białkowego o wysokiej czystości rzędu 85–88% białka (Boye i in., 2010). Niestety, wadą micelizacji jest bardzo duże zużycie wody – aby efektywnie strącić białka przez rozcieńczenie, wymagane są znaczne objętości, co rodzi problemy ze skalowaniem przemysłowym i gospodarowaniem ściekami. W konsekwencji metoda ta, mimo interesujących wyników laboratoryjnych, nie doczekała się szerszego zastosowania komercyjnego i traktowana jest raczej jako ciekawostka naukowa lub opcja do zastosowania niszowego.

3.3.4. Łagodna ekstrakcja solna i ultrafiltracja.

Najnowsze badania wskazują, że obiecującym podejściem do izolacji białek z makuchów może być zastosowanie łagodniejszych warunków ekstrakcji – np. umiarkowanie kwaśnego odczynu i soli zamiast silnej zasady – połączonych z technikami membranowymi zamiast strącania. Zhang i in. (2024) porównali klasyczną ekstrakcję alkaliczną białek rzepaku z alternatywną ekstrakcją w roztworze soli magnezu przy pH 6,5, po której białka oczyszczono metodą ultrafiltracji. Okazało się, że mało kwaśna (ang. weakly acidic) ekstrakcja solna (pH 6,5, 0,15 M MgCl₂) pozwoliła odzyskać ponad 40% białka z surowca i znacząco obniżyć poziom związków antyodżywczych w produkcie. Otrzymane tą metodą preparaty cechowały się jaśniejszą barwą i łagodniejszym zapachem oraz wykazywały lepszą rozpuszczalność, wyższą aktywność emulgowania i pianotwórczość niż izolaty uzyskane metodą alkaliczną. Poprawie uległa również wartość odżywcza – otrzymane białko miało korzystniejszy profil aminokwasowy i wyższą strawność w sztucznym przewodzie pokarmowym. Autorzy podkreślają, że metoda ta jest

łagodniejsza dla białek i daje produkt bardziej atrakcyjny spożywczo; jedynym wyzwaniem pozostaje nieco niższa wydajność w porównaniu z ekstrakcją alkaliczną, którą należałoby poprawić przy skalowaniu procesu. Z praktycznego punktu widzenia, wdrożenie takiej technologii wymagałoby wyposażenia zakładu w układ ultrafiltracji oraz obiegu roztworów soli, ale jednocześnie eliminuje konieczność stosowania silnych odczynników i może ułatwić uzyskanie produktu o wysokiej jakości sensorycznej. Jest to warty uwagi sposób na otrzymanie tzw. „białek natywnych” o zachowanych funkcjach biologicznych i lepszej akceptowalności w żywności (Hansen i in., 2022).

3.3.5. Usuwanie polifenoli i substancji antyodżywczych.

Cechą charakterystyczną wielu makuchów oleistych jest wysoka zawartość związków fenolowych i innych substancji antyodżywczych (pozostałości p procesach produkcyjnych, nagromadzonych zanieczyszczeń, itp.), które mogą utrudniać izolację białka i pogarszać jakość otrzymanego izolatu. Przykładowo, makuch rzepakowy zawiera glukozynolany i polifenole (m.in. kwas synapinowy), a słonecznikowy jest zasobny w kwas chlorogenowy – związki te nadają ciemną barwę i gorzki posmak, a także obniżają rozpuszczalność i właściwości funkcjonalne białek (Singh i in., 2022). Dlatego częstą praktyką jest ich częściowe usunięcie przed lub w trakcie procesu izolacji białka. Jedną z prostszych metod jest płukanie surowca w etanolu/wodzie, które wypłukuje polifenole przy minimalnych stratach białka – np. zastosowanie mieszaniny etanol: woda 8:2 (v/v) wobec makuchu rzepaku pozwoliło zredukować zawartość fenoli przy jedynie śladowym ubytku białka (Zhang i in., 2024). Na skalę przemysłową potencjalnie opłacalne jest odzyskiwanie etanolu z powrotem (destylacja), dzięki czemu krok ten nie generuje dużych strat rozpuszczalnika. Alternatywnym podejściem jest stosowanie żywic adsorpcyjnych – np. nierozpuszczalnych polimerów (typu Amberlite XAD 16HP) o powinowactwie do związków fenolowych (Pickardt i in., 2015). W badaniach pilotażowych zastosowanie żywicy do oczyszczenia ekstraktu białkowego ze słonecznika pozwoliło uzyskać po wysuszeniu izolat o zawartości białka aż 94–98%, pozbawiony większości polifenoli, podczas gdy bez tego etapu czystość była znacznie niższa. Wadą jest koszt i konieczność regeneracji takich żywic, ale ich użycie może okazać się uzasadnione ekonomicznie, gdy celem jest produkt spożywczy o neutralnym smaku i jasnej barwie. W literaturze opisywano także wykorzystanie wymiany jonowej – kolumn wypełnionych selektywnym

adsorbentem – do jednoczesnego oczyszczania i frakcjonowania białek. Przykładowo, Moreno-González i in. (2021) użyli chromatografii kationowymiennej do rozdziału białek rzepaku na frakcję napin i krucyferyn, uzyskując każdą z nich w czystości >98%. Jest to jednak technologia wysoko-specjalistyczna, wymagająca kosztownej aparatury, dlatego jej zastosowanie ogranicza się na razie do skali laboratoryjnej lub ewentualnie produkcji składników o bardzo wysokiej wartości dodanej (np. izolacja specyficznych bioaktywnych peptydów).

3.3.6. Wspomaganie procesu nowoczesnymi technologiami.

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie metodami intensyfikacji ekstrakcji białek z surowców roślinnych oraz technologiami bardziej zrównoważonymi środowiskowo. Badane są m.in.: ultradźwięki, mikrofae, ekstrakcja enzymatyczna, pulsacyjne pola elektryczne, ekstrakcja przy użyciu cieczy w stanie nadkrytycznym lub subkrytycznym, a także zastosowanie tzw. naturalnych eutektycznych rozpuszczalników (NADES). Celem wszystkich tych innowacji jest zwiększenie wydajności i szybkości pozyskiwania białka, przy jednoczesnym obniżeniu zużycia energii i chemikaliów oraz poprawie jakości produktu końcowego. Poniżej omówiono najważniejsze z nich w kontekście możliwości wdrożeniowych:

- Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (UAE) – Ultradźwięki o wysokiej mocy przyłożone podczas ekstrakcji potrafią skutecznie rozbijać struktury komórkowe i aglomeraty, ułatwiając dyfuzję rozpuszczalnika w głąb cząstek i uwalnianie białek do roztworu. W efekcie znacząco rośnie wydajność procesu oraz skraca się czas ekstrakcji (Dong i in., 2011). Przykładowo, Dabbour i in. (2018) zoptymalizowali sonikację w procesie pozyskiwania białka ze słonecznika: już 15 minut działania ultradźwięków o gęstości mocy ~220 W/L (45 °C) zwiększyło uzysk białka do 54% (względem ~40% metodą tradycyjną), a otrzymany izolat miał bardzo wysoką czystość ~93% oraz polepszone właściwości funkcjonalne. Podobnie, w przypadku makuchu rzepakowego zastosowanie ultradźwięków (np. energii 150 kJ/L przy 30 °C) pozwoliło zwiększyć odzysk białka z 60% do ok. 72,5% oraz podniosło rozpuszczalność izolatu o 50% w zakresie pH neutralnego, bez destrukcyjnego wpływu na skład podjednostkowy białek (Villalón-López i Martínez-Padilla, 2025). Z perspektywy wdrożenia, technika UAE jest stosunkowo łatwa do zaadaptowania:

wymaga wyposażenia aparatury ekstrakcyjnej w przetworniki ultradźwiękowe zanurzone w medium lub sprzężone z naczyniem ekstrakcyjnym. Dostępne są już komercyjnie systemy do sonikacji cieczy w skali przemysłowej, zarówno pracujące okresowo, jak i w trybie ciągłym przepływowym. Kluczowe jest zapewnienie odpowiedniej mocy i unikanie nadmiernego przegrzewania próbek (ultradźwięki generują ciepło), co rozwiązuje się przez chłodzenie układu. Biorąc pod uwagę znaczną poprawę wydajności i jakości białek, ultradźwięki wydają się bardzo obiecującym ulepszeniem procesu – ich koszt energetyczny może się zwrócić dzięki zwiększeniu ilości otrzymanego produktu i potencjalnie lepszej wartości rynkowej izolatu.

- Ekstrakcja wspomagana mikrofalami – Działanie mikrofal polega na dielektrycznym rozgrzewaniu materiału, co powoduje szybki wzrost temperatury wewnątrz cząstek surowca. To z kolei rozluźnia strukturę matrycy i może ułatwiać uwalnianie składników rozpuszczalnych, w tym białek. Zaletą mikrofal jest bardzo krótki czas potrzebny do podgrzewania wsadu (ogrzewanie wolumetryczne), co skraca całkowity czas ekstrakcji (López-Salazar i in., 2023). Badania sugerują, że mikrofały mogą zwiększyć efektywność pozyskiwania białek z surowców roślinnych, jednocześnie zużywając mniej energii niż konwencjonalne ogrzewanie konwekcyjne (Bedin i in., 2019). Należy jednak uważać, by nie doprowadzać do lokalnego przegrzania i denaturacji białka – kontrola mocy mikrofal i ewentualne cykliczne załączanie pozwalają utrzymać temperaturę w optymalnym zakresie. Wdrożenie mikrofal w skali przemysłowej wymaga specjalnych ekstraktorów przystosowanych do pracy w polu mikrofalowym (materiały naczynia nie wchodzące w interakcje z promieniowaniem, odpowiednie zabezpieczenia). Takie urządzenia istnieją np. w przemyśle ekstrakcji ziół czy przypraw, choć w przypadku wydzielania białek nie są jeszcze powszechne. Niemniej, przy odpowiedniej optymalizacji, technologia mikrofalowa może oferować szybki i stosunkowo energooszczędny sposób izolacji białek – co czyni ją wartą rozważenia w nowoczesnym zakładzie.
- Wspomaganie enzymatyczne – Enzymy hydrolityczne mogą zostać użyte do selektywnego rozkładu tych komponentów surowca, które utrudniają uwalnianie białek. Najczęściej stosuje się koktajle enzymów celulolitycznych i hemicelulolitycznych w celu nadtrawienia ścian komórkowych, polisacharydów włóknistych i innych makromolekuł otaczających białka (Domínguez i in., 1994).

Taka obróbka enzymatyczna (zwykle poprzedzająca właściwą ekstrakcję) może znacząco zwiększyć ilość rozpuszczonego białka. Przykładowo, badania Rommi i in. (2014) wykazały, że dodatek preparatów pektynolitycznych (Pectinex) i celulolitycznych (Celluclast) zwiększył ilość wyekstrahowanego białka nawet 1,7-krotnie w porównaniu z brakiem enzymów. Innym podejściem jest użycie enzymów proteolitycznych – tu celem nie jest zachowanie nienaruszonych białek, lecz ich częściowa hydroliza w celu ułatwienia rozpuszczenia (mniejsze peptydy łatwiej przechodzą do roztworu). Przykładowo, proteaza Alcalase była testowana w procesie tzw. enzymatycznej ekstrakcji wodnej (*aqueous enzymatic extraction*), gdzie jednocześnie ekstrahowano olej i białko z nasion wodorozpuszczalnych emulsji. Po zakończeniu takiego procesu w fazie wodnej uzyskiwano hydrolizaty białkowe – rozpuszczalne peptydy zamiast całych, natywnych protein. W optymalnych warunkach uzyskano tym sposobem ~80–83% białka z nasion w formie rozpuszczonych peptydów (Zhang, i in., 2007). Enzymatyczne wspomaganie ma tę zaletę, że odbywa się w łagodnych warunkach i może zwiększyć odzysk białka bez potrzeby używania silnych odczynników. Wadą są natomiast koszty enzymów oraz konieczność ich inaktywacji i usuwania po procesie (by nie pozostały w produkcie końcowym). Ponadto, jeśli celem jest izolacja pełnowartościowych białek, użycie proteaz jest nieefektywne, ponieważ prowadzi do powstania hydrolizatów. Dlatego enzymy celulolityczne wydają się bardziej perspektywiczne – poprawiają dostępność białek nie uszkadzając ich bezpośrednio. Zastosowanie enzymów na skalę przemysłową wydłuża i komplikuje proces. Jednak w wielu gałęziach przemysłu spożywczego (np. w browarnictwie) taki dodatkowy etap jest standardem, więc przy odpowiednim uzasadnieniu ekonomicznym można go wdrożyć także w produkcji izolatu białek z makuchów.

- Inne nowatorskie metody – Poza wyżej wymienionymi, trwają prace nad szeregiem innych technik. Pulsacyjne pola elektryczne (PEF) oraz wyładowania o wysokim napięciu (HVED) mogą perforować struktury komórek roślinnych na skutek zjawiska elektroporacji, co ułatwia wypłukiwanie białek. Barba i in. (2015) zastosowali wyładowania elektryczne do wyłoków rzepaku, uzyskując jednocześnie uwolnienie z matrycy innych cennych składników: izotiocyjanianów, fenoli i białek. Ciecze nadkrytyczne, takie jak nadkrytyczny dwutlenek węgla (SC-CO₂), znalazły zastosowanie głównie w odtłuszczaniu surowców – np. odtłuszczanie makuchu

rzepakowego za pomocą SC-CO₂ (z dodatkiem etanolu jako współ rozpuszczalnika) pozwala jednocześnie usunąć część barwników i substancji bioaktywnych, poprawiając jakość późniejszego izolatu białkowego. Co więcej, odtłuszczenie nadkrytyczne sprzyja lepszemu odzyskowi białka w porównaniu z tradycyjnym tłoczeniem – prawdopodobnie ze względu na brak wysokiej temperatury i brak pozostałości rozpuszczalnika organicznego w surowcu (Li i in., 2021). Naturalne głęboko eutektyczne rozpuszczalniki (NADES) to kolejna innowacja – są to mieszaniny związków organicznych (np. cholina i glicerol), tworzące ciecz zdolną do rozpuszczania biopolimerów, a przy tym uznawane za bardziej ekologiczne i często nietoksyczne. Grudniewska i in. (2018) zastosowali NADES na bazie chlorku choliny i glicerolu do ekstrakcji białek z makucha rzepakowego oraz makucha z wiesiołka i uzyskali zwiększenie wydajności w porównaniu z tradycyjnymi rozpuszczalnikami wodnymi. Jakkolwiek obiecujące, NADES w kontekście żywności wymagają dalszych badań – przede wszystkim co do bezpieczeństwa spożycia ewentualnych pozostałości takich rozpuszczalników w izolacie oraz opłacalności ich odzysku i recyklingu w procesie.

3.3.7. Metody suchego frakcjonowania.

Wszystkie dotychczas opisane techniki to procesy mokre, w których białko przechodzi do roztworu. Warto wspomnieć, że istnieje też podejście alternatywne – mechaniczne frakcjonowanie na sucho, które nie wymaga użycia wody ani odczynników chemicznych. Polega ono na drobnym rozdrobnieniu makuchu, a następnie rozdzieleniu uzyskanej mączki na frakcję bogatą w białko i frakcję bogatą we włókno za pomocą technik takich jak sito powietrzne, klasyfikacja aerodynamiczna lub separacja w polu grawitacyjnym (Murru i in., 2020). Ponieważ cząstki białkowe (np. z wewnętrznych części komórek) są zwykle drobniejsze i lżejsze od cząstek okrywy nasiennej i włókna, istnieje możliwość ich częściowego rozdzielenia. W praktyce makuch mieli się na bardzo drobno, a następnie przesiewa i poddaje działaniu strumienia powietrza w separatorze (klasyfikatorze). Lżejsze cząstki (bogatsze w białko) unoszą się i zbierane są jako koncentrat białkowy, cięższe (z większą zawartością łusek, ligniny) opadają jako frakcja włóknista. Murru i in. (2020) wykorzystali taką metodę dla śruty słonecznikowej, osiągając wydajność przekraczającą 65% oraz zawartość białka na poziomie około 43%. Choć powstały produkt nie jest

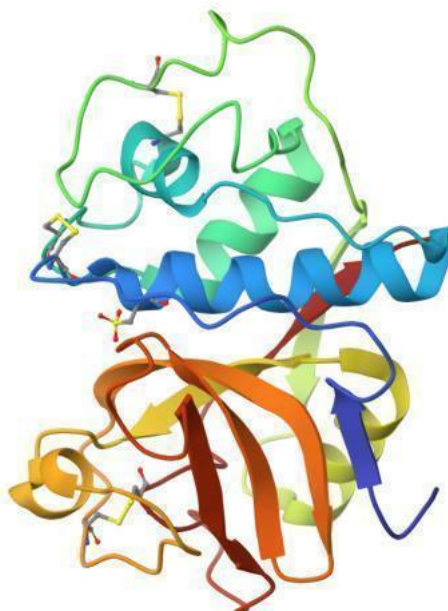
„izolatem” w ścisłym znaczeniu, to jednak taka poprawa wartości może być wystarczająca dla wielu zastosowań spożywczych (np. jako dodatek wysokobiałkowy do żywności) lub paszowych. Główną zaletą frakcjonowania suchego jest prostota i niska uciążliwość – technika ta wymaga tylko urządzeń mechanicznych (młyny, separatory) i nie generuje ścieków ani nie zużywa odczynników. Koszty energetyczne przemiału i separacji są relatywnie niskie. Ograniczeniem jest to, że maksymalna osiągalna koncentracja białka rzadko przekracza 55–60%, ponieważ zawsze pewna ilość białka pozostaje związana z cięższymi cząstkami włóknistymi. Mimo to, sucha metoda może stanowić atrakcyjne uzupełnienie mokrych procesów – np. wstępne odrzucenie części włókna przed ekstrakcją mokrą zwiększy efektywność późniejszego procesu chemicznego. W kontekście wdrożenia przemysłowego, technologia sucha jest z pewnością najłatwiejsza do implementacji (sprzęt stosowany jest powszechnie w młynarstwie i przemyśle paszowym), jednak otrzymywany produkt ma ograniczoną czystość i funkcjonalność.

Reasumując, istnieje wiele metod izolacji białek z makuchów oleistych od klasycznych, sprawdzonych technologii po nowatorskie rozwiązania. Tradycyjna ekstrakcja alkaliczna z precypitacją zapewnia wysoką czystość i wydajność, jest dobrze znana i możliwa do natychmiastowego wdrożenia, choć wiąże się z użyciem chemikaliów. Modyfikacje typu ultrafiltracja czy łagodna ekstrakcja solna oferują poprawę jakości produktu (lepszą rozpuszczalność, smak, wartość odżywczą) i mniejsze obciążenie środowiska, jednak wymagają inwestycji w odpowiednią infrastrukturę (membrany, systemy odzysku). Techniki pomocnicze jak ultradźwięki czy enzymy mogą znacząco zwiększyć efektywność procesu ich implementacja wymaga dodatkowego wyposażenia, ale jest osiągalna i potencjalnie opłacalna dla przedsiębiorstwa. Bardziej zaawansowane metody (PEF, NADES) na razie pozostają w sferze badań i półtechnicznej skali, ich pełne wdrożenie przemysłowe wymaga dalszych badań nad optymalizacją i ekonomiką. Sucha frakcjonowanie stanowi prostą alternatywę, niewymagającą skomplikowanej instalacji, lecz dającą produkt o niższej koncentracji białka. Literatura przedmiotu wyraźnie wskazuje, że optymalna metoda izolacji powinna być zrównoważona: dostatecznie efektywna, a zarazem możliwie prosta i skalowalna w warunkach przemysłowych. Wybór konkretnej technologii wymaga więc analizy kompromisów między wydajnością, jakością białka a kosztami i komplikacją procesu, z uwzględnieniem specyfiki danego surowca.

3.4. Enzymy roślinne stosowane do hydrolizy białek (papaina, bromelaina, ficyna) i ich specyfika substratowa

Enzymy proteolityczne pochodzenia roślinnego – przede wszystkim papaina, bromelaina i ficyna należą do najczęściej wykorzystywanych biokatalizatorów do hydrolizy białek w przemyśle spożywczym i biotechnologii. Są to endopeptydazy cysteinowe (proteazy tiolowe) z rodziny papainy (C1A) (Venetikidou i in., 2025). Cechują się one szeroką specyficznością substratową, zdolnością do działania w szerokim zakresie warunków pH i temperatury oraz statusem GRAS (ang. Generally Recognized As Safe) nadanym przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA), co umożliwia ich powszechne zastosowanie w żywności (Matkawala i in., 2022). Poniżej omówiono szczegółowo właściwości enzymatyczne papainy, bromelainy i ficyny ich mechanizm działania, optymalne warunki aktywności, a także źródła surowcowe, dostępność handlową i zastosowania.

3.4.1. Papaina (*Carica papaya* L.; EC 3.4.22.2)



Rycina 4. Struktura papainy – model wstążkowy. Źródło: RCSB Protein Data Bank (9PAP).

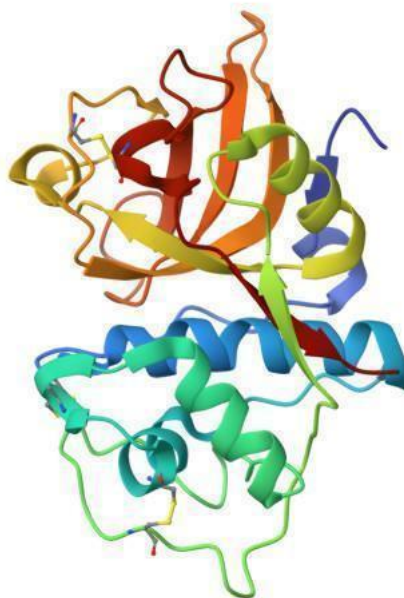
Papaina jest klasyczną proteazą cysteinową izolowaną z lateksu niedojrzałych owoców papai (*Carica papaya* L.) czyli mlecznego soku wyciekającego z nacięć skórki owocu. Stanowi główny enzym proteolityczny w lateksie papai (oprócz papainy zawarte są m.in. chimopapainy, karikainy i glicyloendopeptydazy). Mechanizm działania papainy opiera się na obecności nukleofilowej grupy tiolowej cysteiny w centrum aktywnym (wspomaganej przez resztę histydyny), która atakuje wiązanie peptydowe substratu (Venetikidou i in., 2025). Papaina jest enzymem o bardzo szerokiej specyfice substratowej – potrafi hydrolizować wiele różnych wiązań peptydowych wewnątrz cząsteczki białka (endopeptydaza) i cechuje się stosunkowo niewielkimi ograniczeniami co do sekwencji aminokwasów w miejscach cięcia (tzn. „proteaza niespecyficzna”) (Venetikidou i in., 2025). Optimum aktywności papainy przypada zwykle w zakresie pH ~6,0–7,0 i temperaturze ok. 60–65 °C (Grzonka i in., 2007). Niemniej jednak aktywność utrzymuje się w bardzo szerokim przedziale pH (od około 3 do 9) oraz w zakresie temperatur 37–70°C (Shouket i in., 2020). Tak szeroki zakres działania odróżnia papainę od wielu enzymów zwierzęcych i mikrobiologicznych i czyni ją użyteczną w różnych procesach przetwórczych.

Papaina od dawna jest dostępna w handlu jako preparat enzymatyczny (zarówno w postaci proszku, jak i płynnych ekstraktów) i znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym. Używa się jej m.in. do zmiękczenia mięsa, klarowania piwa i soków (hydroliza białek koloidalnych odpowiedzialnych za zmętnienie), a także do otrzymywania hydrolizatów białkowych o poprawionej rozpuszczalności i właściwościach funkcjonalnych (Mazorra-Manzano i in., 2017).

Papaina, dzięki szerokiej (w praktyce nieselektywnej) specyfice, należy do najskuteczniejszych enzymów stosowanych w hydrolizie białek roślinnych. Umożliwia uzyskanie wysokiego stopnia hydrolizy (DH) oraz dużego udziału krótkich peptydów i wolnych aminokwasów. Przykładowo, Domokos-Szabolcsy i in. (2024) wykazali, że po 12 godzinach hydrolizy białek ciecierzycy i soczewicy z użyciem papainy osiągnięto odpowiednio ~28% i ~35% DH, co wyraźnie przewyższało efekty uzyskane dla bromelainy i ficyny w analogicznych warunkach; jednocześnie na żelach SDS-PAGE obserwowano niemal całkowity zanik pasm wysokocząsteczkowych, potwierdzający zdolność papainy do degradacji większości frakcji białkowych. Tak głęboka hydroliza może jednak mieć niejednoznaczne konsekwencje dla właściwości bioaktywnych: z jednej strony sprzyja uwolnieniu sekwencji peptydowych, z drugiej może nadmiernie rozdrabniać pożądane, dłuższe peptydy do bardzo krótkich fragmentów lub pojedynczych aminokwasów, nie

zawsze zachowujących aktywność biologiczną. W praktyce hydrolizaty papainowe często charakteryzują się bardzo niską średnią masą peptydów (liczne cząsteczki <1 kDa) i wysoką zawartością aminokwasów wolnych (Domokos-Szabolcsy i in., 2024). Hu i in. (2020) zaobserwowali, że w hydrolizacie kukurydzianym dominowały bardzo krótkie peptydy o nieco niższej aktywności antyoksydacyjnej, podczas gdy enzymy o węższej specyfice (ficyna, bromelaina) przy umiarkowanym DH wytwarzały peptydy o wyższej aktywności. Z drugiej strony, Cotabarren i in. (2019) wykazali, że hydroliza wyłoków z nasion chia z użyciem papainy prowadzi do powstania niskocząsteczkowych peptydów (<15 kDa) o silnej zdolności zmiatania wolnych rodników (DPPH, ABTS). Nath i in. (2020) stwierdził również wzrost zdolności antyoksydacyjnej oraz aktywności inhibicji ACE po zastosowaniu papainy do hydrolizy białek mleka sojowego. Zebrane dane wskazują więc, że papaina jest efektywnym enzymem do uwalniania z białek roślinnych bioaktywnych peptydów, przy czym zależność między DH, długością peptydów a ich aktywnością nie jest liniowa i wymaga optymalizacji warunków procesu pod kątem zamierzonej funkcji produktu.

3.4.2. Bromelaina (*Ananas comosus* L.; EC 3.4.22.32)



Rycina 5. Struktura bromelainy w kompleksie z inhibitorem E-64 – model wstążkowy. Źródło: RCSB Protein Data Bank (6YCF).

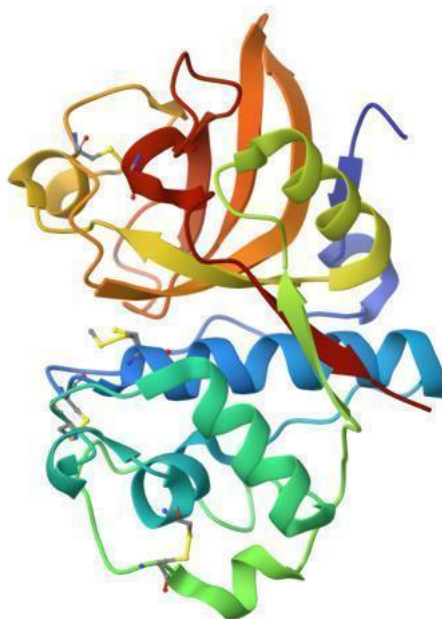
Bromelaina jest mieszaniną proteolitycznych enzymów cysteinowych pozyskiwanych z ananasa (*Ananas comosus* L.), głównie z rdzenia i łodygi (tzw. bromelaina łodygowa) oraz z soku owocowego (bromelaina owocowa). Preparaty handlowe określane jako „bromelaina” zazwyczaj zawierają dominujący enzym cysteinowy o masie ok. 24–28 kDa (łodygowa bromelaina) wraz z mniejszymi ilościami innych proteaz ananasowych (ananainy, komosainy itp.) (Kumar i in., 2023). Podobnie jak papaina, bromelaina należy do rodziny proteaz papainowych i działa w oparciu o mechanizm nukleofilowego ataku anionu tiolanowego cysteiny na wiązanie peptydowe. Specyfika substratowa bromelainy jest szeroka, choć badania wskazują na pewne preferencje. Enzym ten wykazuje powinowactwo do cięcia wiązań w sąsiedztwie reszt aromatycznych, niepolarnych i zasadowych – co pokrywa się w dużym stopniu z charakterystyką papainy. W porównaniu z papainą bromelaina bywa jednak określana jako proteaza o nieco węższej specyficzności – co przekłada się na inny profil peptydów po hydrolizie (Venetikidou i in., 2025). Bromelaina wykazuje aktywność w szerokim zakresie pH od około 3 do 9, przy czym jako optimum wielu źródeł podaje wartości w granicach pH ~6–7 (dla bromelainy z łodygi). Optymalna temperatura działania bromelainy mieści się zwykle między 50 a 60 °C. W literaturze spotyka się rozbieżności – np. podawano maksima aktywności w zakresie 50–60 °C, a nawet do 70 °C, zależnie od pochodzenia preparatu i substratu testowego (Venetikidou i in., 2025).

Zastosowania bromelainy w przemyśle spożywczym są zbliżone do papainy. Najbardziej znanym jest użycie bromelainy jako dodatku zmiękczającego mięso – enzym ten doskonale hydrolizuje białka mięśniowe (takie jak kolagen i aktyna-miozyna), poprawiając kruchość nawet twardszych mięs (Bekhit i in., 2014). Bromelaina jest również stosowana do klarowania piwa – dodana przed filtracją rozkłada białka powodujące zmętnienie (podobnie jak papaina) (Mazorra-Manzano i in., 2017). W przemyśle paszowym bywa komponentem dodatków zwiększających strawność pasz wysokobiałkowych (Matkawala i in., 2022). Poza przemysłem spożywczym, bromelaina ma zastosowania farmaceutyczne i nutraceutyczne: przypisuje się jej działanie przeciwzapalne, wspomagające trawienie oraz potencjalne właściwości przeciwobrzękowe, przez co występuje w suplementach diety jako enzym trawienny i środek wspierający rekonwalescencję (np. po urazach) (Kumar i in., 2023).

Bromelaina jest efektywną, choć zwykle mniej „agresywną” proteazą niż papaina w hydrolizie białek roślinnych. Domokos-Szabolcsy i in. (2024) wykazali, że podczas 12-godzinnej hydrolizy białek roślin strączkowych (ciecierzyca, soczewica) bromelaina osiąga

niższy stopień hydrolizy niż papaina (maksymalnie ~20–31% wobec ~28–35%), co wskazuje na wolniejszy przebieg proteolizy; jednocześnie na żelach SDS-PAGE obserwowano zanik licznych pasm wysokocząsteczkowych, choć mniej kompletny niż w próbach z papainą. Pod względem profilu produktów bromelaina, podobnie jak papaina, generowała duże ilości oligopeptydów i wolnych aminokwasów, przy czym w hydrolizatach bromelainowych stwierdzono relatywnie więcej peptydów o średniej długości (np. 2–6 reszt), podczas gdy papaina wytwarza wyjątkowo dużo di- i tripeptydów (Domokos-Szabolcsy i in., 2024). W badaniu Hu i in. (2020) porównującym trzy proteazy roślinne bromelaina wymagała dłuższego czasu, aby uzyskać optymalny rozkład białek kukurydzy, lecz wygenerowała hydrolizaty o najwyższej wydajności peptydów antyoksydacyjnych. Z kolei w przypadku ryżu brązowego frakcja <1 kDa otrzymana po trawieniu bromelainą wykazywała podwyższoną aktywność antyoksydacyjną (DPPH, ABTS) oraz silne hamowanie ACE (Selamassakul, i in., 2020). Dane te wskazują, że bromelaina stanowi atrakcyjną alternatywę dla proteaz zwierzęcych; dzięki pochodzeniu roślinnemu i statusowi „clean label” jest szczególnie pożądana w produktach wegańskich (Mazorra-Manzano i in., 2017).

3.4.3. Ficyna (*Ficus carica* L.; EC 3.4.22.3)



Rycina 6. Struktura ficyny – model wstążkowy. Źródło: RCSB Protein Data Bank (8R78).

Ficina to proteolityczny enzym (a ściślej mieszanina kilku izoenzymów) pochodzący z lateksu figowca pospolitego (*Ficus carica* L.). Podobnie jak papaina i bromelaina, ficyna należy do rodziny cysteinowych endopeptydaz papainopodobnych i wykazuje zbliżony mechanizm działania katalitycznego (Venetikidou i in., 2025). Lateks figowca, pozyskiwany z zielonych owoców lub naciętych gałęzi – historycznie używano go m.in. do wytworzenia skrzepu z mleka w serowarstwie ludowym czy jako środek na pasożyty przewodu pokarmowego (Shah, i in., 2014). Ficyna najchętniej hydrolizuje wiązania peptydowe, gdzie od strony N-końcowej ciętego wiązania występuje arginina, a zaraz przed nim aminokwas niepolarny. Ogólnie jednak ficyna, podobnie jak papaina, jest uznawana za enzym o bardzo szerokim zakresie ciętych sekwencji, co skutkuje powstawaniem złożonych mieszanin peptydów o zróżnicowanej długości. Optymalne warunki działania ficyny są zbliżone do innych proteaz papainowych: maksimum aktywności notuje się zwykle przy temperaturze rzędu 50–60 °C i w pH neutralnym ok. 6–7 (Morellon-Sterling i in., 2020).

Dostępność handlowa ficyny jest nieco mniejsza niż papainy i bromelainy, ale można ją nabyć jako preparat ciekły lub liofilizowany. W przemyśle spożywczym ficyna bywa wykorzystywana jako składnik mieszanych preparatów proteolitycznych do zmiękczenia mięsa oraz wspomnianych już koagulantów roślinnych do serowarstwa (Bekhit i in., 2014; Shah i in., 2014). Badania potwierdzają, że ficyna wykazuje aktywność krzepnącą mleko trawi kazeinę w sposób inicjujący powstawanie skrzepu podobnie do podpuszczki cielęcej. Niestety, jej nadmierna aktywność proteolityczna często prowadzi do rozkładu skrzepu i powstawania peptydów gorzkich w smaku, co ogranicza zastosowanie czystej ficyny jako zamiennika podpuszczki (Shah i in., 2014).

Ficina, w porównaniu z papainą i bromelainą, zwykle wykazuje niższą wydajność proteolizy białek roślinnych. W badaniach Domokos-Szabolcsy i in. (2024) uzyskano najniższe wartości DH dla białek strączkowych właśnie przy użyciu ficyny, po 12 godzinach hydrolizy soczewicy DH wyniósł ~21%. Analiza SDS-PAGE potwierdziła wolniejszą degradację niektórych opornych frakcji: pasmo ~50 kDa w białkach soczewicy zanikało całkowicie już po 1 godzinie działania papainy i bromelainy, natomiast przy ficynie pozostawało częściowo widoczne nawet po 12 godzinach. Mimo niższego tempa proteolizy ficyna może wytwarzać peptydy o wysokiej aktywności biologicznej. W badaniu Hu i in. (2020) frakcje peptydowe uzyskane działaniem ficyny na białka kukurydzy wykazywały bardzo silną aktywność antyoksydacyjną, co autorzy wiążą z możliwością preferencyjnego

uwalniania krótkich sekwencji zawierających reszty aromatyczne (tyrozynę, tryptofan) lub motywy hydrofobowe sprzyjające zmiataniu wolnych rodników. Innymi słowy, mniejsza „agresywność” ficyny może sprzyjać powstawaniu bardziej selektywnych, funkcjonalnych peptydów. Z tego względu ficyna pozostaje obiecującym enzymem do otrzymywania roślinnych hydrolizatów białkowych o potencjale bioaktywnym.

Podsumowując, papaina, bromelaina i ficyna są wartościowymi narzędziami biokonwersji białek roślinnych do produktów o wysokiej wartości dodanej. Enzymy te są łatwo dostępne komercyjnie, pochodzą z naturalnych źródeł (papaja, ananas, figowiec) i są akceptowane jako bezpieczne składniki żywności. W porównaniu z powszechnie stosowanymi proteazami mikrobiologicznymi (np. Alcalase, Protamex) czy zwierzęcymi (pepsyna, trypsyna) nie budzą obaw natury etycznej, a ich wykorzystanie wpisuje się w trend „clean label” oraz dążenie do ograniczania enzymów otrzymywanych metodami inżynierii genetycznej. Ich zastosowanie wpisuje się w cele zrównoważonego przetwórstwa oraz rosnące wymagania regulacyjne i konsumenckie. Stanowi to solidną podstawę do wdrażania roślinnych hydrolizatów o zaprojektowanych funkcjach prozdrowotnych w skali przemysłowej.

3.5. Bioaktywne peptydy z białek roślin oleistych: właściwości antyoksydacyjne, hipotensyjne, immunomodulujące i inne

Bioaktywne peptydy to krótkie sekwencje aminokwasowe (2–20 aminokwasów), które powstają w wyniku hydrolizy enzymatycznej lub fermentacji. W strukturze białka macierzystego pozostają one nieaktywne, a swoją bioaktywność ujawniają dopiero po uwolnieniu (Peres Fabbri i in., 2023). Ze względu na niewielkie rozmiary mogą być łatwo wchłaniane w przewodzie pokarmowym i docierać do miejsc docelowego działania. Ich aktywność biologiczna zależy w dużej mierze od sekwencji aminokwasów (obecności kluczowych reszt oraz konfiguracji końców N- i C-terminalnych), jak również od właściwości fizykochemicznych peptydu, takich jak hydrofobowość, ładunek elektrostatyczny czy struktura drugorzędowa (Nasri, 2017).

W ostatnich latach szczególne zainteresowanie wzbudzają peptydy pozyskiwane z białek roślinnych, zwłaszcza z nasion roślin oleistych (m.in. rzepaku, słonecznika,

ostropestu, soi, grochu, lnu), ze względu na ich wysoką dostępność, bezpieczeństwo stosowania oraz wielokierunkową bioaktywność. W literaturze bardzo dobrze udokumentowano szerokie spektrum funkcji fizjologicznych peptydów bioaktywnych, obejmujące m.in. działanie antyoksydacyjne, hipotensyjne, immunomodulujące, antymikrobiologiczne, hipoglikemiczne oraz przeciwnowotworowe (Garbacz i in., 2023). W dalszej części pracy omówiono główne grupy aktywności, mechanizmy działania peptydów oraz wybrane przykłady opisane w literaturze.

Tabela 1. Peptydy z roślin oleistych i ich bioaktywności.

Źródło	Sekwencja	Aktywność	Bibliografia
chia	KLKKNL	przeciwnowotworowe	Quintal i in., 2021
czarny sezam	ITAPHW, SLPNYHPSPR	inhibitor ACE	Du i in., 2023
konopie	LR, PLMLP	przeciw cukrzycowe	Ren i in., 2016
rzepak	WDHHAPQLR	antyoksydacyjna	Zhu i in., 2022
rzepak	IY, RIY, VW, VWIS	inhibitor ACE	Marczak i in., 2023
rzepak	LY, RALP, GHS	przeciwzapalne	He i in., 2019
rzepak	WYP	przeciwnowotworowe	Wang i in., 2016
rzepak	NDGNQPL	przeciwnowotworowe	Ma i in., 2023
sezam	STIR, AGGVPR	przeciwdrobnoustrojowe	Zhu i in., 2024
słonecznik	ACAHDKV	antyoksydacyjna	Ren i in., 2010
słonecznik	FVNPQAGS	inhibitor ACE	Megias i in., 2004
słonecznik	PADVTPEEKPEV	przeciwzapalne	Tonolo i in., 2024
soja	WPK, AYLH	neuroprotekcyjne	Amakye i in., 2021
soja	VHVV	neuroprotekcyjne	Ju i in., 2019
soja	LLPLPVLK, SWLRL, WLRL	przeciw cukrzycowe	Wang i in., 2019
soja	GSR, EAK	przeciw cukrzycowe	Jiang i in., 2018

3.5.1. Peptydy o aktywności antyoksydacyjnej

Peptydy antyoksydacyjne mogą neutralizować nadmiar wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (ROS) zarówno przez bezpośrednie oddawanie wodoru

lub elektronu, jak i przez przerywanie reakcji łańcuchowych w lipidach. Najsilniej działają zwykle krótkie, hydrofobowe i/lub aromatyczne peptydy (np. z udziałem Pro, Val, Leu, Tyr, Trp, Met), zdolne do stabilizacji rodników po donacji atomu wodoru/elektronu. Istotną rolę odgrywa też histydyna (pierścień imidazolowy), cysteina (grupa tiolowa) i metionina (łatwo ulega utlenieniu), które sprzyjają dezaktywacji ROS. Reszty aromatyczne (Phe, Tyr, Trp) mogą pełnić funkcję donorów wodoru, a grupy kwaśne i zasadowe ułatwiają chelatowanie prooksydacyjnych jonów metali (Fe^{2+} , Cu^{2+}) oraz neutralizację nadtlenu. W efekcie peptydy te hamują inicjację i propagację peroksydacji lipidów, chroniąc składniki komórkowe przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Tawalbeh i in., 2023; Zhu i in., 2024). Co ważne, niska masa cząsteczkowa (<1 kDa) zwiększa skuteczność antyoksydacyjną – mniejsze fragmenty łatwiej przenikają bariery biologiczne i wchodzi w reakcje z rodnikami. Oprócz bezpośredniego „zmiatania” ROS, peptydy mogą też podnosić aktywność endogennych enzymów antyoksydacyjnych (np. SOD) oraz poziom glutationu, aktywując szlaki obronne przeciw stresowi oksydacyjnemu.

Hydrolizaty białek z nasion roślin oleistych, takich jak rzepak, len, słonecznik, soja, sezam czy konopie, konsekwentnie ujawniają szerokie spektrum aktywności przeciwutleniającej, co potwierdzono w licznych badaniach z wykorzystaniem testów chemicznych, modeli komórkowych i badań *in vivo*. Dobrym przykładem są hydrolizaty białek rzepaku, otrzymywane z wykorzystaniem proteaz bakteryjnych lub roślinnych, zawierające m.in. peptyd WDHHPQLR, który w modelu komórkowym hamował apoptozę indukowaną stresem oksydacyjnym (Zhu i in., 2022). Podobne efekty zaobserwowano dla hydrolizatów białek słonecznika: obecne w nich krótkie peptydy chroniły komórki Caco-2 przed indukowanym stresem oksydacyjnym (Lopes i in., 2025). Z białek słonecznika, po hydrolizie z użyciem Flavourzyme, wyodrębniono peptyd o sekwencji ACAHDKV, który w testach chemicznych wykazywał wysoką aktywność przeciwutleniającą, co sugeruje jego potencjał ochronny wobec uszkodzeń oksydacyjnych związanych ze starzeniem i kancerogenezą (Ren i in., 2010).

Szeroki przegląd peptydów o aktywności antyoksydacyjnej pozyskiwanych z białek roślin oleistych przedstawiono w pracy przeglądowej Garbacz i in. (2023). Zgromadzone dane, wraz z omówionymi powyżej wynikami badań, wskazują, że nasiona roślin oleistych stanowią istotne źródło peptydów bioaktywnych, potencjalnie przydatnych zarówno jako składniki żywności funkcjonalnej, jak i naturalne antyoksydanty w produktach spożywczych.

3.5.2. Peptydowe inhibitory ACE (hipotensyjne)

Enzym konwertujący angiotensynę I (ACE) jest kluczowym elementem układu renina–angiotensyna–aldosteron, odpowiedzialnego za regulację ciśnienia tętniczego. Przekształca on nieaktywną angiotensynę I w angiotensynę II – silny wazokonstryktor podnoszący ciśnienie krwi. Inhibitory ACE blokują centrum aktywne enzymu i ograniczają powstawanie angiotensyny II, co prowadzi do rozszerzenia naczyń i obniżenia ciśnienia tętniczego (Tawalbeh, i in., 2023). Jednocześnie hamują rozkład bradykininy, nasilają jej działanie wazodylatacyjne i dodatkowo wzmacniając efekt hipotensyjny. Stosowane klinicznie syntetyczne inhibitory ACE (kaptopryl, enalapryl i in.) są skuteczne, lecz ich stosowanie wiąże się z ryzykiem działań niepożądanych, dlatego poszukuje się naturalnych związków o podobnym mechanizmie działania. Bioaktywne peptydy o aktywności ACE-inhibitorowej stanowią w tym kontekście interesującą alternatywę, choć ich szersze wykorzystanie ogranicza nadal umiarkowana biodostępność (Nawaz i in., 2017). Z punktu widzenia aktywności inhibitorowej wobec ACE istotna jest struktura peptydu. Większość opisanych w literaturze peptydowych inhibitorów ACE to krótkie oligopeptydy (2–12 aminokwasów) o niewielkiej masie cząsteczkowej, co ułatwia im dostęp do kieszeni aktywnej enzymu. ACE preferencyjnie wiąże ligandy posiadające hydrofobową resztę C-końcową (np. Pro, Ile, Val, Phe, Trp), często z proliną w pozycji przedostatniej, co naśladuje sekwencję karboksykońcową angiotensyny I. Obecność reszt kwaśnych (Asp, Glu) na końcu łańcucha może natomiast obniżać aktywność inhibitora ze względu na niekorzystne oddziaływanie z centrum katalitycznym zawierającym jon Zn^{2+} . Istotna jest także długość peptydu – zbyt długie sekwencje gorzej dopasowują się do centrum aktywnego, podczas gdy niskocząsteczkowe di- i tripeptydy mogą wiązać się z ACE z siłą porównywalną do niektórych leków, co czyni je szczególnie pożądanymi składnikami hydrolizatów białkowych (Peighambardoust i in., 2021).

Hydrolizaty białek nasion roślin oleistych są intensywnie badane jako naturalne źródła peptydów hipotensyjnych. Z hydrolizatu białek rzepaku, otrzymanego w wyniku działania subtylizyny, wyizolowano cztery silne peptydy hamujące konwertazę angiotensyny: IY, RIY, VW oraz VWIS. Wszystkie te sekwencje podane doustnie szczurom z samoistnym nadciśnieniem (SHR – spontaneous hypertensive rats) powodowały obniżenie ciśnienia tętniczego (Marczak i in., 2003). Z hydrolizatów białek słonecznika, otrzymanych przy użyciu pepsyny i pankreatyny, wyodrębniono peptyd FVNPQAGS o potwierdzonej aktywności inhibitora ACE (Megias i in., 2004). Nasiona czarnego sezamu również

dostarczają peptydów o silnym działaniu hipotensyjnym – oczyszczono z nich m.in. sekwencje ITAPHW i SLPNYHPSPR, które efektywnie hamują ACE (Du i in., 2023).

W pracy przeglądowej Garbacz i in. (2023) przedstawiono szerszy przegląd peptydów o aktywności inhibitorowej wobec ACE, wyizolowanych z białek soi, rzepaku, lnu, konopi oraz innych nasion roślin oleistych. Zebrane dane wskazują, że peptydowe inhibitory ACE pochodzące z białek roślin oleistych charakteryzują się dużą różnorodnością sekwencji i często łączą efekt hipotensyjny z innymi korzystnymi aktywnościami biologicznymi, co zwiększa ich potencjał zastosowania w żywności funkcjonalnej oraz preparatach nutraceutycznych.

3.5.3. Inne bioaktywne funkcje peptydów żywnościowych

Poza działaniem przeciwutleniającym i hipotensyjnym, peptydy żywnościowe mogą wykazywać szereg innych bioaktywnych funkcji, wspomagających zdrowie i zapobiegających chorobom cywilizacyjnym. Ich wielokierunkowość działania wynika z różnorodności sekwencji aminokwasowych, które mogą oddziaływać na rozmaite cele molekularne w organizmie. Poniżej pokrótce omówiono najważniejsze z tych funkcji, wraz z przykładami peptydów pochodzenia roślinnego.

3.5.3.1. Działanie immunomodulujące i przeciwzapalne

Niektóre peptydy wpływają na układ odpornościowy, poprzez modulację aktywności komórek immunokompetentnych (m.in. makrofagów) oraz profilu wydzielanych cytokin, wykazując zarówno działanie immunostymulujące (wzmacniające odpowiedź obronną), jak i immunosupresyjne (łagodzące nadmierne reakcje zapalne). Takie właściwości nadają im potencjalne zastosowanie zarówno w preparatach wspierających odporność, jak i w łagodzeniu przewlekłego stanu zapalnego o podłożu immunologicznym. W badaniu Han i in. (2022) wykazano, że białka z odtłuszczonych wyłoków nasion oleistych stanowią obiecujące źródło peptydów o działaniu przeciwzapalnym. Frakcje peptydowe z rzepaku najsilniej ograniczały ekspresję mediatorów prozapalnych i jednocześnie zwiększały poziom cytokiny przeciwzapalnej w komórkach makrofagów. Dodatkowo peptydy z rzepaku i sezamu hamowały aktywację szlaku sygnałowego NF- κ B, natomiast rzepak, sezam i soja zmniejszały ekspresję receptorów rozpoznających lipopolisacharyd bakterii (LPS), co przekładało się na osłabienie odpowiedzi zapalnej. Z hydrolizatu białka słonecznika

wyizolowano peptyd PADVTPEEKPEV, który aktywuje w komórkach szlak antyoksydacyjny Nrf2 i jednocześnie hamuje ścieżkę zapalną NF-κB, wykazując wyraźne działanie cytoprotekcyjne oraz przeciwzapalne (Tonolo i in., 2024). Peptydy rzepakowe LY, RALP i GHS ujawniły działanie przeciwzapalne *in vivo*, obniżając u szczurów SHR ekspresję prozapalnych cytokin oraz enzymu iNOS w tkance sercowej, co wiązano z hamowaniem szlaku NF-κB – kluczowego regulatora odpowiedzi zapalnej (He i in., 2019). Te oraz inne przykłady peptydów immunomodulujących przedstawione w pracy Garbacz i in. (2023) wskazują, że peptydy pochodzące z białek roślin oleistych mogą wielokierunkowo modulować odpowiedź immunologiczną, m.in. poprzez hamowanie szlaków prozapalnych i równoczesne wspieranie mechanizmów obronnych gospodarza. Z tego względu stanowią one obiecujących kandydatów do zastosowania w żywności prozdrowotnej i preparatach nutraceutycznych.

3.5.3.2. Działanie neuroprotektcyjne

Bioaktywne peptydy mogą także wspomagać funkcjonowanie układu nerwowego i chronić neurony przed uszkodzeniami. Szczególnie obiecujące są pod tym względem peptydy o właściwościach antyoksydacyjnych i przeciwzapalnych, które przenikając przez barierę krew-mózg mogą przeciwdziałać neurodegeneracji. W modelach doświadczalnych wykazano, że hydrolizat białek soi łagodzi zaburzenia poznawcze związane ze starzeniem; zidentyfikowane w nim peptydy WPK i AYLH silnie chroniły komórki nerwowe przed stresem oksydacyjnym wywołanym H₂O₂ (Amakye i in., 2021). Ponadto u szczurów z nadciśnieniem, którym podawano peptyd VHVV wyizolowany z białek soi, stwierdzono zwiększoną ekspresję białek związanych z pamięcią długotrwałą oraz przeżyciem neuronów (Ju i in., 2019). Wyniki te sugerują, że peptydy o działaniu przeciwutleniającym i przeciwzapalnym mogą wspomagać zdrowie układu nerwowego i przyczyniać się do ograniczania ryzyka neurodegeneracji.

3.5.3.3. Działanie przeciwnowotworowe:

Mechanizmy antynowotworowe peptydów mogą obejmować wiązanie się peptydów z onkogennymi białkami regulatorowymi w komórce, działanie jako inhibitory proteaz zaangażowanych w progresję nowotworów czy też modulowanie odpowiedzi immunologicznej przeciw komórkom zmienionym nowotworowo. Lunazyna (pochodząca

z nasion soi) należy do najlepiej poznanych peptydów o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Jej aktywność wiąże się ze specyficzną sekwencją aminokwasową, obejmującą motyw Arg–Gly–Asp (RGD), uczestniczący w procesach adhezji komórkowej, oraz C-końcowy odcinek poli-asparaginianowy złożony z dziewięciu reszt kwasu asparaginowego, sprzyjający oddziaływaniom z chromatyną i modulacji ekspresji genów (Dia i in., 2011). W modelu komórek raka piersi MCF-7 wykazano, że sfermentowane ekstrakty sojowe, ograniczają proliferację komórek nowotworowych i obniżają ekspresję genów związanych z kancerogenezą (Hwang i in., 2011), a doniesienia dotyczące koncentratów peptydów sojowych wskazują na możliwość istotnego zmniejszenia częstości występowania nowotworów piersi, prostaty i przewodu pokarmowego, szacowanego nawet na około 80% (Badger i in., 2005). Obiecujące wyniki uzyskano również dla peptydów pochodzących z innych białek roślin oleistych: z hydrolizatów białek rzepaku wyizolowano tripeptyd WYP, który istotnie hamował proliferację komórek raka piersi MCF-7 poprzez aktywację szlaku apoptozy mitochondrialnej (Wang i in., 2016), a peptyd KLKKNL z białek nasion chia wykazywał aktywność przeciwnowotworową w modelach *in vitro* (Quintal-Bojórquez i in., 2021). W ostatnich latach opisano także heptapeptyd NDGNQPL z hydrolizatu białek rzepaku, hamujący proliferację komórek raka wątroby HepG2 (Ma i in., 2023). Choć większość badań dotyczących przeciwnowotworowego działania peptydów znajduje się na etapie badań komórkowych lub zwierzęcych, uzyskane wyniki są obiecujące i sugerują, że dieta bogata w bioaktywne peptydy – zwłaszcza o właściwościach przeciwutleniających i przeciwzapalnych – może zmniejszać ryzyko rozwoju niektórych nowotworów lub wspomagać skuteczność konwencjonalnej terapii onkologicznej.

3.5.3.4. Działanie przeciwcukrzycowe

Peptydy żywnościowe mogą korzystnie wpływać na gospodarkę węglowodanową, przede wszystkim poprzez hamowanie enzymów trawiennych (α -amylazy, α -glukozydazy) oraz dipeptydylopeptydazy IV (DPP-IV), a także pośrednio przez modulację działania inkretyn (Antony i in., 2021). Z hydrolizatów białek soi wyizolowano krótkie oligopeptydy (m.in. LLPLPVLK, SWLRL, WLRL) o silnej inhibicji α -glukozydazy, przy jednoczesnej aktywności antyoksydacyjnej, ACE-inhibitorowej i DPP-IV-inhibitorowej (Wang i in., 2019). Hydrolizat białka sojowego otrzymany po trawieniu trypsyną również zidentyfikowano jako źródło inhibitorów α -glukozydazy – wyodrębniono dwa peptydy, GSR i EAK (Jiang i in., 2018). Ren i in. (2016) wyizolowali natomiast z białek konopi dwa

peptydy, LR i PLMLP, wykazujące istotną aktywność inhibitorową wobec α -glukozydazy. Podobny profil działania opisano dla hydrolizatów białek lnu, które *in vitro* hamują α -glukozydazę i DPP-IV oraz wykazują aktywność przeciwutleniającą, co wskazuje na ich potencjał nutraceutyczny w prewencji zaburzeń glikemii (Mudgil i in., 2023). Dodatkowo analizy *in silico* potwierdzają, że białka roślin oleistych (soi, lnu, rzepaku, słonecznika, sezamu) stanowią znakomite prekursory peptydowych inhibitorów DPP-IV – enzymatyczna hydroliza tych surowców może uwalniać liczne krótkie sekwencje o potencjalnej aktywności hipoglikemicznej, poszerzając pulę kandydatów na nutraceutyki przeciwcukrzycowe (Han i in., 2019).

3.5.3.5. Działanie przeciwdrobnoustrojowe

Peptydy o aktywności przeciwdrobnoustrojowej stanowią obiecującą odpowiedź na rosnącą oporność drobnoustrojów na klasyczne antybiotyki. Większość z nich to krótkie, kationowe sekwencje, bogate w lizynę, argininę, oddziałują z ujemnie naładowaną ścianą komórkową drobnoustrojów, prowadząc do jej uszkodzenia (Gagat i in., 2024). Jednym z najlepiej scharakteryzowanych peptydów przeciwdrobnoustrojowych pochodzących z roślin oleistych jest GBP (glycinin basic peptide) – zasadowy polipeptyd pochodzący z białka soi (glicyniny). Wykazuje on szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz grzybów. Cennym źródłem peptydów przeciwdrobnoustrojowych jest również białko sezamu, w którym metodami *in silico* i *in vitro* zidentyfikowano kilka peptydów o aktywności przeciwbakteryjnej; spośród nich STIR i AGGVPR hamują wzrost *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus* (Zhu i in., 2024). Analizy *in silico* wskazują ponadto, że hydroliza enzymatyczna białek rzepaku może uwalniać liczne nowe sekwencje o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej – łącznie zidentyfikowano 26 takich peptydów (Duan i in., 2021). Zebrane wyniki, uwzględniające również dane z pracy przeglądowej Garbacz i in. (2023), sugerują, że nasiona roślin oleistych mogą stanowić istotne źródło peptydów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Podsumowując, peptydy pozyskiwane z białek roślinnych stanowią wszechstronne składniki bioaktywne, które w zależności od sekwencji mogą wpływać korzystnie na różne układy organizmu. Literatura dostarcza licznych dowodów (zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*)

na ich antyoksydacyjne, hipotensyjne, przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwdrobnoustrojowe, neuroprotektoryjne, przeciwnowotworowe i przeciwcukrzycowe właściwości. Dzięki temu bioaktywne peptydy postrzegane są jako perspektywiczne *nutraceutyki*, mogące znaleźć zastosowanie w profilaktyce wielu chorób przewlekłych lub jako uzupełnienie tradycyjnych terapii.

3.6. Zastosowanie hydrolizatów białkowych z nasion roślin oleistych

Hydrolizaty białkowe otrzymywane z nasion roślin oleistych cechują się szerokim spektrum bioaktywnych i funkcjonalnych właściwości, co przekłada się na liczne potencjalne zastosowania praktyczne. Dzięki zawartości biopeptydów o udokumentowanym działaniu prozdrowotnym, a także korzystnemu profilowi aminokwasowemu, hydrolizaty te stanowią cenny składnik w różnych sektorach – od przemysłu spożywczego i nutraceutycznego po kosmetyczny i nawet farmaceutyczny. Poniżej omówiono kluczowe obszary zastosowań.

3.6.1. Żywność funkcjonalna

Zainteresowanie wykorzystaniem peptydów bioaktywnych w przemyśle spożywczym wynika z możliwości nadania produktom spożywczym dodatkowych funkcji prozdrowotnych oraz poprawy ich jakości. Hydrolizaty białek roślin oleistych znajdują zastosowanie jako składniki wielu produktów – od napojów funkcjonalnych, przez pieczywo i wyroby zbożowe, po substytuty mięsa i nabiału – podnosząc ich wartość odżywczą, właściwości fizykochemiczne oraz stabilność. Przykłady zastosowania bioaktywnych peptydów pochodzących z białek roślin oleistych w żywności funkcjonalnej przedstawiono w artykule przeglądowym Garbacz i in. (2023).

3.6.2. Suplementy diety

Ze względu na swoje właściwości bioaktywne, peptydy pozyskiwane z białek nasion oleistych są intensywnie badane pod kątem zastosowań nutraceutycznych w suplementach diety ukierunkowanych na ochronę zdrowia. Literatura dostarcza licznych dowodów, że peptydy te mogą korzystnie wpływać na funkcje organizmu – wykazano m.in. zdolność obniżania ciśnienia krwi poprzez hamowanie enzymu konwertującego angiotensynę (ACE)

oraz redukcję stężenia „złego” cholesterolu LDL we krwi (Yang i in., 2023; He i in., 2019). Takie efekty sugerują możliwość wykorzystania tych związków w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych oraz zaburzeń metabolicznych (Udenigwe i Rouvinen-Watt, 2015). W konsekwencji peptydy z roślin oleistych postrzegane są jako obiecujące suplementy diety – mogą one stanowić składnik kapsulek, koncentratów białkowych czy innych preparatów prozdrowotnych przeznaczonych dla osób chcących w naturalny sposób wspierać organizm. Co ważne, hydrolizaty białkowe i mieszaniny peptydów na ogół charakteryzują się szybszym trawieniem i większą biodostępnością aminokwasów niż odpowiadające im białka natywne (Koopman i in., 2009). Ta właściwość stanowi jedną z podstaw ich zastosowania w żywieniu osób o specjalnych potrzebach – w tym w dietach klinicznych oraz mieszankach mlekozastępczych z białkiem silnie hydrolizowanym przeznaczonych dla niemowląt z alergią na białka mleka krowiego (np. formuły z białkiem intensywnie hydrolizowanym) (Xiang i in., 2011). Warto również wspomnieć o możliwości zwiększania podaży mikroskładników za pomocą peptydów – wykazano np., że krótki peptyd NSM (Asn-Ser-Met) otrzymany z białka rzepaku cechuje się wyjątkowo wysoką zdolnością chelatowania jonów cynku, co czyni go potencjalnym naturalnym nośnikiem cynku w preparatach mineralnych (Xie i in., 2015). Mimo że większość dostępnych obecnie dowodów pochodzi z badań laboratoryjnych i modelowych, rosnąca ilość *in vivo* wyników (np. na modelach zwierzęcych) potwierdza prozdrowotny wpływ peptydów roślinnych, wzmacniając zasadność ich wdrażania w formie nutraceutyków (Nasri i in., 2017).

3.6.3. Farmaceutyki

W obszarze farmacji bioaktywne peptydy z surowców oleistych rozpatrywane są głównie jako potencjalne środki wspomagające terapię lub matryce do projektowania nowych leków, co wynika z szerokiego spektrum udokumentowanych aktywności biologicznych tych związków (Purohit i in., 2024; Garbacz i in., 2023). Przykładowo, niektóre hipotensyjne peptydy roślinne (np. sekwencje trójpeptydowe z rzepaku) są analizowane pod kątem rozwoju nowych leków obniżających ciśnienie krwi, potencjalnie o mniejszym ryzyku działań niepożądanych niż syntetyczne farmaceutyki (He i in., 2019). Równie obiecujące są peptydy o innych aktywnościach terapeutycznych – np. antyoksydacyjny peptyd RAP-8 wyizolowany z hydrolizatu białek rzepaku w badaniu na myszach skutecznie łagodził objawy niealkoholowego stłuszczenia wątroby, zmniejszając stan zapalny i włóknienie oraz poprawiając gospodarkę lipidową i wrażliwość

na insulinę (Zhao i in., 2019). Duże zainteresowanie budzą również peptydy o aktywności przeciwnowotworowej, w szczególności lunazyna. W licznych badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że lunazyna hamuje acetylację histonów, moduluje ekspresję genów, zatrzymuje cykl komórkowy i indukuje apoptozę komórek nowotworowych; jest ona uznawana za obiecujący czynnik chemoprewencyjny oraz potencjalny składnik terapii skojarzonych, choć dane kliniczne pozostają ograniczone (Kaufman-Szymczyk i in., 2023; Vuyyuri i in., 2018; Galvez i in., 2001). W ostatnich latach intensywnie rozwija się koncepcja wykorzystania peptydów jako nośników leków i innych substancji czynnych, przy czym szczególną uwagę zwraca się na ich zdolność do samoorganizacji. Samoorganizujące się peptydy, dzięki możliwości projektowania ich budowy i właściwości, mogą tworzyć różne struktury i działać jako skuteczne nośniki leków, zapewniając wysoką pojemność ładunku, dobrą stabilność, łatwiejsze przenikanie przez błony komórkowe i celowane dostarczanie do miejsca działania (Gao i in., 2023). Mimo że zastosowania farmaceutyczne peptydów znajdują się nadal głównie na etapie badań przedklinicznych, stanowią one obiecującą niszę dla przyszłych innowacji biotechnologicznych i farmakologicznych.

3.6.4. Kosmetyki

Przemysł kosmetyczny również dostrzega potencjał peptydów pozyskiwanych z białek roślin oleistych. Bioaktywne peptydy o niskiej masie cząsteczkowej mogą – w porównaniu z natywnymi, dużymi białkami – łatwiej dyfundować przez warstwę rogową i docierać do głębszych warstw naskórka i skóry właściwej, zwłaszcza gdy są odpowiednio sformułowane (np. w układach nośnikowych, emulsjach, nanowłóknach). Z tego względu peptydy roślinne (w tym z nasion oleistych) są coraz częściej rozpatrywane jako aktywne składniki preparatów przeciwstarzeniowych i regenerujących (Apone i in., 2019; Burnett i in., 2022).

Wykazano, że peptydy i hydrolizaty białka sojowego wpływają na metabolizm komórek skóry. W badaniach *in vitro* mieszaniny peptydów sojowych (często w połączeniu z peptydami kolagenowymi) stymulowały ludzkie fibroblasty skóry, zwiększając syntezę kolagenu typu I i III oraz ekspresję genów macierzy pozakomórkowej, co wskazuje na potencjał przebudowy struktury skóry właściwej (Tokudome i in., 2012; Inoue i in., 2012). Z kolei niskocząsteczkowy peptyd sojowy (LSP) zwiększał w prawidłowych ludzkich keratynocytach ekspresję kluczowych białek bariery naskórkowej, co sugeruje wzmacnianie funkcji ochronnej skóry (Tokudome i in., 2014). W badaniach na modelu szczurzym

dwutygodniowa suplementacja dietą zawierającą peptydy sojowe i kolagenowe prowadziła do wzrostu poziomu kolagenu typu I i III w skórze, potwierdzając przeciwstarzeniowy potencjał tej kombinacji (Inoue i in., 2012). Interesujące przykłady zastosowań peptydów sojowych dotyczą produktów o działaniu regenerującym. Hydrolizat białka sojowego zawierający peptydy o sekwencjach zbliżonych do białek macierzy pozakomórkowej skóry wykazywał w badaniach *in vitro* i *in vivo* zdolność przyspieszania gojenia ran poprzez stymulację syntezy składników macierzy, pobudzanie reepitelializacji, poprawę adhezji komórek i wspieranie regeneracji tkanek (Tokudome i in., 2012; Chien i in., 2013). W innym podejściu peptydy sojowe osadzono na nanowłóknistej matrycy z octanu celulozy – taki w pełni roślinny opatrunek imitował właściwości macierzy pozakomórkowej skóry, sprzyja proliferacji i migracji fibroblastów oraz przyspiesza gojenie ran w modelach zwierzęcych (Ahn i in., 2018). Hydrolizaty białka sojowego, dzięki obecności krótkich peptydów, wykazują także silną aktywność przeciwutleniającą, hamującą tyrozinazę oraz wspomagającą gojenie ran w modelach komórkowych (Nguyen i in., 2024). Badania obejmują także inne surowce oleiste – enzymatyczne hydrolizaty białek rzepaku okazały się efektywnymi składnikami przeciwstarzeniowymi – w badaniach *in vitro* na ludzkich fibroblastach skóry nie wywierały działania toksycznego, a jednocześnie hamowały ponad 80% wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu oraz aktywność elastazy ($\approx 83\%$ inhibicji) i mieloperoksydazy ($\approx 36\%$ inhibicji), czyli enzymów odpowiedzialnych za degradację kolagenu i rozwój stanu zapalnego w skórze (Rivera i in., 2015).

Peptydy roślinne – w tym pochodzące z surowców oleistych – cechuje korzystny profil bezpieczeństwa, dobra tolerancja oraz zgodność z trendem na składniki roślinne i „vegan/clean beauty”. Jako mieszaniny krótkich fragmentów białek o zróżnicowanej sekwencji mogą one wykazywać jednocześnie działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, promujące syntezę kolagenu czy przyspieszające regenerację, co czyni hydrolizaty białek nasion oleistych atrakcyjną bazą do projektowania wielofunkcyjnych preparatów kosmetycznych.

3.6.5. Materiały do pakowania żywności

Ciekawym i szybko rozwijającym się obszarem zastosowań hydrolizatów i białek roślin oleistych jest biodegradowalne pakowanie żywności. Białka pozyskiwane z makuchów oleistych mogą być wykorzystywane do wytwarzania jadalnych folii i powłok ochronnych, stanowiących ekologiczną alternatywę dla tradycyjnych tworzyw sztucznych

(Petraru i Amariei, 2023). Dzięki wysokiej zdolności tworzenia sieci polipeptydowej, filmy białkowe odznaczają się dobrą barierowością wobec tlenu i aromatów oraz odpowiednimi właściwościami mechanicznymi (Petraru i Amariei, 2023). Przykładem może być badanie Aquilia i in. (2025), w którym wykazano, że dołączenie enzymatycznego hydrolizatu białka rzepakowego do biokompozytu z mączki rzepakowej może poprawić właściwości mechaniczne takiego opakowania – obserwuje się istotny wzrost elastyczności folii przy jednoczesnym obniżeniu jej przenikalności dla wody oraz lepszej stabilności termicznej materiału. Hydrolizaty białkowe mogą pełnić w takich opakowaniach również rolę aktywnych dodatków o właściwościach antyoksydacyjnych czy przeciwbakteryjnych. Badania wskazują, że wzbogacenie biodegradowalnych folii w peptydy bioaktywne pozytywnie wpływa na ich funkcjonalność – zapobiega utlenianiu zapakowanej żywności i ogranicza wzrost drobnoustrojów chorobotwórczych, wydłużając okres przydatności do spożycia produktu (Roy i in., 2024). W dobie poszukiwania zrównoważonych, przyjaznych środowisku rozwiązań, wykorzystanie białek pozyskanych z odpadów przemysłu olejowego (makuchów) do produkcji biodegradowalnych opakowań stanowi innowacyjny kierunek o dużym potencjale praktycznym.

4. Cel i zadania i hipotezy badawcze

4.1. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy było opracowanie i optymalizacja procesu otrzymywania peptydów z białek roślin oleistych, o potencjalnych właściwościach przeciwutleniających i hipotensyjnych.

W ramach pracy zrealizowano następujące cele szczegółowe:

- Opracowanie i optymalizacja metody izolacji białka z makuchów rzepaku, słonecznika i ostropestu.
- Przeprowadzenie analiz *in silico* wyizolowanych białek w celu identyfikacji peptydów o potencjalnej aktywności antyoksydacyjnej i hipotensyjnej,
- Optymalizacja procesu hydrolizy enzymatycznej z wykorzystaniem wybranych proteaz roślinnych,
- Ocena aktywności antyoksydacyjnej i hipotensyjnej otrzymanych hydrolizatów białkowych,
- Przeskalowanie opracowanego procesu z warunków laboratoryjnych do skali przemysłowej,
- Opracowanie noty technologicznej opisującej proces wytwarzania proteopeptydów w warunkach przemysłowych.

4.2. Zadania badawcze

Realizacji celu głównego podporządkowano następujące zadania badawcze, odpowiadające kolejnym etapom części doświadczalnej:

1. Ocena i wybór surowców roślinnych

Dokonanie charakterystyki makuchów roślin oleistych dostępnych dla przedsiębiorstwa wdrażającego technologię i na tej podstawie wybór makuchów rzepakowego, słonecznikowego i ostropestowego jako surowców modelowych do dalszych badań.

2. Opracowanie metody ekstrakcji białek w skali laboratoryjnej

Zaprojektowanie i optymalizacja warunków ekstrakcji białek z wybranych makuchów, obejmująca m.in. dobór stopnia rozdrobnienia surowca, stosunku faz, pH, temperatury i czasu procesu.

3. Charakterystyka składu białkowego wyizolowanych frakcji

Identyfikacja i charakterystyka głównych frakcji białkowych otrzymanych z makuchów rzepaku, słonecznika i ostropestu z wykorzystaniem odpowiednich technik analitycznych, w celu przygotowania wiarygodnej podstawy do dalszych analiz *in silico* i projektowania procesu hydrolizy.

4. Analizy *in silico* potencjalnej bioaktywności peptydów

Przeprowadzenie symulowanej hydrolizy wyizolowanych białek z zastosowaniem wybranych enzymów proteolitycznych oraz ocena przewidywanych sekwencji peptydowych pod kątem potencjalnej aktywności bioaktywnych przy użyciu narzędzi bioinformatycznych. Etap ten miał na celu ukierunkowanie doboru warunków hydrolizy enzymatycznej w badaniach eksperymentalnych.

5. Opracowanie i optymalizacja procesu hydrolizy enzymatycznej w skali laboratoryjnej

Wyznaczenie optymalnych warunków hydrolizy białek z makuchów rzepaku, słonecznika i ostropestu w skali laboratoryjnej (wybór i udział enzymu, pH, temperatura, czas reakcji) z wykorzystaniem oznaczeń stopnia hydrolizy (DH).

6. Ocena właściwości antyoksydacyjnych i hipotensyjnych otrzymanych hydrolizatów

Oznaczenie potencjału antyoksydacyjnego oraz aktywności inhibitorowej wobec ACE otrzymanych hydrolizatów białkowych. Porównanie wyników uzyskanych dla różnych warunków procesu oraz odniesienie ich do przewidywań uzyskanych w analizach *in silico*.

7. Przeskalowanie procesu izolacji białek i otrzymywania hydrolizatów

Weryfikacja możliwości przeniesienia opracowanego w skali laboratoryjnej procesu izolacji białek i ich hydrolizy do warunków przemysłowych, z wykorzystaniem dostępnej linii technologicznej. Ocena wpływu skali procesu na wydajność izolacji, przebieg hydrolizy, właściwości uzyskanych hydrolizatów. Opracowanie noty technologicznej dotyczącej wytwarzania proteopeptydów z makuchów roślin oleistych, obejmującej wymagania jakościowe, bezpieczeństwa oraz dokumentacji procesu.

4.3. Hipoteza badawcza

Punktem wyjścia do zaplanowania badań była następująca hipoteza ogólna:

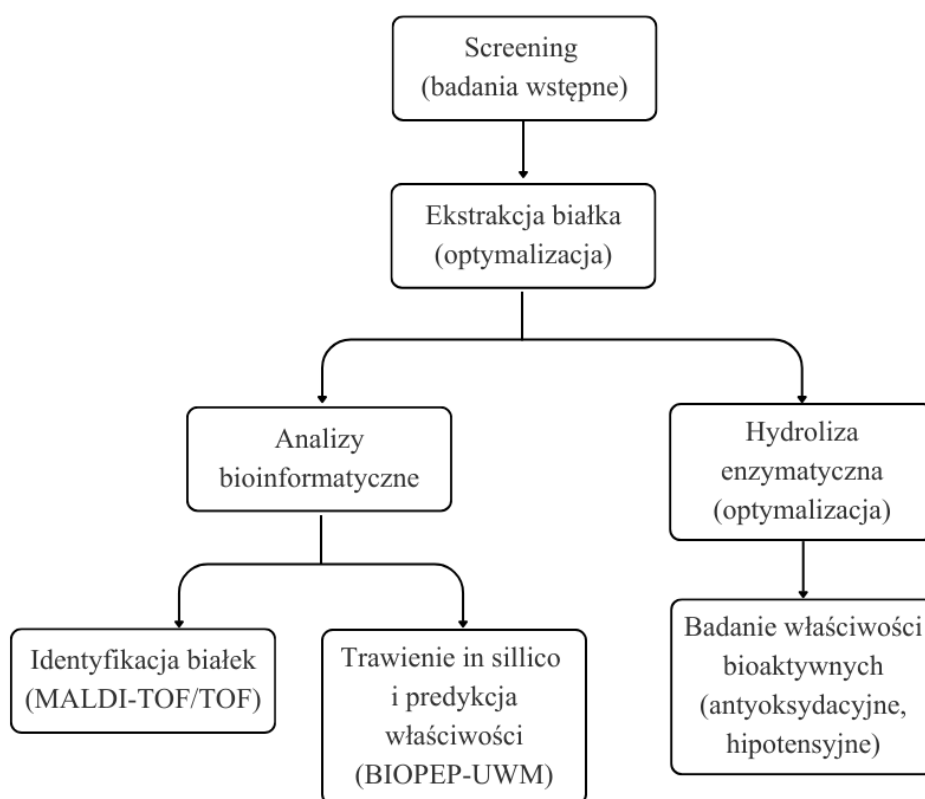
Peptydy uzyskane w wyniku kontrolowanej hydrolizy enzymatycznej białek izolowanych z makuchów roślin oleistych, prowadzonej z zastosowaniem odpowiednio dobranych surowców, enzymów i parametrów procesu, wykazują istotne właściwości przeciwutleniające i hipotensyjne, a zaprojektowany proces ich wytwarzania może zostać przeskalowany do skali przemysłowej przy zachowaniu pożądanego profilu bioaktywności.

Hipotezę tę uszczegółowiono w formie trzech powiązanych hipotez roboczych:

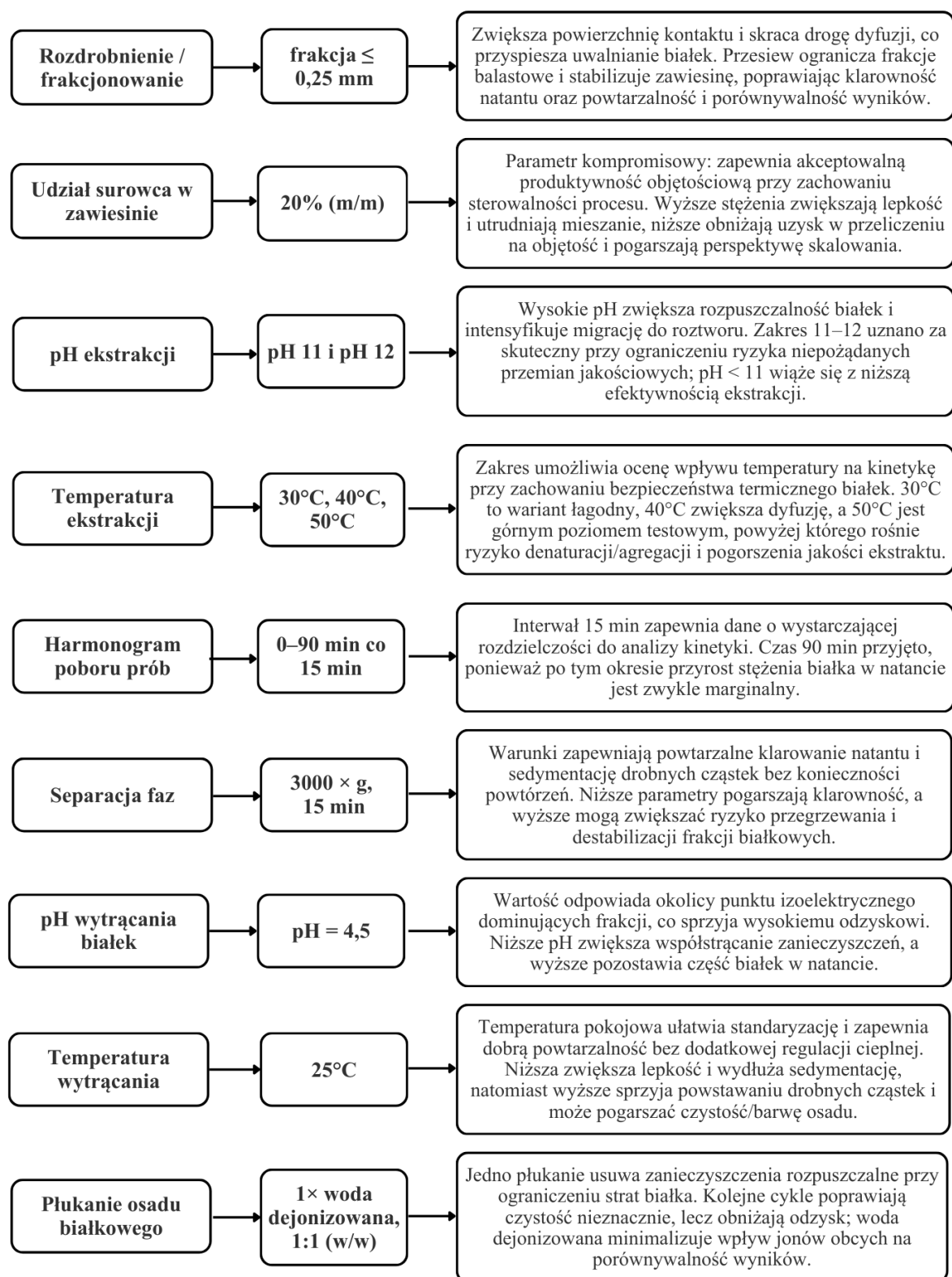
1. **Hipoteza 1.** *Białka izolowane z makuchów rzepakowych, słonecznikowych i ostropestowych zawierają sekwencje aminokwasowe, które po hydrolizie enzymatycznej wybranymi proteazami roślinnymi (papainą, bromelainą, ficyną) generują mieszaniny peptydów o istotnej aktywności antyoksydacyjnej i inhibitorowej wobec konwertazy angiotensyny I (ACE).*
2. **Hipoteza 2.** *Odpowiedni dobór parametrów procesu (pH, temperatura, czas, udział enzymu) pozwala na zwiększenie udziału peptydów bioaktywnych przy zachowaniu wysokiej wydajności ekstrakcji i hydrolizy, a uzyskane profile aktywności można przewidywać na podstawie analiz in silico sekwencji białek i peptydów.*
3. **Hipoteza 3.** *Opracowany w skali laboratoryjnej proces izolacji białka i jego hydrolizy może zostać przeskalowany do warunków przemysłowych przy zachowaniu kluczowych parametrów jakościowych ekstraktu i hydrolizatu (udział białka, stopień hydrolizy, profil aktywności antyoksydacyjnej i hipotensyjnej).*

4.4. Schematy przebiegu badań

Ogólny schemat przebiegu badań przedstawiono na Rycinie 7. Z kolei na Rycinie 8 zaprezentowano schemat doboru warunków procesu (screening), obejmujący przygotowanie surowca, ekstrakcję, separację faz oraz wytrącanie i płukanie osadu białkowego.



Rycina 7. Schemat blokowy przebiegu badań



Rycina 8. Schemat doboru parametrów przygotowania surowca oraz warunków ekstrakcji i wytrącania białek z makuchów roślinnych na podstawie badań wstępnych (screeningu).

5. Materiały i metody

5.1. Materiały

5.1.1. Makuchy roślin oleistych

Makuchy z rzepaku (*Brassica napus* L.), słonecznika (*Helianthus annuus* L.) oraz ostropestu plamistego (*Silybum marianum* L.) pozyskano z zakładu AMF Life (Wola Rzędzińska, Polska) jako produkty uboczne tłoczenia na zimno oleju; wykorzystano odpowiednio partie PZ-16/21/HURT (rzepak), PZ-9/21/HURT i PZ-16/21/HURT (słonecznik) oraz PZ-12/21/HURT (ostropest).

5.1.2. Enzymy proteolityczne

W badaniach zastosowano trzy roślinne proteazy cysteinowe: papainę, bromelainę oraz ficynę. Wszystkie preparaty pochodziły od jednego producenta (Enzybel International, Belgia) i były klasy czystości odpowiedniej do zastosowań żywnościowych (food grade). Optymalne warunki aktywności, zadeklarowane przez producenta, zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Optymalne warunki reakcji dla użytych proteaz cysteinowych (deklaracje producenta)

Enzym	Nazwa handlowa	Optymalna temperatura	Optymalne pH
Papaina	PERFORMASE® 30000 USP-U/mg	70 °C	6
Bromelaina	BROMELAIN®	50 °C	5
Ficina	FICIN FSM20	60 °C	7

5.1.3. Inne odczynniki

W badaniach wykorzystywano odczynniki chemiczne i materiały laboratoryjne o czystości analitycznej. Do regulacji pH próbek stosowano kwas chlorowodorowy (HCl) oraz wodorotlenek sodu (NaOH). Oznaczanie składu chemicznego prowadzono z użyciem: stężonego kwasu siarkowego (VI) (H₂SO₄), siarczanu potasu (K₂SO₄), siarczanu miedzi (II) (CuSO₄), wodorotlenku sodu (NaOH), kwasu borowego (H₃BO₃), wskaźnika Tashiro, roztworu kwasu chlorowodorowego (HCl), fenolu, glukozy, n-heksanu.

Analizy elektroforetyczne oraz przygotowanie próbek do spektrometrii mas wykonano z użyciem: mocznika, CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), DTT (ditiotreitol), buforu Tris-HCl, glicerolu, SDS (sodium dodecyl sulfate), IAA (iodoacetamide), wodorowęglanu amonu (NH_4HCO_3), acetonitrylu (ACN) oraz trypsyny. Do zakwaszania i przygotowania próbek do MALDI-TOF/TOF stosowano TFA (kwas trifluorooctowy) oraz matrycę HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid). Do elektroforezy stosowano również paski IPG ReadyStrip, pH 3–10.

Do oznaczania stopnia hydrolizy użyto TCA (kwas trichlorooctowy). W badaniach właściwości hydrolizatów stosowano: ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), nadsiarczan potasu, bufor PBS (bufor fosforanowy), Trolox, DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), metanol, TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-s-triazyna; 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine), HCl, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, bufor octanowy oraz FeSO_4 , HHL (hippuryl-L-histidyl-L-leucine), bufor boranowy, chlorek sodu (NaCl), ACE (konwertaza angiotensyny) oraz octan etylu.

5.2. Metody laboratoryjne

5.2.1. Przygotowanie makuchów do analiz

Przed rozpoczęciem analiz laboratoryjnych makuchy rzepakowy, słonecznikowy i ostropestowy poddano standaryzacji w celu zapewnienia reprezentatywności oraz jednorodności próbek. Surowiec rozdrobniono w młynku nożowym (Royal Catering, Niemcy) do granulacji $\leq 0,25$ mm. Mielenie prowadzono krótko, lecz intensywnie, aby zminimalizować wzrost temperatury materiału przy jednoczesnym osiągnięciu docelowego stopnia rozdrobnienia. Wielkość cząstek weryfikowano poprzez przesiewanie porcji materiału przez sito analityczne o oczkach 0,25 mm (60 mesh; Multiserw LPzE, Polska). Ujednolicenie granulacji pozwalało na uzyskanie zbliżonego rozkładu wielkości cząstek w całej próbce i ograniczało ryzyko błędów wynikających z niejednorodności (np. selektywnego rozdziału większych fragmentów bogatych w łuski lub cząstek o podwyższonej zawartości tłuszczu).

Po rozdrobnieniu materiał homogenizowano przez dokładne wymieszanie w czystych, suchych pojemnikach z użyciem szpatułek lub poprzez kilkukrotne przesypywanie. Tak przygotowane, rozdrobnione i homogenizowane próbki umieszczano

w szczelnych pojemnikach z tworzywa sztucznego i przechowywano w suchych, chłodnych warunkach, z dala od bezpośredniego światła słonecznego, do czasu prowadzenia analiz.

5.2.2. Ekstrakcja białka – optymalizacja metody

Do badań wykorzystano wcześniej przygotowane próbki makuchów z rzepaku, słonecznika i ostropestu. Proces izolacji białka obejmował cztery etapy: I–II (ekstrakcja alkaliczna), III (wytrącanie białka) oraz IV (płukanie osadu). Optymalizacji poddano wyłącznie etapy ekstrakcji alkalicznej (I i II), natomiast etapy III i IV prowadzono w warunkach ustalonych na podstawie literatury i badań wstępnych.

- Etap I – pierwsza ekstrakcja.

W pierwszym etapie oceniano wpływ temperatury (30, 40, 50 °C) oraz pH (11,0; 12,0) na efektywność wydzielania białka. Do każdej próby odważano 200 g makucha i zawieszano w 800 mL wody destylowanej. Wartość pH regulowano roztworami NaOH lub HCl, kontrolując ją pH-metrem laboratoryjnym (Elmetron CPC-46, Polska). Ekstrakcję prowadzono przez 90 min na mieszadle magnetycznym z kontrolą temperatury (IKA Plate, Germany), wspomagając proces mieszadłem mechanicznym (IKA RW 20 digital, Germany). W trakcie ekstrakcji próbki do analiz pobierano co 15 min. Następnie zawiesiny wirowano (3000 × g, 15 min; MPW-352R, Polska), a uzyskane supernatanty zbierano do oznaczenia zawartości białka metodą Kjeldahla. Każdą z sześciu kombinacji warunków (3 temperatury × 2 poziomy pH) wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach, a kolejność doświadczeń randomizowano w celu ograniczenia wpływu zmienności czasowej i temperaturowej. W wyniku optymalizacji etapu I wybrano warunki ekstrakcji zapewniające najwyższą wydajność wydzielania białka, a uzyskany w tych warunkach materiał (supernatant oraz osad) wykorzystano w kolejnych etapach procesu izolacji, w tym do optymalizacji etapu II.

- Etap II – druga ekstrakcja.

Osad pozostały po pierwszej ekstrakcji uzupełniano wodą dejonizowaną do masy 1 000 g, po czym regulowano pH (11 lub 12) i inkubowano przez 60 min w temperaturach 30–50 °C, analogicznie jak w etapie I. Próbkę do analiz pobierano co 15 min. Po zakończeniu inkubacji zawiesiny wirowano (3000 × g, 15 min), a supernatanty zbierano w celu oceny wydajności drugiej ekstrakcji. Każdy wariant prowadzono w trzech powtórzeniach.

- Etap III – wytrącanie białka (mikroprecypitacja).

Po wytypowaniu optymalnych warunków dla etapów I i II przeprowadzono ekstrakcję białka w tych parametrach, a następnie połączono uzyskane supernatanty. Roztwór zakwaszono HCl do pH 4,5 w temperaturze pokojowej, mieszając na mieszadle magnetycznym przez 30 min, po czym wirowano ($3000 \times g$, 15 min). Z otrzymanego osadu pobierano część do dalszych analiz (oznaczenie zawartości białka i suchej masy), pozostałą część przeznaczano do etapu IV, natomiast płyn nadosadowy odrzucano.

- Etap IV – płukanie osadu.

Osad z etapu III płukano wodą dejonizowaną, zawieszając go w stosunku 1:1 (w/w), homogenizując, a następnie ponownie wirowając ($3000 \times g$, 15 min). Po płukaniu osad analizowano pod kątem zawartości białka, cukru, tłuszczu i suchej masy, a pozostałą część preparatu przechowywano w lodówce (4 °C) do czasu dalszych oznaczeń.

5.2.3. Analiza składu chemicznego

Charakterystykę składu chemicznego prowadzono na różnych etapach prac badawczych, obejmujących zarówno ocenę składu wyjściowego makuchów, optymalizację warunków ekstrakcji białka, jak i oznaczanie składu ekstraktów oraz hydrolizatów otrzymanych w skali laboratoryjnej i przemysłowej. Oznaczenia wykonano zgodnie z procedurami opisanymi poniżej, a wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe z trzech niezależnych powtórzeń ($n = 3$).

5.2.3.1. Oznaczanie zawartości białka (metoda Kjeldahla)

Zawartość białka ogólnego oznaczono klasyczną metodą Kjeldahla, obejmującą mineralizację mokrą, destylację amoniaku oraz miareczkowanie. Do kolby Kjeldahla odważano 1,00 g homogenizowanej próby, dodawano 20,0 mL stężonego H_2SO_4 oraz mieszaninę katalizatorów ($K_2SO_4/CuSO_4$), po czym prowadzono mineralizację w ok. 350 °C do uzyskania klarownego roztworu. Po ostudzeniu zawartość kolby alkalizowano, dodając 40,0 mL 40% roztworu NaOH i destylowano amoniak w prądzie pary wodnej. Uchwycony amoniak absorbowano w 40,0 mL roztworu H_3BO_3 4% (m/v) z wskaźnikiem Tashiro, a następnie destylat miareczkowano mianowanym roztworem HCl o stężeniu ok. 0,10 mol/L

do zmiany barwy wskaźnika. Na podstawie zużycia titranta obliczano zawartość azotu, a następnie przeliczano ją na białko całkowite z zastosowaniem współczynnika konwersji $k = 6,25$.

5.2.3.2. Oznaczanie zawartości cukrów (metoda fenolowo-kwasowa)

Całkowitą zawartość cukrów oznaczano kolorymetrycznie metodą fenolowo-kwasową wg Dubois. Około 0,50 g próbki rozpuszczano w wodzie destylowanej, a powstały roztwór klarowano przez filtrację. Do próbki reakcyjnej odmierzano 0,50 mL klarownego roztworu, dodawano 0,50 mL 5% (m/v) roztworu fenolu, po czym szybko dolewano 2,50 mL stężonego H_2SO_4 , energicznie mieszając. Mieszaninę inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono absorbancję przy 490 nm (Marcel s330, Polska) względem próby ślepej. Zawartość cukrów obliczano na podstawie krzywej wzorcowej przygotowanej dla serii roztworów glukozy.

5.2.3.3. Oznaczanie zawartości tłuszczu (metoda Soxhleta)

Zawartość tłuszczu oznaczano metodą Soxhleta z użyciem n-heksanu jako rozpuszczalnika. Wyszuszone do stałej masy próbki o masie 3,00 g umieszczano w celulozowych gilzach ekstrakcyjnych i poddawano ekstrakcji n-heksanem (150 mL, cz.d.a.) w aparacie Soxhleta (Chemland, Polska) przez ok. 6 h, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika (ok. 68 °C). Po zakończeniu ekstrakcji gilzy odsączano i spłukiwano gorącym heksanem, a rozpuszczalnik z kolby ekstrakcyjnej odparowywano do sucha. Pozostałość tłuszczową dosuszano w 105 °C do stałej masy, chłodzono w eksykatorze do temperatury pokojowej i ważono. Zawartość tłuszczu obliczano wagowo w odniesieniu do masy próbki wyjściowej.

5.2.3.4. Oznaczanie suchej masy

Zawartość suchej masy oznaczano metodą wagosuszarkową. Jednorodne próbki (~2,00 g) nakładano bezpośrednio na szalkę wagosuszarki (RADWAG MA 50.X2.A, Polska), równomiernie rozprowadzając warstwę materiału. Suszenie prowadzono w 105 °C do osiągnięcia stałej masy, definiowanej jako tempo ubytku $\leq 0,01\%$ / min w trybie

automatycznym urządzenia. Po zakończeniu rejestrowano masę końcową, a wynik wyrażano jako procent masy pozostałej po suszeniu w odniesieniu do masy początkowej.

5.2.3.5. Obliczanie wydajności procesu

Wydajność procesu izolacji białka dla każdego surowca definiowano jako stosunek ilości białka w preparacie końcowym do ilości białka zawartego w surowcu wyjściowym, w przeliczeniu na suchą masę, wyrażony w procentach. Ilość białka wyznaczano jako iloczyn masy próbki i oznaczonej zawartości białka (metoda Kjeldahla).

5.2.4. Elektroforeza

Rozdział białek przeprowadzono dwuetapowo, łącząc izoelektryczne ogniskowanie (IEF – isoelectric focusing) z elektroforezą SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis). W pierwszym etapie próbki ekstraktów białkowych, zawierające po 10 µg białka, rozpuszczono w buforze rehydratacyjnym (8 M mocznika, 4 % CHAPS, 70 mM DTT, 0,5 % amfolitów; zakres pH 3–10), po czym nanoszono je na 18-centymetrowe paski IPG ReadyStrip (pH 3–10; Bio-Rad, Polska). IEF prowadzono do osiągnięcia łącznego ładunku 30 kV·h przy użyciu systemu PROTEAN IEF (Bio-Rad). Po zakończeniu ogniskowania paski równoważono przez 15 min w buforze zawierającym 50 mM Tris-HCl (pH 8,8), 6 M mocznika, 30 % glicerolu, 2 % SDS oraz 1 % DTT, a następnie kolejne 15 min w tym samym buforze z dodatkiem 2,5 % jodoacetamidu. Następnie paski przenoszono na żele poliakrylamidowe SDS o wymiarach 20 × 20 cm i grubości 1,5 mm (T = 11 %, C = 2,6 %), przygotowane zgodnie z protokołem Laemmli'ego (Laemmli, 1970). Rozdział w drugim wymiarze realizowano w aparacie Protean II XI (Bio-Rad) zgodnie z instrukcjami producenta. Plamy białkowe uwidacziano metodą barwienia srebrem kompatybilną z późniejszą analizą spektrometrii mas (Shevchenko i in., 1996).

5.2.5. Wycięcie plamek białkowych, przygotowanie próbek do spektrometrii mas

Wybrane plamki białkowe o wizualnie najwyższej intensywności wycinano z żeli, rozdrobniono na drobne fragmenty i przenoszono do probówek o pojemności 0,5 mL.

Fragmenty żelu trzykrotnie płukano w 100 mM NH_4HCO_3 (pH 8,5) przez 5 min, odwadniano w acetonitrylu (ACN), a następnie suszono 15 min koncentratorem próżniowym (CentriVap, Labconco, Polska). Redukcję przeprowadzano poprzez rehydratację żelu w 10 mM DTT rozpuszczonego w 50 mM NH_4HCO_3 (56 °C, 60 min). Po ostudzeniu do temperatury pokojowej roztwór zastępowano 50 mM jodoacetamidem w 50 mM NH_4HCO_3 i inkubowano próbki w ciemności przez 45 min w RT. Następnie fragmenty żelu trzykrotnie płukano 100 mM NH_4HCO_3 (5 min, RT), ponownie odwadniano w ACN i suszono 15 min koncentratorem. Trawienie enzymatyczne prowadzono na lodzie, dodając stopniowo trypsynę (12,5 ng/ μL ; Trypsin Gold, grade MS, Promega, USA) przygotowaną w 50 mM NH_4HCO_3 , tak aby całkowicie zrehydratować fragmenty żelu. Następnie dodawano bufor 50 mM NH_4HCO_3 i pozostawiano próbki na noc w 37 °C. Po trawieniu supernatant zbierano, a peptydy ekstrahowano trzykrotnie przy użyciu 70 % ACN z 1,5 % TFA, każdorazowo sonifikując próbki 15 min w łaźni ultradźwiękowej (Ultron U-507, Ultron, Dywity). Połączone supernatanty odparowywano w koncentratorem przez 45 min w 40 °C.

5.2.6. Analiza MALDI-TOF/TOF

Osad peptydowy zawieszono w 10 μL 0,1 % TFA, a następnie oczyszczono za pomocą końcówek μC18 ZipTip (Eppendorf, Poznań) zgodnie z instrukcją producenta. Z oczyszczonej mieszaniny peptydów pobierano 1 μL , mieszano z matrycą HCCA (3,5-dimetoksy-4-hydroksycynamonian), nanoszono na płytkę AnchorChip (Bruker, Polska) i suszono w temperaturze pokojowej. Widma masowe rejestrowano na spektrometrze Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker, Polska) w trybie odbiciowym dla jonów dodatnich przy napięciu przyspieszającym 25 kV. Kalibrację zewnętrzną przeprowadzano z użyciem wzorca peptydowego (Bruker). Do określania monoizotopowych mas peptydów wykorzystano oprogramowanie FlexAnalysis 3.0 (Bruker-Daltonics). Identyfikację białek i peptydów prowadzono przy użyciu algorytmu MASCOT, przeszukując bazę UniProtKB (wersja 2024_04) z ograniczeniem do taksonomii „Green Plants (Viridiplantae)”. Parametry wyszukiwania ustawiono następująco: enzym – trypsyna; modyfikacja stała – karbamidometylacja cysteiny; modyfikacja zmienna – oksydacja metioniny; tolerancja masy – 50 ppm fragmentu MS/MS, dopuszczono 1 brakujący fragment (miscleavage).

5.2.7. Trawienie in silico i predykcja bioaktywności z wykorzystaniem bazy BIOPEP

Sekwencje aminokwasowe zidentyfikowanych białek poddano symulowanemu trawieniu enzymatycznemu w bazie BIOPEP (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>, dostęp: 5 kwietnia 2025) (Minkiewicz i in., 2019). Korzystając z narzędzia “Enzyme(s) action”, dla każdego białka przeprowadzono in silico trawienie przy użyciu proteaz pochodzenia roślinnego: papainy, bromelainy oraz ficyny. Otrzymane wirtualne fragmenty peptydowe analizowano następnie modulem “search for active fragments”, co umożliwiło wskazanie sekwencji o udokumentowanych właściwościach bioaktywnych i tym samym oszacowanie potencjalnych funkcji peptydów.

5.2.8. Hydroliza enzymatyczna

Ekstrakty białkowe z rzepaku, słonecznika i ostropestu rozpuszczano w wodzie do objętości 1000 mL, uzyskując stężenie 20 g białka/L. Mieszaninę umieszczano na mieszadle magnetycznym z kontrolą temperatury (IKA Plate, Niemcy); po osiągnięciu zadanej temperatury pH korygowano przy użyciu roztworów NaOH i HCl do wartości optymalnej dla danej proteazy, kontrolując je pH-metrem (Elmetron CPC-46, Polska).

Reakcję inicjowano przez dodanie wybranej proteazy w ilości 5% lub 10% (m/m) względem masy białka, co odpowiada stosunkom E:S równym odpowiednio 1:20 i 1:10 (enzym:substrat). Hydrolizę prowadzono w warunkach izotermicznych przy stałym mieszanii przez 180 min. W celu monitorowania przebiegu procesu co 30 min pobierano próbki o objętości 0,5 mL do oznaczenia stopnia hydrolizy. Każdy wariant hydrolizy prowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach technologicznych.

5.2.9. Oznaczanie stopnia hydrolizy (DH)

Jako miarę efektywności procesu przyjęto stopień hydrolizy (DH, *degree of hydrolysis*). Bezpośrednio po pobraniu próbki (0,5 ml) dodawano do niej 0,5 mL 10% (m/v) TCA, dokładnie mieszano i inkubowano 15 min na lodzie w celu wytrącenia niezhydrolizowanych białek. Próbkę wirowano ($5500 \times g$, 10 min; MPW-352R, Polska), po czym w supernatancie oznaczano stężenie rozpuszczonych peptydów metodą

spektrofotometryczną (pomiar absorbancji przy 280 nm; Marcel c330, Polska). Każdą próbkę analizowano w dwóch powtórzeniach. Stopień hydrolizy obliczono jako procent rozpuszczonego peptydu w stosunku do początkowej zawartości białka w hydrolizowanej mieszaninie.

5.2.10. Przygotowanie hydrolizatów

W oparciu o wyniki optymalizacji parametrów procesu hydrolizy enzymatycznej białek, dla wszystkich badanych surowców i enzymów przyjęto ujednolicone warunki: stężenie enzymu 5% (m/m względem masy białka) oraz czas reakcji 120 min. W tych warunkach przygotowano hydrolizaty przeznaczone do dalszych analiz. Po zakończeniu hydrolizy mieszaniny poddawano termicznej inaktywacji enzymu (100 °C, 10 min). Otrzymane hydrolizaty liofilizowano, a uzyskane suche preparaty przechowywano w warunkach suchych, w temperaturze 4 °C, do czasu oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej i hipotensyjnej.

5.2.11. Oznaczanie właściwości antyoksydacyjnych

5.2.11.1. Metoda ABTS

Oznaczenie zdolności przeciwutleniającej przeprowadzono metodą ABTS wg Re i in. (1999), z drobnymi modyfikacjami. Roztwór rodnika kationowego ABTS•+ przygotowywano 16 godzin przed pomiarami poprzez zmieszanie równych objętości wodnych roztworów 7 mM ABTS i 2,4 mM nadsiarczanu potasu, a następnie inkubację mieszaniny w ciemności. Przed użyciem roztwór rozcieńczano buforem PBS do uzyskania absorbancji $0,70 \pm 0,02$ przy $\lambda = 734$ nm. Do 1,0 mL roztworu ABTS•+ dodawano 50,0 μ L próbki hydrolizatu o stężeniu 0,5 mg/mL, mieszano i po 6 min mierzono absorbancję przy $\lambda = 734$ nm względem próby ślepej. Zdolność przeciwutleniającą obliczano na podstawie krzywej wzorcowej Troloxu i wyrażano jako μ mol równoważnika Troloxu na gram próbki; wszystkie oznaczenia wykonywano w trzech powtórzeniach ($n = 3$).

5.2.11.2. Metoda DPPH

Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH przeprowadzono według metody opisanej przez Brand-Williams i in. (1995), z pewnymi modyfikacjami. Roztwór

wyjściowy rodnika DPPH• przygotowywano przez rozpuszczenie 9,8 mg DPPH w 50 mL metanolu; roztwór przechowywano w butelce z ciemnego szkła, w warunkach zaciemnienia. Do pomiarów sporządzano roztwór roboczy poprzez pięciokrotne rozcieńczenie roztworu wyjściowego metanolem, tak aby jego absorbanca przy 515 nm wynosiła $0,90 \pm 0,02$. W probówkach reakcyjnych mieszano 0,5 mL roztworu badanych hydrolizatów o stężeniu 0,25 mg/mL oraz 1,5 mL świeżo przygotowanego roztworu DPPH•. Próbkę inkubowano w ciemności przez 30 minut, po czym mierzono absorbancję przy $\lambda = 515$ nm względem próby ślepej. Zdolność przeciwutleniającą obliczano na podstawie krzywej wzorcowej Troloxu i wyrażano jako μmol równoważnika Troloxu na gram próbki; wszystkie oznaczenia wykonywano w trzech powtórzeniach ($n = 3$).

5.2.11.3. Metoda FRAP

Oznaczenie zdolności redukującej przeprowadzono metodą FRAP według Benzie i Strain (1996), z modyfikacjami. Odczynnik FRAP przygotowywano bezpośrednio przed pomiarem przez zmieszanie roztworów: TPTZ 10 mM w 40 mM HCl, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM oraz buforu octanowego 300 mM (pH 3,6) w stosunku 1:1:10 (v/v/v). Do próbki wprowadzano 1,5 mL świeżo przygotowanego odczynnika FRAP oraz 0,5 mL próbki hydrolizatu, mieszano i po 5 min rejestrowano absorbancję przy $\lambda = 593$ nm względem próby ślepej. Zdolność redukującą określano na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej z roztworów FeSO_4 i wyrażano jako $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ próbki. Wszystkie oznaczenia wykonywano w trzech powtórzeniach ($n = 3$).

5.2.12. Oznaczenie właściwości hipotensyjnych

Aktywność inhibitorową badanych hydrolizatów wobec enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) oznaczano metodą spektrofotometryczną opartą na hydrolizie substratu Hipuryl-His-Leu (HHL) w oparciu o metodę Cushmana i Cheunga (1971) z pewnymi modyfikacjami. Roztwór substratu HHL przygotowywano jako roztwór roboczy o stężeniu 8,3 mM w 100 mM buforze boranowym (pH 8,3) zawierającym 0,3 M NaCl. Próbkę hydrolizatu przygotowano w stężeniach 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/mL.

W probówce reakcyjnej łączono próbkę hydrolizatu z 50 μl roztworu ACE i preinkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Reakcję inicjowano przez dodanie 250 μl roztworu HHL (8,3 mM), po czym mieszaninę inkubowano przez 30 min w

temperaturze 37 °C. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 250 µL 1 N HCl. Powstały kwas hipurowy ekstrahowano w 500 µL octanu etylu, warstwę organiczną odparowywano do sucha, a pozostałość rozpuszczano w 1,0 mL wody destylowanej. Absorbancję mierzono przy $\lambda = 228$ nm względem próby ślepej z użyciem spektrofotometru UV-Vis.

Jako próbkę kontrolną, odpowiadającą 100% aktywności enzymu ACE, stosowano mieszaninę reakcyjną bez dodatku hydrolizatu. Stopień inhibicji określano na podstawie porównania wartości absorbancji prób z inhibitorem i próby kontrolnej, przy czym spadek absorbancji w obecności inhibitora był proporcjonalny do poziomu zahamowania aktywności ACE. Wartość IC₅₀ zdefiniowano jako stężenie peptydów (mg białka/mL) powodujące 50% inhibicji aktywności ACE w opisanych warunkach. IC₅₀ wyznaczano na podstawie zależności procentu inhibicji od stężenia peptydów, wykorzystując interpolację punktu odpowiadającego 50% inhibicji z dopasowanej krzywej regresji. Wszystkie oznaczenia prowadzono w trzech powtórzeniach (n = 3).

5.3. Metody technologiczne przeskalowania

5.3.1. Charakterystyka linii technologicznej

Proces przeskalowania realizowano na istniejącej linii technologicznej przedsiębiorstwa, obejmującej zbiornik procesowy o pojemności 300 L ze stali nierdzewnej, wyposażony w mieszadło mechaniczne oraz płaszcz grzewczo–chłodzący, wirówkę dekantacyjną, zbiornik reakcyjny o pojemności 1000 L z płaszczem grzewczo–chłodzącym i mieszadłem, wyparkę podciśnieniową o pojemności 300 L z mieszadłem oraz suszarkę rozpyłową.

Zastosowano także standardową aparaturę kontrolno–pomiarową (pH-metry, czujniki temperatury, przepływomierze, wagi) oraz podstawowy sprzęt laboratoryjny, w tym dygestorium do przygotowywania roztworów odczynników.

Dobór aparatury oraz konfigurację linii dostosowano do istniejących zasobów przedsiębiorstwa, tak aby proces wytwarzania hydrolizatów z makuchów roślin oleistych mógł zostać zintegrowany z dotychczasowym profilem produkcji i wykorzystaniem dostępnej infrastruktury technologicznej.

5.3.2. Przygotowanie makuchów

Przed przetwarzaniem makuchy poddawano standaryzacji obejmującej trzystopniową obróbkę: rozdrobnienie w młynie bijakowym, przesiewanie na przesiewaczu wibracyjnym wyposażonym w sito o oczkach odpowiadających 60 mesh w celu uzyskania jednnorodnej frakcji ziarnowej oraz homogenizację rozdrobnionego materiału w pojemnikach procesowych. Uzyskany, rozdrobniony i zhomogenizowany surowiec etykietowano (rodzaj surowca, data, numer partii) i magazynowano w suchym magazynie surowców, w warunkach określonych w nocie technologicznej, do czasu przeprowadzenia procesu ekstrakcji.

5.3.3. Ekstrakcja białka w skali przemysłowej

Ekstrakcję białka prowadzono partiami po 40 kg zmielonego makuchu. Proces obejmował kolejno dwuetapowe ługowanie, wytrącanie białka oraz płukanie osadu białkowego. Dla każdego rodzaju surowca wykonano trzy niezależne powtórzenia technologiczne.

W etapie I do zbiornika o pojemności 300 L wprowadzano 150 L wody destylowanej, podgrzewano do temperatury zależnej od rodzaju surowca (50 °C dla rzepaku i ostropestu, 40 °C dla słonecznika), a następnie dodawano wodorotlenek sodu w ilości zapewniającej osiągnięcie pH 12 (łącznie 1200 g NaOH na 40 kg makucha). Po całkowitym rozpuszczeniu zasady dodawano 40 kg makucha i homogenizowano mieszaninę (ok. 15 min), po czym prowadzono mieszanie przy 75 obr./min przez kolejne 45 min, utrzymując założoną temperaturę i pH. Zawiesinę kierowano do wirówki dekantacyjnej pracującej przy 4000 × g i przepływie 25 L/min. Uzyskany supernatant (frakcja białkowa) zbierano do zbiornika pośredniego, natomiast pellet poddawano ponownej ekstrakcji w etapie II.

W etapie II do tego samego zbiornika wprowadzano taką ilość wody, aby po dodaniu pelletu łączna masa wsadu wynosiła ok. 200 kg. Dodawano 360 g NaOH, aby osiągnąć pH 12, ponownie ustawiano temperaturę (jak w etapie I) i prowadzono homogenizację oraz mieszanie w warunkach analogicznych jak poprzednio. Po zakończeniu drugiego etapu ekstrakcji zawiesinę ponownie wirowano w takich samych warunkach, a uzyskany supernatant łączono z supernatantem z etapu I. Pellet kierowano do utylizacji.

Po zakończeniu ługowania w etapie III połączone supernatanty zakwaszano w zbiorniku 300 L, roztworem 6 M HCl do pH 4,5. Po 30 min mieszania w stałej temperaturze

zawiesinę ponownie poddawano wirowaniu ($4000 \times g$, 25 L/min). Osad stanowił frakcję białkową, natomiast supernatant usuwano jako ściek procesowy.

W etapie IV osad białkowy płukano wodą destylowaną w stosunku 1:1 (woda:osad, w/w), homogenizowano przez ok. 15 min, a następnie ponownie wirowano w tych samych warunkach. Uzyskany ekstrakt białkowy ważono, pobierano próbki do analiz składu chemicznego, a pozostałą część kierowano bezpośrednio do hydrolizy lub – w razie konieczności przerwania procesu – przechowywano w 4 °C (maksymalnie 72 h) bądź zamrażano w -20 °C.

5.3.4. Hydroliza enzymatyczna, zateżanie i suszenie hydrolizatów

Hydrolizę enzymatyczną prowadzono w zbiorniku reakcyjnym o pojemności 1000 L, w objętości roboczej 700 L. Masę wyizolowanego białka (ekstraktu białkowego) oraz ilość wody destylowanej dobierano w zależności od rodzaju surowca: dla makuchu rzepakowego stosowano 90 kg ekstraktu i 610 L wody, dla słonecznika 50 kg ekstraktu i 650 L wody, a dla ostropestu 55 kg ekstraktu i 645 L wody. Początkowo do zbiornika wprowadzano 300 L wody i podgrzewano do 70°C, a następnie porcjami dodawano zawiesinę ekstraktu przygotowaną w zbiornikach 50 L (10 kg ekstraktu + 30 L wody) i uzupełniano wodą aż do osiągnięcia docelowej masy i objętości.

Po wprowadzeniu całej porcji ekstraktu korygowano pH zawiesiny do 6,0 przy użyciu roztworów 6 M HCl lub 5 M NaOH, kontrolując je na bieżąco. Do tak przygotowanej zawiesiny w temperaturze 70°C dodawano 800 g papainy i prowadzono hydrolizę przez 3 h przy ciągłym mieszaniu, utrzymując stałe pH i temperaturę. Dla każdego rodzaju surowca proces hydrolizy przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach technologicznych. W celu monitorowania przebiegu procesu co 30 min pobierano próbkę o objętości 0,5 mL do oznaczenia stopnia hydrolizy, zgodnie z metodyką opisaną wcześniej. Po zakończeniu hydrolizy enzym inaktywowano poprzez podgrzanie zawiesiny do 100°C i utrzymywanie tej temperatury przez 10 min. Następnie hydrolizat schładzano do ok. 80°C w wymienniku ciepła i kierowano do zbiornika pośredniego.

W celu ograniczenia objętości przed suszeniem hydrolizat zateżano we wyparce podciśnieniowej w porcjach po ok. 200 L. Proces prowadzono w temperaturze 80°C i przy ciśnieniu około 200 mbar, do uzyskania ok. 100 L destylatu z każdej partii, co odpowiada redukcji objętości roztworu o około 50%. Zateżony roztwór kierowano do zbiornika zasilającego suszarkę rozpyłową.

Suszenie rozpyłowe prowadzono przy temperaturze wlotowej powietrza 210°C, wydajności pompy perystaltycznej 100 mL/min i częstotliwości pracy atomizera 400 Hz. Po ustabilizowaniu temperatury rozpoczynano podawanie zatężonego hydrolizatu i suszono do przetworzenia całej partii. Gotowy proszek odbierano z odbieralnika, przepłukując instalację niewielką ilością wody destylowanej po zakończeniu procesu. Produkt końcowy pakowano do oznakowanych pojemników jednostkowych, które mogły być przechowywane w temperaturze otoczenia przez okres do 12 miesięcy, zgodnie z zakładowymi wymaganiami jakościowymi.

5.3.5. Oznaczanie składu chemicznego oraz właściwości bioaktywnych otrzymanych hydrolizatów

W celu porównania składu chemicznego hydrolizatów otrzymanych w różnych skalach procesu przeprowadzono analizy próbek uzyskanych w warunkach przemysłowych oraz odpowiadających im hydrolizatów przygotowanych w skali laboratoryjnej (trawionych papainą). Oceniano zawartość białka, cukrów, tłuszczu oraz suchej masy, a także aktywność antyoksydacyjną i hipotensyjną hydrolizatów. Wszystkie analizy składu chemicznego oraz oznaczenia właściwości bioaktywnych wykonano zgodnie z metodykami szczegółowo opisanymi w poprzednim podrozdziale.

Na podstawie uzyskanych wyników oznaczeń przeprowadzonych dla hydrolizatów otrzymanych w skali laboratoryjnej oraz przemysłowej porównano następujące parametry procesu:

- wydajność izolacji białka (udział białka odzyskanego w ekstrakcie względem zawartości białka w surowym makuchu),
- zawartość białka, tłuszczu, cukrów i suchej masy w ekstrakcie białkowym
- stopień hydrolizy
- zawartość białka, tłuszczu, cukrów i suchej masy w produkcie końcowym (hydrolizacie),
- parametry aktywności biologicznej (aktywność antyoksydacyjna, zdolność inhibicji ACE).

Analiza porównawcza tych parametrów umożliwiła ocenę wrażliwości procesu na zwiększenie skali, identyfikację głównych różnic oraz wskazanie obszarów wymagających dalszej optymalizacji w kontekście wdrożenia przemysłowego.

5.4. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna wykonana została w środowisku R 4.5.2, wydanie 31.10.2025. Wizualizację graficzną w postaci wykresów wykonano w oparciu o bibliotekę Tidyverse (2.0.0, 22.02.2023).

Dla etapu ekstrakcji I oraz II analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem danych pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń pomiarowych dla każdej kombinacji pH, temperatury oraz czasu inkubacji. Dane analizowano bez ich wcześniejszego uśredniania. Zmienną zależną była zawartość białka [%], natomiast czynnikami stałymi były pH (11 i 12), temperatura (30, 40 i 50°C) oraz czas inkubacji (0, 15, 30, 45, 60, 75 i 90 min).

W celu oceny wpływu badanych czynników oraz ich interakcji zastosowano trójczynnиковą analizę wariancji (ANOVA). Istotność efektów głównych oraz interakcji oceniano na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. W przypadku stwierdzenia istotnych różnic statystycznych pomiędzy poziomami czynnika czasu, przeprowadzono test post-hoc Tukeya (HSD) w celu identyfikacji jednorodnych grup statystycznych.

Dodatkowo, w celu porównania poszczególnych punktów czasowych względem czasu początkowego (0 min) w obrębie tego samego pH i temperatury, wykonano test t-Studenta z korektą Welcha. Uzyskane wartości p wykorzystano do oznaczenia istotności statystycznej na wykresach oraz w tabelach wyników.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Na wykresach zaprezentowano wszystkie pojedyncze punkty pomiarowe (symbole bez wypełnienia), wartości średnie (symbole wypełnione) oraz belki błędu odpowiadające odchyleniu standardowemu. Trend zmian w czasie zilustrowano przy użyciu krzywych regresji drugiego stopnia, dopasowanych oddzielnie dla każdej temperatury i wartości pH. Krzywe regresji generowano w celu zobrazowania trendów zmian zawartości białka w funkcji czasu inkubacji. Dla każdej kombinacji pH i temperatury dopasowano model regresji wielomianowej drugiego stopnia na podstawie wartości średnich obliczonych z trzech powtórzeń. Współczynniki modeli wyznaczano metodą najmniejszych kwadratów. Dopasowane modele wykorzystano wyłącznie do celów wizualizacji trendów czasowych i nie stanowiły podstawy do wnioskowania statystycznego.

Wielkości efektów dla wszystkich głównych efektów i interakcji określono ilościowo za pomocą cząstkowego eta kwadrat (η^2p) uzyskanego z trójczynnиковej analizy wariancji (ANOVA). Aby uwzględnić potencjalne przeszacowanie wielkości efektu związane z cząstkowym eta kwadrat w układach wieloczynnikowych, dodatkowo obliczono

omega kwadrat (ω^2) jako mniej obciążony estymator proporcji wyjaśnionej wariancji. Różnicę między wartościami η^2p i ω^2 uwzględniono w celu zilustrowania stopnia wpływu wielkości efektu. Interpretacja wielkości efektu była zgodna z wytycznymi Cohena, z dodatkowymi rozważaniami zalecanymi przez Lakensa klasyfikującymi efekty jako małe, średnie lub duże.

Tabela 3. Interpretacja wielkości efektu dla η^2p i ω^2 (wg Cohen, 1988)

Zakres wartości	η^2p wielkość efektu	ω^2 wielkość efektu	Interpretacja praktyczna
< 0,01	znikomy	znikomy	efekt pomijalny, brak znaczenia praktycznego
0,01 – 0,05	mały	mały	słaby efekt, ograniczone znaczenie biologiczne
0,06 – 0,13	średni	średni	umiarkowany efekt, potencjalnie istotny biologicznie
$\geq 0,14$	duży	duży	silny efekt o dużym znaczeniu praktycznym

Dla badania optymalizacji procesu hydrolizy enzymatycznej, dla wszystkich układów enzymatycznych (papaina, bromelaina, ficyna, 5 i 10% m/m) pomiary wykonano w czterech powtórzeniach ($n = 4$), a wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

Wpływ rodzaju enzymu (papaina, bromelaina, ficyna), stężenia enzymu (5% i 10%) oraz czasu hydrolizy (0–180 min) na stopień hydrolizy [%] oceniono przy użyciu trójczynnikowej analizy wariancji (three-way ANOVA) z uwzględnieniem efektów głównych oraz wszystkich możliwych interakcji pomiędzy czynnikami. Przed analizą dane sprawdzono pod kątem spełnienia założeń ANOVA, w tym normalności rozkładu reszt oraz homogeniczności wariancji. W przypadku stwierdzenia istotnych statystycznie efektów ($p < 0.05$), przeprowadzono test post-hoc Tukeya (Tukey's Honestly Significant Difference, HSD) w celu identyfikacji istotnych różnic pomiędzy średnimi wartościami stopnia hydrolizy. Porównania wykonano oddzielnie dla kolejnych punktów czasowych w obrębie tego samego enzymu i stężenia, co pozwoliło na precyzyjną ocenę dynamiki procesu

hydrolizy. Wyniki testu post-hoc przedstawiono w postaci oznaczeń literowych, gdzie różne litery wskazują na istotne różnice statystyczne pomiędzy analizowanymi grupami ($p < 0.05$).

Do wizualizacji danych wykorzystano wykresy przedstawiające wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym, pojedyncze punkty pomiarowe oraz krzywe regresji dopasowane metodą najmniejszych kwadratów. Oznaczenia istotności statystycznej naniesiono bezpośrednio na wykresach w formie liter zgodnych z wynikami testu Tukeya. Poziom istotności statystycznej we wszystkich analizach przyjęto jako $\alpha = 0.05$.

Analizę statystyczną właściwości antyoksydacyjnych (ABTS, DPPH), redukcyjnych (FRAP) aktywności inhibitorowej wobec konwertazy angiotensyny I (ACE) wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Przed wykonaniem analizy sprawdzono założenia normalności rozkładu reszt oraz jednorodności wariancji, które uznano za spełnione.

W przypadku stwierdzenia istotnych efektów głównych lub interakcji ($p < 0.05$), różnice pomiędzy średnimi porównywano za pomocą testu post-hoc Tukeya HSD z korektą na wielokrotne porównania. Wyniki testu post-hoc przedstawiono w formie literowych oznaczeń istotności statystycznej, gdzie różne litery wskazują na istotne różnice pomiędzy grupami ($p < 0.05$), natomiast identyczne litery oznaczają brak istotnych różnic.

Wyniki analizy zilustrowano za pomocą wykresów pudełkowych (boxplot), prezentujących medianę, zakres międzykwartyłowy, wartości minimalne i maksymalne oraz średnią arytmetyczną. Oznaczenia literowe uzyskane z testu Tukeya naniesiono bezpośrednio na wykresy. Poziom istotności statystycznej przyjęto jako $\alpha = 0.05$.

W celu oceny wpływu z skali procesu (skala laboratoryjna, skala przemysłowa), zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Przed wykonaniem analizy sprawdzono spełnienie podstawowych założeń ANOVA, tj. normalności rozkładu reszt oraz jednorodności wariancji.

W przypadku stwierdzenia istotnych efektów ($p < 0.05$), różnice pomiędzy średnimi porównywano za pomocą testu post-hoc Tukeya HSD, z korektą na wielokrotne porównania. Wyniki testu post-hoc przedstawiono w formie literowych oznaczeń istotności statystycznej, gdzie różne litery oznaczają istotne różnice pomiędzy grupami, natomiast te same litery wskazują na brak istotnych różnic statystycznych. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $\alpha = 0.05$.

6. Wyniki

6.1. Podstawowy skład chemiczny makuchów

W Tabeli 4. zestawiono podstawowy skład chemiczny makuchów z rzepaku, słonecznika i ostropestu. Wszystkie surowce charakteryzowały się wysoką suchą masą (89,36–93,59%), co sprzyja ich stabilności podczas przechowywania i ogranicza ryzyko niekorzystnych zmian mikrobiologicznych oraz enzymatycznych.

Najwyższą zawartość białka stwierdzono w makuchu słonecznikowym (40,70%), co czyni go najbardziej perspektywnym surowcem pod względem potencjalnego uzysku białka. Nieco niższą zawartość białka wykazano w makuchu rzepakowym (34,74%), natomiast najmniej białka zawierał makuch z ostropestu (30,02%). Z punktu widzenia efektywności procesu izolacji oznacza to, że przy tej samej ilości surowca największą ilość białka można teoretycznie odzyskać z makuchu słonecznikowego, podczas gdy w przypadku ostropestu konieczne byłoby przetworzenie większej masy materiału, aby uzyskać porównywalny ładunek białka.

Tabela 4. Skład chemiczny makuchów z rzepaku, słonecznika i ostropestu (średnia $\pm$ SD, n = 3).

Surowiec	Zawartość białka (%)	Zawartość cukrów (%)	Zawartość tłuszczu (%)	Sucha masa (%)
rzepak	34,74 $\pm$ 1,20	9,92 $\pm$ 0,33	12,43 $\pm$ 0,08	89,36 $\pm$ 1,98
słonecznik	40,70 $\pm$ 1,37	9,11 $\pm$ 0,30	12,40 $\pm$ 0,41	92,87 $\pm$ 2,74
ostropest	30,02 $\pm$ 1,05	3,47 $\pm$ 0,12	13,02 $\pm$ 0,47	93,59 $\pm$ 3,09

Zawartość tłuszczu w makuchach była zbliżona (ok. 12–13%), co wskazuje na porównywalny stopień odtłuszczenia po procesie tłoczenia. Istotne znaczenie ma natomiast zawartość cukrów, które łatwo współekstrahują się z białkami i mogą pogarszać ich czystość oraz właściwości funkcjonalne. Najwyższy udział cukrów stwierdzono w makuchu rzepakowym (9,92%), niewiele niższy – w słonecznikowym (9,11%), natomiast zdecydowanie najniższą zawartość tych związków odnotowano w makuchu z ostropestu (3,47%). Z tego względu, mimo niższej zawartości białka, ostropest może być korzystnym surowcem do otrzymywania koncentratów białkowych o wyższej czystości. Makuch rzepakowy, przy relatywnie wysokiej zawartości cukrów i najniższej suchej masie, może

natomiast sprawiać najwięcej trudności w uzyskaniu frakcji białkowej o wysokiej czystości i stabilności.

Podsumowując, makuch słonecznikowy wydaje się najbardziej perspektywicznym surowcem pod względem wydajności izolacji białka, natomiast makuch z ostropestu – pod względem ograniczonej zawartości współekstrahujących cukrów. Makuch rzepakowy zajmuje pozycję pośrednią, choć jego wyższa zawartość cukrów i niższa sucha masa mogą wymagać staranniejszego zaprojektowanego procesu oczyszczania.

6.2. Optymalizacja procesu ekstrakcji białka

6.2.1. Rzepak

6.2.1.1. Etap I

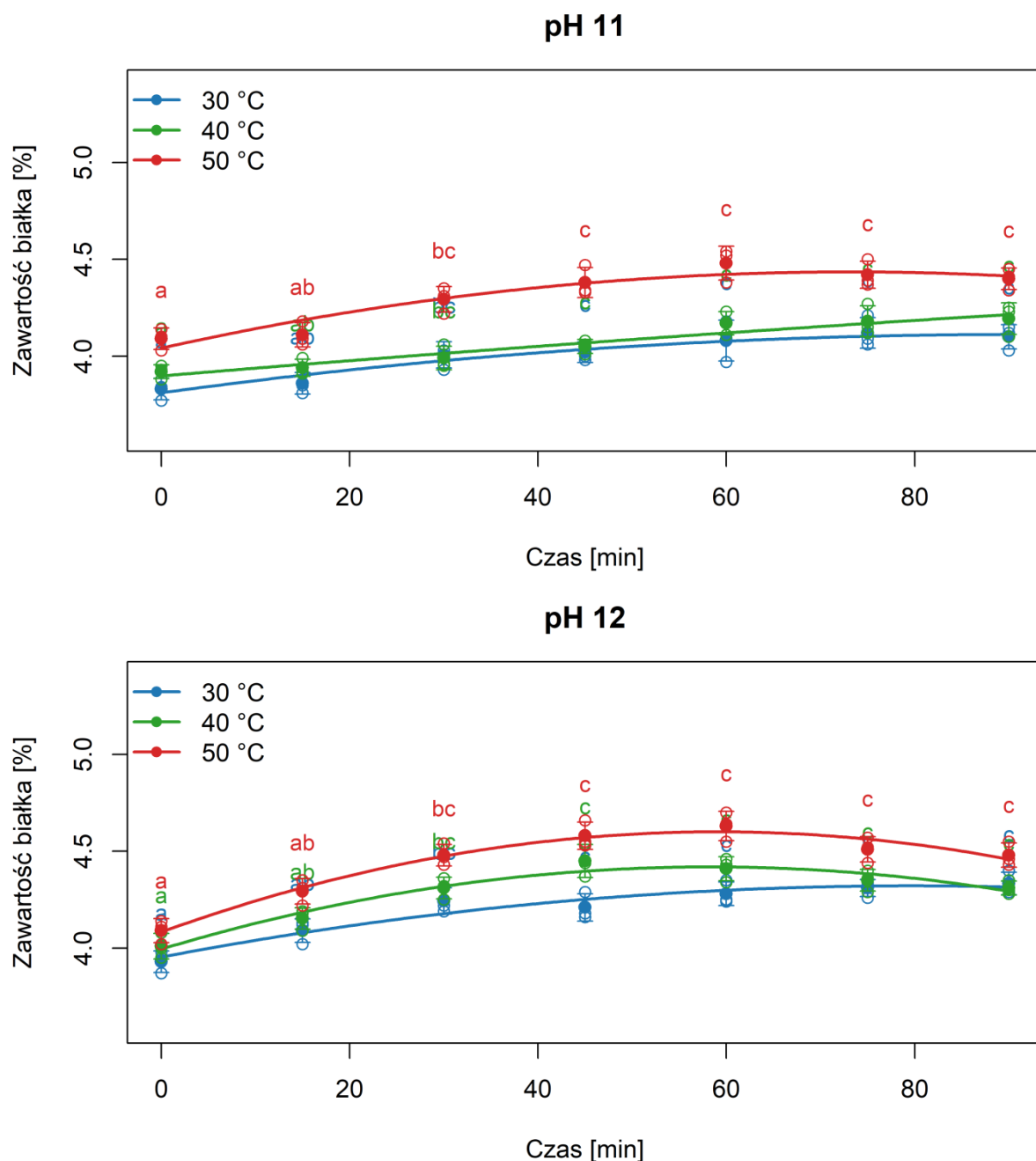
Wyniki pierwszego etapu ekstrakcji białek rzepaku (Tabela 5, Rycina 9) wskazują na jednoznaczny, dodatni wpływ zarówno temperatury, jak i pH na uwalnianie białka do roztworu. Dla czasu 60 min zwiększenie temperatury z 30 do 50 °C powodowało wzrost zawartości białka w natancie o ok. 8–10%, natomiast podniesienie pH z 11 do 12 przy tej samej temperaturze skutkowało dodatkowym wzrostem rzędu ~3–6%.

Tabela 5. Zawartość białka [%] w natancie podczas I etapu ekstrakcji białka rzepaku (średnia $\pm$ SD, $n = 3$). Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

Czas [min]	pH=11			pH=12		
	30 °C	40 °C	50 °C	30 °C	40 °C	50 °C
0	3,83 $\pm$ 0,06 ^a	3,92 $\pm$ 0,04 ^a	4,09 $\pm$ 0,06 ^a	3,93 $\pm$ 0,06 ^a	4,01 $\pm$ 0,07 ^a	4,09 $\pm$ 0,06 ^a
15	3,86 $\pm$ 0,06 ^{ab}	3,94 $\pm$ 0,04 ^{ab}	4,11 $\pm$ 0,06 ^{ab}	4,09 $\pm$ 0,06 ^{ab}	4,15 $\pm$ 0,06 ^{ab}	4,29 $\pm$ 0,07 ^{ab}
30	4,01 $\pm$ 0,07 ^{bc}	3,99 $\pm$ 0,06 ^{bc}	4,29 $\pm$ 0,07 ^{bc}	4,24 $\pm$ 0,07 ^{bc}	4,31 $\pm$ 0,06 ^{bc}	4,48 $\pm$ 0,06 ^{bc}
45	4,02 $\pm$ 0,05 ^c	4,05 $\pm$ 0,04 ^c	4,38 $\pm$ 0,08 ^c	4,21 $\pm$ 0,07 ^c	4,45 $\pm$ 0,09 ^c	4,58 $\pm$ 0,07 ^c
60	4,08 $\pm$ 0,11 ^c	4,17 $\pm$ 0,06 ^c	4,48 $\pm$ 0,09 ^c	4,28 $\pm$ 0,06 ^c	4,41 $\pm$ 0,06 ^c	4,63 $\pm$ 0,08 ^c
75	4,12 $\pm$ 0,08 ^c	4,18 $\pm$ 0,08 ^c	4,42 $\pm$ 0,07 ^c	4,31 $\pm$ 0,04 ^c	4,35 $\pm$ 0,06 ^c	4,51 $\pm$ 0,07 ^c
90	4,10 $\pm$ 0,06 ^c	4,19 $\pm$ 0,08 ^c	4,40 $\pm$ 0,06 ^c	4,33 $\pm$ 0,06 ^c	4,31 $\pm$ 0,04 ^c	4,48 $\pm$ 0,06 ^c

W całym badanym zakresie obserwowano typową kinetykę ekstrakcji: szybki wzrost stężenia białka w roztworze w ciągu pierwszych 45–60 min, a następnie przejście do stanu

plateau. Najwyższą zawartość białka uzyskano przy pH 12 i 50 °C po 60 min, przy czym warunki pH 11 i 50 °C dawały tylko nieznacznie niższy poziom. Wydłużanie procesu powyżej 60 min nie przynosiło dalszych korzyści, a przy 50 °C prowadziło do niewielkiego spadku zawartości białka.



Rycina 9. Wykres ekstrakcji białka z rzepaku w trakcie etapu I w funkcji czasu i temperatury dla zawartości białka [%], przedstawiony osobno dla pH 11 i pH 12. Puste symbole oznaczają pojedyncze pomiary (trzy powtórzenia), wypełnione symbole – wartości średnie $\pm$ SD. Krzywe przedstawiają dopasowane modele regresji drugiego stopnia. Różne litery (w obrębie tej samej

temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

Z praktycznego punktu widzenia optymalnym kompromisem między wydajnością a nakładami operacyjnymi jest prowadzenie etapu I ekstrakcji przez ok. 60 min. Wybór warunków 50 °C, pH 12 pozwala maksymalizować odzysk białka, natomiast pH 11 i 50 °C stanowi korzystną alternatywę o niewielkiej utracie wydajności.

Tabela 6. Wielkości wpływu efektów (pH, temperatura i czas, w różnych kombinacjach) na wynik ekstrakcji białek rzepaku w trakcie etapu I w wyrażone jako cząstkowe η^2p i ω^2 uzyskanych z trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Różnica między η^2p a ω^2 odzwierciedla stopień wzrostu wielkości efektów związany z cząstkowym η^2p . Interpretację wielkości efektu przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Cohena i Lakensa.

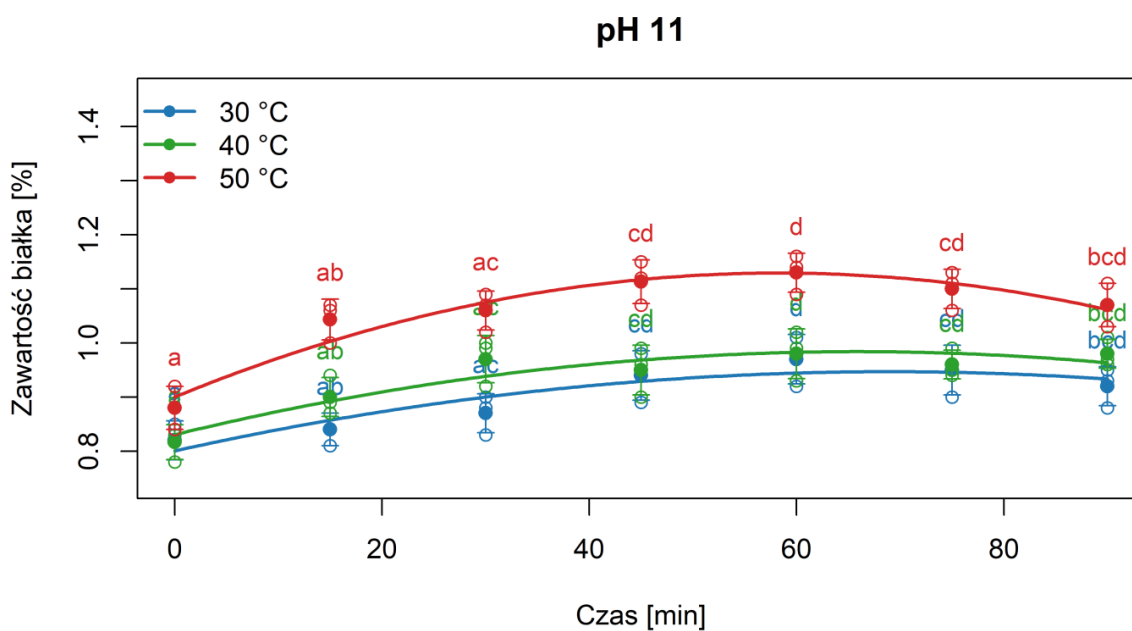
Efekt	η^2p	ω^2	$\eta^2p - \omega^2$	Interpretacja
pH	0,33	0,26	0,07	duży
temperatura	0,51	0,44	0,07	duży
czas	0,77	0,70	0,07	bardzo duży
pH × temperatura	0,07	0,03	0,04	mały–średni
pH × czas	0,20	0,14	0,06	duży
temperatura × czas	0,35	0,28	0,07	duży
pH × temperatura × czas	0,16	0,10	0,06	średni

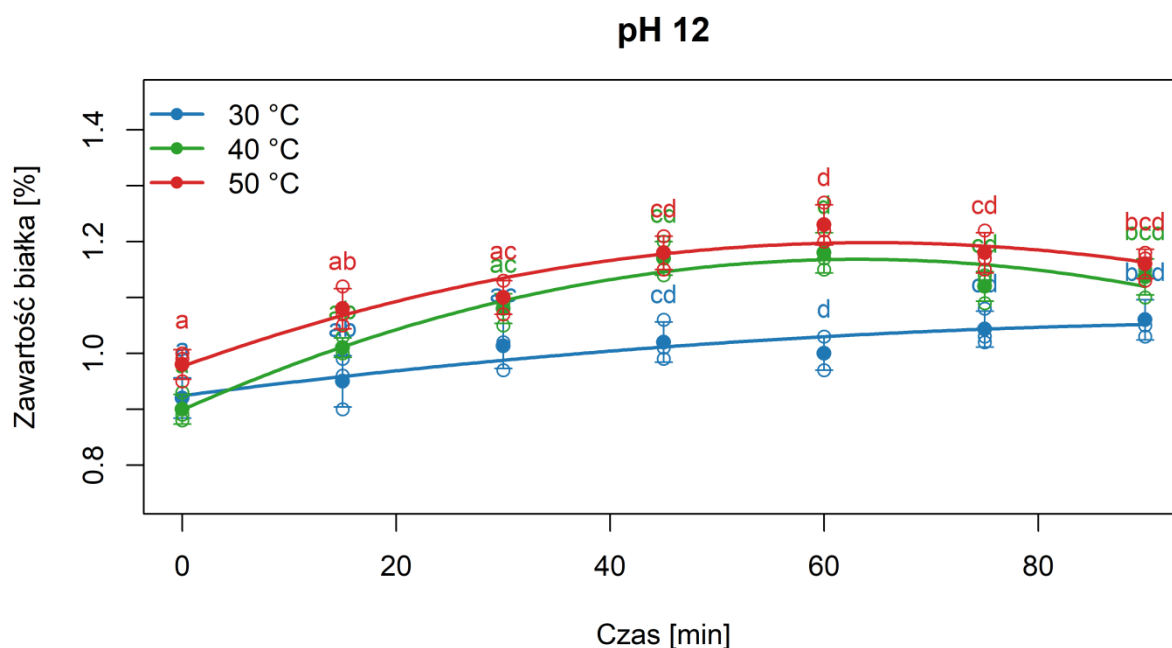
6.2.1.2. Etap II

W etapie II ekstrakcji ponownie obserwowano dodatni wpływ temperatury i pH na efektywność procesu, z kinetyką prowadzącą do plateau po ok. 60 min (dla temperatur ≥ 40 °C). Dla czasu 60 min zwiększenie temperatury z 30 do 50 °C podniosło zawartość białka w natancie o ok. 16–23%. Zmiana pH z 11 do 12 dawała efekt zależny od temperatury: niewielki przy 30 °C, wyraźnie korzystny przy 40 °C i umiarkowany przy 50 °C. W większości kombinacji warunków maksima obserwowano po 60 min, po czym następował niewielki spadek. Jedynie przy 30 °C i pH 12 ekstrakcja przebiegała wolniej, z łagodnym wzrostem do 90 min.

Tabela 7. Zawartość białka [%] w natancie podczas II etapu ekstrakcji białka rzepaku (średnia $\pm$ SD, n = 3). Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

	pH=11			pH=12		
Czas [min]	30 °C	40 °C	50 °C	30 °C	40 °C	50 °C
0	0,82 $\pm$ 0,04 ^a	0,82 $\pm$ 0,03 ^a	0,88 $\pm$ 0,04 ^a	0,92 $\pm$ 0,04 ^a	0,90 $\pm$ 0,03 ^a	0,98 $\pm$ 0,03 ^a
15	0,84 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,90 $\pm$ 0,04 ^{ab}	1,04 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,95 $\pm$ 0,05 ^{ab}	1,01 $\pm$ 0,02 ^{ab}	1,08 $\pm$ 0,04 ^{ab}
30	0,87 $\pm$ 0,04 ^{ac}	0,97 $\pm$ 0,04 ^{ac}	1,06 $\pm$ 0,04 ^{ac}	1,01 $\pm$ 0,04 ^{ac}	1,08 $\pm$ 0,03 ^{ac}	1,10 $\pm$ 0,03 ^{ac}
45	0,94 $\pm$ 0,05 ^{cd}	0,95 $\pm$ 0,05 ^{cd}	1,11 $\pm$ 0,04 ^{cd}	1,02 $\pm$ 0,04 ^{cd}	1,17 $\pm$ 0,03 ^{cd}	1,18 $\pm$ 0,03 ^{cd}
60	0,97 $\pm$ 0,05 ^d	0,98 $\pm$ 0,05 ^d	1,13 $\pm$ 0,04 ^d	1,00 $\pm$ 0,03 ^d	1,18 $\pm$ 0,04 ^d	1,23 $\pm$ 0,04 ^d
75	0,95 $\pm$ 0,05 ^{cd}	0,96 $\pm$ 0,03 ^{cd}	1,10 $\pm$ 0,04 ^{cd}	1,04 $\pm$ 0,03 ^{cd}	1,12 $\pm$ 0,03 ^{cd}	1,18 $\pm$ 0,04 ^{cd}
90	0,92 $\pm$ 0,04 ^{bcd}	0,98 $\pm$ 0,03 ^{bcd}	1,07 $\pm$ 0,04 ^{bcd}	1,06 $\pm$ 0,04 ^{bcd}	1,14 $\pm$ 0,03 ^{bcd}	1,16 $\pm$ 0,03 ^{bcd}





Rycina 10. Wykres ekstrakcji białka z rzepaku w trakcie etapu II w funkcji czasu i temperatury dla zawartości białka [%], przedstawiony osobno dla pH 11 i pH 12. Puste symbole oznaczają pojedyncze pomiary (trzy powtórzenia), wypełnione symbole – wartości średnie $\pm$ SD. Krzywe przedstawiają dopasowane modele regresji drugiego stopnia. Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

Z perspektywy projektowania procesu 60 min można uznać za optymalny czas trwania etapu II. Warunki pH 12 i 50 °C zapewniają najwyższy odzysk, natomiast pH 12 i 40 °C dają nieco niższy wynik przy mniejszym zużyciu energii. Wydłużanie etapu II powyżej 60 min nie jest uzasadnione, a przy wyższych temperaturach może prowadzić do spadku efektywności.

Tabela 8. Wielkości wpływu efektów (pH, temperatura i czas, w różnych kombinacjach) na wynik ekstrakcji białek rzepaku w trakcie etapu II w wyrażone jako cząstkowe η^2p i ω^2 uzyskanych z trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Różnica między η^2p a ω^2 odzwierciedla stopień wzrostu wielkości efektów związany z cząstkowym η^2p . Interpretację wielkości efektu przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Cohena i Lakensa.

Efekt	η^2p	ω^2	$\eta^2p - \omega^2$	Interpretacja
pH	0,41	0,33	0,08	duży

Efekt	η^2p	ω^2	$\eta^2p - \omega^2$	Interpretacja
temperatura	0,52	0,45	0,07	duży
czas	0,78	0,71	0,07	bardzo duży
pH $\times$ temperatura	0,09	0,05	0,04	średni
pH $\times$ czas	0,21	0,15	0,06	duży
temperatura $\times$ czas	0,34	0,26	0,08	duży
pH $\times$ temperatura $\times$ czas	0,17	0,11	0,06	duży

6.2.1.3. Etap III i IV

W etapie III procesu przeprowadzono strącanie białka, uzyskując osad, w którym oznaczono zawartość białka oraz suchej masy (Tabela 9). W kolejnym etapie (IV) osad ten poddano oczyszczaniu, co skutkowało wyraźnym wzbogaceniem frakcji białkowej. Zawartość białka w ekstrakcie wzrosła z $13,78 \pm 0,20\%$ do $15,25 \pm 0,17\%$, a sucha masa z $18,55 \pm 0,27\%$ do $19,27 \pm 0,16\%$. W konsekwencji udział białka w suchej masie zwiększył się z $74,27 \pm 1,53\%$ do $79,15 \pm 1,10\%$.

W produkcie końcowym oznaczono ponadto $2,23 \pm 0,16\%$ cukrów oraz $7,99 \pm 0,37\%$ tłuszczu w suchej masie. Niska zawartość cukrów oraz umiarkowany poziom lipidów przy $\sim 79\%$ udziale białka wskazują, że etap IV skutecznie doczyszczcza i koncentruje frakcję białkową. Całkowita wydajność procesu wyniosła $52,3 \pm 0,8\%$.

Tabela 9. Skład biochemiczny ekstraktów białkowych z rzepaku po etapie III i IV (średnia $\pm$ SD, n = 3).

	Białko (%)	Sucha masa (%)	Zawartość białka w suchej masie (%)	Zawartość cukrów w suchej masie (%)	Zawartość tłuszczu w suchej masie (%)
etap III	$13,78 \pm 0,20$	$18,55 \pm 0,27$	$74,27 \pm 1,53$	-	-
etap IV	$15,25 \pm 0,17$	$19,27 \pm 0,16$	$79,15 \pm 1,1$	$2,23 \pm 0,16$	$7,99 \pm 0,37$

6.2.2. Słonecznik

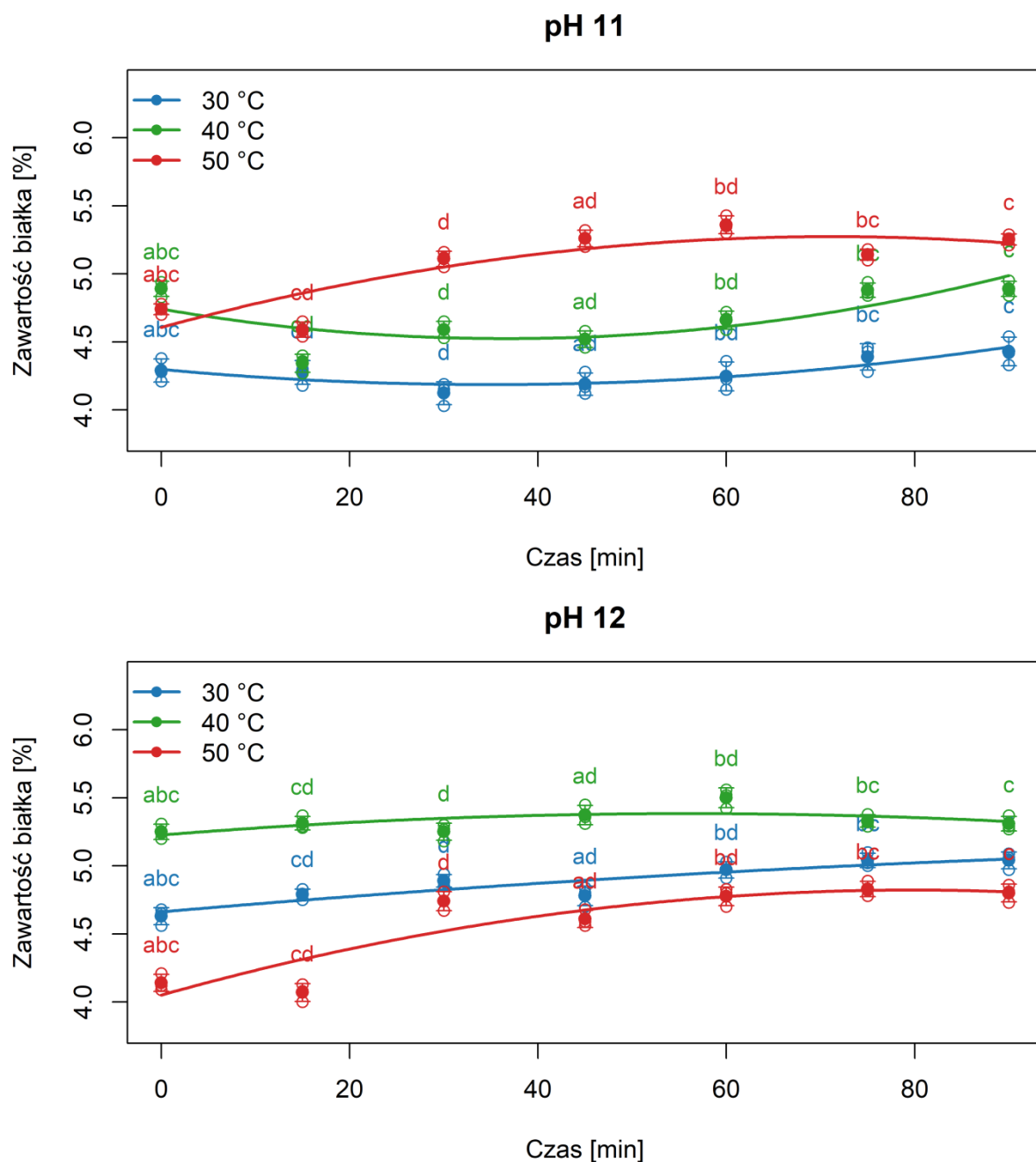
6.2.2.1. Etap I

W przypadku ekstrakcji białek słonecznika pH okazało się czynnikiem dominującym: średni uzysk przy pH 12 przewyższał uzysk przy pH 11 o ok. 5,6%. Najwyższe wartości stężenia białka w natancie uzyskano dla pH 12 w temperaturze 40 °C, osiągając maksimum $5,50 \pm 0,07\%$ po 60 min (Tabela 10, Rycina 10). Porównywalny, choć nieco niższy wynik otrzymano przy pH 11 i 50 °C ($5,36 \pm 0,07\%$ po 60 min).

Tabela 10. Zawartość białka [%] w natancie podczas I etapu ekstrakcji białka słonecznika (średnia $\pm$ odchylenie standardowe, n = 3). Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

Czas [min]	pH=11			pH=12		
	30 °C	40 °C	50 °C	30 °C	40 °C	50 °C
0	$4,29 \pm 0,09^{abc}$	$4,89 \pm 0,06^{abc}$	$4,74 \pm 0,04^{abc}$	$4,63 \pm 0,06^{abc}$	$5,25 \pm 0,06^{abc}$	$4,14 \pm 0,06^{abc}$
15	$4,28 \pm 0,09^{cd}$	$4,34 \pm 0,07^{cd}$	$4,59 \pm 0,06^{cd}$	$4,79 \pm 0,04^{cd}$	$5,31 \pm 0,05^{cd}$	$4,07 \pm 0,07^{cd}$
30	$4,12 \pm 0,08^d$	$4,59 \pm 0,06^d$	$5,11 \pm 0,06^d$	$4,89 \pm 0,05^d$	$5,25 \pm 0,06^d$	$4,74 \pm 0,07^d$
45	$4,19 \pm 0,08^{ad}$	$4,52 \pm 0,06^{ad}$	$5,26 \pm 0,06^{ad}$	$4,78 \pm 0,07^{ad}$	$5,37 \pm 0,07^{ad}$	$4,61 \pm 0,06^{ad}$
60	$4,25 \pm 0,11^{bd}$	$4,66 \pm 0,07^{bd}$	$5,36 \pm 0,07^{bd}$	$4,97 \pm 0,06^{bd}$	$5,50 \pm 0,07^{bd}$	$4,78 \pm 0,07^{bd}$
75	$4,39 \pm 0,10^{bc}$	$4,88 \pm 0,05^{bc}$	$5,14 \pm 0,04^{bc}$	$5,04 \pm 0,05^{bc}$	$5,33 \pm 0,05^{bc}$	$4,83 \pm 0,06^{bc}$
90	$4,43 \pm 0,11^c$	$4,89 \pm 0,06^c$	$5,25 \pm 0,04^c$	$5,04 \pm 0,06^c$	$5,31 \pm 0,05^c$	$4,80 \pm 0,07^c$

Wpływ temperatury był zależny od odczynu. Przy pH 12 ogrzanie z 30 do 40 °C poprawiało uzysk, natomiast dalsze podniesienie temperatury do 50 °C powodowało spadek zawartości białka. Przy pH 11 obserwowano trend przeciwny – stopniowy wzrost uzysku wraz ze wzrostem temperatury do 50 °C. Można to tłumaczyć równowagą pomiędzy zwiększoną solubilizacją białek w silnie alkalicznym środowisku a początkiem denaturacji/agregacji w wyższej temperaturze przy pH 12, co ogranicza rozpuszczalność. Podobnie jak w przypadku rzepaku, w większości analizowanych wariantów przyrost stężenia białka następował do 60 min, po czym krzywe przechodziły w plateau.



Rycina 11. Wykres ekstrakcji białka z słonecznika w trakcie etapu I w funkcji czasu i temperatury dla zawartości białka [%], przedstawiony osobno dla pH 11 i pH 12. Puste symbole oznaczają pojedyncze pomiary (trzy powtórzenia), wypełnione symbole – wartości średnie $\pm$ SD. Krzywe przedstawiają dopasowane modele regresji drugiego stopnia. Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

Podsumowując, optymalnymi parametrami etapu I ekstrakcji białek słonecznika są pH 12, temperatura 40 °C i czas 60 min; wydłużenie procesu powyżej 60–75 min nie przynosi istotnych korzyści technologicznych.

Tabela 11. Wielkości wpływu efektów (pH, temperatura i czas, w różnych kombinacjach) na wynik ekstrakcji białek słonecznika w trakcie etapu I w wyrażone jako cząstkowe η^2p i ω^2 uzyskanych z trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Różnica między η^2p a ω^2 odzwierciedla stopień wzrostu wielkości efektów związany z cząstkowym η^2p . Interpretację wielkości efektu przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Cohena i Lakensa.

Efekt	η^2p	ω^2	$\eta^2p - \omega^2$	Interpretacja
pH	0,31	0,24	0,07	duży
temperatura	0,49	0,42	0,07	duży
czas	0,74	0,67	0,07	bardzo duży
pH × temperatura	0,07	0,03	0,04	mały–średni
pH × czas	0,19	0,13	0,06	duży
temperatura × czas	0,33	0,26	0,07	duży
pH × temperatura × czas	0,15	0,09	0,06	średni

6.2.2.2. Etap II

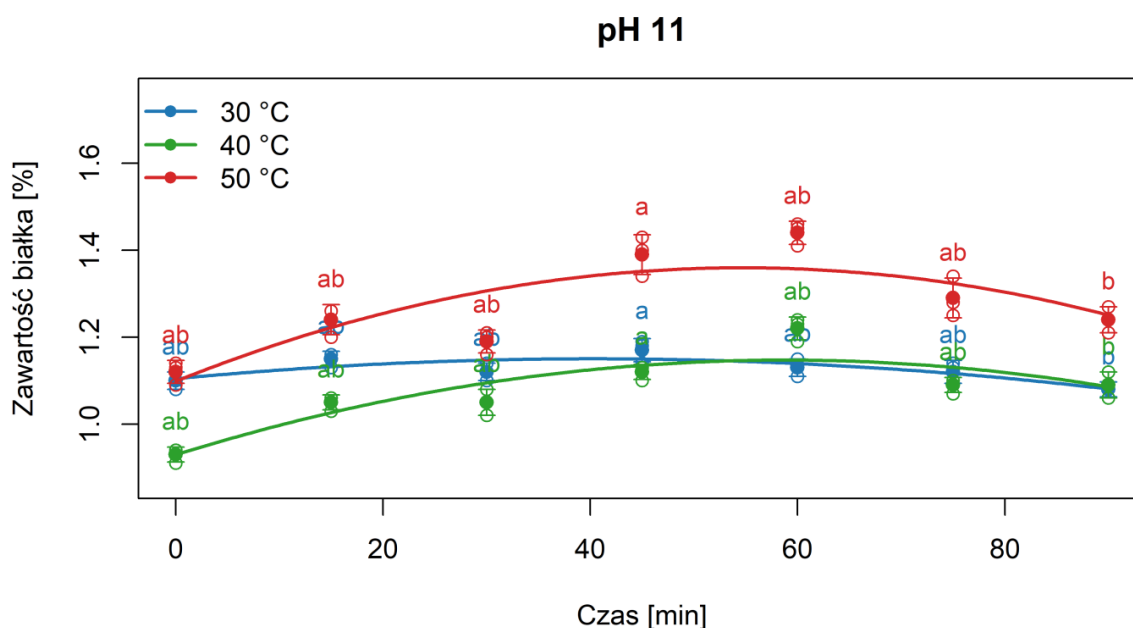
W etapie II pH ponownie okazało się istotnym czynnikiem, choć jego wpływ był umiarkowany (Tabela 12, Rycina 12).

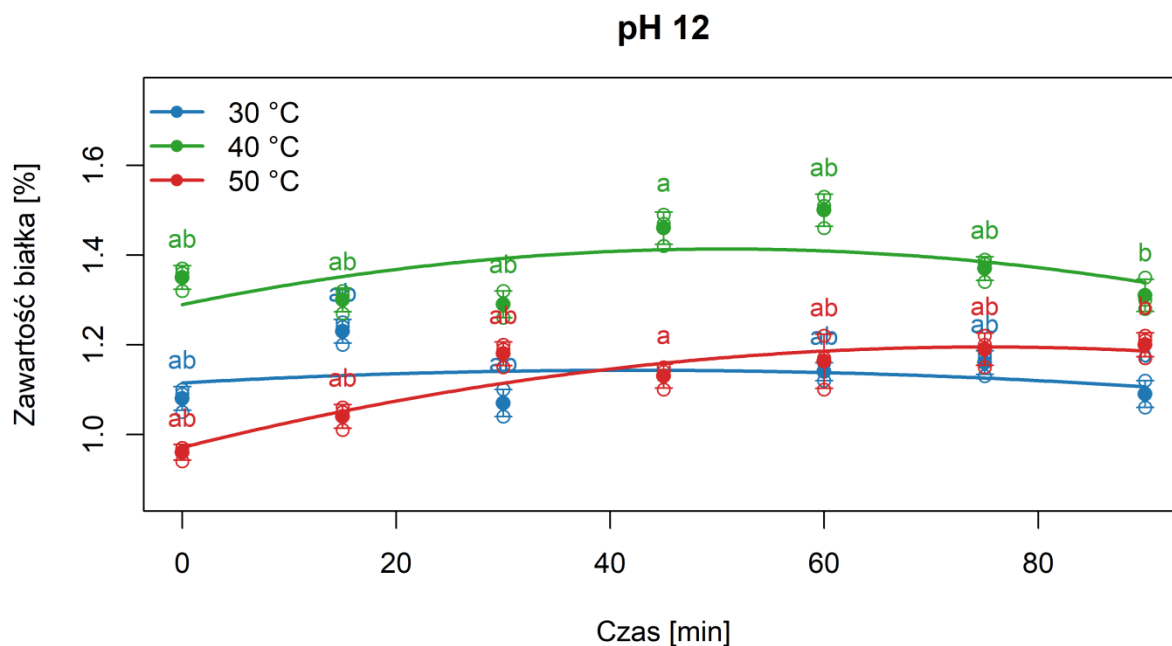
Tabela 12. Zawartość białka [%] w natancie podczas II etapu ekstrakcji białka słonecznika (średnia $\pm$ odchylenie standardowe, n = 3). Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, p < 0,05). ANOVA (p < 0,05).

Czas [min]	pH=11			pH=12		
	30 °C	40 °C	50 °C	30 °C	40 °C	50 °C
0	1,10 $\pm$ 0,02 ^{ab}	0,93 $\pm$ 0,02 ^{ab}	1,12 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,08 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,35 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,96 $\pm$ 0,02 ^{ab}
15	1,15 $\pm$ 0,02 ^{ab}	1,05 $\pm$ 0,02 ^{ab}	1,24 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,23 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,30 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,04 $\pm$ 0,0 ^{ab}
30	1,12 $\pm$ 0,02 ^{ab}	1,05 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,19 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,07 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,29 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,18 $\pm$ 0,0 ^{ab}

	pH=11			pH=12		
Czas [min]	30 °C	40 °C	50 °C	30 °C	40 °C	50 °C
45	1,17 ± 0,03 ^a	1,12 ± 0,02 ^a	1,39 ± 0,05 ^a	1,13 ± 0,03 ^a	1,46 ± 0,04 ^a	1,13 ± 0,03 ^a
60	1,13 ± 0,02 ^{ab}	1,22 ± 0,03 ^{ab}	1,44 ± 0,03 ^{ab}	1,14 ± 0,02 ^{ab}	1,50 ± 0,04 ^{ab}	1,16 ± 0,06 ^{ab}
75	1,12 ± 0,03 ^{ab}	1,09 ± 0,02 ^{ab}	1,29 ± 0,05 ^{ab}	1,16 ± 0,03 ^{ab}	1,37 ± 0,03 ^{ab}	1,19 ± 0,04 ^{ab}
90	1,08 ± 0,02 ^b	1,09 ± 0,03 ^b	1,24 ± 0,03 ^b	1,09 ± 0,03 ^b	1,31 ± 0,04 ^b	1,20 ± 0,03 ^b

Maksymalną zawartość białka w natancie odnotowano dla pH 12, 40 °C po 60 min ekstrakcji. Bardzo zbliżony wynik uzyskano po tym samym czasie dla pH 11 i 50 °C, co wskazuje na wyraźną interakcję temperatury i pH: przy pH 12 optimum przypada na 40 °C (dalsze podgrzewanie do 50 °C obniża uzysk), natomiast przy pH 11 wzrost temperatury do 50 °C systematycznie poprawia ekstrakcję. Kinetyka procesu wskazuje, że kluczowe zmiany zachodzą do 45–60 min. Średnia zawartość białka wzrasta z ok. 1,09% (0 min) do 1,27% (60 min), tj. o ok. 16%, po czym obserwuje się plateau lub lekki spadek (75–90 min).





Rycina 12. Wykres ekstrakcji białka z słonecznika w trakcie etapu II w funkcji czasu i temperatury dla zawartości białka [%], przedstawiony osobno dla pH 11 i pH 12. Puste symbole oznaczają pojedyncze pomiary (trzy powtórzenia), wypełnione symbole – wartości średnie $\pm$ SD. Krzywe przedstawiają dopasowane modele regresji drugiego stopnia. Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

Podsumowując, optymalnymi parametrami etapu II są pH 12, temperatura 40 °C i czas 60 min. W zastosowaniach wymagających łagodniejszych warunków alkalicznych dobrą alternatywą jest kombinacja pH 11, 50 °C, 60 min, dająca tylko nieznacznie niższy uzysk. Wydłużanie procesu powyżej 60–75 min nie poprawia wydajności.

Tabela 13. Wielkości wpływu efektów (pH, temperatura i czas, w różnych kombinacjach) na wynik ekstrakcji białek słonecznika w trakcie etapu II w wyrażone jako cząstkowe η^2p i ω^2 uzyskanych z trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Różnica między η^2p a ω^2 odzwierciedla stopień wzrostu wielkości efektów związany z cząstkowym η^2p . Interpretację wielkości efektu przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Cohena i Lakensa.

Efekt	η^2p	ω^2	$\eta^2p - \omega^2$	Interpretacja
pH	0,28	0,21	0,07	duży
temperatura	0,51	0,44	0,07	duży
czas	0,73	0,66	0,07	bardzo duży

Efekt	η^2p	ω^2	$\eta^2p - \omega^2$	Interpretacja
pH $\times$ temperatura	0,06	0,02	0,04	mały–średni
pH $\times$ czas	0,18	0,12	0,06	duży
temperatura $\times$ czas	0,31	0,24	0,07	duży
pH $\times$ temperatura $\times$ czas	0,14	0,08	0,06	średni

6.2.2.3. Etap III i IV

Wyniki oznaczeń zawartości białka oraz suchej masy w osadzie uzyskanym w etapie III przedstawiono w Tabeli 14. Oczyszczanie osadu białkowego przeprowadzone w etapie IV wyraźnie podniosło czystość frakcji białkowej. Zawartość białka wzrosła z $23,75 \pm 0,14\%$ do $27,28 \pm 0,18\%$, a sucha masa z $28,18 \pm 0,16\%$ do $29,74 \pm 0,21\%$. Przełożyło się to na zwiększenie udziału białka w suchej masie z $84,27 \pm 0,69\%$ do $91,73 \pm 0,89\%$.

W próbce końcowej oznaczono ponadto $0,67 \pm 0,07\%$ cukrów oraz $2,08 \pm 0,10\%$ tłuszczu w suchej masie. Niska zawartość składników niebiałkowych przy $\sim 92\%$ udziale białka potwierdza skuteczne doczyszczenie i koncentrację frakcji białkowej w etapie IV. Całkowita wydajność procesu wyniosła $46,9 \pm 0,9\%$.

Tabela 14. Skład biochemiczny ekstraktów białkowych ze słonecznika po etapie III i IV (średnia $\pm$ SD, n = 3).

	Białko (%)	Sucha masa (%)	Zawartość białka w suchej masie (%)	Zawartość cukrów w suchej masie (%)	Zawartość tłuszczu w suchej masie (%)
etap III	$23,75 \pm 0,14$	$28,18 \pm 0,16$	$84,27 \pm 0,69$	-	-
etap IV	$27,28 \pm 0,18$	$29,74 \pm 0,21$	$91,73 \pm 0,89$	$0,67 \pm 0,07$	$2,08 \pm 0,10$

6.2.3. Ostropest

6.2.3.1. Etap I

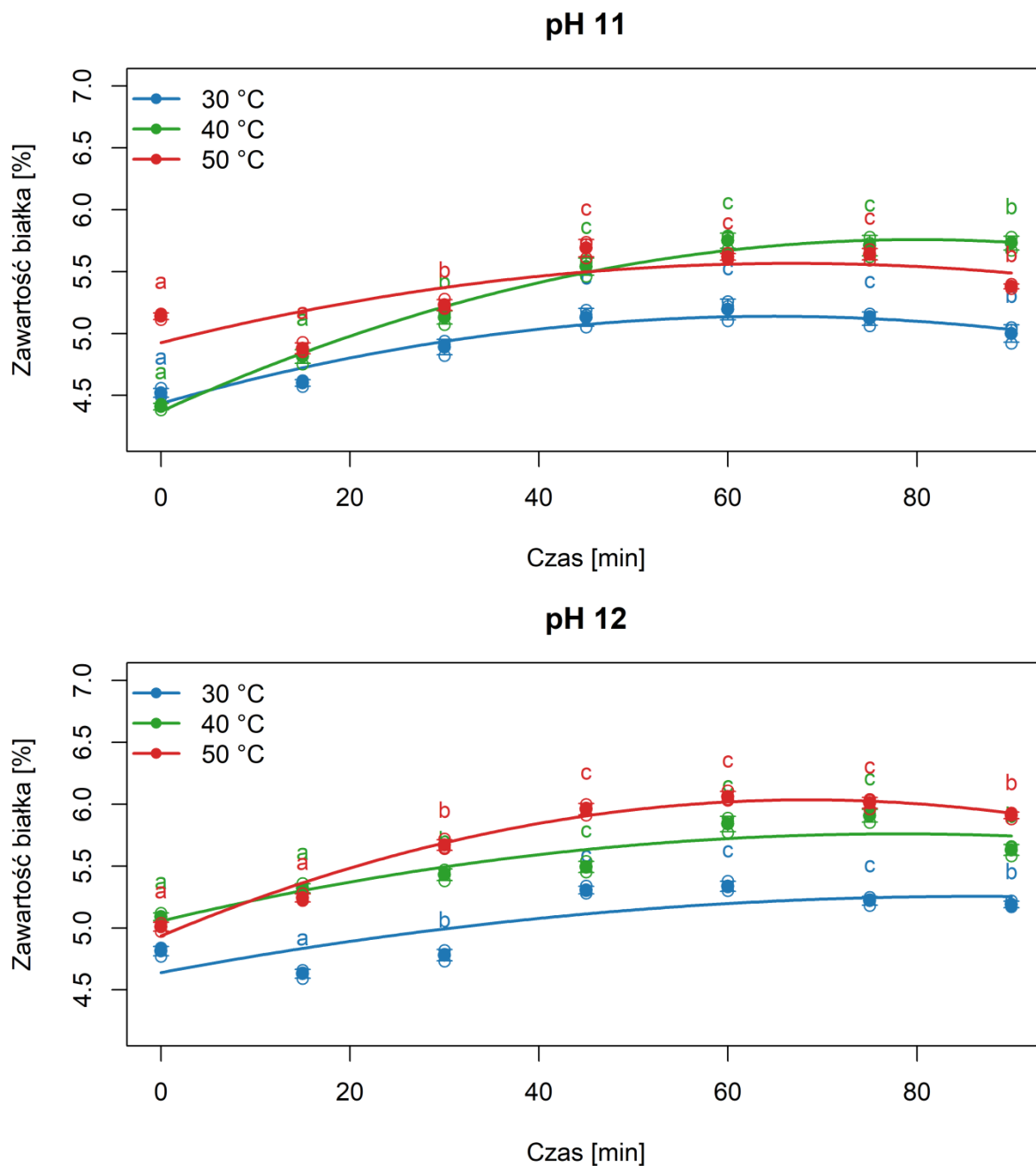
W I etapie ekstrakcji białek z ostropestu obserwowano szybki wzrost uzysku do 45–60 min, po czym stężenie białka w natancie stabilizowało się lub nieznacznie spadało

(Tabela 15, Rycina 13). Maksimum odnotowano po 60 min dla pH 12 i temperatury 50 °C; wydłużenie czasu do 90 min powodowało niewielki spadek uzysku.

Tabela 15. Zawartość białka [%] w natancie podczas I etapu ekstrakcji białka ostropestu (średnia $\pm$ odchylenie standardowe, $n = 3$). Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

	pH=11			pH=12		
Czas [min]	30 °C	40 °C	50 °C	30 °C	40 °C	50 °C
0	4,52 $\pm$ 0,04 ^a	4,41 $\pm$ 0,03 ^a	5,14 $\pm$ 0,03 ^a	4,81 $\pm$ 0,04 ^a	5,09 $\pm$ 0,03 ^a	5,01 $\pm$ 0,04 ^a
15	4,60 $\pm$ 0,03 ^a	4,81 $\pm$ 0,06 ^a	4,88 $\pm$ 0,04 ^a	4,63 $\pm$ 0,04 ^a	5,32 $\pm$ 0,04 ^a	5,24 $\pm$ 0,03 ^a
30	4,89 $\pm$ 0,06 ^b	5,13 $\pm$ 0,05 ^b	5,23 $\pm$ 0,04 ^b	4,78 $\pm$ 0,05 ^b	5,43 $\pm$ 0,05 ^b	5,67 $\pm$ 0,04 ^b
45	5,13 $\pm$ 0,07 ^c	5,54 $\pm$ 0,07 ^c	5,69 $\pm$ 0,07 ^c	5,31 $\pm$ 0,03 ^c	5,49 $\pm$ 0,05 ^c	5,96 $\pm$ 0,05 ^c
60	5,19 $\pm$ 0,08 ^c	5,75 $\pm$ 0,06 ^c	5,62 $\pm$ 0,03 ^c	5,34 $\pm$ 0,04 ^c	5,84 $\pm$ 0,06 ^c	6,06 $\pm$ 0,04 ^c
75	5,12 $\pm$ 0,05 ^c	5,71 $\pm$ 0,08 ^c	5,64 $\pm$ 0,05 ^c	5,22 $\pm$ 0,04 ^c	5,91 $\pm$ 0,05 ^c	6,01 $\pm$ 0,04 ^c
90	5,00 $\pm$ 0,07 ^b	5,73 $\pm$ 0,06 ^b	5,38 $\pm$ 0,02 ^b	5,19 $\pm$ 0,03 ^b	5,63 $\pm$ 0,04 ^b	5,91 $\pm$ 0,03 ^b

Podwyższenie pH z 11 do 12 zwiększało zawartość białka w natancie w całym zakresie temperatur, najsilniej przy 50 °C, a słabiej przy 30 °C i 40 °C. Wpływ temperatury był wyraźny: przejście z 30 °C do 40 °C podniosło uzysk o ok. 9–11% (w zależności od pH). Dalsze ogrzanie do 50 °C było korzystne przy pH 12, natomiast przy pH 11 nieznacznie pogarszało wynik.



Rycina 13. Wykres ekstrakcji białka z ostropestu w trakcie etapu I w funkcji czasu i temperatury dla zawartości białka [%], przedstawiony osobno dla pH 11 i pH 12. Puste symbole oznaczają pojedyncze pomiary (trzy powtórzenia), wypełnione symbole – wartości średnie $\pm$ SD. Krzywe przedstawiają dopasowane modele regresji drugiego stopnia. Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

Na podstawie uzyskanych rezultatów za warunki optymalne etapu I uznaje się pH 12, temperaturę 50 °C i czas 60 min. Jeżeli priorytetem są łagodniejsze warunki lub niższe koszty energetyczne, rozsądną alternatywą są warianty pH 12, 40 °C, 60–75 min lub pH 11, 40 °C, 60 min, przy stratach rzędu kilku procent względem maksimum.

Tabela 16. Wielkości wpływu efektów (pH, temperatura i czas, w różnych kombinacjach) na wynik ekstrakcji białek ostropestu w trakcie etapu I w wyrażone jako cząstkowe η^2p i ω^2 uzyskanych z trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Różnica między η^2p a ω^2 odzwierciedla stopień wzrostu wielkości efektów związany z cząstkowym η^2p . Interpretację wielkości efektu przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Cohena i Lakensa.

Efekt	η^2p	ω^2	$\eta^2p - \omega^2$	Interpretacja
pH	0,36	0,29	0,07	duży
temperatura	0,55	0,47	0,08	duży
czas	0,81	0,74	0,07	bardzo duży
pH × temperatura	0,07	0,03	0,04	mały–średni
pH × czas	0,23	0,17	0,06	duży
temperatura × czas	0,38	0,31	0,07	duży
pH × temperatura × czas	0,18	0,12	0,06	średni–duży

6.2.3.2. Etap II

W II etapie ekstrakcji uzysk rósł do 60–75 min, po czym stabilizował się lub nieznacznie zmalał (Tabela 17, Rycina 14).

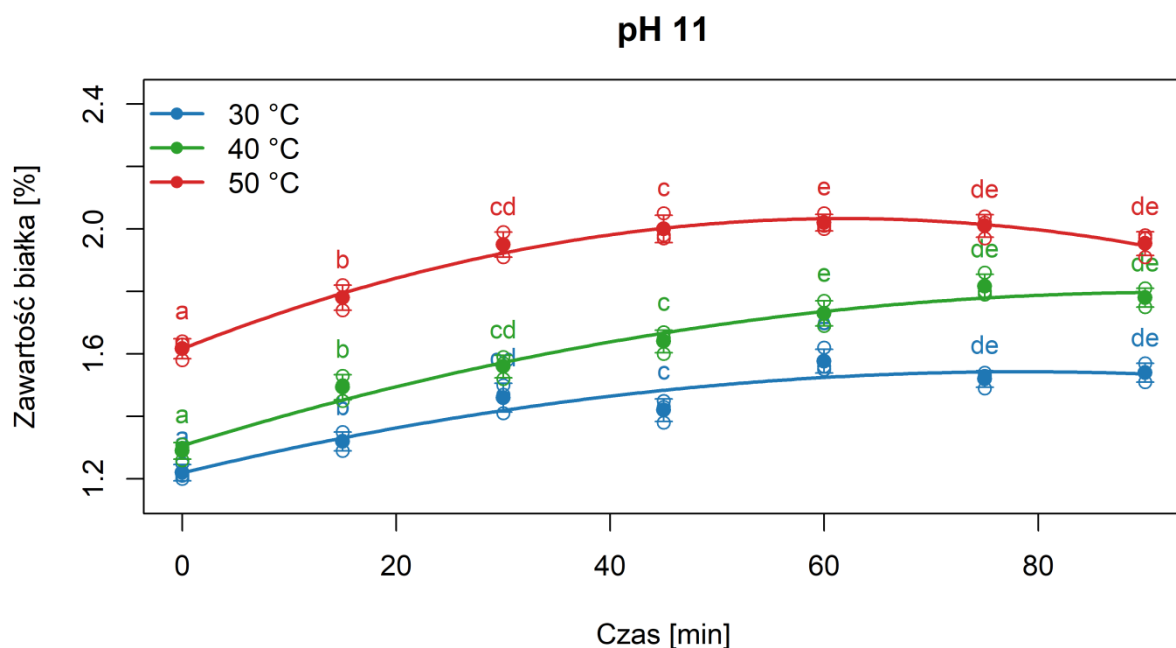
Tabela 17. Zawartość białka [%] w natancie podczas II etapu ekstrakcji białka ostropestu (średnia $\pm$ SD, n = 3). Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

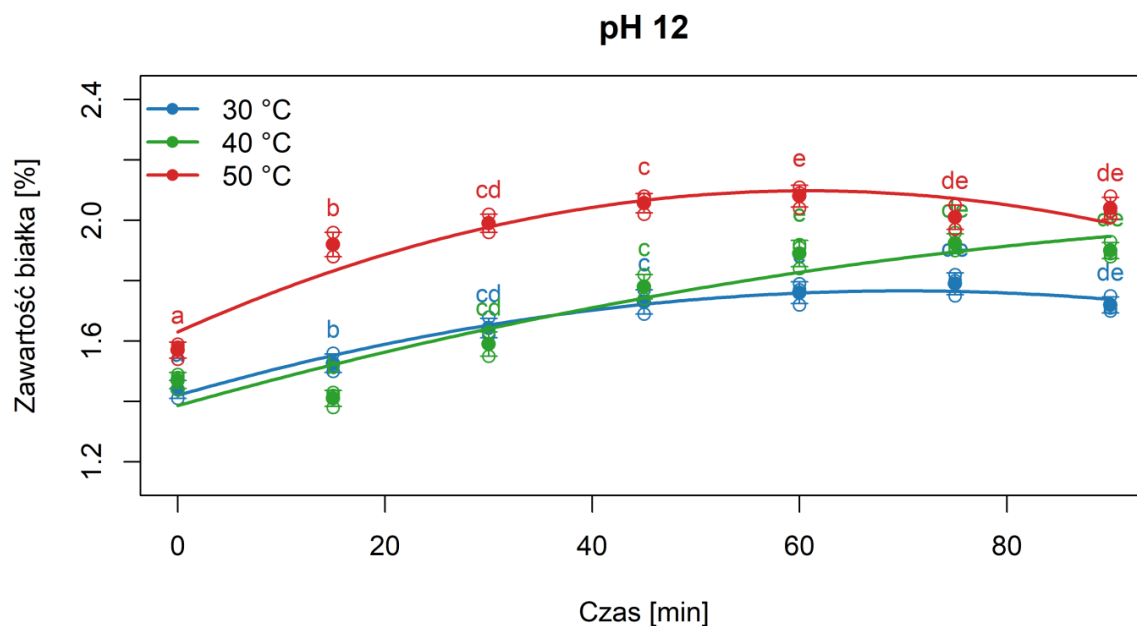
Czas [min]	pH=11			pH=12		
	30 °C	40 °C	50 °C	30 °C	40 °C	50 °C
0	1,22 $\pm$ 0,03 ^a	1,29 $\pm$ 0,03 ^a	1,62 $\pm$ 0,03 ^a	1,44 $\pm$ 0,03 ^a	1,47 $\pm$ 0,03 ^a	1,57 $\pm$ 0,03 ^a
15	1,32 $\pm$ 0,03 ^b	1,49 $\pm$ 0,04 ^b	1,78 $\pm$ 0,04 ^b	1,53 $\pm$ 0,03 ^b	1,41 $\pm$ 0,03 ^b	1,92 $\pm$ 0,04 ^b
30	1,46 $\pm$ 0,05 ^{cd}	1,56 $\pm$ 0,04 ^{cd}	1,95 $\pm$ 0,04 ^{cd}	1,64 $\pm$ 0,03 ^{cd}	1,59 $\pm$ 0,04 ^{cd}	1,99 $\pm$ 0,03 ^{cd}
45	1,42 $\pm$ 0,04 ^c	1,64 $\pm$ 0,04 ^c	2,00 $\pm$ 0,04 ^c	1,73 $\pm$ 0,04 ^c	1,78 $\pm$ 0,04 ^c	2,06 $\pm$ 0,03 ^c
60	1,58 $\pm$ 0,04 ^e	1,73 $\pm$ 0,04 ^e	2,02 $\pm$ 0,03 ^e	1,76 $\pm$ 0,04 ^e	1,89 $\pm$ 0,04 ^e	2,08 $\pm$ 0,04 ^e

	pH=11			pH=12		
Czas [min]	30 °C	40 °C	50 °C	30 °C	40 °C	50 °C
75	1,52 ± 0,03 ^{de}	1,82 ± 0,04 ^{de}	2,01 ± 0,04 ^{de}	1,79 ± 0,04 ^{de}	1,92 ± 0,03 ^{de}	2,01 ± 0,04 ^{de}
90	1,54 ± 0,03 ^{de}	1,78 ± 0,03 ^{de}	1,95 ± 0,04 ^{de}	1,72 ± 0,03 ^{de}	1,90 ± 0,03 ^{de}	2,04 ± 0,04 ^{de}

Maksymalną zawartość białka w natancie uzyskano po 60 min dla pH 12 i temperatury 50 °C. Podniesienie pH z 11 do 12 zwiększało odzysk w całym zakresie temperatur, przy czym efekt był tym silniejszy, im niższa była temperatura. Temperatura działała korzystnie w sposób monotoniczny: przejście z 30 °C do 50 °C (dla 60 min) podniosło uzysk o 27,8% przy pH 11 i o 18,2% przy pH 12.

Za warunki optymalne dla etapu II ekstrakcji uznaje się pH 12, temperaturę 50 °C i czas 60 min.





Rycina 14. Wykres ekstrakcji białka z ostropestu w trakcie etapu II w funkcji czasu i temperatury dla zawartości białka [%], przedstawiony osobno dla pH 11 i pH 12. Puste symbole oznaczają pojedyncze pomiary (trzy powtórzenia), wypełnione symbole – wartości średnie $\pm$ SD. Krzywe przedstawiają dopasowane modele regresji drugiego stopnia. Różne litery (w obrębie tej samej temperatury) oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi (HSD Tukeya, $p < 0,05$). ANOVA ($p < 0,05$).

Tabela 18. Wielkości wpływu efektów (pH, temperatura i czas, w różnych kombinacjach) na wynik ekstrakcji białek ostropestu w trakcie etapu II w wyrażone jako cząstkowe η^2p i ω^2 uzyskanych z trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Różnica między η^2p a ω^2 odzwierciedla stopień wzrostu wielkości efektów związany z cząstkowym η^2p . Interpretację wielkości efektu przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Cohena i Lakensa.

Efekt	η^2p	ω^2	$\eta^2p - \omega^2$	Interpretacja
pH	0,34	0,27	0,07	duży
temperatura	0,53	0,46	0,07	duży
czas	0,79	0,72	0,07	bardzo duży
pH $\times$ temperatura	0,08	0,04	0,04	średni
pH $\times$ czas	0,22	0,16	0,06	duży
temperatura $\times$ czas	0,36	0,29	0,07	duży
pH $\times$ temperatura $\times$ czas	0,17	0,11	0,06	średni–duży

6.2.3.3. Etap III i IV

Wyniki oznaczeń zawartości białka oraz suchej masy w osadzie uzyskanym w etapie III przedstawiono w Tabeli 19. Oczyszczanie frakcji białkowej przeprowadzone w etapie IV pozwoliło uzyskać koncentrat o wyraźnie podwyższonej czystości białkowej. Zawartość białka w próbce wzrosła z $18,77 \pm 0,33\%$ do $25,23 \pm 0,30\%$, a sucha masa z $25,66 \pm 0,42\%$ do $30,51 \pm 0,34\%$. Zawartość białka w suchej masie zwiększyła się z $73,15 \pm 1,76\%$ do $82,68 \pm 1,35\%$.

W produkcie po etapie IV udział cukrów był śladowy ($0,49 \pm 0,03\%$ s.m.), natomiast zawartość tłuszczu wynosiła $8,06 \pm 0,25\%$ s.m. Niska zawartość składników niebiałkowych przy $\sim 83\%$ udziale białka potwierdza skuteczne doczyszczenie i koncentrację frakcji białkowej. Sumaryczna wydajność procesu wyniosła $51,8 \pm 0,8\%$.

Tabela 19. Skład biochemiczny ekstraktów białkowych z ostropestu po etapie III i IV (średnia $\pm$ SD, n = 3).

	Białko (%)	Sucha masa (%)	Zawartość białka w suchej masie (%)	Zawartość cukrów w suchej masie (%)	Zawartość tłuszczu w suchej masie (%)
etap III	$18,77 \pm 0,33$	$25,66 \pm 0,42$	$73,15 \pm 1,76$	-	-
etap IV	$25,23 \pm 0,30$	$30,51 \pm 0,34$	$82,68 \pm 1,35$	$0,49 \pm 0,03$	$8,06 \pm 0,25$

6.3. Analizy *in silico* wyekstrahowanych białek

6.3.1. Rzepak

Rozdział frakcji białkowej nasion rzepaku metodą dwuwymiarowej elektroforezy (2D-PAGE) pozwolił uzyskać złożony wzór plamek białkowych, spośród których 50 spotów wyselekcjonowano do dalszej identyfikacji. W zbiorze spotów poddanych analizie większość (26) odpowiadała różnym podjednostkom i izoformom krucyferyny, co wskazuje na wysoki stopień heterogeniczności oraz obecność modyfikacji potranslacyjnych tego głównego białka zapasowego. Zidentyfikowano również pojedyncze białko typu wicyliny (globulina 7S), rzadko opisywane u kapustowatych, oraz szereg białek pełniących funkcje metaboliczne, obronne i strukturalne (m.in. enzymy dehydrogenazowe, mirozynaza, lektyny

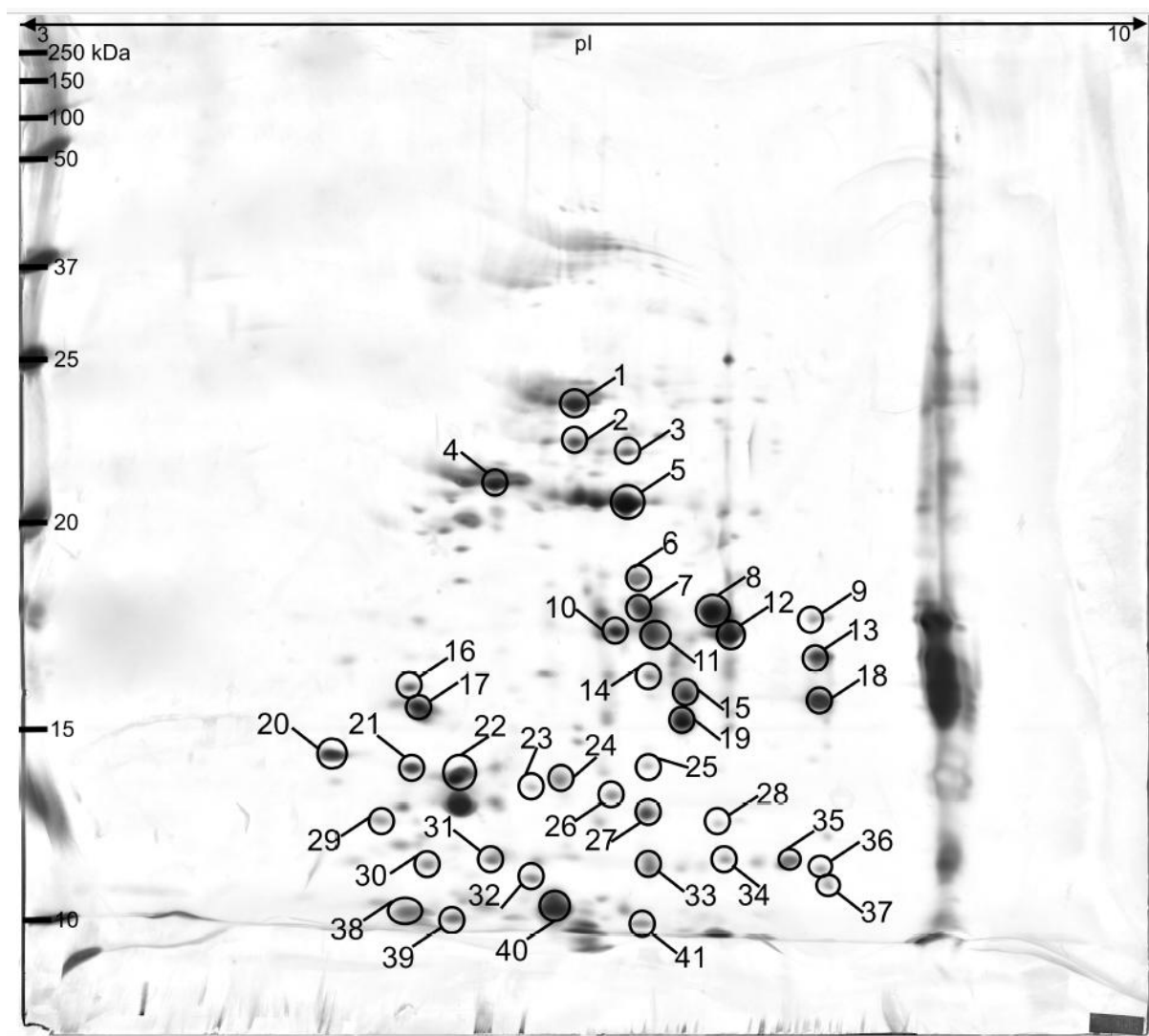
typu jacalin, mitochondrialna Mn-dysmutaza nadadtlenkowa oraz oleozyny ciałek olejowych).

Analiza *in silico* w bazie BIOPEP, przeprowadzona dla hydrolizatów uzyskanych z użyciem papainy, bromelainy i ficyny, wykazała wysoką zdolność badanych białek do generowania bioaktywnych peptydów. Najwyższą liczbę peptydów, w tym bioaktywnych, uzyskano po trawieniu bromelainą. Łącznie opisano 39 typów aktywności biologicznej, przy czym typowy hydrolizat zawierał peptydy reprezentujące kilkanaście funkcji. Najliczniej występowały peptydy o aktywności inhibitorów ACE i DPP IV oraz o działaniu przeciwutleniającym, natomiast rzadziej, lecz istotne biologicznie, były sekwencje o potencjale przeciwnowotworowym, przeciwbakteryjnym oraz inhibitory kluczowych enzymów (m.in. syntazy tymidylanowej, reduktazy HMG-CoA, fosfolipazy A₂). Szczegółowe profile przewidywanych aktywności peptydów bioaktywnych, powstających w wyniku *in silico* trawienia enzymatycznego zidentyfikowanych białek rzepaku, zilustrowano na mapie cieplnej.

Przedstawione wyniki stanowią syntetyczne ujęcie badań szczegółowo omówionych w pracy Garbacz i in. (2025).

6.3.2. Słonecznik

Rozdział frakcji białkowej nasion słonecznika techniką 2D PAGE przedstawiono na Rycinie 15. Na obrazie żelu wyróżniono 41 spotów, które zidentyfikowano metodą spektrometrii mas; zestawienie danych identyfikacyjnych podano w Tabeli 20.



Rycina 15. Żel 2D-PAGE białek z makucha słonecznikowego.

Uzyskany profil rozdziału wskazuje na wyraźną dominację różnych form 11S globuliny nasiennej G (11S3_HELAN) przypisano łącznie 38 z 41 spotów (m.in. nr 1–5, 7–15, 17–37, 39–41). Poza białkami zapasowymi wykryto niewielką liczbę białek funkcjonalnych – aktynę (spoty 16, 38) oraz chloroplastowe białko S13 rybosomu 30S (spot 6). Identyfikacja białek przypisanych do gatunku *A. thaliana* wynika z wykorzystania tego organizmu jako najlepiej scharakteryzowanego modelu referencyjnego oraz z wysokiego stopnia konserwacji sekwencji peptydowych białek cytoszkieletu i rybosomalnych, które w procedurze dopasowywania są wiązane przez algorytmy z najpełniej opisanymi homologami dostępnymi w bazach danych. Uzyskane wyniki potwierdzają, że proteom badanej frakcji nasion *H. annuus* jest silnie zdominowany przez

białka zapasowe z rodziny 11S, uzupełnione przez nieliczne białka strukturalne i elementy aparatu translacyjnego.

Tabela 20. Białka zidentyfikowane w makuchu słonecznikowym metodą MALDI-TOF.

Nr spotu	Nazwa białka	Nazwa UniProt	Gatunek	Masa	pI
1	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	23,3	6,4
2	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	22,2	6,4
3	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	22,0	6,9
4	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	21,1	5,8
5	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	20,8	6,9
6	30S ribosomal protein S13, chloroplastic	RR13_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	18,2	7,0
7	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	17,5	7,0
8	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	17,4	7,4
9	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	17,2	8,1
10	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	17,0	6,8
11	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	16,9	7,1
12	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	16,9	7,5
13	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	16,5	8,1

Nr spotu	Nazwa bialka	Nazwa UniProt	Gatunek	Masa	pI
14	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	16,1	7,1
15	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	15,8	7,2
16	Actin-1	ACT_ ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	15,9	5,1
17	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	15,5	5,2
18	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	15,6	8,1
19	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	15,2	7,2
20	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	14,5	4,8
21	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	14,3	5,1
22	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	14,0	5,6
23	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	13,8	6,0
24	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	14,0	6,3
25	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	14,2	7,1
26	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	13,5	6,8
27	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	13,1	7,1
28	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	13,0	7,4

Nr spotu	Nazwa białka	Nazwa UniProt	Gatunek	Masa	pI
29	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	13,0	5,0
30	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	11,8	5,5
31	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	11,9	5,8
32	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	11,5	6,1
33	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	11,8	7,1
34	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	11,9	7,5
35	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	11,9	8,0
36	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	11,7	8,1
37	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	11,2	8,2
38	Actin-1	ACT_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	10,1	5,2
39	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	9,8	5,6
40	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	10,2	6,4
41	11S globulin seed storage protein G3	11S3_HELAN	<i>Helianthus annuus</i>	9,8	7,0

Każdą z sekwencji białkowych zidentyfikowanych w analizie proteomicznej poddano następnie proteolizie *in silico* w bazie BIOPEP, z wykorzystaniem modułu „Enzyme(s) action” (papaina, bromelaina, ficyna), a uzyskane profile peptydowe

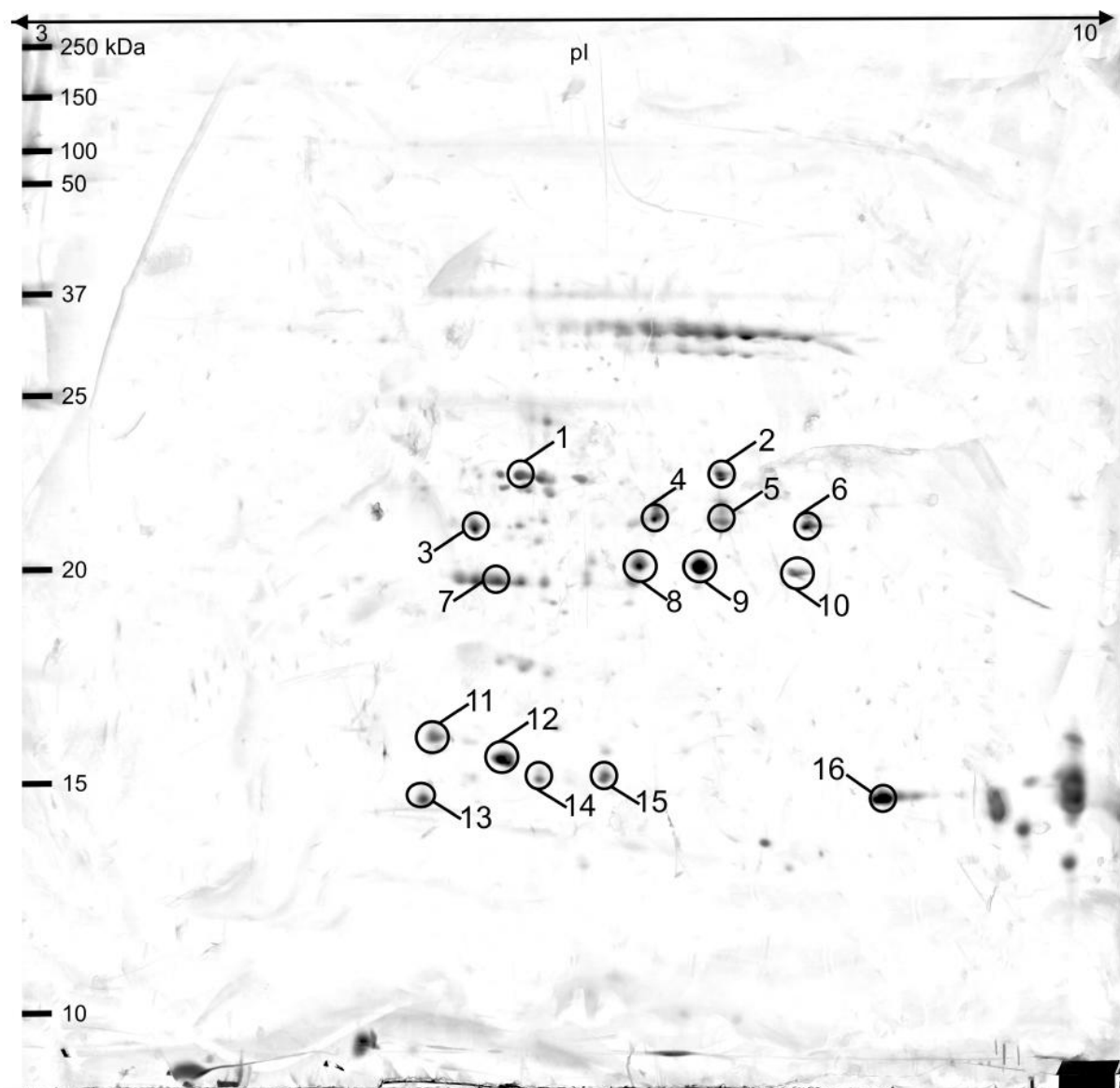
analizowano narzędziem „Search for active fragments” w celu wyodrębnienia potencjalnie bioaktywnych fragmentów.

Dominującym składnikiem proteomu badanej frakcji białkowej była 11S globulina G3 (11S3_HELAN), której przypisano 38 z 41 zidentyfikowanych plamek na żelu 2D-PAGE. W konsekwencji to właśnie hydroliza 11S3_HELAN w największym stopniu determinowała uzyskany profil peptydowy i stanowiła podstawowy punkt odniesienia dla oceny potencjału bioaktywnego. Trawienie 11S3_HELAN papainą generowało 207 peptydów, z czego 133 zaklasyfikowano jako bioaktywne; w przypadku ficyny otrzymano 243 peptydy (103 bioaktywne), a bromelainy – 296 peptydów (129 bioaktywnych). Dla porównania, hydroliza aktyny-1 (ACT1_ARATH) dawała niższe wartości: odpowiednio 145 (52 bioaktywne) po papainie, 151 (83 bioaktywne) po ficynie oraz 174 (97 bioaktywnych) po bromelainie. Najmniej wydajnym prekursorem peptydów okazało się białko RR13_ARATH, które w zależności od zastosowanej proteazy generowało 88–104 peptydy, z czego jedynie 20–24 uznano za bioaktywne. W skali całego analizowanego zestawu białek bromelaina wytwarzała najwyższą liczbę peptydów ogółem i bioaktywnych (odpowiednio 574 i 246), w porównaniu z ficyną (489 i 210) oraz papainą (440 i 208) (Tabela 21).

Tabela 21. Łączna liczba peptydów oraz peptydów bioaktywnych uzyskanych w wyniku *in silico* hydrolizy białek słonecznika przy użyciu papainy, ficyny i bromelainy (analiza w bazie BIOPEP).

Białko	Peptydy ogółem (papaina)	Peptydy bioaktywne (papaina)	Peptydy ogółem (ficyna)	Peptydy bioaktywne (ficyna)	Peptydy ogółem (bromelaina)	Peptydy bioaktywne (bromelaina)
11S3_HELAN	207	133	243	103	296	129
ACT1_ARATH	145	52	151	83	174	97
RR13_ARATH	88	23	95	24	104	20
w sumie	440	208	489	210	574	246

Na podstawie analizy produktów trawienia globuliny 11S (11S3_HELAN) wykazano wysoką różnorodność funkcjonalną generowanych peptydów: po zastosowaniu papainy i ficyny przewidywano obecność 23, a po bromelainie 22 odrębnych typów



Rycina 17. Żel 2D-PAGE białek z makucha z ostropestu.

Ze względu na ograniczoną reprezentację sekwencji *S. marianum* w dostępnych bazach danych oraz wysoką konserwatywność białek zapasowych u roślin dwuliściennych, uzyskane widma peptydów zostały automatycznie dopasowane do najlepiej scharakteryzowanych homologów z *Arabidopsis thaliana* lub *Brassica napus*. Takie przypisania odzwierciedlają relacje homologiczne oraz większą gęstość adnotacji w genomach referencyjnych; nazwy gatunków podane w tabeli należy zatem traktować jako etykiety najbliższych homologów, a nie rzeczywistego pochodzenia gatunkowego białek ostropestu.

Profil 2D wskazuje, że dominującą grupę stanowią białka zapasowe typu 11S/12S – łącznie 15 z 16 spotów – reprezentowane przez różne izoformy krucyferyny. Jedyny

pozostały spot odpowiada białku związanym z ciałkami olejowymi (Oil body associated protein 1A; spot nr 7). Rozmieszczenie plamek w zakresie mas cząsteczkowych ~15–25 kDa oraz obecność sygnału ~35–37 kDa są zgodne z proteolitycznym rozdzieleniem prekursora 11S na łańcuch zasadowy i kwaśny.

Tabela 22. Białka zidentyfikowane w makuchu z ostropestu metodą MALDI-TOF.

Nr spotu	Nazwa białka	Nazwa UniProt	Gatunek	Masa	pI
1	Cruciferin CRU1	CRU3_BRANA	<i>Brassica napus</i>	23,0	6,0
2	Cruciferin CRU1	CRU3_BRANA	<i>Brassica napus</i>	23,0	7,6
3	Cruciferin CRU1	CRU3_BRANA	<i>Brassica napus</i>	21,1	5,7
4	Cruciferin CRU1	CRU3_BRANA	<i>Brassica napus</i>	21,2	7,2
5	Cruciferin CRU1	CRU3_BRANA	<i>Brassica napus</i>	21,2	7,6
6	Cruciferin BnC1	CRU1_BRANA	<i>Brassica napus</i>	21,1	8,2
7	Oil body-associated protein 1A	OBP1A_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20,0	5,8
8	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	20,1	7,1
9	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	20,1	7,4
10	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	20,0	8,1
11	Cruciferin	CRUA_BRANA	<i>Brassica napus</i>	16,1	5,4
12	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	15,8	5,9

Nr spotu	Nazwa białka	Nazwa UniProt	Gatunek	Masa	pI
13	12S seed storage protein CRD	CRU4_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	14,8	5,1
14	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	15,0	6,1
15	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	15,0	6,8
16	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	14,8	8,8

Zidentyfikowane w ekstrakcie ostropestowym białka poddano proteolizie *in silico* w BIOPEP, stosując moduł „Enzyme(s) action” dla papainy, bromelainy i ficyny oraz przesiew „Search for active fragments”. Tabela 23 przedstawia łączną liczbę otrzymanych peptydów i peptydów sklasyfikowanych jako bioaktywne. Spośród trzech zastosowanych proteaz najwyższą wydajność w generowaniu bioaktywnych fragmentów uzyskano dla papainy: 1 087 peptydów ogółem, z czego 704 sklasyfikowano jako bioaktywne. Dla ficyny odnotowano 1 133 peptydy (519 bioaktywnych), a dla bromelainy 1 152 peptydy (660 bioaktywnych).

Tabela 23. Łączna liczba peptydów oraz peptydów bioaktywnych uzyskanych w wyniku *in silico* hydrolizy białek ostropestu przy użyciu papainy, ficyny i bromelainy (analiza w bazie BIOPEP).

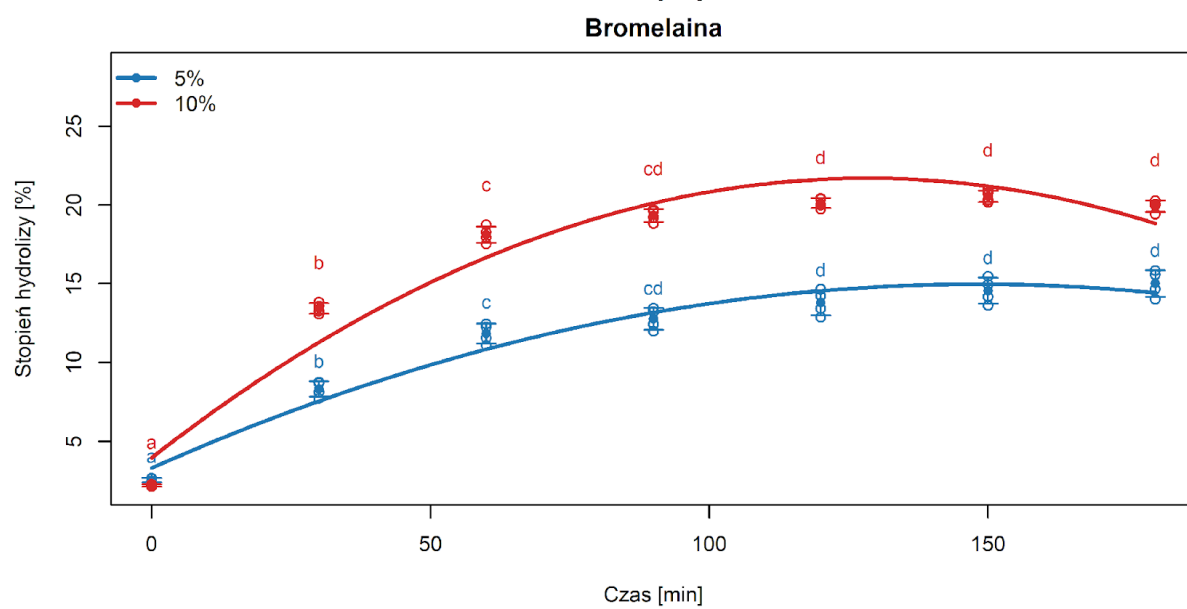
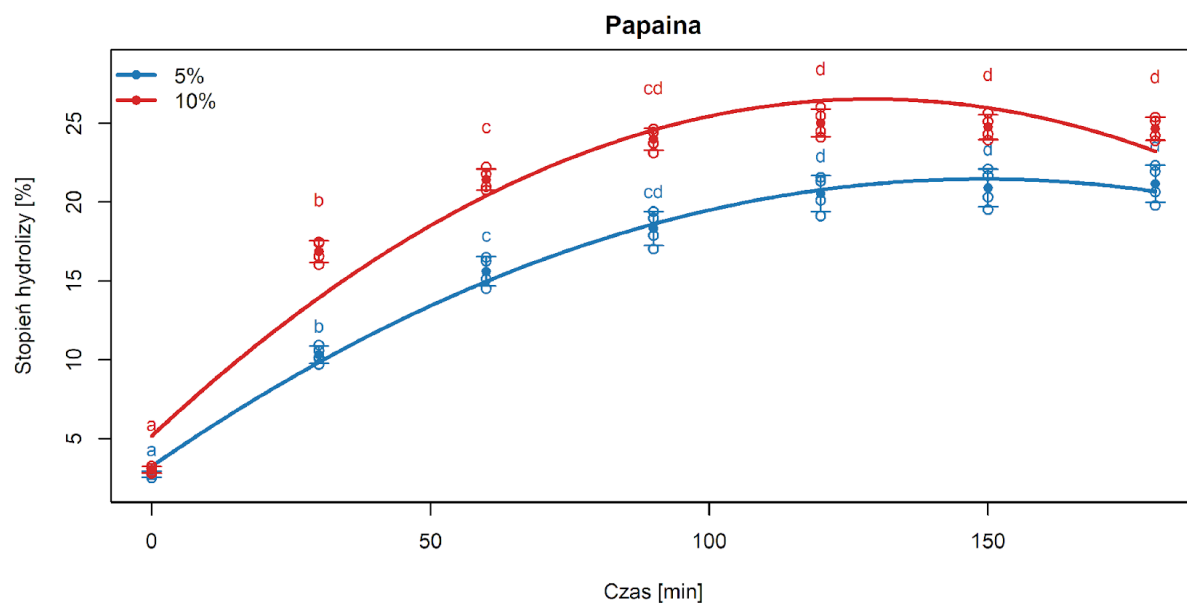
Białko	Peptydy ogółem (papaina)	Peptydy bioaktywne (papaina)	Peptydy ogółem (ficyna)	Peptydy bioaktywne (ficyna)	Peptydy ogółem (bromelaina)	Peptydy bioaktywne (bromelaina)
CRU3_BRANA	215	125	218	76	222	77
CRU1_BRANA	211	150	213	115	216	149
OBP1A_ARATH	83	36	88	59	91	53
CRU4_BRANA	197	142	204	98	207	133

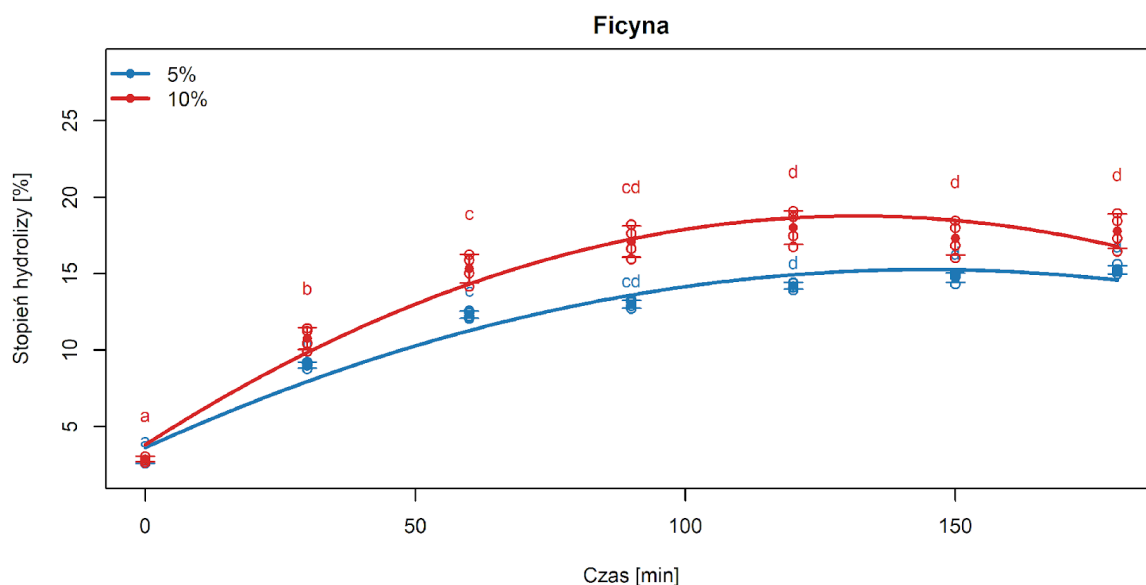
Białko	Peptydy ogółem (papaina)	Peptydy bioaktywne (papaina)	Peptydy ogółem (ficyna)	Peptydy bioaktywne (ficyna)	Peptydy ogółem (bromelaina)	Peptydy bioaktywne (bromelaina)
CRU4_ARATH	170	100	197	48	200	107
CRUA_BRANA	211	151	213	123	216	141
w sumie	1087	704	1133	519	1152	660

Hydrolizaty uzyskane z białek ostropestu wykazywały szerokie spektrum potencjalnych funkcji bioaktywnych, obejmujące łącznie 33 typy bioaktywności (Rycina 18). Średnio każdy hydrolizat zawierał peptydy reprezentujące 12–17 różnych klas aktywności. Nawet substrat dający najmniejszą liczbę bioaktywnych fragmentów (76 peptydów w przypadku białka CRU3_BRANA trawionego ficyną) charakteryzował się obecnością 10 typów aktywności, podczas gdy najbardziej zróżnicowane spektrum – do 23 typów – stwierdzono w hydrolizatach białek CRU4_BRANA i CRUA_BRANA. Potwierdza to zależność między liczbą generowanych fragmentów a różnorodnością ich potencjalnych właściwości.

Analogicznie jak w przypadku białek rzepaku i słonecznika, we wszystkich analizowanych hydrolizatach najczęściej identyfikowano peptydy o aktywności inhibitorów konwertazy angiotensyny I (ACE), inhibitorów dipeptydylopeptydazy IV (DPP IV) oraz o działaniu przeciwutleniającym. Przykładowo, w hydrolizacie białka CRU1_BRANA po trawieniu papainą spośród 150 peptydów bioaktywnych 62 wykazywały aktywność inhibitorów DPP IV, 51 – inhibitorów ACE, a 3 charakteryzowały się aktywnością antyoksydacyjną. Często obserwowano również peptydy działające jako inhibitory reniny, neuropeptydy oraz inhibitory DPP III.

Rzadziej stwierdzane, lecz potencjalnie istotne z farmakologicznego punktu widzenia, były inne klasy aktywności, zwykle reprezentowane przez pojedyncze sekwencje. Należały do nich m.in. funkcje immunostymulujące, przeciwzapalne i regulujące, jak również sporadyczne przypadki aktywności przeciwnowotworowej (pojedyncze sekwencje w hydrolizatach OBP1A_ARATH) oraz inhibitory enzymów metabolicznych (np. syntazy tymidylanowej, lipazy trzustkowej). Pomimo ich niewielkiej liczebności (zwykle 1–2 peptydy na hydrolizat), obecność tych motywów wskazuje, że białka ostropestu mogą stanowić źródło nie tylko dominujących klas peptydów (inhibitorów ACE, DPP IV i





Rycina 19 . Kinetyka stopnia hydrolizy (DH, %) białek rzepaku w czasie (0–180 min) dla papainy, bromelainy i ficyny przy dawkach 5% i 10% (m/m). Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SD ($n = 4$). Różne litery oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi w obrębie tego samego enzymu i stężenia, zgodnie z testem HSD Tukeya ($p < 0,05$). Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

W przypadku białek rzepaku tempo hydrolizy było najwyższe w pierwszych 60–90 min reakcji, po czym wyraźnie się obniża i ustabilizowało w przedziale 120–180 min (Tabela 24, Rycina 19). Najwyższą skuteczność uzyskano dla papainy w stężeniu 10% (m/m), dla której stopień hydrolizy (DH) osiągał $25,02 \pm 0,87\%$ w 120 min i utrzymywał się na zbliżonym poziomie do końca doświadczenia. Redukcja dawki papainy do 5% obniżała DH do $20,53 \pm 1,14\%$ w 120 min; w przedziale 150–180 min obserwowano jedynie niewielki przyrost, co wskazuje na osiągnięcie plateau około 120 min. Dla bromelainy wartości DH były niższe i silniej zależne od dawki enzymu. Stężenie 10% pozwalało osiągnąć $20,12 \pm 0,32\%$ w 120 min i maksimum około 150 min ($20,54 \pm 0,36\%$), natomiast 5% prowadziło do powolnego wzrostu DH do $15,02 \pm 0,84\%$ w 180 min. Ficyna była najmniej efektywna: przy stężeniu 10% uzyskiwano $18,00 \pm 1,09\%$ w 120 min (bez dalszych istotnych zmian), a dawka 5% skutkowała powolnym wzrostem do $15,25 \pm 0,28\%$ w 180 min.

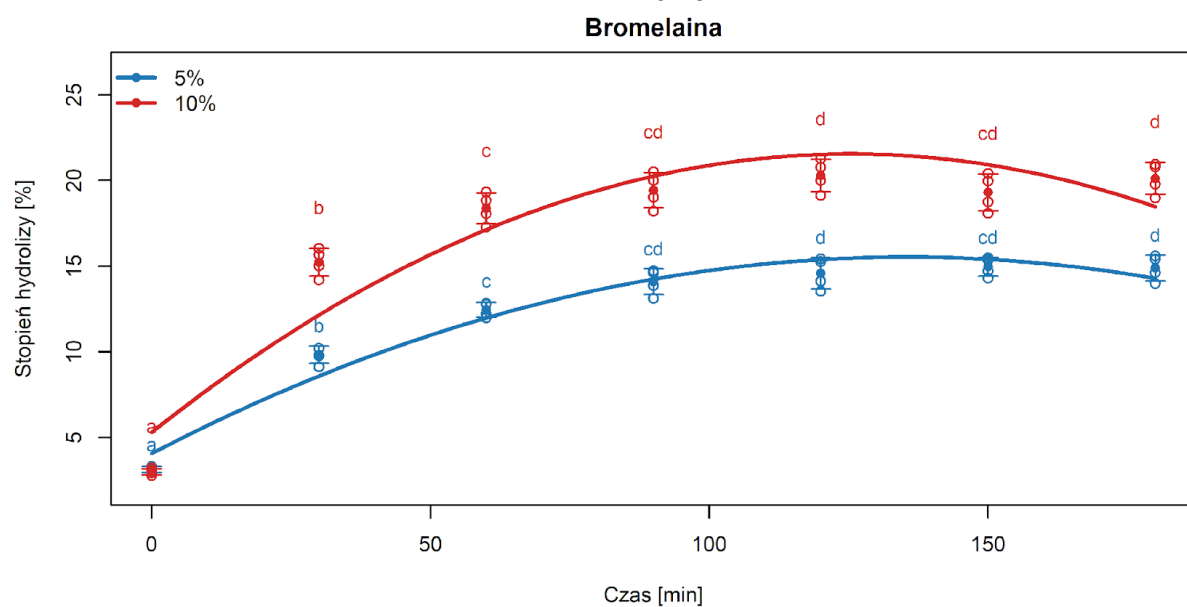
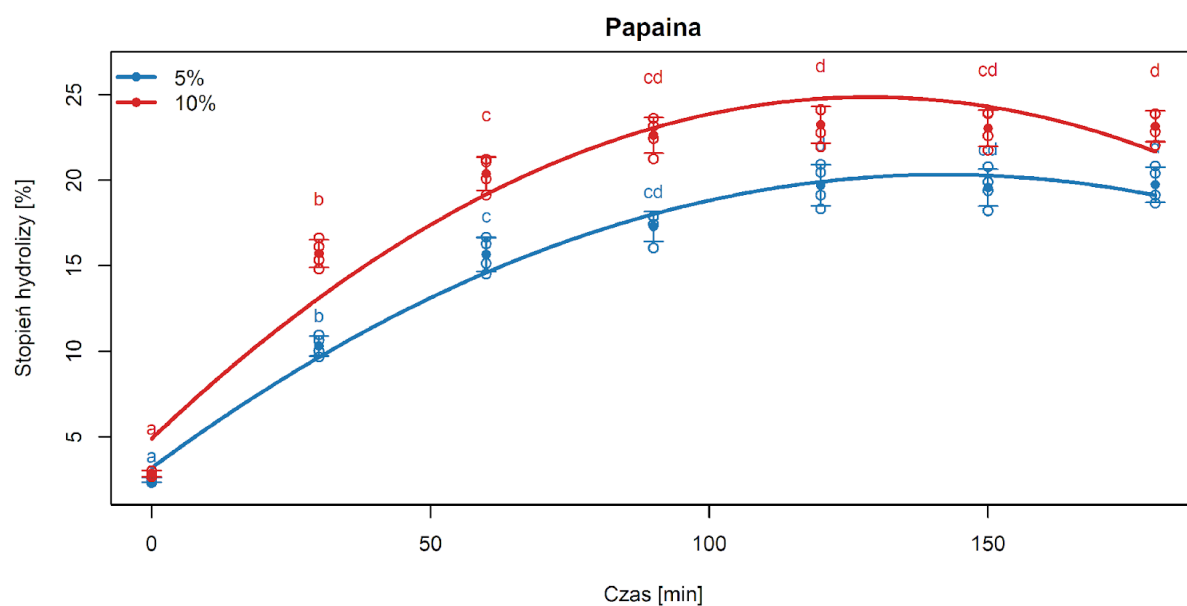
Tabela 24. Stopień hydrolizy (DH, %) białek rzepaku po 0–180 min dla papainy, bromelainy i ficyny (5% i 10% m/m) (średnia $\pm$ SD, n = 4). Różne litery oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi w obrębie tego samego enzymu i stężenia, zgodnie z testem HSD Tukeya ($p < 0,05$). Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

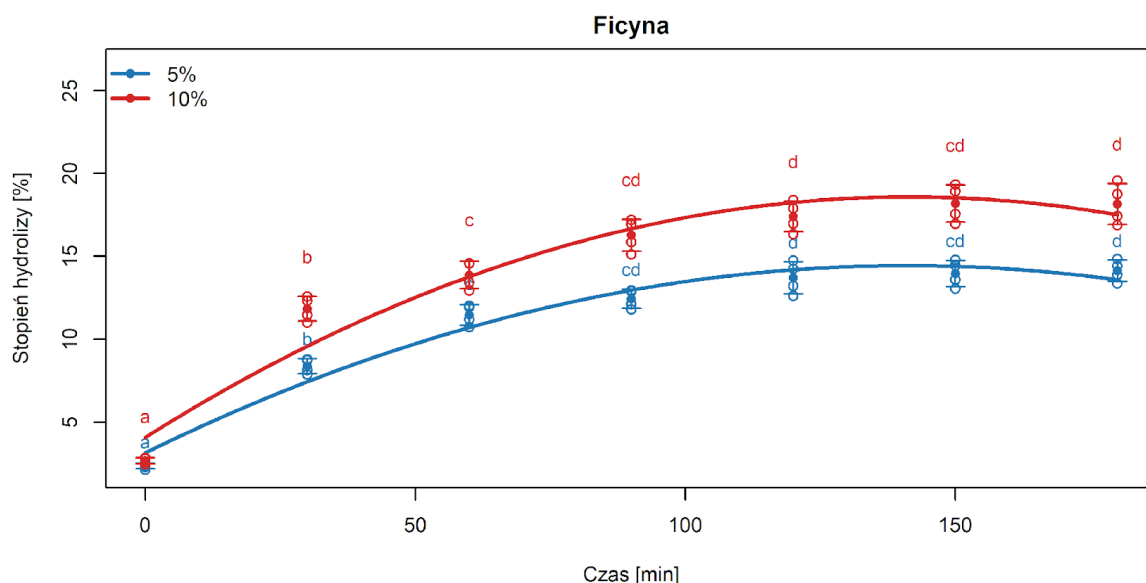
	papaina		bromelaina		ficyna	
Czas [min]	5%	10%	5%	10%	5%	10%
0	2,74 $\pm$ 0,19 ^a	3,01 $\pm$ 0,21 ^a	2,53 $\pm$ 0,15 ^a	2,21 $\pm$ 0,07 ^a	2,65 $\pm$ 0,07 ^a	2,88 $\pm$ 0,18 ^a
30	10,32 $\pm$ 0,54 ^b	16,86 $\pm$ 0,70 ^b	8,32 $\pm$ 0,49 ^b	13,43 $\pm$ 0,33 ^b	9,02 $\pm$ 0,19 ^b	10,75 $\pm$ 0,72 ^b
60	15,59 $\pm$ 0,93 ^c	21,43 $\pm$ 0,68 ^c	11,83 $\pm$ 0,63 ^c	18,11 $\pm$ 0,51 ^c	12,31 $\pm$ 0,23 ^c	15,32 $\pm$ 0,94 ^c
90	18,32 $\pm$ 1,07 ^{cd}	23,98 $\pm$ 0,69 ^{cd}	12,77 $\pm$ 0,68 ^{cd}	19,34 $\pm$ 0,40 ^{cd}	13,00 $\pm$ 0,25 ^{cd}	17,09 $\pm$ 1,01 ^{cd}
120	20,53 $\pm$ 1,14 ^d	25,02 $\pm$ 0,87 ^d	13,80 $\pm$ 0,80 ^d	20,12 $\pm$ 0,32 ^d	14,20 $\pm$ 0,23 ^d	18,00 $\pm$ 1,09 ^d
150	20,90 $\pm$ 1,19 ^d	24,75 $\pm$ 0,78 ^d	14,56 $\pm$ 0,82 ^d	20,54 $\pm$ 0,36 ^d	14,74 $\pm$ 0,31 ^d	17,32 $\pm$ 1,10 ^d
180	21,17 $\pm$ 1,17 ^d	24,66 $\pm$ 0,72 ^d	15,02 $\pm$ 0,84 ^d	19,92 $\pm$ 0,36 ^d	15,25 $\pm$ 0,28 ^d	17,77 $\pm$ 1,13 ^d

Z punktu widzenia optymalizacji procesu dla białek rzepaku warunki zapewniające najwyższy stopień hydrolizy to: papaina w stężeniu 10% i czas hydrolizy 120 min. W sytuacjach wymagających ograniczenia zużycia enzymu rozsądną alternatywę stanowi papaina 5% przy wydłużeniu inkubacji do 150–180 min. Bromelaina 10% po 120–150 min zapewnia efekt porównywalny z papainą 5%, lecz istotnie niższy niż papaina 10%. Ficyna, niezależnie od dawki, pozostaje enzymem o najniższej efektywności w stosunku do białek rzepaku.

6.4.2. Słonecznik

W przypadku hydrolizy białek słonecznika najszybszy przyrost DH występował w pierwszej godzinie reakcji, po czym we wszystkich układach obserwowano wyraźne spowolnienie i plateau w zakresie 120–180 min (Tabela 25, Rycina 20).





Rycina 20. Kinetka stopnia hydrolizy (DH, %) białek słonecznika w czasie (0–180 min) dla papainy, bromelainy i ficyny przy dawkach 5% i 10% (m/m). Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SD ($n = 4$). Różne litery oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi w obrębie tego samego enzymu i stężenia, zgodnie z testem HSD Tukeya ($p < 0,05$). Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

Najwyższe wartości stopnia hydrolizy odnotowano dla papainy w stężeniu 10%: $23,23 \pm 1,07\%$ w 120 min, bez istotnych zmian do 180 min. Zmniejszenie dawki do 5% obniżało efekt do $19,70 \pm 1,20\%$ w 120 min, a dodatkowe 30–60 min inkubacji nie przynosiło praktycznej poprawy. Bromelaina była mniej wydajna, choć zwiększenie stężenia z 5% do 10% wyraźnie poprawiało wyniki. Dawka 10% pozwalała uzyskać $20,30 \pm 0,94\%$ w 120 min (wartość ta utrzymywała się w kolejnych pomiarach), podczas gdy przy 5% plateau ustalało się na poziomie 14,59–14,97% w 120–150 min. Ficyna charakteryzowała się najniższą skutecznością: przy 10% osiągnęto $17,40 \pm 0,92\%$ w 120 min, z nieznacznym wzrostem do $18,19 \pm 1,12\%$ w 150 min i bez dalszych zmian do 180 min; przy 5% wartości DH utrzymywały się w przedziale 13,70–14,12% w okresie 120–180 min.

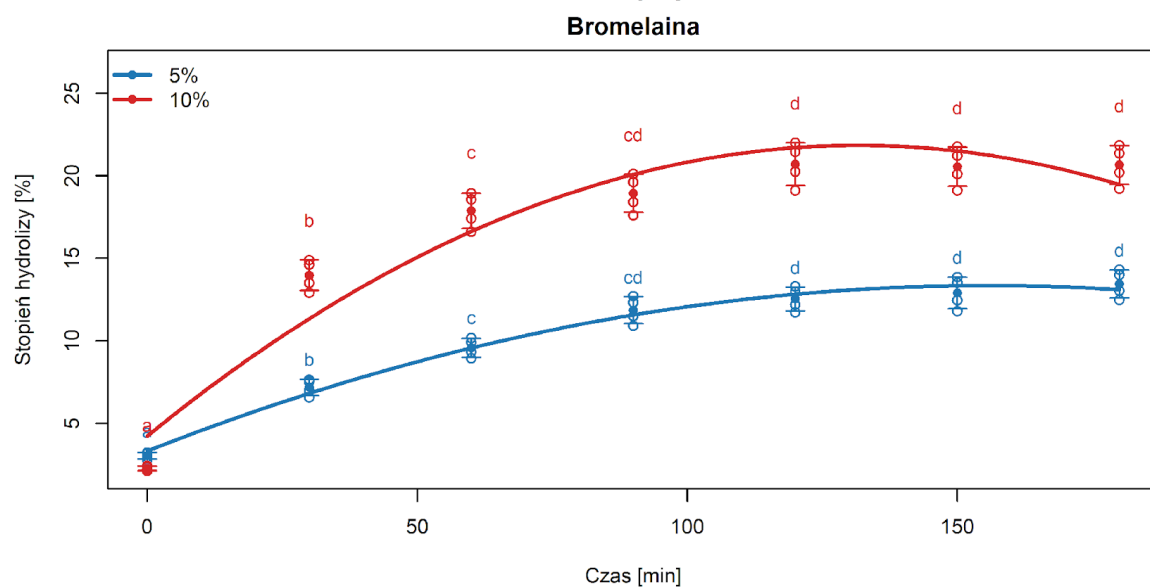
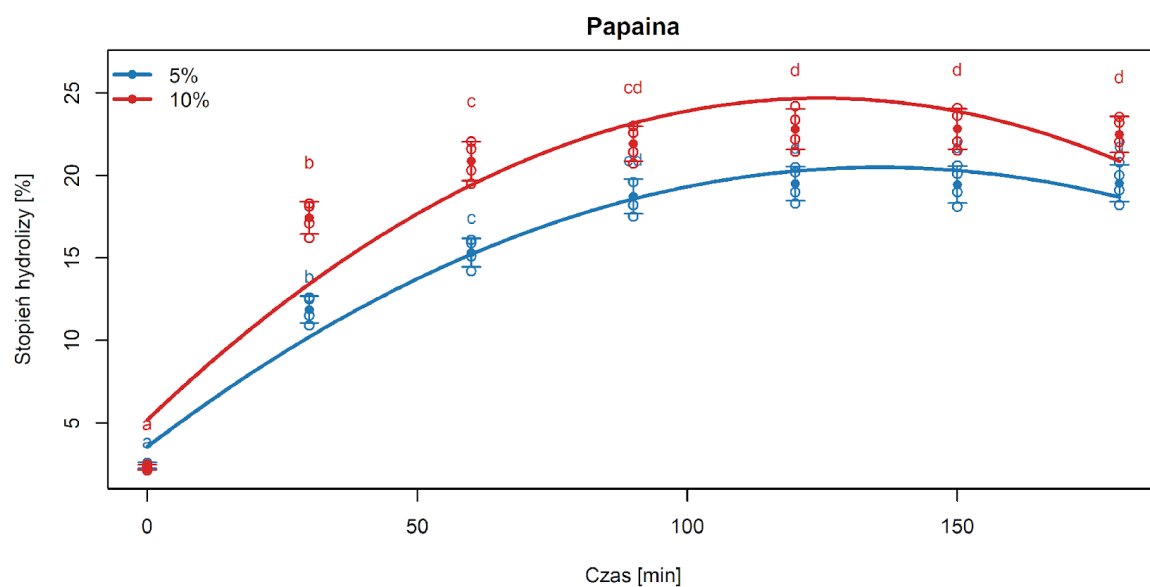
Tabela 25. Stopień hydrolizy (DH, %) białek słonecznika po 0–180 min dla papainy, bromelainy i ficyny (5% i 10% m/m) (średnia $\pm$ SD, (n = 4). Różne litery oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi w obrębie tego samego enzymu i stężenia, zgodnie z testem HSD Tukeya ($p < 0,05$). Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

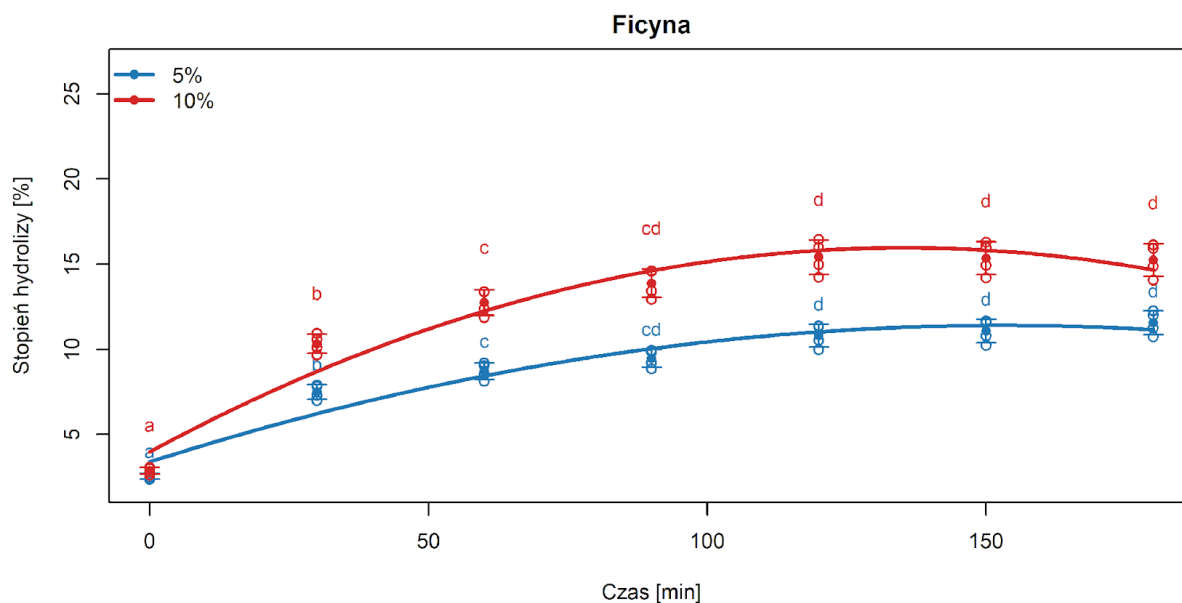
	papaina		bromelaina		ficyna	
Czas [min]	5%	10%	5%	10%	5%	10%
0	2,49 $\pm$ 0,13 ^a	2,87 $\pm$ 0,18 ^a	3,13 $\pm$ 0,17 ^a	2,99 $\pm$ 0,18 ^a	2,34 $\pm$ 0,17 ^a	2,66 $\pm$ 0,18 ^a
30	10,32 $\pm$ 0,59 ^b	15,72 $\pm$ 0,81 ^b	9,83 $\pm$ 0,51 ^b	15,23 $\pm$ 0,81 ^b	8,37 $\pm$ 0,46 ^b	11,83 $\pm$ 0,74 ^b
60	15,65 $\pm$ 0,99 ^c	20,37 $\pm$ 0,97 ^c	12,45 $\pm$ 0,42 ^c	18,38 $\pm$ 0,90 ^c	11,46 $\pm$ 0,62 ^c	13,87 $\pm$ 0,84 ^c
90	17,29 $\pm$ 0,87 ^{cd}	22,61 $\pm$ 1,04 ^{cd}	14,09 $\pm$ 0,75 ^{cd}	19,44 $\pm$ 1,02 ^{cd}	12,43 $\pm$ 0,58 ^{cd}	16,27 $\pm$ 0,97 ^{cd}
120	19,70 $\pm$ 1,20 ^d	23,23 $\pm$ 1,07 ^d	14,59 $\pm$ 0,92 ^d	20,30 $\pm$ 0,94 ^d	13,70 $\pm$ 0,96 ^d	17,40 $\pm$ 0,92 ^d
150	19,56 $\pm$ 1,08 ^{cd}	23,02 $\pm$ 1,06 ^{cd}	14,97 $\pm$ 0,55 ^{cd}	19,31 $\pm$ 1,07 ^{cd}	13,96 $\pm$ 0,79 ^{cd}	18,19 $\pm$ 1,12 ^{cd}
180	19,74 $\pm$ 1,03 ^d	23,14 $\pm$ 0,90 ^d	14,90 $\pm$ 0,74 ^d	20,13 $\pm$ 0,93 ^d	14,12 $\pm$ 0,64 ^d	18,15 $\pm$ 1,23 ^d

Optymalne parametry procesu dla białek słonecznika stanowią papaina w stężeniu 10% i czas hydrolizy 120 min. Jako alternatywę umożliwiającą ograniczenie zużycia enzymu można wskazać papainę 5% przez 120 min, która daje nieco niższy efekt niż wariant optymalny, a jest porównywalna z bromelainą 10% w tym samym horyzoncie czasowym. Ficyna, podobnie jak w przypadku rzepaku, pozostaje enzymem o najniższej efektywności w analizowanych warunkach.

6.4.3. Ostropest

W przypadku białek ostropestu dynamika hydrolizy była wyraźnie zależna od rodzaju i dawki enzymu. We wszystkich układach obserwowano gwałtowny wzrost stopnia hydrolizy (DH) do 90–120 min, po czym tempo reakcji wyraźnie spadało i wartości stabilizowały się.





Rycina 21. Kinetka stopnia hydrolizy (DH, %) białek ostropestu w czasie (0–180 min) dla papainy, bromelainy i ficyny przy dawkach 5% i 10% (m/m). Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SD ($n = 4$). Różne litery oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi w obrębie tego samego enzymu i stężenia, zgodnie z testem HSD Tukeya ($p < 0,05$). Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

Najwyższą efektywność uzyskano dla papainy w stężeniu 10%: $22,80 \pm 1,23\%$ w 120 min, bez istotnych zmian do 180 min. Zmniejszenie dawki papainy do 5% obniżało DH do $\sim 19,50 \pm 1,03\%$ w 120 min; wydłużenie inkubacji nie przynosiło praktycznych korzyści, wskazując na plateau już około 120 min. Bromelaina wykazywała niższą skuteczność, ale zaobserwowano wyraźną ze zwiększonej dawki: przy stężeniu 10% DH osiągał $20,70 \pm 1,29\%$ w 120 min i utrzymywał ten poziom w kolejnych pomiarach; przy 5% wartości były wyraźnie niższe i narastały wolniej. Ficyna pozostawała najmniej efektywna: stężenie 10% dawało $15,40 \pm 1,00\%$ w 120 min, po czym odnotowano nieznaczny spadek, a dla 5% DH utrzymywał się w zakresie 10,80–11,55% między 120 a 180 min.

Tabela 26. Stopień hydrolizy (DH, %) białek ostropestu po 0–180 min dla papainy, bromelainy i ficyny (5% i 10% m/m) (średnia $\pm$ SD, n=4). Różne litery oznaczają statystycznie istotne różnice między punktami czasowymi w obrębie tego samego enzymu i stężenia, zgodnie z testem HSD Tukeya ($p < 0,05$). Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

	papaina		bromelaina		ficyna	
Czas [min]	5%	10%	5%	10%	5%	10%
0	2,43 $\pm$ 0,19 ^a	2,31 $\pm$ 0,16 ^a	3,03 $\pm$ 0,20 ^a	2,26 $\pm$ 0,14 ^a	2,55 $\pm$ 0,17 ^a	2,86 $\pm$ 0,20 ^a
30	11,88 $\pm$ 0,82 ^b	17,43 $\pm$ 0,98 ^b	7,17 $\pm$ 0,50 ^b	13,97 $\pm$ 0,93 ^b	7,49 $\pm$ 0,44 ^b	10,32 $\pm$ 0,56 ^b
60	15,33 $\pm$ 0,87 ^c	20,87 $\pm$ 1,18 ^c	9,57 $\pm$ 0,56 ^c	17,87 $\pm$ 1,07 ^c	8,71 $\pm$ 0,49 ^c	12,74 $\pm$ 0,75 ^c
90	18,73 $\pm$ 1,05 ^{cd}	21,93 $\pm$ 1,05 ^{cd}	11,85 $\pm$ 0,81 ^{cd}	18,93 $\pm$ 1,14 ^{cd}	9,46 $\pm$ 0,52 ^{cd}	13,87 $\pm$ 0,84 ^{cd}
120	19,50 $\pm$ 1,03 ^d	22,80 $\pm$ 1,23 ^d	12,53 $\pm$ 0,72 ^d	20,70 $\pm$ 1,29 ^d	10,80 $\pm$ 0,68 ^d	15,40 $\pm$ 1,00 ^d
150	19,45 $\pm$ 1,12 ^d	22,82 $\pm$ 1,23 ^d	12,90 $\pm$ 0,96 ^d	20,54 $\pm$ 1,18 ^d	11,06 $\pm$ 0,69 ^d	15,34 $\pm$ 0,97 ^d
180	19,53 $\pm$ 1,12 ^d	22,49 $\pm$ 1,09 ^d	13,44 $\pm$ 0,85 ^d	20,65 $\pm$ 1,18 ^d	11,55 $\pm$ 0,69 ^d	15,24 $\pm$ 0,96 ^d

W ujęciu praktycznym optymalne warunki dla białek ostropestu stanowią papaina w stężeniu 10% i czas 120 min. Jeżeli priorytetem jest ograniczenie zużycia enzymu, możliwą alternatywą jest papaina 5% przez 120 min lub – przy zachowaniu wyższej dawki enzymu – bromelaina 10% przez 120 min. We wszystkich analizowanych wariantach ficyna pozostaje enzymem o najniższej wydajności hydrolizy białek ostropestu.

6.5. Badanie właściwości antyoksydacyjnych i hipotensyjnych

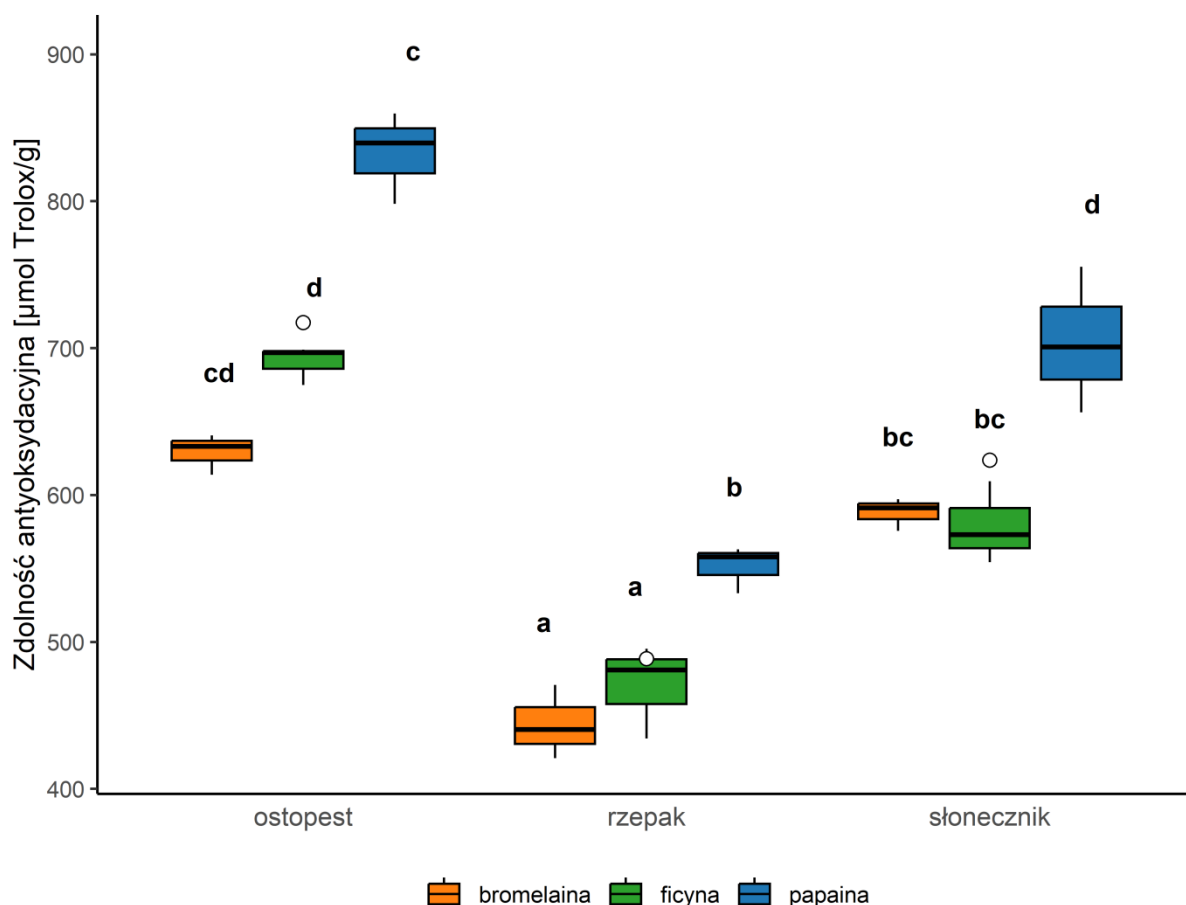
6.5.1. Właściwości antyoksydacyjne

Pomiary aktywności antyoksydacyjnej ujawniły wyraźne różnice zależne od surowca, zastosowanej proteazy oraz rodzaju testu (ABTS, DPPH, FRAP), co potwierdza komplementarny charakter tych metod. Zaobserwowano zróżnicowane profile aktywności dla hydrolizatów z ostropestu, słonecznika i rzepaku oraz spójne tendencje związane ze specyficznością działania papainy, bromelainy i ficyny (Tabela Rycina 27).

Tabela 27. Aktywność antyoksydacyjna hydrolizatów białkowych rzepaku, słonecznika i ostropestu otrzymanych z użyciem papainy, bromelainy i ficyny, oznaczona trzema metodami: ABTS, DPPH oraz FRAP; średnia $\pm$ SD (n = 3). Różne litery w obrębie kolumny oznacz istotne różnice statystyczne (ANOVA, test post-hoc Tukeya HSD, $p < 0.05$).

Surowiec	Enzym	ABTS	DPPH	FRAP
		[$\mu\text{mol Trolox /g s.m.}$]	[$\mu\text{mol Trolox /g s.m.}$]	[$\mu\text{mol Fe}^{2+} / \text{g s.m.}$]
rzepak	papaina	551,26 $\pm$ 16,02 ^b	95,46 $\pm$ 5,98 ^{bc}	188,25 $\pm$ 14,37 ^{bc}
	bromelaina	443,91 $\pm$ 25,10 ^a	89,58 $\pm$ 3,48 ^{abc}	217,36 $\pm$ 19,46 ^{cd}
	ficyna	470,18 $\pm$ 31,93 ^a	106,11 $\pm$ 7,10 ^c	140,49 $\pm$ 11,08 ^a
słonecznik	papaina	704,18 $\pm$ 49,63 ^d	330,01 $\pm$ 12,21 ^d	237,45 $\pm$ 22,45 ^d
	bromelaina	587,97 $\pm$ 11,09 ^{bc}	390,80 $\pm$ 25,13 ^c	206,35 $\pm$ 18,82 ^{bcd}
	ficyna	578,83 $\pm$ 27,94 ^{bc}	380,71 $\pm$ 18,49 ^c	169,54 $\pm$ 14,05 ^{ab}
ostropest	papaina	832,49 $\pm$ 31,29 ^c	66,23 $\pm$ 3,33 ^{ab}	217,81 $\pm$ 16,44 ^{cd}
	bromelaina	629,17 $\pm$ 13,84 ^{cd}	73,84 $\pm$ 4,70 ^{abc}	180,39 $\pm$ 15,55 ^{abc}
	ficyna	690,18 $\pm$ 13,36 ^d	59,61 $\pm$ 2,79 ^a	160,30 $\pm$ 13,51 ^{ab}

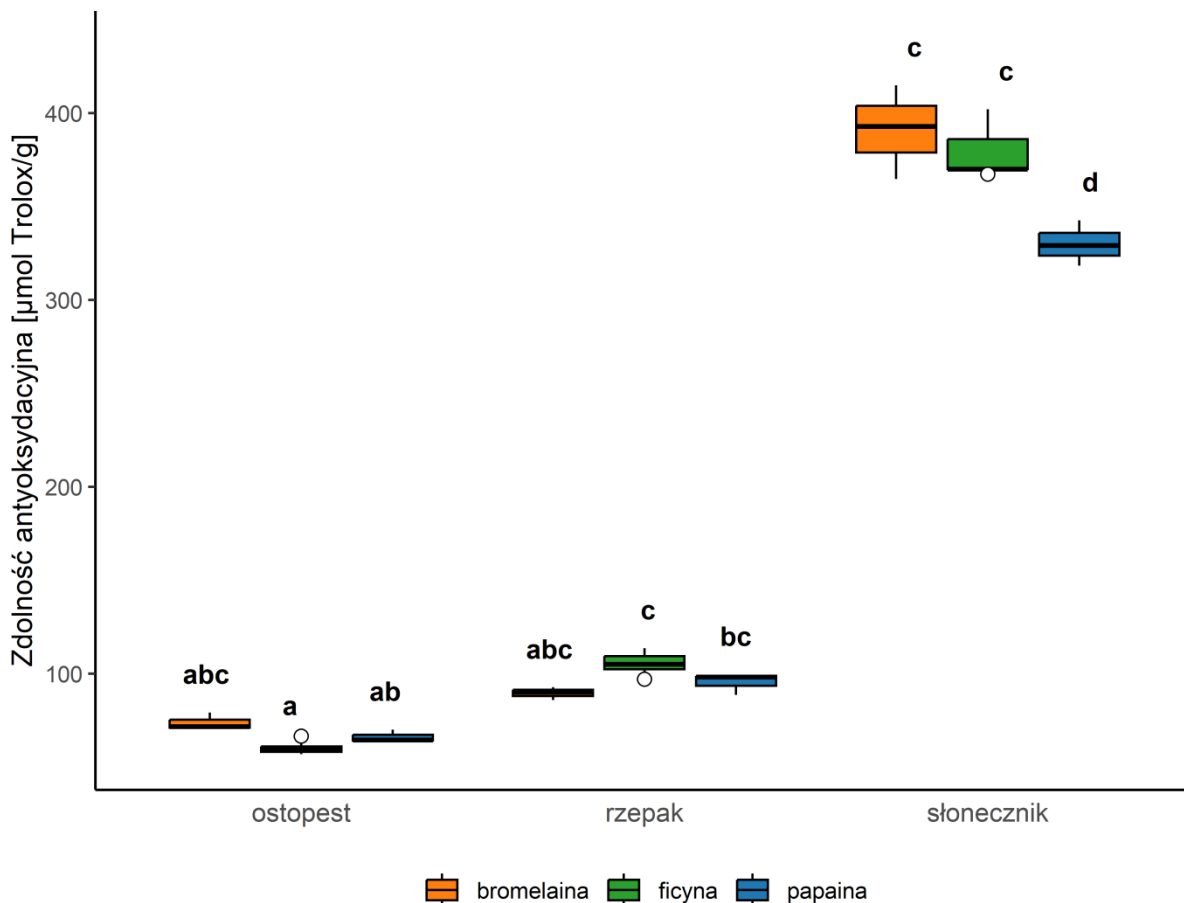
W teście ABTS najwyższą aktywność uzyskały hydrolizaty z ostropestu, szczególnie po trawieniu papainą (832,49 $\pm$ 31,29 $\mu\text{mol Trolox/g}$), wyraźnie przewyższając analogiczne preparaty ze słonecznika (papaina: 704,18 $\pm$ 49,63 $\mu\text{mol Trolox/g}$) i rzepaku (papaina: 551,26 $\pm$ 16,02 $\mu\text{mol Trolox/g}$). W obrębie każdego surowca hydrolizaty po papainie konsekwentnie osiągały najwyższe wartości, przewyższając preparaty po bromelainie o około 20–30% oraz po ficynie o około 15–25% (w zależności od surowca). Wskazuje to, że profil peptydów generowanych przez papainę sprzyja mechanizmom przeniesienia elektronu/wodoru ocenianym wobec kationorodnika ABTS^{•+} w środowisku wodnym.



Rycina 22. Zdolność antyoksydacyjna hydrolizatów białkowych z makuchu z rzepaku, słonecznika i ostropestu oznaczona metodą ABTS. Dane przedstawiono jako medianę (linia w pudełku), zakres międzykwartyłowy (box), wartości minimalne i maksymalne (wąsy) wartość średnią (punkt). Różne litery nad wykresami oznacz istotne różnice statystyczne (ANOVA, test post-hoc Tukeya HSD, $p < 0.05$).

W teście DPPH, bardziej wrażliwym na lipofilowość i kinetykę reakcji, najwyższe wartości uzyskały hydrolizaty białkowe ze słonecznika. Po trawieniu bromelainą i ficyną odnotowano porównywalnie wysokie poziomy aktywności (odpowiednio $390,80 \pm 25,13$ oraz $380,71 \pm 18,49 \mu\text{mol Trolox/g}$), natomiast papaina dawała nieco niższy wynik ($330,01 \pm 12,21 \mu\text{mol Trolox/g}$). Hydrolizaty z rzepaku wykazały umiarkowaną zdolność zmiatania DPPH• (maksymalnie $106,11 \pm 7,10 \mu\text{mol Trolox/g}$ po hydrolizie ficyną), podczas gdy hydrolizaty z ostropestu – mimo bardzo wysokiej aktywności w ABTS – odznaczały się stosunkowo niską aktywnością w teście DPPH (ok. $60\text{--}74 \mu\text{mol Trolox/g}$, w zależności od enzymu). Takie rozbieżności między testami są typowe w sytuacji, gdy dominują krótsze,

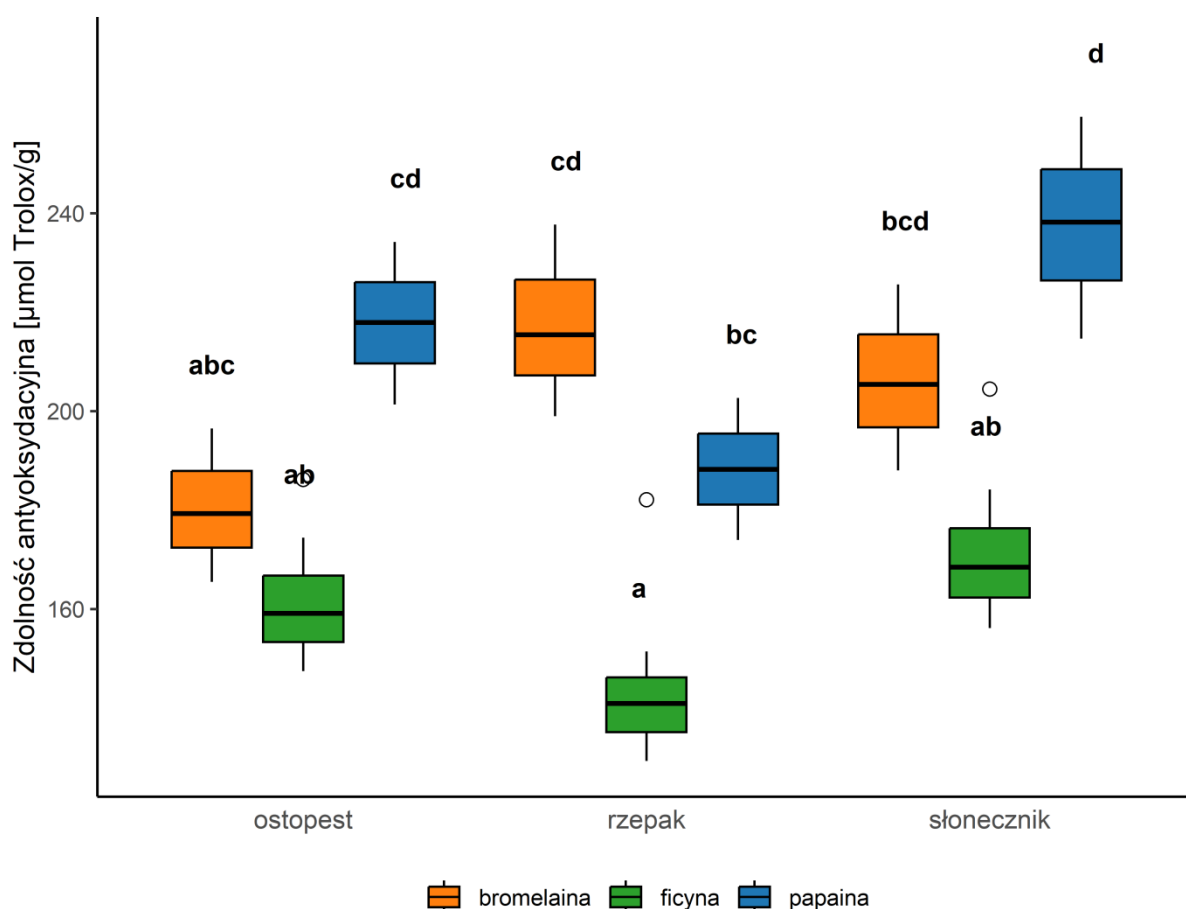
bardziej polarne peptydy o wysokim potencjale przeniesienia elektronu (mechanizm ET), lecz ograniczonej efektywności w warunkach reakcji z lipofilowym DPPH•.



Rycina 23. Zdolność antyoksydacyjna hydrolizatów białkowych z makuchu z rzepaku, słonecznika i ostropestu oznaczona metodą DPPH. Dane przedstawiono jako medianę (linia w pudełku), zakres międzykwartylowy (box), wartości minimalne i maksymalne (wąsy) wartość średnią (punkt). Różne litery nad wykresami oznacz istotne różnice statystyczne (ANOVA, test post-hoc Tukeya HSD, $p < 0.05$).

W teście FRAP rozrzut wartości był mniejszy (ok. 140–240 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$). Najwyższą moc redukcyjną uzyskał hydrolizat ze słonecznika po papainie ($237,45 \pm 22,45 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$). W przypadku hydrolizatów rzepakowych najwyższą wartość odnotowano po trawieniu bromelainą ($217,36 \pm 19,46 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$), natomiast w hydrolizatach z ostropestu – po papainie ($217,81 \pm 16,44 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$). Uśredniając, papaina zapewniała najwyższą aktywność w teście FRAP, bromelaina – nieco niższą, a

ficyna – najniższą, co jest spójne z obserwacjami z testu ABTS i może wynikać z generowania peptydów o korzystnym potencjale redoks.



Rycina 24. Zdolność redukująca hydrolizatów białkowych z makuchu z rzepaku, słonecznika i ostropestu oznaczona metodą FRAP. Dane przedstawiono jako medianę (linia w pudełku), zakres międzykwartylowy (box), wartości minimalne i maksymalne (wąsy) wartość średnią (punkt). Różne litery nad wykresami oznacz istotne różnice statystyczne (ANOVA, test post-hoc Tukeya HSD, $p < 0.05$).

Zestawienie danych wskazuje, że najszersze „spektrum” aktywności (wysokie ABTS, bardzo wysokie DPPH oraz najwyższe FRAP) wykazują hydrolizaty ze słonecznika, szczególnie po trawieniu papainą i bromelainą. Hydrolizat z ostropestu po papainie osiąga poziom referencyjny w ABTS i wysoki FRAP, lecz pozostaje ograniczony w DPPH, co sugeruje przewagę frakcji peptydowych skutecznych wobec $ABTS^{\bullet+}$ w fazie wodnej, a mniej reaktywnych wobec $DPPH^{\bullet}$. Hydrolizaty z rzepaku prezentują wartości pośrednie;

optymalny wybór proteazy zależy tu od docelowego mechanizmu działania antyoksydacyjnego (dla ABTS – papaina, dla DPPH – ficyna, dla FRAP – bromelaina).

W zastosowaniach wodnych, gdzie kluczowa jest wysoka zdolność przenoszenia elektronu, najbardziej obiecujący wydaje się hydrolizat z ostropestu po papainie. W matrycach o większym udziale fazy lipidowej lub tam, gdzie istotna jest reaktywność wobec DPPH•, lepsze wyniki zapewniają hydrolizaty słonecznikowe otrzymane z użyciem bromelainy lub ficyny. Jeśli priorytetem jest moc redukcyjna przy zachowaniu dobrej aktywności w pozostałych testach, najbardziej zrównoważony profil wykazuje hydrolizat słonecznikowy po papainie.

6.5.2. Właściwości hipotensyjne

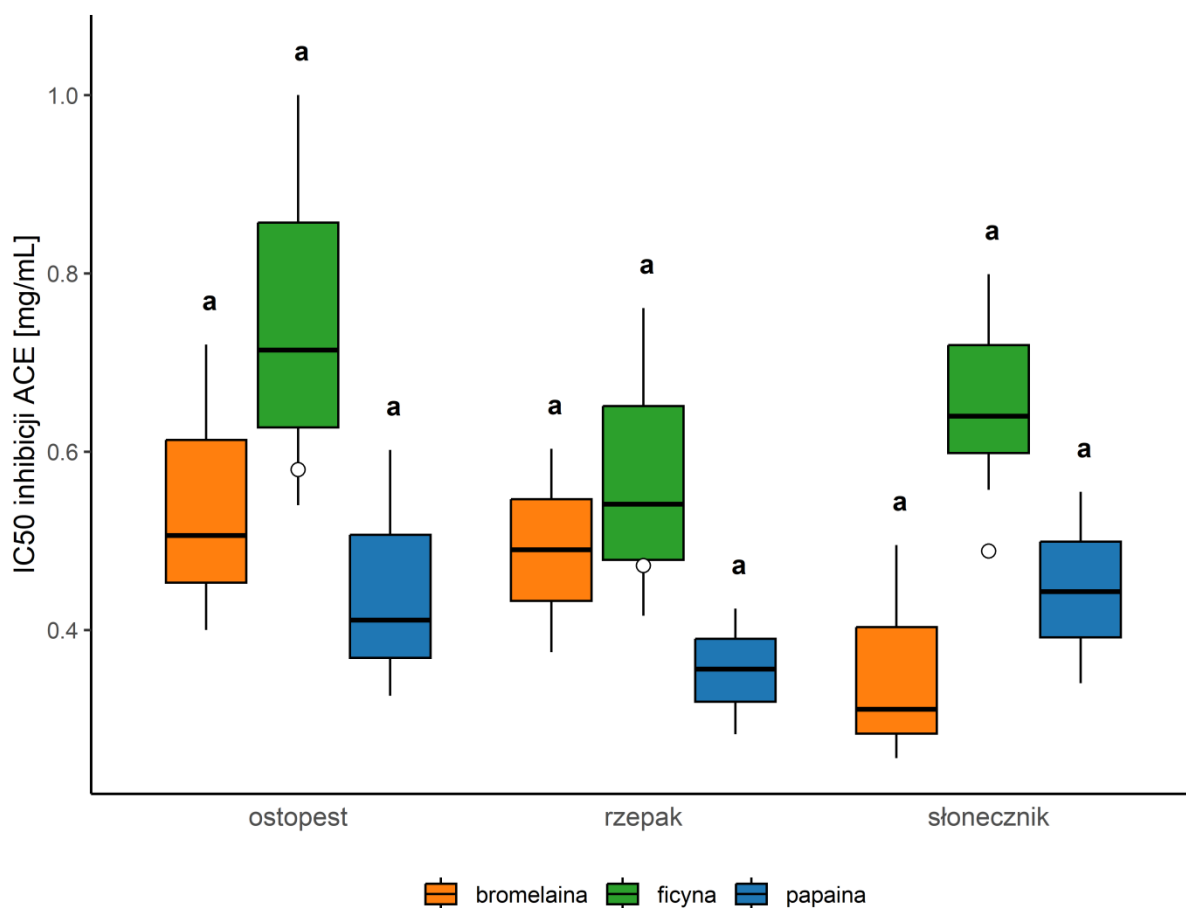
Hydrolizaty białkowe z rzepaku, słonecznika i ostropestu, otrzymane z użyciem papainy, bromelainy lub ficyny, wykazały wyraźną aktywność inhibitorową wobec konwertazy angiotensyny I (ACE). Wartości IC_{50} mieściły się w zakresie 0,35–0,70 mg/mL, a stopień inhibicji przy stężeniu próbki 1 mg/mL wynosił 52,68–64,22%. Największą aktywność odnotowano dla hydrolizatu rzepakowego otrzymanego z użyciem papainy oraz dla hydrolizatu słonecznikowego uzyskanego z użyciem bromelainy. Oba te warianty charakteryzowały się niskimi wartościami IC_{50} ($0,35 \pm 0,06$ i $0,35 \pm 0,12$ mg/mL) i wysoką inhibicją przy 1 mg/mL ($64,22 \pm 4,95$ i $63,69 \pm 4,46\%$), co wskazuje na korzystny profil peptydów powstających podczas hydrolizy tymi proteazami. Najśłabszą aktywność wykazał hydrolizat białek ostropestu trawiony ficyną ($IC_{50} = 0,70 \pm 0,16$ mg/mL; $52,68 \pm 3,90\%$ inhibicji przy 1 mg/mL).

Tabela 28. Aktywność inhibitorowa hydrolizatów białkowych otrzymanych z rzepaku, słonecznika i ostropestu wobec enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE). Wartości przedstawiono jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 3$). IC_{50} – stężenie próbki powodujące 50 % inhibicji ACE; % inhibicji dla próbki 1 mg/mL – procent zahamowania aktywności enzymu przy stężeniu 1 mg/mL hydrolizatu. Różne litery oznaczają statystyczne istotne różnice (ANOVA, test post-hoc Tukeya HSD, $p < 0.05$).

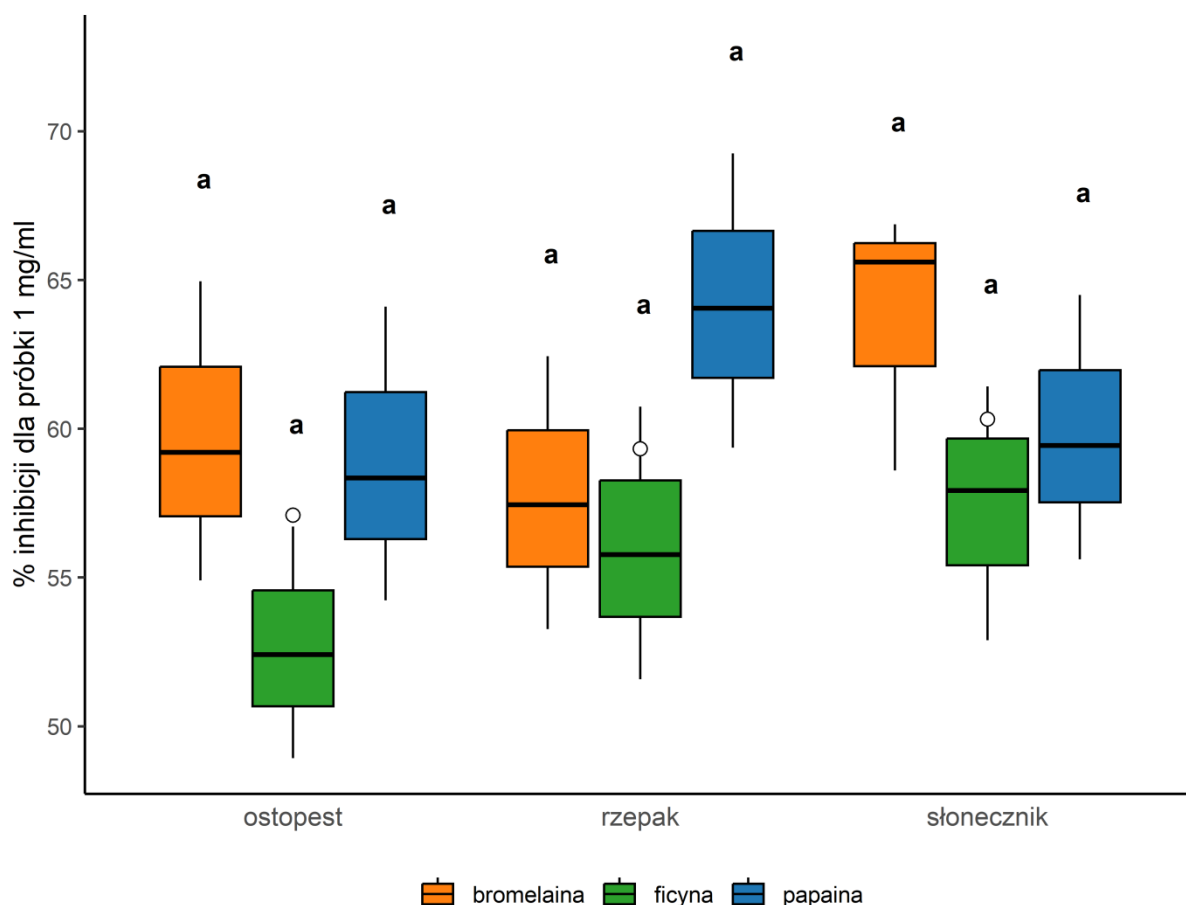
surowiec	enzym	IC_{50} [mg/mL]	% inhibicji dla próbki 1 mg/mL
rzepak	papaina	$0,35 \pm 0,06^a$	$64,22 \pm 4,95^a$
	bromelaina	$0,48 \pm 0,08^a$	$57,71 \pm 4,59^a$
	ficyna	$0,53 \pm 0,09^a$	$56,03 \pm 4,59^a$

surowiec	enzym	IC50 [mg/mL]	% inhibicji dla próbki 1 mg/mL
słonecznik	papaina	$0,43 \pm 0,11^a$	$60,01 \pm 4,45^a$
	bromelaina	$0,35 \pm 0,12^a$	$63,69 \pm 4,46^a$
	ficyna	$0,65 \pm 0,09^a$	$57,41 \pm 4,29^a$
ostropest	papaina	$0,43 \pm 0,12^a$	$58,89 \pm 4,96^a$
	bromelaina	$0,52 \pm 0,10^a$	$59,69 \pm 5,04^a$
	ficyna	$0,70 \pm 0,16^a$	$52,68 \pm 3,90^a$

Analiza w obrębie poszczególnych surowców ujawniła powtarzalne tendencje. W przypadku białek rzepaku najwyższą aktywność uzyskano po zastosowaniu papainy, niższą po bromelainie, a najniższą po ficynie. Dla białek słonecznika najkorzystniejsza była bromelaina, następnie papaina, a na końcu ficyna. W ostropeście papaina i bromelaina dawały wyniki zbliżone, natomiast hydrolizaty uzyskane z użyciem ficyny były istotnie słabsze. W przekroju wszystkich surowców najslabsze działanie wykazywały hydrolizaty po ficynie, podczas gdy papaina i bromelaina tworzyły grupę o wyższej skuteczności, z niewielkimi różnicami zależnymi od surowca.



Rycina 25. Wartości IC₅₀ inhibicji konwertazy angiotensyny (ACE) dla próbki przy stężeniu 1 mg/mL hydrolizatu dla hydrolizatów białkowych z makuchu z rzepaku, słonecznika i ostopestu. Dane przedstawiono jako medianę (linia w pudełku), zakres międzykwartylowy (box), wartości minimalne i maksymalne (wąsy), wartość średnią (punkt). Różne litery nad wykresami oznaczają istotne różnice statystyczne (ANOVA, test post-hoc Tukeya HSD, $p < 0.05$).



Rycina 26. Wartości procentowej inhibicji konwertazy angiotensyny (ACE) dla próbki przy stężeniu 1 mg/mL hydrolizatu dla hydrolizatów białkowych z makuchu z rzepaku, słonecznika i ostropestu. Dane przedstawiono jako medianę (linia w pudełku), zakres międzykwartylowy (box), wartości minimalne i maksymalne (wąsy), wartość średnią (punkt). Różne litery nad wykresami oznaczają istotne różnice statystyczne (ANOVA, test post-hoc Tukeya HSD, $p < 0.05$).

Z punktu widzenia zastosowań w żywności funkcjonalnej o potencjale hipotensyjnym najbardziej obiecujące są dwa warianty: hydrolizat rzepakowy po trawieniu papainą oraz hydrolizat słonecznikowy trawiony bromelainą. Łączą one najniższe wartości IC_{50} z najwyższą inhibicją ACE przy 1 mg/ml. W przypadku białek ostropestu dobór enzymu ma kluczowe znaczenie, gdyż wariant z ficyną wyraźnie ustępuje kombinacjom z papainą i bromelainą. Wyniki potwierdzają, że odpowiednie parowanie surowca i proteazy determinuje potencjał inhibitorowy wobec ACE i pozwala istotnie zwiększyć aktywność w stosunku do mniej korzystnych konfiguracji.

6.6. Przeskalowanie procesu ekstrakcji białek i otrzymywania hydrolizatów

6.6.1. Porównanie wydajności izolacji białka

Wydajność izolacji białka w skali laboratoryjnej i przemysłowej zestawiono w Tabeli 29. We wszystkich analizowanych przypadkach przeskalowanie procesu wiązało się ze spadkiem uzysku białka z makuchów rzepakowych, słonecznikowych i ostropestu. Obniżenie wydajności wynosiło kilka punktów procentowych, co odpowiada redukcji rzędu kilkunastu procent względem wartości uzyskiwanych w skali laboratoryjnej. Najmniejszą wrażliwość na zmianę skali wykazał proces prowadzony na makuchu rzepakowym, natomiast największą względną utratę wydajności odnotowano dla ostropestu.

Tabela 29. Wydajność izolacji białka z makuchów rzepakowych, słonecznikowych i z ostropestu w skali laboratoryjnej i przemysłowej (średnia $\pm$ SD). Istotność statystyczną różnic pomiędzy procesami oceniono osobno dla każdego surowca przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA); $p < 0.05$ uznano za istotne statystycznie (pogrubione).

surowiec	skala laboratoryjna	skala przemysłowa	p-value
rzepak	52,3 $\pm$ 0,8	46,8 $\pm$ 2,3	0.018
słonecznik	46,9 $\pm$ 0,9	41,1 $\pm$ 1,8	0.012
ostropest	51,8 $\pm$ 0,8	44,5 $\pm$ 2,6	0.009

Zwraca uwagę wyraźna różnica w zmienności wyników pomiędzy obiema skalami. W warunkach laboratoryjnych odchylenia standardowe są bardzo niskie, co świadczy o wysokiej powtarzalności procesu. W skali przemysłowej rozrzut wyników jest większy, co wskazuje na zwiększoną wrażliwość procesu na zmiany parametrów operacyjnych. Biorąc pod uwagę relatywnie niewielki błąd oznaczeń w obu skalach, obserwowane różnice między wydajnością laboratoryjną a przemysłową można uznać za efekt systematyczny, a nie przypadkowy.

Opisany trend jest typowy dla procesów poddawanych przeskalowaniu – w większej skali trudniej jest zapewnić jednakową intensywność mieszania i transportu masy w całej objętości układu, a straty materiału na elementach aparatury stanowią istotniejszy udział w bilansie masowym. Pomimo tych ograniczeń wydajności uzyskane w skali przemysłowej pozostają na poziomie umożliwiającym praktyczne wykorzystanie opracowanej metody

izolacji białka i potwierdzają możliwość jej skutecznego przeniesienia do warunków przemysłowych.

6.6.2. Porównanie składu chemicznego ekstraktów białkowych

Skład chemiczny ekstraktów białkowych otrzymanych w skali laboratoryjnej i przemysłowej przedstawiono w Tabeli 30. Przeskalowanie procesu sprzyjało koncentracji frakcji białkowej – we wszystkich wariantach odnotowano wzrost zarówno zawartości białka, jak i suchej masy, przy stosunkowo niewielkich zmianach udziału składników niebiałkowych. Oznacza to, że w większej skali uzyskiwano ekstrakty bardziej skoncentrowane, co najprawdopodobniej wynika z zastosowania odmiennego sposobu rozdziału faz, tj. wirówki dekantacyjnej, a w konsekwencji z większej efektywności oddzielania fazy ciekłej od fazy stałej.

Tabela 30. Skład chemiczny ekstraktów białkowych otrzymanych w skali laboratoryjnej i przemysłowej (wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe).

Surowiec	Skala laboratoryjna	Skala przemysłowa	p-value
Zawartość białka (%)			
Rzepak	15,25 $\pm$ 0,17	27,55 $\pm$ 0,73	< 0,001
Słonecznik	27,28 $\pm$ 0,18	35,58 $\pm$ 0,72	< 0,001
Ostropest	25,23 $\pm$ 0,30	31,47 $\pm$ 0,87	0,001
Sucha masa (%)			
Rzepak	19,27 $\pm$ 0,16	33,92 $\pm$ 0,69	< 0,001
Słonecznik	29,73 $\pm$ 0,21	37,96 $\pm$ 0,69	< 0,001
Ostropest	30,51 $\pm$ 0,34	37,96 $\pm$ 0,69	< 0,001
Zawartość białka w suchej masie (%)			
Rzepak	79,14 $\pm$ 0,23	81,22 $\pm$ 2,14	0,21
Słonecznik	91,76 $\pm$ 0,13	91,58 $\pm$ 0,19	0,32
Ostropest	82,69 $\pm$ 0,25	82,93 $\pm$ 2,98	0,89
Zawartość cukrów w suchej masie (%)			
Rzepak	2,23 $\pm$ 0,12	2,72 $\pm$ 0,23	0,018
Słonecznik	0,67 $\pm$ 0,07	1,65 $\pm$ 0,14	< 0,001
Ostropest	0,49 $\pm$ 0,03	1,29 $\pm$ 0,10	< 0,001

Surowiec	Skala laboratoryjna	Skala przemysłowa	p-value
Zawartość tłuszczu w suchej masie (%)			
Rzepak	7,98 ± 0,43	6,78 ± 0,31	0,012
Słonecznik	2,08 ± 0,07	1,43 ± 0,13	< 0,001
Ostropest	8,06 ± 0,14	7,85 ± 0,27	0,31

Udział białka w suchej masie ekstraktów był wysoki we wszystkich analizowanych wariantach procesu, przy czym w skali przemysłowej odnotowano tendencję do jego niewielkiego wzrostu. Ekstrakty słonecznikowe charakteryzowały się najwyższą „czystością białkową”, przy bardzo zbliżonych wartościach udziału białka w suchej masie w obu skalach procesu. Wskazuje to, że skalowanie nie sprzyjało współizolacji składników niebiałkowych i pozwoliło zachować wysoką selektywność procesu w kierunku frakcji białkowej.

Podsumowując, przeskalowanie procesu izolacji prowadziło do uzyskania ekstraktów o wyższej koncentracji suchej masy i białka przy utrzymaniu bardzo wysokiego udziału białka w suchej masie. Opracowana procedura izolacji jest zatem odporna na zmianę skali i umożliwia otrzymywanie surowca o porównywalnej, a miejscami nawet nieco wyższej jakości białkowej w warunkach zbliżonych do przemysłowych.

6.6.3. Porównanie stopnia hydrolizy

Badania prowadzone w skali laboratoryjnej wykazały, że hydroliza białek z wykorzystaniem 10% dodatku papainy przebiega bardziej efektywnie – uzyskiwano wyższe wartości stopnia hydrolizy (DH), a czas reakcji równy 120 min był wystarczający do osiągnięcia praktycznego plateau. Zastosowanie tak wysokiego stężenia enzymu w warunkach przemysłowych wiązałoby się jednak z istotnymi kosztami, dlatego na etapie przeskalowania przyjęto niższe, 5% stężenie papainy jako kompromis między efektywnością reakcji a jej opłacalnością ekonomiczną.

Tabela 31. Stopień hydrolizy (DH, %, średnia $\pm$ SD) ekstraktów białkowych otrzymanych z makuchów z rzepaku, słonecznika i z ostropestu w skali laboratoryjnej i przemysłowej: w czasie (0–180 min) przy użyciu papainy w stężeniu 5% (m/m). Istotność statystyczną różnic pomiędzy procesami oceniono osobno dla każdego surowca przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA); $p < 0.05$ uznano za istotne statystycznie (pogrubione).

Surowiec	Czas [min]	Skala laboratoryjna	Skala przemysłowa	p-value
Rzepak	0	2,74 $\pm$ 0,17	1,82 $\pm$ 0,60	0,030
	30	10,32 $\pm$ 0,54	8,95 $\pm$ 0,72	0,018
	60	15,59 $\pm$ 0,89	13,93 $\pm$ 1,32	0,041
	90	18,32 $\pm$ 1,06	16,18 $\pm$ 1,18	0,029
	120	20,53 $\pm$ 1,07	17,16 $\pm$ 1,10	0,006
	150	20,90 $\pm$ 1,12	18,32 $\pm$ 1,42	0,014
	180	21,17 $\pm$ 1,15	18,45 $\pm$ 1,06	0,008
Słonecznik	0	2,49 $\pm$ 0,13	2,72 $\pm$ 0,21	0,18
	30	10,32 $\pm$ 0,58	7,56 $\pm$ 1,03	0,011
	60	15,65 $\pm$ 1,03	11,72 $\pm$ 1,48	0,009
	90	17,29 $\pm$ 0,90	14,47 $\pm$ 1,48	0,018
	120	19,70 $\pm$ 1,16	15,52 $\pm$ 0,59	0,004
	150	19,56 $\pm$ 1,09	17,13 $\pm$ 0,86	0,021
	180	19,74 $\pm$ 1,13	17,72 $\pm$ 0,94	0,028
Ostropest	0	2,43 $\pm$ 0,18	2,41 $\pm$ 0,45	0,94
	30	11,88 $\pm$ 0,83	8,95 $\pm$ 0,87	0,003
	60	15,33 $\pm$ 0,79	11,63 $\pm$ 0,90	0,002
	90	18,73 $\pm$ 1,05	15,32 $\pm$ 0,83	0,004
	120	19,50 $\pm$ 0,93	16,77 $\pm$ 0,90	0,006
	150	19,45 $\pm$ 1,05	17,72 $\pm$ 1,02	0,030
	180	19,53 $\pm$ 1,16	17,81 $\pm$ 1,31	0,040

W Tabeli 31 przedstawiono przebieg zmian stopnia hydrolizy ekstraktów białkowych w skali laboratoryjnej i przemysłowej. W skali przemysłowej, przy 5% dodatku enzymu, przebieg hydrolizy był zbliżony dla wszystkich badanych surowców: w początkowej fazie obserwowano szybki wzrost DH, który następnie stopniowo

wyhamowywał. W porównaniu ze skalą laboratoryjną w tych samych punktach czasowych uzyskiwano nieco niższe wartości DH, co można wiązać z mniej korzystnymi warunkami transportu masy w większym układzie reakcyjnym.

Kluczową różnicą był natomiast brak wyraźnego plateau po 120 min – w skali przemysłowej stopień hydrolizy nadal rósł pomiędzy 120. a 180. minutą, co wskazuje, że wydłużenie czasu procesu pozwala częściowo zrekompensować obniżone stężenie enzymu i zbliżyć się do wartości osiąganych w mniejszej skali.

Przyjęta strategia – redukcja stężenia papainy do 5% przy jednoczesnym wydłużeniu czasu hydrolizy do 180 min – umożliwia uzyskanie wysokiego, technologicznie satysfakcjonującego stopnia hydrolizy w skali przemysłowej. Oznacza to, że proces może być prowadzony w sposób ekonomicznie korzystniejszy, przy zachowaniu parametrów jakościowych hydrolizatów porównywalnych z uzyskiwanymi w warunkach laboratoryjnych.

6.6.4. Porównanie składu chemicznego otrzymanych hydrolizatów

Skład hydrolizatów otrzymanych w skali laboratoryjnej i przemysłowej przedstawiono w Tabeli 32. Przeskalowanie procesu hydrolizy nie prowadziło do istotnego pogorszenia jakości preparatów. We wszystkich wariantach białko pozostawało zdecydowanie dominującym składnikiem, a zawartości oznaczone w skali przemysłowej były zbliżone do wartości uzyskanych w skali laboratoryjnej. Niewielkie obniżenie udziału frakcji białkowej, szczególnie widoczne w przypadku hydrolizatów ze słonecznika i ostropestu, mieściło się w akceptowalnym zakresie zmienności procesu i nie ograniczało ich potencjału aplikacyjnego z punktu widzenia zastosowań technologicznych.

Tabela 32. Skład chemiczny hydrolizatów białkowych otrzymanych z makuchów z rzepaku, słonecznika i z ostropestu w skali laboratoryjnej i przemysłowej: zawartość białka, cukrów, tłuszczu i suchej masy, średnia $\pm$ SD. Istotność statystyczną różnic pomiędzy skalami oceniono osobno dla każdego surowca przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA); $p < 0.05$ uznano za istotne statystycznie (pogrubione).

Surowiec	Skala laboratoryjna	Skala przemysłowa	p-value
Zawartość białka (%)			
Rzepak	70,60 $\pm$ 1,93	70,15 $\pm$ 1,47	0,68
Słonecznik	81,25 $\pm$ 1,13	76,40 $\pm$ 1,93	0,011
Ostropest	74,32 $\pm$ 1,38	72,43 $\pm$ 1,04	0,07
Zawartość cukrów (%)			
Rzepak	3,03 $\pm$ 0,13 %	3,82 $\pm$ 0,42 %	0,020
Słonecznik	1,05 $\pm$ 0,15 %	1,95 $\pm$ 0,54 %	0,041
Ostropest	0,69 $\pm$ 0,13 %	1,29 $\pm$ 0,23 %	0,014
Zawartość tłuszczu (%)			
Rzepak	8,99 $\pm$ 1,47	9,45 $\pm$ 0,46	0,59
Słonecznik	3,40 $\pm$ 0,28	2,89 $\pm$ 0,45	0,17
Ostropest	8,43 $\pm$ 0,64	8,46 $\pm$ 0,25	0,94
Sucha masa (%)			
Rzepak	94,01 $\pm$ 1,14	92,31 $\pm$ 0,93	0,11
Słonecznik	95,02 $\pm$ 1,26	91,64 $\pm$ 1,91	0,042
Ostropest	93,98 $\pm$ 1,53	93,44 $\pm$ 1,63	0,63

W hydrolizatach ze skali przemysłowej odnotowano nieco wyższą zawartość cukrów niż w analogicznych próbach laboratoryjnych, przy jednocześnie porównywalnym poziomie tłuszczu. Ogólna sucha masa była nieznacznie niższa w skali przemysłowej, co można wiązać z odmiennym charakterem procesu suszenia. Zmiany te miały jednak ograniczony zakres i nie wpływały istotnie na proporcje głównych frakcji składników odżywczych.

Podsumowując, przejście do skali przemysłowej pozwala na otrzymywanie hydrolizatów o składzie zbliżonym do uzyskiwanego w skali laboratoryjnej – z wysoką zawartością białka oraz umiarkowanym udziałem frakcji węglowodanowej i lipidowej.

Opracowana procedura hydrolizy jest odporna na zmianę skali i umożliwia wytwarzanie surowca o stabilnych, przewidywalnych parametrach jakościowych.

6.6.5. Porównanie właściwości bioaktywnych otrzymanych hydrolizatów

Aktywność biologiczną hydrolizatów otrzymanych w skali laboratoryjnej i przemysłowej przedstawiono w Tabeli 33. Przeskalowanie procesu wiązało się z umiarkowanym spadkiem właściwości bioaktywnych. We wszystkich zastosowanych testach przeciwutleniających (ABTS, DPPH, FRAP) wartości oznaczone dla próbek ze skali przemysłowej były niższe niż w skali laboratoryjnej, natomiast w przypadku aktywności ACE zaobserwowano wzrost wartości IC_{50} , świadczący o słabszej zdolności hamowania enzymu. Tendencja ta była spójna dla wszystkich surowców, przy zachowaniu dotychczasowych zależności między nimi – hydrolizaty z ostropestu i słonecznika charakteryzowały się najwyższą aktywnością przeciwutleniającą, natomiast preparaty rzepakowe wykazywały najkorzystniejsze wartości IC_{50} w obu skalach procesu.

Tabela 33. Aktywność przeciwutleniająca (ABTS, DPPH, FRAP) oraz aktywność inhibitorowa wobec konwertazy angiotensyny (ACE, wartość IC_{50}) hydrolizatów białkowych otrzymanych z makuchów z rzepaku, słonecznika i z ostropestu w skali laboratoryjnej i przemysłowej, średnia $\pm$ SD. Istotność statystyczną różnic pomiędzy skalami oceniono osobno dla każdego surowca przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA); $p < 0.05$ uznano za istotne statystycznie (pogrubione).

Surowiec	Skala laboratoryjna	Skala przemysłowa	p-value
ABTS [μmol Trolox /g]			
Rzepak	551,26 $\pm$ 15,9	449,19 $\pm$ 21,5	0,010
Słonecznik	704,18 $\pm$ 49,7	564,56 $\pm$ 9,8	0,021
Ostropest	832,49 $\pm$ 31,7	659,32 $\pm$ 31,9	0,009
DPPH [μmol Trolox /g]			
Rzepak	95,46 $\pm$ 6,01	87,64 $\pm$ 3,74	0,12
Słonecznik	330,01 $\pm$ 12,25	209,55 $\pm$ 10,11	< 0,001
Ostropest	66,23 $\pm$ 3,38	57,62 $\pm$ 2,44	0,006

Surowiec	Skala laboratoryjna	Skala przemysłowa	p-value
FRAP [$\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /g]			
Rzepak	188,25 $\pm$ 14,37	162,22 $\pm$ 8,79	0,021
Słonecznik	237,45 $\pm$ 22,53	204,47 $\pm$ 10,23	0,034
Ostropest	217,81 $\pm$ 16,58	191,19 $\pm$ 14,05	0,041
inhibicja ACE IC50 [mg/ml]			
Rzepak	0,354 $\pm$ 0,071	0,423 $\pm$ 0,146	0,46
Słonecznik	0,446 $\pm$ 0,108	0,490 $\pm$ 0,147	0,69
Ostropest	0,446 $\pm$ 0,140	0,510 $\pm$ 0,172	0,61

Zaobserwowany spadek aktywności bioaktywnej można wiązać przede wszystkim z odmiennymi warunkami prowadzenia procesu w skali przemysłowej. W większym układzie reakcyjnym trudniej jest zapewnić tak jednorodne warunki hydrolizy oraz tak krótki czas kontaktu produktu z podwyższoną temperaturą i tlenem, jak w skali laboratoryjnej. Dodatkowo zastosowanie aparatury pracującej w sposób ciągły (dekanter do rozdziału faz oraz suszarka rozpyłowa zamiast liofilizatora) sprzyja bardziej intensywnemu oddziaływaniu czynników fizycznych, co może prowadzić do częściowych modyfikacji strukturalnych peptydów – ich utleniania, agregacji lub udziału w reakcjach typu Maillarda. W połączeniu z nieco niższym stopniem hydrolizy i większym udziałem frakcji niebiałkowych w próbkach przemysłowych skutkuje to umiarkowanym obniżeniem stężenia najbardziej aktywnych peptydów w gotowych hydrolizatach i tym samym spadkiem oznaczanej aktywności biologicznej.

Podsumowując, przeskalowanie procesu powoduje zauważalny, choć ilościowo ograniczony spadek aktywności przeciwutleniającej i inhibitorowej wobec ACE. Hydrolizaty otrzymane w skali przemysłowej zachowują jednak korzystny profil bioaktywny, a obserwowane różnice mieszczą się w zakresie typowym dla procesów przenoszonych z warunków laboratoryjnych do większej skali technologicznej. Opracowaną procedurę można uznać za dostatecznie odporną na zmianę skali, przy czym dalsza optymalizacja parametrów procesu może przyczynić się do ograniczenia strat aktywności biologicznej.

7. Dyskusja

Wyniki niniejszej rozprawy potwierdzają, że makuchy z rzepaku, słonecznika i ostropestu mogą być traktowane nie jako odpad, lecz jako pełnowartościowy surowiec do wytwarzania składników funkcjonalnych, pod warunkiem zastosowania odpowiednio zaprojektowanego procesu izolacji białek oraz kontrolowanej hydrolizy enzymatycznej. W odniesieniu do postawionych hipotez całość rezultatów wskazuje, że hipoteza zakładająca możliwość uzyskania hydrolizatów o aktywności przeciwutleniającej oraz inhibitorowej wobec ACE z białek trzech analizowanych makuchów została potwierdzona: wszystkie surowce po hydrolizie wykazywały mierzalną aktywność w testach antyoksydacyjnych i w hamowaniu ACE, choć z wyraźnym zróżnicowaniem profili w zależności od surowca i zastosowanego enzymu. Jednocześnie hipoteza dotycząca tego, że analizy *in silico* mogą przewidywać profil bioaktywności hydrolizatów, została potwierdzona jedynie częściowo: w kilku kluczowych przypadkach obserwowano zgodność jakościową, jednak występowały także rozbieżności wynikające z ograniczeń modeli predykcyjnych oraz wpływu parametrów procesu, których narzędzia bioinformatyczne nie uwzględniają. Z kolei hipoteza o możliwości transferu procesu do skali przemysłowej uzyskała potwierdzenie w tym sensie, że zachowano kierunkowo podobny profil funkcjonalny produktów, natomiast obserwowane różnice w wydajności izolacji białka oraz umiarkowany spadek aktywności funkcjonalnej wskazują na istnienie krytycznych punktów technologicznych wymagających ścisłej kontroli i optymalizacji na etapie wdrożenia.

Interpretacja uzyskanych wyników wymaga uwzględnienia odmienności surowców wyjściowych, ponieważ profil hydrolizatów jest wypadkową zarówno składu białkowego, jak i udziału zanieczyszczeń niebiałkowych (cukrów, frakcji włókiennych, resztkowego tłuszczu czy fenoli), które wpływają na podatność na hydrolizę oraz na przebieg i odczyt testów chemicznych. W przypadku rzepaku dominują białka zapasowe z grupy globulin (krucyferyna) oraz albuminy 2S (napina), o zwartej strukturze stabilizowanej mostkami disiarczkowymi. Taka struktura może ograniczać dostępność miejsc cięcia w białku natywnym, ale jednocześnie sprzyja generowaniu sekwencji bogatych w motywy peptydów bioaktywnych po częściowym „otwarcu” struktury w trakcie ekstrakcji i hydrolizy (Karabulut i in., 2025). Istotne jest, że uzyskane w tej pracy wyniki analiz proteomicznych ekstraktów białkowych rzepaku potwierdziły dominację krucyferyny: po rozdziale elektroforetycznym i identyfikacji metodą MALDI-TOF/TOF w próbkach rzepakowych zidentyfikowano przede wszystkim liczne formy krucyferyny, natomiast w zastosowanych

warunkach nie potwierdzono obecności napin. Dla słonecznika kluczową frakcję stanowią globuliny 11S (helianthiny), których podjednostki po denaturacji alkalicznej i izoelektrycznym wytrącaniu mogą stawać się bardziej podatne na endoproteolizę i sprzyjać generowaniu peptydów o zróżnicowanej hydrofobowości (Ren i in., 2015); zgodnie z tym, w profilu proteomicznym opisanym w tej pracy niemal wszystkie analizowane spoty przypisano globulinom 11S. W przypadku ostropestu, obok dominujących białek o charakterze globulinowym (które również dominują w profilu proteomicznym przedstawionym w tej pracy), na interpretację wyników należy nałożyć specyfikę surowca znanego z obecności związków fenolowych (np. kompleksu sylimaryny), które mogą współekstrahować się lub wiązać z białkami i w konsekwencji modyfikować wyniki testów przeciwutleniających (Lambo i in., 2024). Już na poziomie „materiałowym” uzasadnione jest zatem oczekiwanie, że trzy surowce będą prowadzić do odmiennych profili aktywności i że nie musi istnieć prosta korelacja pomiędzy stopniem hydrolizy, liczbą uwolnionych fragmentów a aktywnością mierzoną danym testem.

Drugim czynnikiem o kluczowym znaczeniu jest dobór enzymu i wynikająca z niego specyficzność substratowa. Papaina, bromelaina i ficyna należą do proteaz cysteinowych, jednak różnią się preferencjami względem reszt aminokwasowych sąsiadujących z wiązaniem peptydowym oraz „agresywnością” hydrolizy w określonych warunkach pH i temperatury. W praktyce przekłada się to na powstawanie mieszanin peptydów o odmiennych rozkładach mas cząsteczkowych, różnej średniej hydrofobowości, innym udziale reszt aromatycznych i zasadowych oraz odmiennych proporcjach krótkich motywów (di-/tripeptydów) względem peptydów kilkunastoaminokwasowych (Domokos Szabolcsy i in., 2024). Z perspektywy mechanistycznej ma to zasadnicze znaczenie: aktywność przeciwutleniająca w testach chemicznych stanowi wypadkową zdolności do donacji elektronu/protonu, stabilizacji rodnika i chelatowania metali, natomiast hamowanie ACE zależy przede wszystkim od dopasowania fragmentu do centrum katalitycznego enzymu oraz oddziaływań w kieszeniach S1/S2, które preferują określone cechy sekwencyjne (Munteanu i Apetrei, 2021). Z tego powodu wysoki stopień hydrolizy nie gwarantuje wysokiej aktywności, jeśli rozkład produktów przesuwają się w stronę fragmentów zbyt krótkich (utrata reszt krytycznych dla interakcji) lub zbyt długich (gorsze dopasowanie do ACE, niższa dyfuzja w teście, większa skłonność do agregacji).

Szczególnie pouczające jest zestawienie analiz *in silico* z wynikami doświadczalnymi, ponieważ ujawnia ono jednocześnie potencjał oraz ograniczenia

podejścia bioinformatycznego. Predykcje BIOPEP dla białek rzepaku sugerowały wysoką skuteczność bromelainy w generowaniu fragmentów bioaktywnych oraz znaczną reprezentację motywów związanych m.in. z hamowaniem ACE (przy mniejszym udziale motywów przypisywanych aktywności przeciwutleniającej). Wyniki *in vitro* wskazały jednak, że to hydrolizat rzepakowy otrzymany z użyciem papainy wykazywał najsilniejsze hamowanie ACE (najniższe IC_{50}), podczas gdy maksimum aktywności przeciwutleniającej zależało od zastosowanej metody oznaczenia. Tę rozbieżność można wyjaśnić kilkoma, niewykluczającymi się mechanizmami. Po pierwsze, narzędzia *in silico* symulują cięcia na sekwencji i zliczają motywy opisane w bazie, nie uwzględniając ograniczeń kinetycznych i strukturalnych rzeczywistego procesu (niedostępność miejsc cięcia wskutek struktury białka i agregacji, różnice w szybkości hydrolizy poszczególnych regionów, wtórna degradacja potencjalnie aktywnych fragmentów). Po drugie, BIOPEP traktuje wykryte motywy jako równoważne, natomiast pomiary aktywności są wrażliwe na „potencję” konkretnych peptydów: pojedynczy peptyd o wysokim powinowactwie do ACE może w praktyce determinować wynik bardziej niż liczne motywy o niskiej aktywności (Minkiewicz i in., 2019; Udenigwe, 2014). Odmienne, bardziej jednoznaczny obraz uzyskano dla słonecznika. Predykcja wskazywała na szczególnie wysoką zdolność bromelainy do generowania peptydów bioaktywnych z białek słonecznika, a walidacja *in vitro* potwierdziła, że hydrolizat słonecznikowy po bromelainie należał do najsilniejszych inhibitorów ACE (IC_{50} porównywalne z najlepszymi wynikami uzyskanymi dla rzepaku) i charakteryzował się najwyższą zdolnością zmiatania rodnika DPPH wśród analizowanych próbek. Sugeruje to, że w tym układzie miejsca cięcia preferowane przez bromelainę są korzystnie rozmieszczone w sekwencjach globulin słonecznika. W efekcie powstaje znaczący udział fragmentów o cechach sprzyjających zarówno aktywności DPPH, jak i hamowaniu ACE, takich jak peptydy krótsze lub średniej długości zawierające reszty aromatyczne i/lub hydrofobowe. Jednocześnie w mniejszym stopniu ujawnia się efekt nadmiernej hydrolizy, który mógłby prowadzić do degradacji kluczowych sekwencji. W przypadku ostropestu zależność okazała się bardziej złożona. Predykcja wskazywała, że papaina generuje szczególnie dużo fragmentów bioaktywnych (choć bromelaina mogła generować więcej fragmentów ogółem), natomiast wyniki doświadczalne wykazały, że hydrolizat ostropestowy po papainie cechował się najwyższą aktywnością w ABTS i FRAP oraz dobrym hamowaniem ACE, podczas gdy w DPPH ostropest pozostawał wyraźnie najsłabszy niezależnie od enzymu. Obserwacja ta pozwala sformułować kilka wniosków. Po pierwsze, w ostropeście

prawdopodobnie powstaje pula peptydów i/lub współwystępujących składników niebiałkowych preferencyjnie aktywnych w mechanizmach typu SET (FRAP) oraz w układach, w których rodnik ma bardziej uniwersalny charakter (ABTS), natomiast w bardziej hydrofobowym układzie DPPH potencjał ten ujawnia się słabiej. Po drugie, zgodność predykcji *in silico* z wynikami ABTS/FRAP może mieć charakter pośredni, ponieważ aktywności antyoksydacyjne mogą być istotnie wzmacniane przez składniki towarzyszące (np. fenole), których BIOPEP nie obejmuje.

Zróżnicowanie rezultatów w trzech testach antyoksydacyjnych nie świadczy o niespójności danych, lecz odzwierciedla fakt, że poszczególne metody mierzą różne aspekty reaktywności. DPPH opiera się na zmiataniu stabilnego rodnika w warunkach, w których istotna jest m.in. rozpuszczalność i dostępność antyoksydantu w danej fazie; reakcja często faworyzuje związki i peptydy bardziej hydrofobowe lub zawierające określone reszty aromatyczne zdolne do stabilizacji rodnika (Nicklisch i Waite, 2014). ABTS jest metodą bardziej uniwersalną, reagującą z szerszą klasą antyoksydantów (zarówno hydrofilowych, jak i lipofilowych) i często lepiej odzwierciedlającą potencjał mieszanin o złożonym składzie (Re i in., 1999). FRAP natomiast nie jest testem zmiatania rodnika, lecz miarą zdolności redukującej (donacji elektronu) w warunkach kwaśnych (Benzie i Strain, 1996). W świetle tych mechanizmów uzasadnione staje się, dlaczego hydrolizaty słonecznikowe (szczególnie po bromelainie i ficynie) dominują w DPPH, natomiast hydrolizaty ostropestowe (zwłaszcza po papainie) dominują w ABTS i wykazują wysoką zdolność redukującą w FRAP: są to odmienne „typy” mieszanin antyoksydacyjnych, potencjalnie różniące się udziałem peptydów hydrofobowych i aromatycznych oraz wpływem składników towarzyszących. Analogicznie, brak prostego przełożenia pomiędzy testami antyoksydacyjnymi a hamowaniem ACE jest zgodny z odmiennością mechanizmów bioaktywności. Hamowanie ACE zależy od dopasowania sekwencji do centrum aktywnego enzymu i od oddziaływań elektrostatycznych oraz hydrofobowych. W konsekwencji hydrolizat może być umiarkowanym antyoksydantem w DPPH, a zarazem bardzo dobrym inhibitorem ACE, jeśli zawiera krótki zestaw peptydów o korzystnych cechach końca C-terminalnego. W literaturze podkreśla się, że aktywne peptydy ACE-inhibitorowe są zwykle krótkie (często 2–12 aminokwasów) i wykazują preferencję obecności reszt aromatycznych lub hydrofobowych w pobliżu C-końca, co ułatwia oddziaływanie w kieszeniach wiążących ACE, podczas gdy peptydy przeciwutleniające mogą być dłuższe, a ich aktywność wynikać zarówno z reszt aromatycznych (donacja protonu i stabilizacja rodnika), jak i z reszt

kwasowych/zasadowych (chelatuujących metale) czy histydyny (oddziaływania z jonami metali) (Vermeirssen i in., 2004; Li i in., 2025).

Stopień hydrolizy (DH) stanowi podstawowy parametr opisujący postęp proteolizy i umożliwia porównanie przebiegu reakcji w różnych układach enzym–substrat. W przeprowadzonych doświadczeniach DH różnił się w zależności od surowca i zastosowanej proteazy, osiągając wartości około 10–25% (w zależności od warunków procesu), co pozostaje zbliżone do danych literaturowych dla układów porównywalnych. Domokos Szabolcsy i in. (2024), analizując hydrolizę białek roślin strączkowych, wykazali, że papaina osiągała najwyższy DH po 12 godzinach (około 28% dla ciecierzycy i około 35% dla soczewicy), podczas gdy bromelaina maksymalnie około 20–31%, a ficyna około 21%. Podobnie Zheng i in. (2020) wskazali, że w hydrolizie białka mung wartości DH po 5 godzinach wynosiły rzędu kilkunastu procent (bromelaina około 15%, ficyna około 11%). Wyższe stopnie hydrolizy (≥ 20 –30%) są częściej osiągane przy użyciu proteaz mikrobiologicznych o wysokiej aktywności proteolitycznej, takich jak Alcalase. Przykładowo Megías i in. (2009) wykazali, że trawienie izolatu białek słonecznika Alcalase przez 60 min pozwalało uzyskać $DH = 27,7\%$, natomiast hydroliza sekwencyjna Alcalase/Flavourzyme prowadziła do dalszego wzrostu DH (około 54–66%). Z perspektywy relacji „DH – aktywność” istotne jest, że najwyższy DH nie stanowił uniwersalnego predyktora najwyższej bioaktywności, co bezpośrednio wspiera tezę, iż w przypadku peptydów bioaktywnych decydujące znaczenie ma nie intensywność „pocięcia” białka, lecz jakość powstałych sekwencji i ich proporcje. Badania modelowe często wskazują, że wzrost DH do pewnego poziomu sprzyja generowaniu aktywnych fragmentów, natomiast zbyt daleko posunięta hydroliza może obniżać aktywność wskutek rozpadu peptydów aktywnych do aminokwasów lub bardzo krótkich fragmentów o niższym potencjale (Hen i in., 2012). W niniejszych wynikach zasada ta uwidacznia się m.in. w porównaniu papainy i bromelainy: papaina konsekwentnie generowała najwyższy DH, jednak najwyższe hamowanie ACE dla słonecznika zapewniała bromelaina, co sugeruje, że mniej efektywna hydroliza mogła lepiej zachować bądź wyeksponować sekwencje o korzystnym C-końcu, zamiast poddawać je wtórnej degradacji. Z kolei przewaga papainy w hamowaniu ACE w przypadku rzepaku może wynikać z tego, że sekwencje krucyferyny po cięciu papainą dostarczają szczególnie dużego udziału krótkich peptydów o wysokiej aktywności.

Powyższe obserwacje uzasadniają bardziej pogłębioną interpretację różnic w skuteczności enzymów w kontekście ich specyficzności oraz właściwości substratu. Ficyna

– zgodnie z danymi literaturowymi – wykazuje preferencję cięcia przy wiązaniach z dużą hydrofobową resztą w pozycji P2, co może prowadzić do powstawania mieszanin o relatywnie wysokiej hydrofobowości i bez dominacji produktów di-/tripeptydowych (Zhai i in., 2021). Jest to spójne z obserwacją, że ficyna bywała konkurencyjna w DPPH (szczególnie w przypadku rzepaku), natomiast wypadła słabiej w hamowaniu ACE w ostropestzie, gdzie prawdopodobnie większe znaczenie miały krótsze sekwencje o odmiennym profilu C-końca. Bromelaina generowała układy szczególnie korzystne dla słonecznika, co można łączyć z dopasowaniem preferencji cięcia do sekwencji i struktury globulin słonecznika; jednocześnie jej produktywność *in silico* była wysoka, co sugeruje obecność licznych potencjalnych motywów ujawnianych właśnie przez ten enzym. Papaina, pracująca w wyższej temperaturze i szerokim zakresie pH, mogła sprzyjać intensywniejszemu uwalnianiu struktury białek i osiągnięciu najwyższego DH, co z kolei przekładało się na wysokie wartości ABTS/FRAP oraz na silne hamowanie ACE dla rzepaku. Różnice te nie powinny jednak prowadzić do konkluzji, że jeden enzym jest „najlepszy” w sposób uniwersalny; przeciwnie, stanowią dowód, że optymalizacja jest wypadkową sekwencji i struktury białka (oraz stopnia denaturacji po ekstrakcji), specyficzności proteazy, parametrów procesu (pH, temperatura, czas, dawka enzymu) oraz obecności związków towarzyszących (cukry, fenole), które mogą stabilizować lub destabilizować białka i peptydy oraz wpływać na odczyt aktywności.

Uzyskane w niniejszej pracy wartości aktywności przeciwutleniającej (ABTS: 443,9–832,5 $\mu\text{mol Trolox/g s.m.}$; DPPH: 59,6–390,8 $\mu\text{mol Trolox/g s.m.}$; FRAP: 140,5–237,5 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$) lokują otrzymane hydrolizaty w zakresie raportowanym dla wielu mieszanin peptydowych i ekstraktów roślinnych, przy jednoczesnej wyraźnej specyfice surowcowej. W teście ABTS nawet najniższe wartości dla rzepaku przewyższają zakresy raportowane dla hydrolizatów białek lnu (170–220 $\mu\text{mol Trolox/g}$), podczas gdy FRAP w tej pracy pozostaje częściowo zbliżony do zakresu obserwowanego dla hydrolizatów lnianych (200–240 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$). Sugeruje to porównywalną siłę redukującą przy jednocześnie silniejszej reaktywności wobec ABTS•+ w analizowanych układach (Karamać i in., 2016). W innym badaniu oczyszczona frakcja peptydowa z hydrolizatu białka otrębów ryżowych osiągała 214,6 $\mu\text{mol Trolox/g}$ w ABTS oraz 104,8 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ w FRAP (Phongthai i Rawdkuen, 2019), natomiast dla hydrolizatów białka grochu raportowano wartości rzędu 111 $\mu\text{mol Trolox/g}$ w teście ABTS (Karamać i Bartolomé, 2025). Na tym tle szczególnie wyróżnia się bardzo wysoka aktywność ABTS hydrolizatów ostropestowych,

podczas gdy FRAP w większości przypadków pozostaje porównywalny z wartościami często raportowanymi dla hydrolizatów roślinnych.

Wartości IC_{50} dla inhibicji ACE (około 0,3–0,7 mg/mL) mieszczą się w przedziale typowo raportowanym dla hydrolizatów białek roślinnych otrzymywanych przy użyciu proteaz roślinnych. Boschini i Arnoldi (2014) wskazali dla hydrolizatów białek roślin strączkowych wartości IC_{50} od 0,224 mg/mL (soja) do 0,673 mg/mL (ciecierzyca), natomiast Ishiguro i in. (2012) dla hydrolizatów białek batata raportowali zakres 0,158–1,083 mg/mL. Malomo i in. (2015) wykazali dla hydrolizatów białek konopi IC_{50} w przedziale 0,016–0,228 mg/mL, co podkreśla znaczną zmienność wyników zależną od surowca, enzymu i warunków procesu. Jednocześnie literatura wskazuje, że istotną drogą poprawy aktywności ACE-inhibitorowej może być frakcjonowanie hydrolizatów: Selamassakul i in. (2020) wykazali, że frakcja <1 kDa hydrolizatu białek ryżu po bromelainie osiągała IC_{50} = 0,20 mg/mL po ultrafiltracji, a Şimşek i in. (2022) odnotowali IC_{50} = 0,06 mg/mL dla frakcji <5 kDa z hydrolizatu białka słonecznika (trypsyna + chymotrypsyna). Wyniki te potwierdzają, że selekcja niskocząsteczkowych peptydów może istotnie zwiększać skuteczność poprzez koncentrację najbardziej aktywnych składników.

W kontekście wdrożeniowym kluczowe znaczenie ma odniesienie opisanych mechanizmów do rezultatów uzyskanych w skali przemysłowej, ponieważ dopiero na tym etapie ujawniają się realne ograniczenia i punkty krytyczne procesu. Zaobserwowany spadek wydajności izolacji białka po przeskalowaniu – najmniej dotkliwy dla rzepaku, bardziej widoczny dla słonecznika i szczególnie dla ostropestu – jest typowym efektem przejścia z warunków laboratoryjnych do większej objętości. W większej skali pojawiają się bowiem zjawiska nieobecne lub marginalne w małej skali: gorsza jednorodność mieszania, wolniejsze wyrównywanie pH i temperatury w całej objętości, większe straty na etapach separacji (sedymentacja, przywieranie do aparatury, niedoskonałości wirowania), a także większa wrażliwość na zmienność partii surowca (wilgotność, udział frakcji włóknistej, pozostałości tłuszczu). Z punktu widzenia kontroli jakości oznacza to konieczność traktowania jako krytycznych m.in. standaryzacji surowca, kontroli pH i temperatury w czasie rzeczywistym wraz z zapewnieniem skutecznego mieszania, efektywności etapów rozdzielania faz (dobór parametrów pracy urządzeń separacyjnych), kontroli czasu przebywania mieszaniny na etapach podwyższonej temperatury oraz doboru metody suszenia i warunków termicznych.

Umiarkowany spadek aktywności hydrolizatów po przeskalowaniu w części parametrów można uznać za spodziewany, jeśli uwzględni się różnice pomiędzy suszeniem rozpyłowym a liofilizacją oraz większą ekspozycję mieszaniny na tlen i temperaturę na etapach koncentracji i suszenia. Z jednej strony wyniki wskazują, że proces jest wystarczająco stabilny, aby zachować kierunkowo bioaktywność produktu końcowego (co jest warunkiem koniecznym wykonalności wdrożenia). Z drugiej strony ujawniają realne punkty strat, które mogą być ograniczane poprzez optymalizację kontroli temperatury w reaktorze, ograniczenie ekspozycji na tlen oraz dobór parametrów suszenia rozpyłowego w sposób redukujący degradację i utlenianie peptydów, a także minimalizujący ryzyko reakcji Maillarda (istotne zwłaszcza w obecności cukrów). Niezależnie od aspektów jakościowych, wdrożenie wymaga także optymalizacji ekonomicznej: dawka enzymu i czas hydrolizy powinny być dobierane nie tylko pod kątem maksymalizacji aktywności, lecz również kosztu jednostkowego i wydajności procesu. W tym kontekście uzasadniona była decyzja o redukcji zawartości papainy z 10% (dającej najlepsze wyniki w skali laboratoryjnej) do 5% przy jednoczesnym wydłużeniu czasu reakcji do 3 godzin.

Wartość aplikacyjna pracy wynika z kilku elementów. Po pierwsze, wykazano możliwość wytworzenia hydrolizatów o aktywności przeciwutleniającej i/lub inhibitorowej wobec ACE z surowców ubocznych przemysłu olejarskiego, co wpisuje się w założenia gospodarki o obiegu zamkniętym oraz koncepcję wytwarzania produktów o wartości dodanej. Po drugie, porównanie trzech roślinnych proteaz dowiodło, że dobór enzymu istotnie kształtuje profil bioaktywności, co ma znaczenie technologiczne: ten sam surowiec może prowadzić do różnych funkcjonalności w zależności od enzymu i parametrów procesu. Po trzecie, testy w skali przemysłowej potwierdzają realność przejścia z laboratorium do skali wdrożeniowej przy zachowaniu funkcjonalności produktu końcowego w postaci proszku, preferowanej w wielu zastosowaniach przemysłowych. Równocześnie należy jasno wskazać bariery implementacyjne, takie jak konieczność stabilizacji i powtarzalności procesu wobec zmienności surowca, ryzyko pogorszenia cech sensorycznych (zwłaszcza goryczy typowej dla hydrolizatów o wysokim udziale peptydów hydrofobowych), potrzeba walidacji bezpieczeństwa (alergenność/toksyczność) oraz konieczność dopasowania produktu do docelowej matrycy żywnościowej (rozpuszczalność, wpływ na teksturę i smak). Literatura wskazuje, że frakcjonowanie (np. ultrafiltracja i pozyskanie frakcji <1 kDa) może jednocześnie wzmacniać wybrane aktywności biofunkcjonalne oraz poprawiać profil

smakowy (Selamassakul i in., 2020), co stanowi realną ścieżkę dalszego doskonalenia produktu w kierunku komercjalizacji.

Ograniczenia przeprowadzonych badań należy rozpatrywać na kilku poziomach. Po pierwsze, stopień hydrolizy oznaczano metodą pośrednią opartą na frakcji rozpuszczalnej w TCA i pomiarze absorbancji przy 280 nm, co jest użyteczne porównawczo, lecz obarczone ograniczeniami: metoda nie rozróżnia oligopeptydów od wolnych aminokwasów, zależy od udziału reszt aromatycznych absorbujących przy 280 nm oraz może pomijać część bardzo małych fragmentów bądź być podatna na wpływ substancji towarzyszących. W konsekwencji DH należy interpretować jako wskaźnik względny, a nie absolutną miarę liczby przeciętych wiązań peptydowych. Po drugie, aktywność hydrolizatów oceniano na poziomie testów chemicznych/*in vitro* (DPPH, ABTS, FRAP) oraz testu enzymatycznego ACE w warunkach modelowych; podejście to jest standardowe na etapie badań rozwojowych, lecz nie uwzględnia biodostępności, stabilności peptydów w przewodzie pokarmowym, transportu przez nabłonek jelitowy ani metabolizmu, a zatem aktywność *in vivo* może różnić się od aktywności *in vitro*. Po trzecie, praca nie obejmowała identyfikacji sekwencji peptydów (np. LC-MS/MS) ani frakcjonowania hydrolizatów na klasy mas cząsteczkowych, przez co interpretacja mechanistyczna musi opierać się na przesłankach wynikających z właściwości enzymów i profili aktywności, a nie na przypisaniu konkretnych sekwencji do konkretnych efektów. Po czwarte, brak oceny alergenności i toksyczności ogranicza możliwość bezpośredniego wnioskowania o zastosowaniach spożywczych bez dodatkowych etapów walidacji, zwłaszcza że surowce olejarskie mogą zawierać białka potencjalnie alergenne (np. napiny rzepaku), a hydroliza nie zawsze eliminuje epitopy immunoreaktywne.

Pomimo wskazanych ograniczeń uzyskane dane układają się w spójny obraz. Każdy z trzech makuchów może stanowić źródło hydrolizatów bioaktywnych, a profil aktywności zależy od enzymu oraz parametrów hydrolizy. Predykcje *in silico* są użyteczne na etapie selekcji strategii, jednak wymagają walidacji i interpretacji uwzględniającej realia procesowe. Nie należy oczekiwać prostych korelacji pomiędzy DH, aktywnością przeciwutleniającą i hamowaniem ACE, ponieważ parametry te odnoszą się do odmiennych mechanizmów. Wykonane przeskalowanie potwierdza wykonalność procesu, ale jednocześnie ujawnia krytyczne punkty (wydajność izolacji, kontrola parametrów procesu oraz wpływ suszenia i ekspozycji na tlen oraz temperaturę), które współdecydują o jakości produktu końcowego. Jako perspektywy dalszych prac należy wskazać przede wszystkim

identyfikację sekwencji peptydów odpowiedzialnych za obserwowane aktywności, z wykorzystaniem peptydomiki LC-MS/MS. Istotnym kierunkiem jest również frakcjonowanie hydrolizatów (np. metodą ultrafiltracji) w celu wzbogacenia frakcji o najwyższej aktywności oraz korzystniejszym profilem sensorycznym. Kolejny etap powinny stanowić badania stabilności w warunkach symulowanego trawienia (*in vitro* digestion) oraz w modelach komórkowych, a następnie walidacja *in vivo* i ocena bezpieczeństwa (alergenność/toksyczność) przed docelowym zastosowaniem w produktach spożywczych. Równolegle uzasadnione jest prowadzenie prac nad optymalizacją krytycznych punktów technologicznych w skali przemysłowej (pH, temperatura, mieszanie, kontrola tlenu, parametry suszenia), aby ograniczyć obserwowane straty wydajności i aktywności oraz zwiększyć powtarzalność produktu.

8. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań obejmujących analizy *in silico*, badania doświadczalne w skali laboratoryjnej oraz weryfikację procesu w skali przemysłowej sformułowano następujące wnioski:

Wnioski naukowe

1. Wykazano, że białka pochodzące z makuchów rzepaku, słonecznika oraz ostropestu plamistego stanowią wartościowe źródło sekwencji peptydowych o potencjale bioaktywnym, w szczególności o właściwościach antyoksydacyjnych oraz inhibitorowych wobec enzymu konwertującego angiotensynę (ACE).
2. Analizy *in silico* potwierdziły obecność licznych sekwencji peptydowych o potencjale bioaktywnym w strukturze białek badanych surowców, jednak uzyskane predykcje tylko częściowo korelowały z wynikami uzyskanymi w warunkach doświadczalnych, co wskazuje na ograniczoną zdolność modeli bioinformatycznych do przewidywania rzeczywistej aktywności biologicznej hydrolizatów.
3. Wykazano istotny wpływ rodzaju zastosowanego enzymu proteolitycznego na stopień hydrolizy oraz profil bioaktywności otrzymanych hydrolizatów, przy czym papaina charakteryzowała się najwyższą efektywnością w generowaniu peptydów o aktywności antyoksydacyjnej i hipotensyjnej.
4. Stwierdzono, że stopień hydrolizy nie pozostaje w prostym związku liniowym z aktywnością biologiczną hydrolizatów, co potwierdza kluczową rolę składu sekwencyjnego i długości peptydów, a nie wyłącznie intensywności procesu proteolizy.
5. Wykazano zróżnicowane profile aktywności bioaktywnej hydrolizatów ocenianych za pomocą testów DPPH, ABTS i ACE, co potwierdza, że poszczególne metody analityczne odzwierciedlają odmienne mechanizmy działania peptydów bioaktywnych.

Wnioski technologiczne

6.Opracowano powtarzalny i skalowalny proces technologiczny obejmujący ekstrakcję białek z makuchów oleistych, ich enzymatyczną hydrolizę oraz stabilizację produktu końcowego, możliwy do realizacji w warunkach przemysłowych.

7.Wykazano, że kluczowymi parametrami determinującymi efektywność procesu są: pH i temperatura ekstrakcji, rodzaj i dawka enzymu proteolitycznego, czas hydrolizy oraz warunki dezaktywacji enzymu, których właściwa kontrola umożliwia uzyskanie hydrolizatów o pożądanych właściwościach funkcjonalnych.

8.Potwierdzono, że proces hydrolizy enzymatycznej prowadzony w skali przemysłowej pozwala na uzyskanie hydrolizatów o porównywalnym profilu bioaktywności do produktów otrzymywanych w skali laboratoryjnej, co świadczy o stabilności i reprodukowalności opracowanej technologii.

9.Zidentyfikowano etapy procesu szczególnie wrażliwe technologicznie, w tym regulację pH, kontrolę temperatury hydrolizy oraz etap zatężania i suszenia, które wymagają ścisłego nadzoru w warunkach produkcyjnych.

Wnioski aplikacyjne i wdrożeniowe

10.Opracowana technologia umożliwia efektywne zagospodarowanie ubocznych produktów przemysłu olejarskiego, wpisując się w założenia gospodarki o obiegu zamkniętym oraz zrównoważonego rozwoju.

11.Uzyskane hydrolizaty białkowe wykazują potencjał do zastosowania jako składniki funkcjonalne w produktach spożywczych, suplementach diety oraz żywności o deklarowanych właściwościach prozdrowotnych.

12.Największy potencjał aplikacyjny wykazują hydrolizaty otrzymane z wykorzystaniem papainy, charakteryzujące się korzystnym połączeniem aktywności biologicznej oraz stabilności procesu technologicznego.

13. Przeprowadzone badania stanowią solidną podstawę do dalszych prac wdrożeniowych, obejmujących ocenę biodostępności peptydów, ich stabilności w warunkach przewodu pokarmowego oraz bezpieczeństwa stosowania w produktach żywnościowych.

9. Bibliografia

1. Ahn S, Chantre CO, Gannon AR, Lind JU, Campbell PH, Grevesse T, et al. Soy protein/cellulose nanofiber scaffolds mimicking skin extracellular matrix for enhanced wound healing. *Advanced Healthcare Materials*. 2018; 7:e1701175. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701175>
2. Alli I, Gribbs BF, Okoniewska MK, Konishi Y, Dumas F. Identification and characterization of phaseolin polypeptides in a crystalline protein isolated from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993; 41:1830–1834. <https://doi.org/10.1021/jf00035a005>
3. Amakye WK, Hou C, Xie L, Lin X, Gou N, Yuan E, Ren J. Bioactive Anti-Aging Agents and the Identification of New Anti-Oxidant Soybean Peptides. *Food Bioscience*. 2021; 42:101194. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101194>
4. Anson ML, Pader M. Extraction of Soy Protein. *US Patent* US2785155. 1955.
5. Antony P, Vijayan R. Bioactive Peptides as Potential Nutraceuticals for Diabetes Therapy: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22:9059. <https://doi.org/10.3390/ijms22169059>
6. Apone F, Barbulova A, Colucci MG. Plant and Microalgae Derived Peptides Are Advantageously Employed as Bioactive Compounds in Cosmetics. *Frontiers in Plant Science*. 2019; 10:756. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00756>
7. Aquilia S, Bello C, Pinna M, Bianchi S, Giurlani W, Ciardelli F, Rosi L, Papini AM. Incorporation of Protein Hydrolysate into Rapeseed Meal-Based Materials to Improve Flexibility. *Polymers*. 2025; 17:1740. <https://doi.org/10.3390/polym17131740>
8. Badger TM, Ronis MJJ, Simmen RCM, Simmen FA. Soy protein isolate and protection against cancer. *Journal of the American College of Nutrition*. 2005; 24:146S–149S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2005.10719456>
9. Barba FJ, Boussetta N, Vorobiev E. Emerging technologies for the recovery of isothiocyanates, protein and phenolic compounds from rapeseed and rapeseed press-cake: effect of high voltage electrical discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2015; 31:67–72. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.06.008>
10. Bedin S, Zanella K, Bragagnolo N, Taranto OP. Implication of microwaves on the extraction process of rice bran protein. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2019; 36(4):1653–1665. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190364s20180599>

11. Bekhit AA, Hopkins DL, Geesink G, Bekhit AA, Franks P. Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014; 54(8):1012–1031. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.623247>
12. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239(1):70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
13. Boye J, Zare F, Pletch A. Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*. 2010; 43:414–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
14. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*. 1995; 28(1):25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
15. Burnett C, Boyer I, Bergfeld W, Belsito D, Hill R, Klaassen C, Liebler D, Marks J, Shank R, Slaga T, Snyder P, Heldreth B. Safety Assessment of Plant-Derived Proteins and Peptides as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 2022; 41(2_suppl):5S–20S. <https://doi.org/10.1177/10915818221082579>
16. Chen C, Chi YJ, Zhao MY, et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*. 2012; 21:27–34. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0004-6>
17. Chew SC. Cold-pressed rapeseed (*Brassica napus*) oil: Chemistry and functionality. *Food Research International*. 2020; 131:108997. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108997>
18. Chien KB, Makridakis E, Shah RN. Three-dimensional printing of soy protein scaffolds for tissue regeneration. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2013; 19:417–426. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0383>
19. Chmielewska A, Kozłowska M, Rachwał D, Wnukowski P, Amarowicz R, Nebesny E, Rosicka-Kaczmarek J. Canola/Rapeseed Protein—Nutritional Value, Functionality and Food Application: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021; 61:3836–3856. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1802736>
20. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd ed. Lawrence Erlbaum Associates; 1988.

21. Cotabarren J, Rosso AM, Tellechea M, García-Pardo J, Lorenzo Rivera J, Obregón WD, Parisi MG. Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with papain. *Food Chemistry*. 2019; 274:848–856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.061>
22. Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*. 1971; 20(7):1637–1648. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9)
23. Dabbour M, He R, Ma H, Musa A. Optimization of ultrasound assisted extraction of protein from sunflower meal and its physicochemical and functional properties. *Journal of Food Process Engineering*. 2018; 41:e12799. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12799>
24. Đermanović B, Vujetić J, Sedlar T, Dragojlović D, Popović L, Kojić P, Jovanov P, Šarić B. Optimization of Protein Extraction from Rapeseed Oil Cake by Dephenolization Process for Scale-Up Application Using Artificial Neural Networks. *Foods*. 2025; 14:1762. <https://doi.org/10.3390/foods14101762>
25. Di Lena G, Sánchez del Pulgar J, Lucarini M, Durazzo A, Ondrejčíková P, Oancea F, Frincu R-M, Aguzzi A, Ferrari Nicoli S, Casini I, et al. Valorization Potentials of Rapeseed Meal in a Biorefinery Perspective: Focus on Nutritional and Bioactive Components. *Molecules*. 2021; 26(22):6787. <https://doi.org/10.3390/molecules26226787>
26. Dia VP, de Mejia EG. Lunasin induces apoptosis and modifies the expression of genes associated with extracellular matrix and cell adhesion in human metastatic colon cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011; 55:623–634. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000419>
27. Domínguez H, Núñez MJ, Lema JM. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. *Food Chemistry*. 1994; 49:271–286. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90073-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90073-6)
28. Domokos-Szabolcsy É, Alshaal T, Elhawat N, Kovács Z, Kaszás L, Béni Á, Kiss A. Enhanced oligopeptide and free tryptophan release from chickpea and lentil proteins: a comparative study of enzymatic modification with bromelain, ficin, and papain. *Plants*. 2024; 13(21):3100. <https://doi.org/10.3390/plants13213100>

29. Dong XY, Guo LL, Wei F, Li JF, Jiang ML, Li GM, Zhao YD, Chen H. Some characteristics and functional properties of rapeseed protein prepared by ultrasonication, ultrafiltration and isoelectric precipitation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011; 91(8):1488–1498. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4339>
30. Du T, Xu Y, Xu X, Xiong S, Zhang L, Dong B, Huang J, Huang T, Xiao M, Xiong T, et al. ACE inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of fermented black sesame seed: Random forest-based optimization, screening, and molecular docking analysis. *Food Chemistry*. 2023; 437:137921. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137921>
31. Duan X, Dong Y, Zhang M, Li Z, Bu G, Chen F. Identification and molecular interactions of novel ACE inhibitory peptides from rapeseed protein. *Food Chemistry*. 2023; 422:136085. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136085>
32. Duan X, Zhang M, Chen F. Prediction and analysis of antimicrobial peptides from rapeseed protein using in silico approach. *Journal of Food Biochemistry*. 2021; 45(4):e13598. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13598>
33. Duan Y, Yang X, Shen R, Zhang L, Ma X, Qu Y, He L, Tong L, Han G. From By-Products to Promising Bifunctional Food Ingredients: Physicochemical Characterization and Antioxidant and Emulsifying Improvement Evaluation Based on the Synergy of Phenolic Acids, Flavonoids and Tannins with Bovine Liver Hydrolysates. *Foods*. 2025; 14(13):2225. <https://doi.org/10.3390/foods14132225>
34. Ermis E. Evaluation of the use of spray-dried sunflower meal protein in frankfurter-type chicken sausage. *Eurasian Journal of Food Science and Technology*. 2024; 8(2):52–60.
35. Fleddermann M, Fechner A, Rößler A, Liebert F, Pastor A, Bähr M, Jahreis G. Nutritional evaluation of rapeseed protein compared to soy protein for quality, plasma amino acids, and nitrogen balance--a randomized cross-over intervention study in humans. *Clinical Nutrition*. 2013; 32(4):519–526. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.11.005>
36. Gagat P, Ostrówka M, Duda-Madej A, Mackiewicz P. Enhancing Antimicrobial Peptide Activity through Modifications of Charge, Hydrophobicity, and Structure. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25:10821. <https://doi.org/10.3390/ijms251910821>

37. Galvez AF, Chen N, Macasieb J, de Lumen BO. Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Research*. 2001; 61(20):7473–7478.
38. Gao Y, Wang L, Zhang X, Zhou Z, Shen X, Hu H, Sun R, Tang J. Advances in Self-Assembled Peptides as Drug Carriers. *Pharmaceutics*. 2023; 15:482. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020482>
39. Garbacz K, Wawrzykowski J, Czelej M, Czernecki T, Waśko A. Recent Trends in the Application of Oilseed-Derived Protein Hydrolysates as Functional Foods. *Foods*. 2023; 12(20):3861. <https://doi.org/10.3390/foods12203861>
40. Garbacz K, Wawrzykowski J, Czelej M, Waśko A. In Silico Proteomic Profiling and Bioactive Peptide Potential of Rapeseed Meal. *Foods*. 2025; 14:2451. <https://doi.org/10.3390/foods14142451>
41. Girgih AT, He R, Malomo S, Offengenden M, Wu J, Aluko RE. Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods*. 2014; 6:384–394. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.005>
42. González-Pérez S, Vereijken JM. Sunflower proteins: Overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007; 87(12):2173–2191. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2971>
43. Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P. Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2020; 11:93–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
44. Grand View Research. Functional Foods Market (2024–2030). 2024. [dostęp: 12.12.2025]. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/functional-food-market>
45. Grasso S, Omoarukhe E, Wen X, Papoutsis K, Methven L. The use of upcycled defatted sunflower seed flour as a functional ingredient in biscuits. *Foods*. 2019; 8(8):305. <https://doi.org/10.3390/foods8080305>
46. Grudniewska A, de Melo EM, Chan A, Gniska R, Boratynski F, Matharu AS. Enhanced protein extraction from oilseed cakes using glycerol-choline chloride deep eutectic solvents: a biorefinery approach. *ACS Sustainable Chemistry &*

- Engineering*. 2018; 6:15791–15800.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04359>
47. Grzonka Z, Kasprzykowski F, Wiczak W. Cysteine proteases. In: Polaina J, MacCabe AP, eds. *Industrial Enzymes*. Dordrecht: Springer; 2007. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_11
 48. Han R, Hernandez Alvarez AJ, Maycock J, Murray B, Boesch C. Differential effects of oilseed protein hydrolysates in attenuating inflammation in murine macrophages. *Food Bioscience*. 2022; 49:101860. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101860>
 49. Han R, Maycock J, Murray BS, Boesch C. Identification of angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides derived from oilseed proteins using two integrated bioinformatic approaches. *Food Research International*. 2019; 115:283–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.015>
 50. Hansen L, Bu F, Ismail BP. Structure-Function Guided Extraction and Scale-Up of Pea Protein Isolate Production. *Foods*. 2022; 11:3773. <https://doi.org/10.3390/foods11233773>
 51. He R, Ju X, Yuan J, Wang L, Girgih AT, Aluko RE. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Research International*. 2012; 49:432–438. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.023>
 52. He R, Wang Y, Yang Y, Wang Z, Ju X, Yuan J. Rapeseed protein-derived ACE inhibitory peptides LY, RALP and GHS show antioxidant and anti-inflammatory effects on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*. 2019; 55:211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.031>
 53. Hu R, Chen G, Li Y. Production and Characterization of Antioxidative Hydrolysates and Peptides from Corn Gluten Meal Using Papain, Ficin, and Bromelain. *Molecules*. 2020; 25:4091. <https://doi.org/10.3390/molecules25184091>
 54. Hwang JS, Yoo HJ, Song HJ, Kim KK, Chun YJ, Matsui T, et al. Inflammation-related signaling pathways implicating TGFβ are revealed in the expression profiling of MCF7 cell treated with fermented soybean (chungkookjang). *Nutrition and Cancer*. 2011; 63:645–652. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.551987>
 55. Inoue Y, Itoh H, Aoki M, Ogawa S, Yamane T, Baba T, Tachibana N, Kohno M, Oishi Y, Kobayashi-Hattori K. Accelerating effect of soy peptides containing collagen peptides on type I and III collagen levels in rat skin. *Bioscience*,

- Biotechnology, and Biochemistry. 2012; 76(8):1549–1551.
<https://doi.org/10.1271/bbb.120088>
56. Iwaniak A, Darewicz M, Mogut D, Minkiewicz P. Elucidation of the role of in silico methodologies in approaches to studying bioactive peptides derived from foods. *Journal of Functional Foods*. 2019; 61:103486.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103486>
 57. Jiang M, Yan H, He R, et al. Purification and a molecular docking study of α -glucosidase-inhibitory peptides from a soybean protein hydrolysate with ultrasonic pretreatment. *European Food Research and Technology*. 2018; 244:1995–2005.
<https://doi.org/10.1007/s00217-018-3111-7>
 58. Ju D-T, Kumar KA, Kuo W-W, Ho T-J, Chang R-L, Lin W-T, Day CH, Viswanadha VVP, Liao P-H, Huang C-Y. Bioactive Peptide VHVV Upregulates the Long-Term Memory-Related Biomarkers in Adult Spontaneously Hypertensive Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20:3069.
<https://doi.org/10.3390/ijms20123069>
 59. Kalaydzhiev H, Georgiev R, Ivanova P, Stoyanova M, Silva CLM, Chalova VI. Enhanced Solubility of Rapeseed Meal Protein Isolates Prepared by Sequential Isoelectric Precipitation. *Foods*. 2020; 9:703. <https://doi.org/10.3390/foods9060703>
 60. Karabulut G, Subasi BG, Ivanova P, Goksen G, Chalova V, Capanoglu E. Towards Sustainable and Nutritional-Based Plant Protein Sources: A Review on the Role of Rapeseed. *Food Research International*. 2025; 202:115553.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.115553>
 61. Karamać M, Bartolomé B. Physicochemical Properties and Antioxidant Capacity of Tryptic Hydrolysates of a Pea Protein Isolate: Influence of the Degree of Hydrolysis. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2025; 75(4):351–362.
 62. Karamać M, Kosińska-Cagnazzo A, Kulczyk A. Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17:1027. <https://doi.org/10.3390/ijms17071027>
 63. Kaufman-Szymczyk A, Kaczmarek W, Fabianowska-Majewska K, Lubecka-Gajewska K. Lunasin and Its Epigenetic Impact in Cancer Chemoprevention. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24:9187.
<https://doi.org/10.3390/ijms24119187>

64. Klamczynska B, Czuchajowska Z, Baik BK. Composition, soaking, cooking properties and thermal characteristics of starch of chickpeas, wrinkled peas and smooth peas. *International Journal of Food Science & Technology*. 2001; 36:563–572. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00486.x>
65. Koopman R, Crombach N, Gijsen AP, Walrand S, Fauquant J, Kies AK, Lemosquet S, Saris WH, Boirie Y, van Loon LJ. Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2009; 90(1):106–115. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27474>
66. Kumar V, Mangla B, Javed S, Ahsan W, Kumar P, Garg V, Dureja H. Bromelain: A review of its mechanisms, pharmacological effects and potential applications. *Food & Function*. 2023; 14(18):8101–8128. <https://doi.org/10.1039/d3fo01060k>
67. Lakens D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: A practical primer for t-tests and ANOVAs. *Frontiers in Psychology*. 2013; 4:863. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00863>
68. Lambo MT, Liu R, Zhang X, Zhang Y, Li Y, Sun M. Nutritional Evaluation of Milk Thistle Meal as a Protein Feedstuff for Diets of Dairy Cattle. *Animals*. 2024; 14:1864. <https://doi.org/10.3390/ani14131864>
69. Lammi C, Zandoni C, Arnoldi A, Vistoli G. Two peptides from soy beta-Conglycinin induce a hypocholesterolemic effect in HepG2 Cells by a statin-like mechanism: Comparative in vitro and in silico modeling studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; 63:7945–7951. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03048>
70. Li T, Du W, Huang H, Wan L, Shang C, Mao X, Kong X. Research Progress on the Mechanism of Action of Food-Derived ACE-Inhibitory Peptides. *Life*. 2025; 15(8):1219. <https://doi.org/10.3390/life15081219>
71. Liu Y, Liu Y, Li P, Li Z. Antibacterial properties of cyclolinopeptides from flaxseed oil and their application on beef. *Food Chemistry*. 2022; 385:132715. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132715>
72. Lopes DS, Almeida LGVC, Nardo AE, Añón MC, Dos Santos LD, Rossini BC, Pinilla CMB, Pacheco MTB, Galland F. Antioxidant bioactivity of sunflower protein hydrolysates in Caco-2 cells and in silico structural properties. *Food Chemistry*. 2025; 487:144733. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144733>

73. López-Salazar H, Camacho-Díaz BH, Ocampo MLA, Jiménez-Aparicio AR. Microwave-assisted extraction of functional compounds from plants: A Review. *BioResources*. 2023; 18(3):6614–6638. <https://doi.org/10.15376/biores.18.3.6614-6638>
74. Ma K, Wang Z, Ju X, Huang J, He R. Rapeseed peptide inhibits HepG2 cell proliferation by regulating the mitochondrial and P53 signaling pathways. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2023; 103(3):1474–1483. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12243>
75. Marczak ED, Usui H, Fujita H, Yang Y, Yokoo M, Lipkowski AW, Yoshikawa M. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides*. 2003; 24(6):791–798. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(03\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(03)00174-8)
76. Matkawala F, Nighojkar S, Nighojkar A. Next-generation nutraceuticals: bioactive peptides from plant proteases. *BioTechnologia*. 2022; 103(4):397–408. <https://doi.org/10.5114/bta.2022.120708>
77. Mazorra-Manzano MA, Ramírez-Suarez JC, Yada RY. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018; 58(13):2147–2163. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1308312>
78. Megías C, del Mar Yust M, Pedroche J, Lquari H, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, Vioque J. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(7):1928–1932. <https://doi.org/10.1021/jf034707r>
79. Megías C, Pedroche J, del Mar Yust M. Sunflower Protein Hydrolysates Reduce Cholesterol Micellar Solubility. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2009; 64:86–93. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0108-1>
80. Minkiewicz P, Iwaniak A, Darewicz M. BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20:5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
81. Minkiewicz P, Iwaniak A, Darewicz M. BIOPEP-UWM Virtual—A Novel Database of Food-Derived Peptides with In Silico-Predicted Biological Activity. *Applied Sciences*. 2022; 12(14):7204. <https://doi.org/10.3390/app12147204>
82. Morellon-Sterling R, El-Siar H, Tavano OL, et al. Ficin: a protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.144>

83. Moreno-González M, Chuekitkumchorn P, Silva M, Groenewoud RM. High throughput process development for the purification of rapeseed proteins napin and cruciferin by ion exchange chromatography. *Food and Bioproducts Processing*. 2021; 125:228–241. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.11.011>
84. Mudgil P, Ajayi FF, Alkaabi A, Alsubousi M, Singh BP, Maqsood S. Flaxseed- and chia seed-derived protein hydrolysates exhibiting enhanced in vitro antidiabetic, anti-obesity, and antioxidant properties. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2023; 7:1223884. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1223884>
85. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(7):3380.
86. Murru M, Calvo C. Sunflower protein enrichment. Methods and potential applications. *OCL*. 2020; 27:17. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020007>
87. Nasri M. Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. *Advances in Food Research*. 2017; 81:109–159. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>
88. Nath A, Ahmad AS, Amankwaa A, Csehi B, Mednyánszky Z, Szerdahelyi E, Tóth A, Tormási J, Truong DH, Abrankó L, et al. Hydrolysis of Soybean Milk Protein by Papain: Antioxidant, Anti-Angiotensin, Antigenic and Digestibility Perspectives. *Bioengineering*. 2022; 9:418. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9090418>
89. Nawaz KA, David SM, Muruges E, Thandeeswaran M, Kiran KG, Mahendran R, Angayarkanni J. Identification and in silico characterization of a novel peptide inhibitor of angiotensin converting enzyme from pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Phytomedicine*. 2017; 36:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.013>
90. Nguyen T, Le QT, Tran MLT, Ta KN, Nguyen KT. Antioxidant, Anti-Tyrosinase, and Wound-Healing Capacities of Soy Protein Hydrolysates Obtained by Hydrolysis with Papaya and Cantaloupe Juices Showing Proteolytic Activity. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2024; 74(1):5–15. <https://doi.org/10.31883/pjfn/176894>
91. Nicklisch SCT, Waite JH. Optimized DPPH assay in a detergent-based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins. *MethodsX*. 2014; 1:233–238. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.10.004>
92. Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE. Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl₄-induced liver

- injury in low-protein fed rats. *Phytotherapy Research*. 2005; 19:341–345. <https://doi.org/10.1002/ptr.1685>
93. Nourmohammadi E, Mahoonak AS, Alami M, Ghorbani M. Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil cake protein. *International Journal of Food Properties*. 2017; 20:3244–3255. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1283516>
 94. Nwachukwu ID, Girgih AT, Malomo SA, Onuh JO, Aluko RE. Thermoase-derived flaxseed protein hydrolysates and membrane ultrafiltration peptide fractions have systolic blood pressure-lowering effects in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15:18131–18147. <https://doi.org/10.3390/ijms151018131>
 95. Olsen SH, Hinge Andersen J. The estimation of vicine and convicine in fababeans (*Vicia faba* L.) and isolated fababean proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1978; 29:323–331. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290407>
 96. Opyd PM, Jurgoński A. Intestinal, liver and lipid disorders in genetically obese rats are more efficiently reduced by dietary milk thistle seeds than their oil. *Scientific Reports*. 2021; 11:20895. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00397-1>
 97. Ospina-Quiroga JL, García-Moreno PJ, Guadix A, Guadix EM, Almécija-Rodríguez MC, Pérez-Gálvez R. Evaluation of Plant Protein Hydrolysates as Natural Antioxidants in Fish Oil-In-Water Emulsions. *Antioxidants*. 2022; 11:1612. <https://doi.org/10.3390/antiox11081612>
 98. Paredes-Lopez O, Ordorica-Falomir C, Olivares-Vazque MR. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. *Journal of Food Science*. 1991; 56:726–729. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05367.x>
 99. Peighambardoust SH, Karami Z, Pateiro M, Lorenzo JM. A Review on Health-Promoting, Biological, and Functional Aspects of Bioactive Peptides in Food Applications. *Biomolecules*. 2021; 11:631. <https://doi.org/10.3390/biom11050631>
 100. Peres Fabbri L, Cavallero A, Vidotto F, Gabriele M. Bioactive Peptides from Fermented Foods: Production Approaches, Sources, and Potential Health Benefits. *Foods*. 2024; 13(21):3369. <https://doi.org/10.3390/foods13213369>

101. Petraru A, Amariei S. A Novel Approach about Edible Packaging Materials Based on Oilcakes—A Review. *Polymers*. 2023; 15:3431. <https://doi.org/10.3390/polym15163431>
102. Phongthai S, Rawdkuen S. Fractionation and characterization of antioxidant peptides from rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. *Cereal Chemistry*. 2019; 97. <https://doi.org/10.1002/cche.10247>
103. Pickardt C, Eisner P, Kammerer DR, Carle R. Pilot plant preparation of light-coloured protein isolates from de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake by mild-acidic protein extraction and polyphenol adsorption. *Food Hydrocolloids*. 2015; 44:208–219. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.020>
104. Puchalska P, García MC, Marina ML. Development of a capillary high performance liquid chromatography–ion trap-mass spectrometry method for the determination of VLIVP antihypertensive peptide in soybean crops. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1338:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.059>
105. Purohit K, Reddy N, Sunna A. Exploring the Potential of Bioactive Peptides: From Natural Sources to Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25:1391. <https://doi.org/10.3390/ijms25031391>
106. Quintal-Bojórquez ND, Carrillo-Cocom LM, Hernández-Alvarez AJ, Segura-Campos MR. Anticancer activity of protein fractions from chia (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Food Science*. 2021; 86(7):2861–2871. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15780>
107. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023. <https://www.R-project.org/>
108. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; 26:1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
109. Ren J, Song C, Wang P, Li S, Kopparapu N, Zheng X. Modification of structural and functional properties of sunflower 11S globulin hydrolysates. *Czech Journal of Food Sciences*. 2015; 33(5):474–479. <https://doi.org/10.17221/154/2015-CJFS>

110. Ren J, Zheng XQ, Liu XL, Liu H. Purification of Antioxidant Peptide from Sunflower Protein. *Food Technology and Biotechnology*. 2010; 48(4):519–523.
111. Ren Y, Liang K, Jin Y, Zhang M, Chen Y, Wu H, Lai F. Identification and characterization of two novel α -glucosidase inhibitory oligopeptides from hemp (*Cannabis sativa* L.) seed protein. *Journal of Functional Foods*. 2016; 26:439–450. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.024>
112. Rivera D, Rommi K, Fernandes MM, Lantto R, Tzanov T. Biocompounds from rapeseed oil industry co-stream as active ingredients for skin care applications. *International Journal of Cosmetic Science*. 2015; 37(5):496–505. <https://doi.org/10.1111/ics.12222>
113. Rommi K, Hakala TK, Holopainen U, Nordlund E, Poutanen K, Lantto R. Effect of enzyme-aided cell wall disintegration on protein extractability from intact and dehulled rapeseed (*Brassica rapa* L. and *Brassica napus* L.) press cakes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62(32):7989–7997. <https://doi.org/10.1021/jf501802e>
114. Roy S, Ramakrishnan R, Afzia N, Ghosh T, Zhang W. Recent progress in the antimicrobial and antioxidant peptide activated film/coatings for food packaging applications: A Review. *Food Bioscience*. 2024; 62:105288. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105288>
115. Selamassakul O, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O, Yang L, Maier CS. Bioactive peptides from brown rice protein hydrolyzed by bromelain: Relationship between biofunctional activities and flavor characteristics. *Journal of Food Science*. 2020; 85(3):707–717. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15052>
116. Selamassakul O, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O, Yang L, Maier CS. Bioactive peptides from brown rice protein hydrolyzed by bromelain: Relationship between biofunctional activities and flavor characteristics. *Journal of Food Science*. 2020; 85(3):707–717. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15052>
117. Shah MA, Mir SA, Paray MA. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*. 2014; 94:5–16. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3>
118. Shchekoldina T, Aider M. Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower protein isolate and its use in functional wheat bread making.

- Journal of Food Science and Technology*. 2014; 51(10):2331–2343. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0780-2>
119. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 1996; 68:850–858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>
 120. Shouket HA, Ameen I, Tursunov O, et al. Study on industrial applications of papain: a succinct review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020; 614:012171. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/614/1/012171>
 121. Singh R, Langyan S, Sangwan S, Rohtagi B, Khandelwal A, Shrivastava M. Protein for Human Consumption From Oilseed Cakes: A Review. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2022; 6:856401. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.856401>
 122. Sun XD. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. *International Journal of Food Science & Technology*. 2011; 46(12):2447–2459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02785.x>
 123. Tawalbeh D, Al-U'datt MH, Wan Ahmad WAN, Ahmad F, Sarbon NM. Recent Advances in In Vitro and In Vivo Studies of Antioxidant, ACE-Inhibitory and Anti-Inflammatory Peptides from Legume Protein Hydrolysates. *Molecules*. 2023; 28:2423. <https://doi.org/10.3390/molecules28062423>
 124. Teleszko M, Haraf G, Zając A, Krzos G. Milk Thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertner) Endosperm as an Alternative Protein Source for a Sustainable Food System (SFS)—Pilot Studies. *Sustainability*. 2023; 15:14411. <https://doi.org/10.3390/su151914411>
 125. Tokudome Y, Nakamura K, Hashimoto F. Effects of low molecular weight soybean peptide on mRNA and protein expression levels of differentiation markers in normal human epidermal keratinocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014; 78(6):1018–1021. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.910092>
 126. Tokudome Y, Nakamura K, Kage M, Todo H, Sugibayashi K, Hashimoto F. Effects of soybean peptide and collagen peptide on collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2012; 63(6):689–695. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.652597>

127. Tonolo F, Coletta S, Fiorese F, Grinzato A, Albanesi M, Folda A, Ferro S, De Mario A, Piazza I, Mammucari C, Arrigoni G, Marin O, Cestonaro G, Nataloni L, Costanzo E, Lodovichi C, Rigobello MP, de Bernard M. Sunflower seed-derived bioactive peptides show antioxidant and anti-inflammatory activity: From in silico simulation to the animal model. *Food Chemistry*. 2024; 439:138124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138124>
128. Udenigwe CC, Rouvinen-Watt K. The Role of Food Peptides in Lipid Metabolism during Dyslipidemia and Associated Health Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16:9303–9313. <https://doi.org/10.3390/ijms16059303>
129. Udenigwe CC. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science & Technology*. 2014; 36:137–143. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.004>
130. Ukleja-Sokołowska N, Gawrońska-Ukleja E, Żbikowska-Gotz M, Bartuzi Z, Sokołowski Ł. Sunflower seed allergy: a rare cause of anaphylaxis. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2016; 29(3):498–503. <https://doi.org/10.1177/0394632016651648>
131. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. Oilseeds. [dostęp: 12.12.2025]. <https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity-group/oilseeds>
132. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. Oilseeds. [dostęp: 12.12.2025]. <https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity-group/oilseeds%2C%20meal>
133. Vaštag Z, Popović L, Popovic S, Krimer V, Pericin D. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*. 2011; 124:1316–1321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.062>
134. Velliquette RA, Fast DJ, Maly ER, Alashi AM, Aluko RE. Enzymatically derived sunflower protein hydrolysate and peptides inhibit NF-κB and promote monocyte-to-dendritic cell differentiation. *Food Chemistry*. 2020; 319:126563. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126563>
135. Venetikidou M, Lykartsis E, Adamantidi T, Prokopiou V, Ofrydopoulou A, Letsiou S, Tsoupras A. Proteolytic Enzyme Activities of Bromelain, Ficin, and

- Papain from Fruit By-Products and Potential Applications in Sustainable and Functional Cosmetics for Skincare. *Applied Sciences*. 2025; 15:2637. <https://doi.org/10.3390/app15052637>
136. Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*. 2004; 92(3):357–366. <https://doi.org/10.1079/BJN20041189>
 137. Villalón-López DN, Martínez-Padilla LP. Ultrasound-assisted process to improve proteins recovery from industrial canola and soybean byproducts. *Journal of Food Science and Technology*. 2025; 62(7):1350–1361. <https://doi.org/10.1007/s13197-024-06108-8>
 138. Vuyyuri SB, Shidal C, Davis KR. Development of the plant-derived peptide lunasin as an anticancer agent. *Current Opinion in Pharmacology*. 2018; 41:27–33. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.04.006>
 139. Wanasundara JPD, McIntosh TC, Perera SP, Withana-Gamage TS, Mitra P. Canola/rapeseed protein – functionality and nutrition. *OCL*. 2016; 23(4):D407. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016028>
 140. Wang LF, Zhang J, Yuan Q, Xie HH, Shi JY, Ju XR. Separation and purification of an anti-tumor peptide from rapeseed (*Brassica campestris* L.) and the effect on cell apoptosis. *Food & Function*. 2016; 7(5):2239–2248. <https://doi.org/10.1039/c6fo00042h>
 141. Wang RC, Zhao HX, Pan XX, Orfila C, Lu WH, Ma Y. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of α -glucosidase inhibitory peptides from soy protein. *Food Science & Nutrition*. 2019; 7:1848–1856. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1027>
 142. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, Grolemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen TL, Miller E, Bache SM, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H. Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*. 2019; 4(43):1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
 143. Xie N, Huang J, Li B, Cheng J, Wang Z, Yin J, Yan X. Affinity purification and characterisation of zinc chelating peptides from rapeseed protein hydrolysates: possible contribution of characteristic amino acid residues. *Food Chemistry*. 2015; 173:210–217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.030>

144. Yang F, Huang J, He H, Ju X, Ji Y, Deng F, Wang Z, He R. Study on the hypolipidemic activity of rapeseed protein-derived peptides. *Food Chemistry*. 2023; 423:136315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136315>
145. Ye Z, Liu Y. Polyphenolic compounds from rapeseeds (*Brassica napus* L.): The major types, biofunctional roles, bioavailability, and the influences of rapeseed oil processing technologies on the content. *Food Research International*. 2023; 163:112282. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112282>
146. Zaky AA, Hussien AS, Mostafa S, Abd El-Aty AM. Impact of Sunflower Meal Protein Isolate Supplementation on Pasta Quality. *Separations*. 2022; 9(12):429. <https://doi.org/10.3390/separations9120429>
147. Zaky AA, Shim JH, Abd El-Aty AM. A Review on Extraction, Characterization, and Applications of Bioactive Peptides From Pressed Black Cumin Seed Cake. *Frontiers in Nutrition*. 2021; 8:743909. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.743909>
148. Zhai Y, Cui Y, Song M, Vainstein A, Chen S, Ma H. Papain-Like Cysteine Protease Gene Family in Fig (*Ficus carica* L.): Genome-Wide Analysis and Expression Patterns. *Frontiers in Plant Science*. 2021; 12:681801. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.681801>
149. Zhang R, Fang X, Feng Z, Chen M, Qiu X, Sun J, Wu M, He J. Protein from rapeseed for food applications: Extraction, sensory quality, functional and nutritional properties. *Food Chemistry*. 2024; 439:138109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138109>
150. Zhang SB, Wang Z, Xu SY. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2007; 84:97–105. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1004-6>
151. Zhao Q, Xu H, Hong S, Song N, Xie J, Yan Z, Wang R, Yang P, Jiang X. Rapeseed Protein-Derived Antioxidant Peptide RAP Ameliorates Nonalcoholic Steatohepatitis and Related Metabolic Disorders in Mice. *Molecular Pharmaceutics*. 2019; 16(1):371–381. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01030>
152. Zheng Z, Wang M, Li J, Li J, Liu Y. Comparative assessment of physicochemical and antioxidative properties of mung bean protein hydrolysates. *RSC Advances*. 2020; 10(5):2634–2645. <https://doi.org/10.1039/c9ra06468k>

153. Zhu Y, Lao F, Pan X, Wu J. Food Protein-Derived Antioxidant Peptides: Molecular Mechanism, Stability and Bioavailability. *Biomolecules*. 2022; 12(11):1622. <https://doi.org/10.3390/biom12111622>
154. Zhu Z, Pan F, Wang O, Zhao L, Zhao L. Antibacterial Effect of Sesame Protein-Derived Peptides against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: In Silico and In Vitro Analysis. *Nutrients*. 2024; 16(1):175. <https://doi.org/10.3390/nu16010175>
155. Zhu Z, Xu Z, Li Y, Fan Y, Zhou Y, Song K, Meng L. Antioxidant Function and Application of Plant-Derived Peptides. *Antioxidants*. 2024; 13:1203. <https://doi.org/10.3390/antiox13101203>
156. Žilić S, Barać M, Pešić M, Crevar M, Stanojević S, Nišavić A. Characterization of sunflower seed and kernel proteins. *Helia*. 2010; 33(52):103–114. <https://doi.org/10.2298/HEL1052103Z>

10. Załączniki

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadcza się, że publikacja:

Garbacz, K.; Wawrzykowski, J.; Czelej, M.; Czernecki, T.; Waśko, A. Recent Trends in the Application of Oilseed-Derived Protein Hydrolysates as Functional Foods. Foods 2023, 12(20), 3861.

powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

mgr inż. Katarzyna Garbacz – opracowanie koncepcji pracy, prowadzenie badań, przygotowanie wyników, przygotowanie wstępnej wersji roboczej pracy, przygotowanie wersji końcowej pracy, przygotowanie i redagowanie odpowiedzi na recenzje;

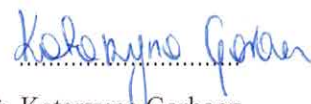
dr Michał Czelej – współprowadzenie badań, redakcja i korekta manuskryptu;

dr Tomasz Czernecki – współudział w opracowaniu koncepcji pracy, redakcja i korekta manuskryptu;

dr Jacek Wawrzykowski – współudział w opracowaniu koncepcji pracy, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu, współpracowanie wyników;

hab. dr hab. Adam Waśko – współudział w opracowaniu koncepcji pracy, redakcja i korekta manuskryptu, nadzór merytoryczny.

Wszyscy autorzy zapoznali się z treścią publikacji i wyrazili zgodę na jej opublikowanie.



mgr inż. Katarzyna Garbacz



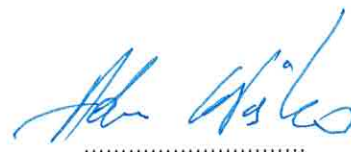
dr Michał Czelej



dr Jacek Wawrzykowski



dr Tomasz Czernecki



prof. dr hab. Adam Waśko

Review

Recent Trends in the Application of Oilseed-Derived Protein Hydrolysates as Functional Foods

Katarzyna Garbacz ^{1,2} , Jacek Wawrzykowski ^{3,*}, Michał Czelej ^{1,2}, Tomasz Czernecki ² and Adam Waśko ² 

¹ Biolive Innovation Sp. z o. o., 3 Dobrzańskiego Street, 20-262 Lublin, Poland

² Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland

³ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland

* Correspondence: jacek.wawrzykowski@up.lublin.pl

Abstract: Oilseed-derived proteins have emerged as an excellent alternative to animal sources for the production of bioactive peptides. The bioactivities exhibited by peptides derived from plant proteins encompass a wide range of health-promoting and disease-preventing effects. Peptides demonstrate potential capabilities in managing diseases associated with free radicals and regulating blood pressure. They can also exhibit properties that lower blood sugar levels and modify immune responses. In addition to their bioactivities, plant-derived bioactive peptides also possess various functional properties that contribute to their versatility. An illustration of this potential can be the ability of peptides to significantly improve food preservation and reduce lipid content. Consequently, plant-derived bioactive peptides hold great promise as ingredients to develop functional products. This comprehensive review aims to provide an overview of the research progress made in the elucidation of the biological activities and functional properties of oilseed-derived proteins. The ultimate objective is to enhance the understanding of plant-derived bioactive peptides and provide valuable insights for further research and use in the food and medicine industries.

Keywords: oilseed; bioactive peptide; functional food; protein hydrolysate



Citation: Garbacz, K.; Wawrzykowski, J.; Czelej, M.; Czernecki, T.; Waśko, A. Recent Trends in the Application of Oilseed-Derived Protein Hydrolysates as Functional Foods. *Foods* **2023**, *12*, 3861. <https://doi.org/10.3390/foods12203861>

Academic Editor: Yonghui Li

Received: 13 September 2023

Revised: 18 October 2023

Accepted: 19 October 2023

Published: 21 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The global food market is undergoing a dynamic transformation as a result of accelerating climate change, the depletion of natural resources, and the growing population. Currently, the main trends observed in the food industry place emphasis on products known as superfoods, sustainable food production, and plant-based foods. Consumers are increasingly looking for products that are safe and natural and are produced using environmentally friendly technologies [1]. This has contributed to the growing interest of the social and scientific community in functional foods, defined as processed or natural foods that, when consumed regularly, show documented positive effects on the human body in addition to the nutritional effects of the nutrients contained therein that are considered essential. The action of functional foods is to improve health and reduce the risk of certain diseases, i.e., cancer, type 2 diabetes, stroke, and cardiovascular disease (CVD) [2]. To achieve this goal, bioactive compounds with, e.g., antimicrobial, antioxidant, or immunomodulatory effects which would constitute functional foods, in combination with conventional food products, are being sought [1]. Research carried out in recent years indicates that protein hydrolysates have great potential in this aspect [3].

Protein hydrolysates are defined as a complex mixture of oligopeptides, peptides, and free amino acids which are formed by partial or complete hydrolysis. In turn, bioactive peptides (BPs) are characterized as a group of organic compounds possessing numerous health-promoting properties such as antioxidant [4], immunomodulatory, antihypertensive, antimicrobial [5], and hypoglycaemic [6] effects as well as cholesterol-lowering [7] or

anti-cancer activity [8]. The bioactive potency of these compounds depends not only on the composition and sequence of amino acid residues but also on their hydrophobicity and charge [3,9]. These compounds can be obtained by digestion in the gastrointestinal tract, fermentation, enzymatic hydrolysis, or in vitro chemical reactions [10]. Protein hydrolysates are obtained from a variety of animal, fungal, or plant sources [11–14]. Given the growing focus on plant-based foods, the use of protein hydrolysates extracted from oilseeds has received considerable interest [15].

Oilseed crops are used in the food industry, e.g., for the production of margarine, confectionery products, or unrefined edible oils [16]. The most commonly cultivated oilseed crops include rapeseed/canola (*Brassica napus* L.), sunflower (*Helianthus annuus* L.), soy (*Glycine max* L.), olive (*Olea europaea* L.), and peanut (*Arachis hypogaea* L.). Their seeds are rich in unsaturated fatty acids, sterols, fiber, proteins, and biopeptides, making them excellent functional ingredients [15]. The effects of oils on human health are invaluable. They not only ensure the absorption of fat-soluble vitamins but also support the efficient operation of the endocrine and neurotransmission systems [16]. The production of cold-pressed oil yields a fiber- and protein-rich by-product called cake, which is increasingly being used as an ingredient in the production of fortified foods. The search for new sources of plant-derived protein hydrolysates for use in food is crucial given the ethically and environmentally justified need to reduce the consumption of meat products, which are the primary source of protein in conventional diets [17].

Hence, in the present work, we focus on different protein hydrolysates with documented health-promoting properties derived from different types of oilseed proteins and their potential use in functional foods. Our aim was to compile recent developments in this field and to identify key steps in the production of foods enriched with protein hydrolysates derived from oilseed plants.

2. Biological Activity of Oilseed-Derived Bioactive Peptides

Dietary proteins, including oilseed proteins, are a source of not only valuable amino acids but also bioactive peptides. Biologically active peptides are fragments of the amino acid sequence of food proteins that become active when released. They are usually released during digestion, fermentation (due to the proteolytic activity of microorganisms), or in vitro enzymatic processes and can then have an impact on human health (Figure 1). Various factors such as the protein type and source, protein pre-treatment, enzyme type, and proteolysis conditions can alter the functionality of hydrolysates and bioactive peptides [18]. Table 1 shows a list of findings of sources of oilseed-derived peptides along with their bioactive properties.

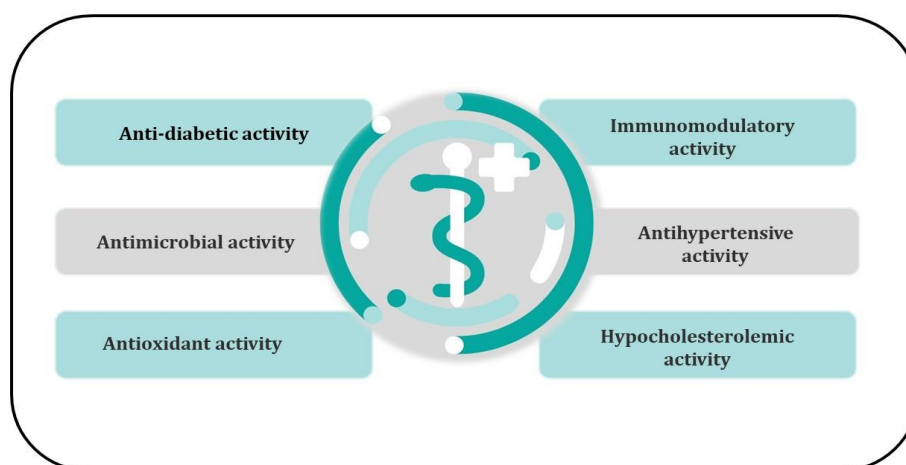


Figure 1. Beneficial effects of bioactive peptides.

Table 1. Peptides from oilseed plants and their bioactivity.

Source	Peptide Sequence	Bioactive Properties	References
Black pumpkin	PQRGEGGRAGNLLREEQEI	antimicrobial	[19]
Chia	-	ACE inhibitor	[20]
Flaxseed	-	antioxidant	[21]
Flaxseed	-	ACE inhibitor	[22,23]
Flaxseed	-	immunomodulatory	[24]
Hemp	WVYY, PSLPA	antioxidant	[25]
Hemp	GVLY, IEE, LGV, RVR	ACE inhibitor	[26]
Rapeseed/Canola	-	antioxidant	[27]
Rapeseed/canola	FQW, FRW, CPF	ACE inhibitor	[28]
Rapeseed/canola	GHS, RALP, LY	ACE inhibitor	[29]
Rapeseed/canola	EFLELL	hypolipidemic	[30]
Sesame	SYPTTECRM	antioxidant	[31]
Soybean	-	antioxidant	[32,33]
Soybean	VLIVP	ACE inhibitor	[34]
Soybean	VHVV	ACE inhibitor	[35]
Soybean	-	antimicrobial	[36]
Soybean	PGTAVFK,	antimicrobial	[37]
Soybean	IKAFKEATKVDKVVVLWTA		
Soybean	LPYP, IAVPTGVA, IAVPGEVA	hypcholesterolemic	[38]
Soybean	YVNPNDNEN,	hypcholesterolemic	[39]
Soybean	YVNPNDNEN		
Soybean	-	immunomodulatory	[40]
Sunflower	YFVP, SGRDP, MVWGP,	anti-inflammatory,	[41]
	TGSYTEGWS	immunomodulatory	

2.1. Antioxidant Activity

Free radicals are one of the etiological factors of many so-called ‘diseases of civilisation’, including cardiovascular disease, diabetes, cancer, diabetes, or rheumatic diseases. For this reason, synthetic antioxidants are used to protect the damaging effects of free radicals in the body [27]. However, studies have shown that synthetic antioxidants can be toxic and dangerous for human health [21]. Therefore, natural antioxidants exhibiting antioxidant potential with little to no side effects have been extracted from various materials. Numerous scientific studies have highlighted the antioxidant properties of protein hydrolysates derived from diverse sources [10]. Free radicals or reactive oxygen species (ROS) can interact with amino acids. However, aromatic amino acids (tyrosine, phenylalanine, and tryptophan), imidazole-containing amino acids (histidine), and nucleophilic sulfur-containing amino acids (methionine and cysteine) have demonstrated the highest reactivity [42]. In a study conducted by Zhang et al. [32], it was shown that a soy protein hydrolysate had the ability to scavenge the free radicals DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-hydrate) ($IC_{50} = 4.22$ mg/mL) and ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) ($IC_{50} = 2.93$). Furthermore, the study showed that the soy protein hydrolysate inhibited the production of intracellular reactive oxygen species (ROS) in Caco-2 cells. Also, Yu et al. [33] investigated the antioxidant activity of four soybean meal peptide fractions (PF1: >5 kDa; PF2: 3–5 kDa; PF3: 1–3 kDa; PF4: <1 kDa). The authors demonstrated that the 1–3 kDa peptides exhibited the highest antioxidant activity. In their study, Lu et al. [31] identified seven novel antioxidant peptides derived from sesame protein hydrolysates, with SYPTTECRM, whose IC_{50} values for DPPH and ABTS were 0.105 mg/mL and 0.004 mg/mL, respectively, showing the highest antioxidant activity. Furthermore, the authors concluded that the presence of Cys6, Met8, the bulky C-terminal amino acid residue (Arg9), and the negatively charged group around sulfur-containing amino acids were responsible for the antioxidant activity of SYPTTECRM. The rapeseed peptides obtained by fermentation showed high free radical scavenging activity, reducing dpower and inhibition of lipid peroxidation, but present low iron ion chelating activity [27]. In a study conducted by Kamarać et al. [21], the antioxidant activity of flaxseed protein hydrolysates derived from five different enzymes was evaluated. The results showed that there was a slight variation in antioxidant activity among the hydrolysates, with the FRAP (ferric reducing antioxidant power) values ranging from 0.20 to 0.24 mmol Fe^{2+} /g and the ABTS scavenging activity

ranging from 0.17 to 0.22 mmol Trolox/g. In research undertaken by Girgih et al. [25], they subjected a hemp protein isolate to hydrolysis by using the enzymes pepsin and pancreatin, resulting in the generation of bioactive peptides. The authors proceeded to identify the sequences for 23 peptides within the hydrolysate. Further examination through in vitro and in vivo testing revealed the enhanced antioxidant characteristics of two peptides, WVYY and PSLPA.

2.2. ACE Inhibitor Activity

Inhibition of the angiotensin I-converting enzyme (ACE; EC 3.4.15.1) by certain food peptides contributes to lowering blood pressure in hypertensive patients. Peptides with ACE-inhibiting activity used as dietary components may support hypertension therapy [43]. As indicated in the literature, the inhibitory activity of peptides against ACE is closely related to their structure. The chain length, composition, and amino acid sequences are crucial [44]. ACE-inhibitory peptides are generally short-chain peptides consisting of specific amino acid residues at the N and/or C terminus. The presence of aromatic (phenylalanine, tryptophan or tyrosine, proline), hydrophobic (leucine, isoleucine, and valine), and basic (arginine and lysine) amino acids at the C terminus has been found to have a strong effect on ACE binding [45]. Available research highlights the possibility of using protein hydrolysates derived from oilseeds as ACE inhibitors. In a study conducted by Puchalska et al. [34], the soy peptide VLIVP isolated from soy protein hydrolysates by protease P showed higher ACE inhibitory activity than the well-studied IPP and VPP peptides from milk. Tsai et al. [35] conducted a study into the potential mechanism of a bioactive peptide from soybean, (VHVV), through an in silico model and spontaneously hypertensive rat experiments. Their docking study revealed that the VHVV peptide from soybean possesses the ability to connect with the ACE active site, thereby inhibiting its activation. Segura-Campos et al. [20], who obtained bioactive peptides from chia proteins by controlled protein hydrolysis using the Alcalase-Flavourzyme sequencing system, obtained results indicating that amino acid hydrophobic residues contributed significantly to the ACE-I inhibitory potency of the chia peptide, probably by blocking angiotensin II production. The inhibitory activity ranged from 48.41% to 62.58% in the purified fractions, but the fraction with a molecular weight of 1.5–2.5 kDa showed the greatest inhibition potential ($IC_{50} = 3.97 \mu\text{g/mL}$; elution volume 427–455 mL). Research conducted by Marambe et al. [22] revealed that potent angiotensin-converting enzyme inhibitory activities were exhibited by flaxseed proteins when hydrolyzed with Flavourzyme, as indicated by IC_{50} values of 0.07 mg/mL. Subsequent investigations by Nwachukwu et al. [23] signal that this flaxseed protein hydrolysate displayed marked inhibition on the function of the angiotensin I-converting enzyme, while concurrently demonstrating a minimal suppressive impact on renin secretion in hypertensive rat models. Orio et al. [26] subjected a hemp seed protein isolate to intensive chemical hydrolysis, and then the purified fractions were tested as angiotensin-converting enzyme inhibitors. The authors identified four potentially bioactive peptides, GVLY, IEE, LGV, and RVR. The IC_{50} values for these peptides were determined in the range of 16–526 μM , confirming that hemp seed may be a valuable source of hypotensive peptides. A study conducted by Duan et al. [28] aimed to evaluate bioactive peptides in rapeseed protein and identify novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides using bioinformatics methods. The authors identified the novel peptides FQW, FRW, and CPF, which exerted potent inhibitory effects on ACE in vitro with IC_{50} values of $44.84 \pm 1.48 \mu\text{M}$, $46.30 \pm 1.39 \mu\text{M}$, and $131.35 \pm 3.87 \mu\text{M}$, respectively. He et al. [29] discovered that the ACE inhibitory peptides GHS, RALP, and LY, derived from canola protein, exhibited considerable inhibitory effects on nitric oxide secretion and proinflammatory cytokines. Additionally, these peptides ameliorated cell damage instigated by oxidative stress in spontaneously hypertensive rats.

2.3. Antimicrobial Activity

Given the rising resistance of microbes to synthetic antibiotics, there is a need to explore new bioactives or extracts as natural and safer alternative antimicrobial agents to treat microbial infections [46]. Antimicrobial peptides consist of up to 50 amino acid residues. In natural conditions, these usually cationic peptides contain hydrophobic amino acids and exhibit a broad spectrum of activity against bacteria, viruses, and fungi [47]. Despite intensive research, their mechanism of action is not fully understood. The most important effects of these peptides include changes in cell membrane permeability, destabilization of membrane lipid structure, binding to lipopolysaccharide, inhibition of DNA replication, inhibition of protein expression, and release of ATP, thus leading to cell lysis [48]. Bioactive peptides derived from oilseeds were also tested for antimicrobial activity [46]. Volatile oils from different *Nigella sativa* samples were examined for their effectiveness against several bacterial isolates. A clear zone of inhibition of growth was observed in the case of *Staphylococcus aureus*, the development of which was associated with the two important bioactive ingredients of *N. sativa*—thymoquinone and melanin [49]. In another study, the antifungal activity of methanolic, aqueous, and chloroform extracts of *N. sativa* was compared. The methanolic extracts were found to have the strongest effect against several strains of *Candida albicans*, followed by the chloroform extracts, while the aqueous extracts did not exhibit antifungal activity [50]. Also, certain proteins and peptides isolated directly from Cucurbitaceae seeds showed antifungal and antimicrobial properties [51]. For example, a peptide (PQRGEGGRAGNLLREEQEI) with a molecular weight of 8 kDa isolated from black pumpkin seeds inhibited mycelial growth in the fungi *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, and *Mycosphaerella oxysporum* [19]. Freitas et al. [36] isolated twelve bioactive peptides from soybean meal protein that inhibited the growth of food-borne pathogenic bacteria. In addition, the authors showed that the isolated peptides were not toxic to mouse fibroblast and bone marrow cells. Liu et al. [52] reported antimicrobial activity of cyclinopeptides present in flaxseed oil. The authors demonstrated the antibacterial activity of 1-Mso-cyclolinopeptides B and 1-Mso, 3-Mso-cyclolinopeptides F against *Listeria monocytogenes*. The research of Dhayakaran et al. [37] provided evidence that the soy peptides PGTAVFK and IKAFKEATKVDKVVVLWTA exhibit antimicrobial properties against *P. aeruginosa* and *L. monocytogenes*.

2.4. Hypolipidaemic Activity

Hyperlipidemia is a prevalent metabolic disorder characterized by elevated levels of lipids in the bloodstream; it is associated with an increased risk of cardiovascular diseases such as myocardial infarction and atherosclerosis [30]. Available scientific research indicates that bioactive peptides contained in oilseeds have the potential to lower blood cholesterol levels [38,39]. Using gel filtration chromatography–mass spectrometry, Yang et al. [30] identified rapeseed peptides with the amino acid sequence EFLELL which exhibited good hypolipidaemic activity. The study evaluated the IC₅₀ values of the EFLELL peptides, which were 0.1973 ± 0.05 mM (sodium taurocholate), 0.375 ± 0.03 mM (sodium cholate), and 0.203 ± 0.06 mM (glycine sodium cholate). The hypolipidaemic activity of the EFLELL peptides was further investigated using cell lines, and the results indicated a significant decrease in total cholesterol (T-CHO), triglycerides (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) under the influence of the rapeseed peptides. Aiello et al. [38] determined the presence of three peptides, LPYP, IAVPTGVA, and IAVPGEVA, derived from soy protein, which demonstrated hypocholesterolemic capabilities. These peptides have the ability to inhibit the functions of a key enzyme (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMG-CoA reductase) implicated in the biosynthesis of cholesterol and, furthermore, modulate cholesterol metabolism in HepG2 cells. Similarly, Lammi et al. [39] discovered two other hypocholesterolemic peptides—YVVNPDNDEN and YVVNPDNNEN—also produced from soy β CG. These peptides additionally regulate cholesterol through the same method.

2.5. Immunomodulatory Activities

While the immune-modulating activities of dairy protein peptides are well known, similar peptides derived from plant proteins through enzymatic hydrolysis have only recently become more available [41]. Velliquette et al. [41] investigated the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of a sunflower protein hydrolysate. The authors identified four novel peptides, YFVP, SGRDP, MVWGP, and TGSYTEGWS, which inhibited IL-1 β -mediated NF- κ B activation. The MVWGP peptide showed the strongest immunomodulatory effect, which may be related to the presence of methionine residues. Wen et al. [40] used Alcalase[®] and neutrase to produce bioactive peptides from soy protein isolates. The researchers identified eighty-five peptide sequences, eighty-four of which could be involved in immunomodulatory properties. These specific peptides were found to have a role in adjusting the activities of cytokines such as TNF- α and IL-6. Additionally, they could also facilitate the propagation of macrophages and augment the concentration of nitric oxide, an immune response mediator. Udenigwe et al. [24] used the enzymes pepsin, ficin, and papain to digest flaxseed proteins. The fraction of peptides with a molecular weight below 1 kDa was separated. These peptides demonstrated notable suppression effects on the nitric oxide production instigated by lipopolysaccharides in RAW 264.7 macrophages, with no observable cytotoxicity.

3. Use of Oilseed-Derived Protein Hydrolysates as Functional Foods

In recent years, there has been a significant increase in consumer interest in food products with functional properties [53]. Due to the extensive effects of bioactive peptides derived from oilseeds, they are more often analyzed for use in functional foods. In addition, the use of cakes in food, which are a by-product of oil production, as an alternative source of protein may ensure the management of waste from the food industry [15]. Moreover, products enriched with proteins of plant origin are good alternatives for vegans and people with dairy allergies [54]. Protein hydrolysates can be used in the production of protein-rich foods, i.e., protein drinks, protein-rich pasta, powdered drinks, infant and weaning foods, bars, or meat substitutes (Figure 2) [55–59].

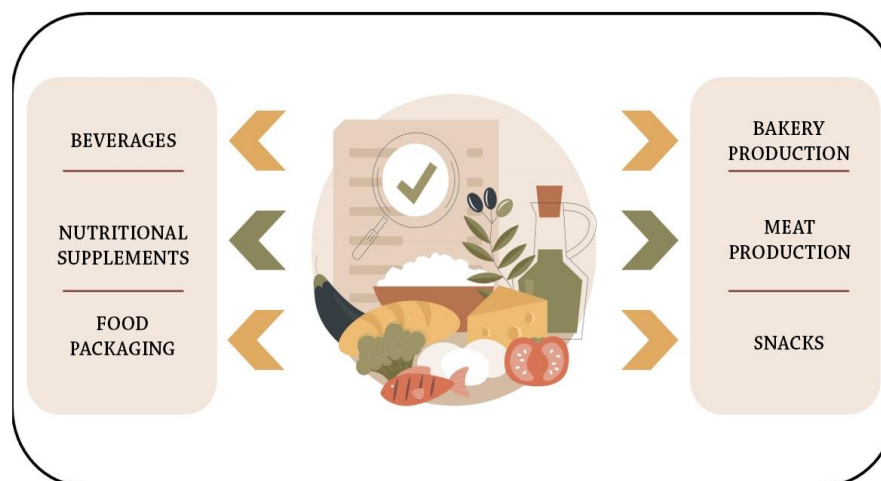


Figure 2. Potential use of oilseed protein hydrolysates in functional food.

Oilseed proteins and peptides are generating considerable interest in the functional food industry due to their robust bioactive properties, including antioxidant, antihypertensive, and neuroprotective activities [15]. They also provide a balanced profile of amino acids that are ideal in diverse sectors, ranging from baking to the meat industry [60,61]. A notable advantage of many oilseeds is their low allergenicity or even non-allergenic properties, making them valuable in the development of functional food products [15]. Particular emphasis must be placed on the profound usage potential of bioactive peptides and protein hydrolysates as natural food preservatives, given their antimicrobial and an-

tioxidant properties [14]. The research conducted by Ospina-Quiroga [55] underscored the pivotal function of hydrolysates derived from oilseed plants as potent antioxidants in food emulsions. Hydrolysates derived from sunflower, rapeseed, and lupin were recognized as efficacious emulsifying agents. These significantly inhibited lipid oxidation, which is a primary factor influencing food quality and longevity [55]. Further, earlier research by Zhang et al. [56] emphasized the role of soy protein hydrolysates in reducing lipid peroxidation. It was observed that the incorporation of bioactive peptides derived from three different fractions of soy protein hydrolysates, which were prepared using microbial proteases, resulted in a noteworthy decrease in lipid peroxidation in ground beef samples. The study conducted by Lee et al. [61] underscores the role of soy hydrolysates as potential antioxidants in the production of specific food products such as pork patties. Research conducted by Hou et al. [57] identified that glycinin basic polypeptides derived from soybean exhibit potent antifungal properties. These polypeptides demonstrated the capability to effectively hinder mycelial growth and spore germination, achieved through the disruption of fungal plasma membranes via the ergosterol synthesis interference. This suggests their potential use in food preservation, improving the sensory qualities of wet noodles. In a similar vein, another study from Ning et al. [62] discovered the role that soy peptides play in enhancing the texture of *Scomberomorus niphonius* surimi (Japanese Spanish Mackerel) and significantly diminishing microbial growth to extend the product's shelf life. These findings, thus, underline the potential that soybean-derived peptides offer as bioactive food additives, particularly in the context of starchy food items and surimi products. In their research, Segura-Campos et al. [63] found that incorporating chia protein hydrolysates into items like white bread and carrot cream was associated with a marked enhancement in ACE inhibitory activity, compared to the unmodified food. Such findings indicate the implications of chia protein hydrolysates in the development of functional food, mainly due to its apparent utility in controlling high blood pressure. Recent investigations have also highlighted the promising applications of hydrolysates, derived from oilseed plants, in the functional beverage industry. Sarker [53] described the implementation of sesame peptides in the development of beverages designed to serve as anti-hypertensive agents. According to Fan [54], there have been various efforts to create functional drinks containing soybean peptides in order to enhance their stability. As a case in point, a novel health drink was developed by Zhang et al. [64] by infusing soybean peptide and selenium-rich yeast into the beverage composition. In the study conducted by Puchalska et al. [58], it was indicated that infant formulas based on soybean peptides were interesting alternatives to cow's milk infant formula. In addition, these peptides were also reported to possess high stability in thermal and acid treatment, good emulsifying properties, and low viscosity.

Beyond the bioactive properties of hydrolysates, hydrolysis also instigates structural adjustments in proteins which improve their solubility, surface active properties, hydration and gelling potential, and overall functionality [17]. The research conducted by Chen et al. [65] illustrated that ice cream's interfacial and viscoelastic properties can be notably improved via the utilization of soy protein hydrolysates obtained using papain and pepsin enzymes. This enhancement results in superior emulsion stability and decelerates the melting rate, thus outperforming the use of skimmed milk powder in ice cream production. Another study concerned with using hydrolysates in ice cream was conducted by the Liu et al. [66]. It was found that soy protein hydrolysates, combined with xanthan gum, were effective as substitutes for fat in low-fat ice cream. The investigators resorted to a combined methodology of enzymatic hydrolysis and thermal-shearing treatment to procure the desired properties. The potential of canola protein hydrolysates in the sector of meat products has been highlighted by Karami and Akbariadergani [67]. Their study showed that canola protein hydrolysates improve the cooking yield, owing to their water-holding capacity. Moreover, Aluko and McIntosh [68] demonstrated that canola protein hydrolysates, having a hydrolysis degree (DH) between 7% and 14%, managed to effectively substitute between 20% and 50% of the egg content in various mayonnaise recipes. Additionally, research by Guo et al. [69] shed light on the implicative usage of enzymatic

hydrolysates extracted from canola proteins in the production of meat-flavored seasonings. They suggested that the creation of ingredients that mimic the aroma of cooked meat could be achieved by conducting the process at lower temperatures and pH values. Conversely, the scent of roasted meat could be achieved by implementing higher temperatures. This showcases the versatility of bioactive hydrolysates from oilseed plants in modifying food flavor profiles.

Hydrolysates of proteins can be incorporated into food products to enhance their nutritional profile. In a work conducted by Guo et al. [70], soy protein hydrolysates were used to fortify wheat flour, resulting in a marked reduction in gluten content and an improvement in the nutritional value of noodle dough. This, in turn, magnified the quality and nutritional attributes of the noodles. Similarly, the research executed by Schmieles et al. [60] exhibited the application of soy protein hydrolysates in bread and bakery products. This additive led to increased firmness while concurrently improving the nutrition level of these bakery products. Pap et al. [71] conducted a study investigating the enzymatic hydrolysis of hemp seed cake, which resulted in two fractions: sediment and liquid. The sediment, possessing the bulk of the major components, exhibited a promising potential for use in solid food formulations, such as breads, crispbread, or crackers. Conversely, the liquid facet, boasting high solubility, showcased its appropriateness for assimilation into drinks and liquid foods, thereby amplifying their nutritional worth.

Lots of examples exist where processed oilseed cake has been used in food. Łopusiewicz et al. [59] used flaxseed cake to produce new fermented beverages such as kefir. The authors obtained results confirming that lactic acid bacteria and yeast were able to grow well in flaxseed cake without any supplementation, and their viability exceeded the recommended level for kefir products. Therefore, beverages can be used as a new non-dairy agent to support beneficial microflora. Research was also conducted on the use of oil cake in the production of bakery products such as bread [72] or biscuits [73]. In order to produce enriched bread, the authors replaced part of the wheat flour with oil and walnut cake (1%, 3%, 5%). Bread containing the highest addition of cake was characterized by the highest hardness as well as the highest antioxidant activity.

Plant-derived proteins applied in the food industry can also be used in the production of food packaging materials [74]. Tkaczewska [75] indicated that some protein hydrolysates that have antimicrobial and antioxidant activities can be used as natural food preservatives. In addition, these peptides can be used as active ingredients in packaging materials such as coatings and edible films. Suput et al. [76], who investigated the possibility of using sunflower oil cake for the production of biopolymer films, obtained smooth and flexible dark brown-green films. Another study demonstrated the potential of rapeseed peptides to be used as a carrier for β -carotene encapsulation [77].

4. Summary

The increased consumer awareness of a healthy diet has led to the rapid development of products known as functional foods in the global food market [1]. New solutions are being sought to provide suitable nutrients to the diet and to benefit human health. An additional challenge is to satisfy the expectations of consumer groups with specific needs, such as vegans, vegetarians, or people with food intolerances. Oilseeds are a valuable source of not only nutrients but also bioactive peptides, offering potential health benefits. These peptides show promising applications in mitigating diseases related to free radicals and in controlling blood pressure. Furthermore, their potentials in food preservation and the reduction in lipid levels have also been noted. Studies have revealed the antioxidant properties of protein hydrolysates from numerous oilseed sources. Their importance in maintaining cardiovascular health, through inhibiting the angiotensin I-converting enzyme (ACE), has also been highlighted. Moreover, peptides derived from oilseeds have shown an antimicrobial effect and also hypolipidemic ability. Due to their numerous properties, oilseed-derived peptides and protein hydrolysates have been incorporated in various food products like functional beverages, bakery products, and meat and dairy substitutes,

enhancing their nutritional profile and quality. They also have potential applications in the food packaging industry. This review highlights the importance of research into bioactive peptides derived from oilseeds as they offer potential health benefits and possible use in the food industry.

Author Contributions: Conceptualization, K.G., T.C. and A.W.; investigation, K.G. and M.C.; writing—original draft preparation, K.G., A.W. and J.W.; writing—review and editing, M.C. and T.C.; visualization, K.G. and J.W.; supervision, A.W.; project administration, K.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Implementation PhD VKT/DW/2/2020.

Data Availability Statement: The data used to support the findings of this study can be made available by the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Granato, D.; Barba, F.J.; Bursac Kovačević, D.; Lorenzo, J.M.; Cruz, A.G.; Putnik, P. Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2020**, *11*, 93–118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Putnik, P.; Bursac Kovacevic, D. Sustainable Functional Food Processing. *Foods* **2021**, *10*, 1438. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nasri, M. Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. *Adv. Food Res.* **2017**, *81*, 109–159.
- Udenigwe, C.C.; Aluko, R.E. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, R11–R24. [\[CrossRef\]](#)
- Salampessy, J.; Phillips, M.; Seneweera, S.; Kailasapathy, K. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia* sp.) insoluble proteins. *Food Chem.* **2010**, *120*, 556–560. [\[CrossRef\]](#)
- Nasri, R.; Abdelhedi, O.; Jemil, I.; Daoued, I.; Hamden, K.; Kallel, C.; Elfeki, A.; Lamri-Senhadj, M.; Boualga, A.; Nasri, M. Ameliorating effects of goby fish protein hydrolysates on high-fat-high-fructose diet-induced hyperglycemia; oxidative stress and deterioration of kidney function in rats. *Chem-Biol. Interact.* **2015**, *24*, 271–280. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Udenigwe, C.C.; Rouvinen-Watt, K. The Role of Food Peptides in Lipid Metabolism during Dyslipidemia and Associated Health Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 9303–9313. [\[CrossRef\]](#)
- Xue, Z.; Wen, H.; Zhai, L.; Yu, Y.; Li, Y.; Yu, W.; Cheng, A.; Wang, X.; Kou, X. Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Res. Int.* **2015**, *77*, 75–81. [\[CrossRef\]](#)
- Meisel, H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors* **2004**, *21*, 55–61. [\[CrossRef\]](#)
- Czelej, M.; Garbacz, K.; Czernecki, T.; Wawrzykowski, J.; Waśko, A. Protein Hydrolysates Derived from Animals and Plants—A Review of Production Methods and Antioxidant Activity. *Foods* **2022**, *11*, 1953. [\[CrossRef\]](#)
- Clare, D.A.; Swaisgood, H.E. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 1187–1195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Liu, R.; Xing, L.; Fu, Q.; Zhou, G.H.; Zhang, W.G. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and byproducts. *Antioxidants* **2016**, *5*, 32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Michalak, K.; Winiarczyk, S.; Adaszek, Ł.; Kosikowska, U.; Andrzejczuk, S.; Garbacz, K.; Dobrut, A.; Jarosz, Ł.; Czupryna, W.; Pietras-Ozga, D. Antioxidant and antimicrobial properties of an extract rich in proteins obtained from *Trametes versicolor*. *J. Vet. Res.* **2023**, *67*, 209–218. [\[CrossRef\]](#)
- Tkaczewska, J. Peptides and protein hydrolysates as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings—A review. *Trends Food. Sci. Tech.* **2020**, *106*, 298–311. [\[CrossRef\]](#)
- Kotecka-Majchrzak, K.; Sumara, A.; Fornal, E.; Montowska, M. Oilseed proteins—Properties and application as a food ingredient. *Trends Food. Sci. Tech.* **2020**, *106*, 160–170. [\[CrossRef\]](#)
- Hidalgo, F.J.; Zamora, R. Peptides and proteins in edible oils: Stability, allergenicity, and new processing trends. *Trends Food Sci. Tech.* **2006**, *17*, 56–63. [\[CrossRef\]](#)
- Singh, R.; Langyan, S.; Sangwan, S.; Rohtagi, B.; Khandelwal, A.; Shrivastava, M. Protein for human consumption from oilseed cakes: A review. *Front. Sustain. Food Syst.* **2022**, *6*, 856401. [\[CrossRef\]](#)
- Peighambardoust, S.H.; Karami, Z.; Pateiro, M.; Lorenzo, J.M. A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive peptides in food applications. *Biomolecules* **2021**, *11*, 631. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, H.X.; Ng, T.B. Isolation of cucurmoschin, a novel antifungal peptide abundant in arginine, glutamate and glycine residues from black pumpkin seeds. *Peptides* **2003**, *24*, 969–972. [\[CrossRef\]](#)
- Segura-Campos, M.R.; Peralta-González, F.; Chel Guerrero, L.; Betancur Ancona, D. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Chia (*Salvia hispanica*) Produced by Enzymatic Hydrolysis. *Int. J. Food Sci.* **2013**, *2013*, 158482. [\[CrossRef\]](#)
- Karamać, M.; Kosińska-Cagnazzo, A.; Kulczyk, A. Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1027. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

22. Marambe, P.W.; Shand, P.J.; Wanasundara, J.P.D. An in-vitro investigation of selected biological activities of hydrolysed flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85*, 1155–1164. [\[CrossRef\]](#)
23. Nwachukwu, I.D.; Girgih, A.T.; Malomo, S.A.; Onuh, J.O.; Aluko, R.E. Thermoase-derived flaxseed protein hydrolysates and membrane ultrafiltration peptide fractions have systolic blood pressure-lowering effects in spontaneously hypertensive rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 18131–18147. [\[CrossRef\]](#)
24. Udenigwe, C.C.; Lu, Y.L.; Han, C.H.; Hou, W.C.; Aluko, R.E. Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chem.* **2009**, *116*, 277–284. [\[CrossRef\]](#)
25. Girgih, A.T.; He, R.; Malomo, S.; Offengenden, M.; Wu, J.; Aluko, R.E. Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *J. Funct. Foods* **2014**, *6*, 384–394. [\[CrossRef\]](#)
26. Orio, L.P.; Boschini, G.; Recca, T.; Morelli, C.F.; Ragona, L.; Francescato, P.; Speranza, G. New ACE-inhibitory peptides from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10482–10488. [\[CrossRef\]](#)
27. He, R.; Ju, X.; Yuan, J.; Wang, L.; Girgih, A.T.; Aluko, R.E. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 432–438. [\[CrossRef\]](#)
28. Duan, X.; Dong, Y.; Zhang, M.; Li, Z.; Bu, G.; Chen, F. Identification and molecular interactions of novel ACE inhibitory peptides from rapeseed protein. *Food Chem.* **2023**, *422*, 136085. [\[CrossRef\]](#)
29. He, R.; Wang, Y.; Yang, Y.; Wang, Z.; Jia, X.; Yuan, J. Rapeseed protein-derived ACE inhibitory peptides LY, RALP and GHS show antioxidant and anti-inflammatory effects on spontaneously hypertensive rats. *J. Funct. Foods* **2019**, *55*, 211–219. [\[CrossRef\]](#)
30. Yang, F.; Huang, J.; He, H.; Ju, X.; Ji, Y.; Deng, F.; Wang, Z.; He, R. Study on the hypolipidemic activity of rapeseed protein-derived peptides. *Food Chem.* **2023**, *423*, 136315. [\[CrossRef\]](#)
31. Lu, X.; Zhang, L.; Sun, Q.; Song, G.; Huang, J. Extraction, identification and structure-activity relationship of antioxidant peptides from sesame (*Sesamum indicum* L.) protein hydrolysate. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 707–716. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Zhang, Q.; Tong, X.; Qi, B.; Wang, Z.; Li, Y.; Sui, X.; Jiang, L. Changes in antioxidant activity of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport. *J. Funct. Foods* **2018**, *42*, 298–305. [\[CrossRef\]](#)
33. Yu, M.; He, S.; Tang, M.; Zhang, Z.; Zhu, Y.; Sun, H. Antioxidant activity and sensory characteristics of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of soybean meal hydrolysate. *Food Chem.* **2018**, *243*, 249–257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Puchalska, P.; García, M.C.; Marina, M.L. Development of a capillary high performance liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry method for the determination of VLIVP antihypertensive peptide in soybean crops. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1338*, 85–91. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Tsai, B.C.K.; Kuo, W.W.; Day, C.H.; Hsieh, D.J.Y.; Kuo, C.H.; Daddam, J.; Chen, R.J.; Padma, V.V.; Wang, G.; Huang, C.Y. The soybean bioactive peptide VHVV alleviates hypertension-induced renal damage in hypertensive rats via the SIRT1-PGC1 α /Nrf2 pathway. *Food Chem.* **2021**, *360*, 129992. [\[CrossRef\]](#)
36. Freitas, C.S.; Vericimo, M.A.; da Silva, M.L.; da Costa, G.C.V.; Pereira, P.R.; Paschoalin, V.M.F.; Del Aguila, E.M. Encrypted antimicrobial and antitumoral peptides recovered from a protein-rich soybean (*Glycine max*) by-product. *J. Funct. Foods* **2019**, *54*, 187–198. [\[CrossRef\]](#)
37. Dhayakaran, R.; Neethirajan, S.; Weng, X. Investigation of the antimicrobial activity of soy peptides by developing a high throughput drug screening assay. *Biochem. Biophys. Rep.* **2016**, *6*, 149–157. [\[CrossRef\]](#)
38. Aiello, G.; Ferruzza, S.; Ranaldi, G.; Sambuy, Y.; Arnoldi, A.; Vistoli, G.; Lammia, C. Behavior of three hypocholesterolemic peptides from soy protein in an intestinal model based on differentiated Caco-2 cell. *J. Funct. Foods* **2018**, *45*, 363–370. [\[CrossRef\]](#)
39. Lammi, C.; Zannoni, C.; Arnoldi, A.; Vistoli, G. Two peptides from soy beta-conglycinin induce a hypocholesterolemic effect in HepG2 cells by a statin-like mechanism: Comparative in vitro and in silico modeling studies. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7945–7951. [\[CrossRef\]](#)
40. Wen, L.; Bi, H.; Zhou, X.; Zhu, H.; Jiang, Y.; Ramadan, N.S.; Zheng, R.; Wang, Y.; Yang, B. Structure and activity of bioactive peptides produced from soybean proteins by enzymatic hydrolysis. *Food Chem. Adv.* **2022**, *1*, 100089. [\[CrossRef\]](#)
41. Velliquette, R.A.; Fast, D.J.; Maly, E.R.; Alashi, A.M.; Aluko, R.E. Enzymatically derived sunflower protein hydrolysate and peptides inhibit NF κ B and promote monocyte differentiation to a dendritic cell phenotype. *Food Chem.* **2020**, *319*, 126563. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Xu, N.; Chen, G.; Liu, H. Antioxidative Categorization of Twenty Amino Acids Based on Experimental Evaluation. *Molecules* **2017**, *22*, 2066. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Korhonen, H. Bioactive milk proteins and peptides: From science to functional applications. *Aust. J. Dairy Technol.* **2009**, *64*, 16–25.
44. Piovesana, S.; Capriotti, A.L.; Cavaliere, C.; La Barbera, G.; Montone, C.M.; Zenezini Chiozzi, R.; Laganà, A. Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 3425–3444. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Aluko, R.E. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *4*, 44–50. [\[CrossRef\]](#)
46. Abu-Zaid, A.A.; Al-Barty, A.; Morsy, K.; Hamdib, H. In vitro study of antimicrobial activity of some plant seeds against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Braz. J. Biol.* **2022**, *82*, e256409. [\[CrossRef\]](#)
47. Nakatsuji, T.; Gallo, R.L. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *J. Investig. Dermatol.* **2012**, *132*, 887–895. [\[CrossRef\]](#)

48. Lei, J.; Sun, L.; Huang, S.; Zhu, C.; Li, P.; He, J.; Mackey, V.; Coy, D.H.; He, Q. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 3919–3931.
49. Gerige, S.J.; Gerige, M.K.Y.; Rao, M.; Ramanjaneyulu. GC-MS analysis of *Nigella sativa* seeds and antimicrobial activity of its volatile oil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2009**, *52*, 1189–1192. [[CrossRef](#)]
50. Bitá, A.; Rosu, A.F.; Calina, D.; Rosu, L.; Zlatian, O.; Dindere, C.; Simionescu, A. An alternative treatment for *Candida* infections with *Nigella sativa* extracts. *Eur. J. Hosp. Pharm.* **2012**, *19*, 162. [[CrossRef](#)]
51. Ozuna, C.; León-Galván, M.F. Cucurbitaceae Seed Protein Hydrolysates as a Potential Source of Bioactive Peptides with Functional Properties. *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*, 2121878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Liu, Y.; Liu, Y.; Li, P.; Li, Z. Antibacterial properties of cyclolinopeptides from flaxseed oil and their application on beef. *Food Chem.* **2022**, *385*, 132715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sarker, A. A review on the application of bioactive peptides as preservatives and functional ingredients in food model systems. *J. Food Process Preserv.* **2022**, *46*, 16800. [[CrossRef](#)]
54. Fan, H.; Liu, H.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Liu, T.; Wang, D. Review on plant-derived bioactive peptides: Biological activities, mechanism of action and utilizations in food development. *J. Future Foods* **2022**, *2*, 143–159. [[CrossRef](#)]
55. Ospina-Quiroga, J.L.; García-Moreno, P.J.; Guadix, A.; Guadix, E.M.; Almécija-Rodríguez, M.C.; Pérez-Gálvez, R. Evaluation of Plant Protein Hydrolysates as Natural Antioxidants in Fish Oil-In-Water Emulsions. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Zhang, L.; Li, J.; Zhou, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 2084–2089. [[CrossRef](#)]
57. Hou, J.; Li, Y.Q.; Wang, Z.S.; Sun, G.J.; Mo, H.Z. Applicative effect of glycinin basic polypeptide in fresh wet noodles and antifungal characteristics. *Food Sci. Technol.* **2017**, *83*, 267–274. [[CrossRef](#)]
58. Puchalska, P.; Marina, M.L.; García, M.C. Isolation and identification of antioxidant peptides from commercial soybean-based infant formulas. *Food Chem.* **2014**, *148*, 147–154. [[CrossRef](#)]
59. Łopusiewicz, Ł.; Drożdowska, E.; Siedlecka, P.; Meżyńska, M.; Bartkowiak, A.; Sienkiewicz, M.; Zielińska-Bliźniewska, H.; Kwiatkowski, P. Development, characterization, and bioactivity of non-dairy kefir-like fermented beverage based on flaxseed oil cake. *Foods* **2019**, *8*, 544. [[CrossRef](#)]
60. Schmiele, M.; Ferrari Felisberto, M.H.; Pedrosa Silva Clerici, M.T.; Chang, Y.K. Mixolab™ for rheological evaluation of wheat flour partially replaced by soy protein hydrolysate and fructooligosaccharides for bread production. *Food Sci. Technol.* **2017**, *76*, 259–269.
61. Lee, Y.K.; Ko, B.B.; Davaatseren, M.; Hong, G.P. Effects of Soy Protein Hydrolysates Prepared by Varying Subcritical Media on the Physicochemical Properties of Pork Patties. *Korean J. Food Sci. An.* **2016**, *36*, 8–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ning, H.Q.; Wang, Z.S.; Li, Y.Q.; Tian, W.L.; Sun, G.J.; Mo, H.Z. Effects of glycinin basic polypeptide on the textural and physicochemical properties of *Scomberomorus niphonius* surimi. *Food Sci. Technol.* **2019**, *114*, 108328. [[CrossRef](#)]
63. Segura-Campos, M.R.; Salazar-Vega, I.M.; Chel-Guerrero, L.A.; Betancur-Ancona, D.A. Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *Food Sci. Technol.* **2013**, *50*, 723–731. [[CrossRef](#)]
64. Zhang, X.; He, H.; Xiang, J.; Li, B.; Zhao, M.; Hou, T. Selenium-containing soybean antioxidant peptides: Preparation and comprehensive comparison of different selenium supplements. *Food Chem.* **2021**, *358*, 129888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chen, W.; Liang, G.; Li, X.; He, Z.; Zeng, M.; Gao, D.; Qin, F.; Goff, H.D.; Chen, J. Effects of soy proteins and hydrolysates on fat globule coalescence and meltdown properties of ice cream. *Food Hydrocoll.* **2019**, *94*, 279–286. [[CrossRef](#)]
66. Liu, R.; Wang, L.; Liu, Y.; Wu, T.; Zhang, Z. Fabricating soy protein hydrolysate/xanthan gum as fat replacer in ice cream by combined enzymatic and heat-shearing treatment. *Food Hydrocoll.* **2018**, *81*, 39–47. [[CrossRef](#)]
67. Karami, Z.; Akbariadergani, B. Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *J. Food. Sci. Technol.* **2019**, *56*, 535–547. [[CrossRef](#)]
68. Aluko, R.E.; McIntosh, T. Limited enzymatic proteolysis increases the level of incorporation of canola proteins into mayonnaise. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2005**, *6*, 195–202. [[CrossRef](#)]
69. Guo, X.; Tian, S.; Small, D.M. Generation of meat-like flavourings from enzymatic hydrolysates of proteins from *Brassica* sp. *Food Chem.* **2010**, *119*, 167–172. [[CrossRef](#)]
70. Guo, X.; Sun, X.; Zhang, Y.; Wang, R.; Yan, X. Interactions between soy protein hydrolyzates and wheat proteins in noodle making dough. *Food Chem.* **2018**, *245*, 500–507. [[CrossRef](#)]
71. Pap, N.; Hamberg, L.; Pihlava, J.M.; Hellström, J.; Mattila, P.; Euro, M.; Pihlanto, A. Impact of enzymatic hydrolysis on the nutrients, phytochemicals and sensory properties of oil hemp seed cake (*Cannabis sativa* L. FINOLA variety). *Food Chem.* **2020**, *320*, 126530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Pycia, K.; Kapusta, I.; Jaworska, G. Walnut oil and oilcake affect selected the physicochemical and antioxidant properties of wheat bread enriched with them. *J. Food Process. Preserv.* **2020**, *44*, e14573. [[CrossRef](#)]
73. Prakash, K.; Naik, S.; Vadivel, D.; Hariprasad, P.; Gandhi, D.; Saravanadevi, S. Utilization of defatted sesame cake in enhancing the nutritional and functional characteristics of biscuits. *J. Food Process. Preserv.* **2018**, *42*, e13751. [[CrossRef](#)]
74. Fadimu, G.J.; Le, T.T.; Gill, H.; Farahnaky, A.; Olatunde, O.O.; Truong, T. Enhancing the Biological Activities of Food Protein-Derived Peptides Using Non-Thermal Technologies: A Review. *Foods* **2022**, *11*, 1823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Tkaczewska, J.; Zając, M.; Jamroz, E.; Derbew, H. Utilising waste from soybean processing as raw materials for the production of preparations with antioxidant properties, serving as natural food preservatives—A pilot study. *Food Sci. Technol.* **2022**, *160*, 113282. [[CrossRef](#)]
76. Šuput, D.; Lazić, V.; Mađarev-Popović, S.; Hromiš, N.; Bulut, S.; Pezo, L.; Baničević, J. Effect of process parameters on biopolymer films based on sunflower oil cake. *J. Process. Energy Agric.* **2018**, *22*, 125–128. [[CrossRef](#)]
77. Lan, M.; Fu, Y.; Dai, H.; Ma, L.; Yu, Y.; Zhu, H.; Wang, H.; Zhang, Y. Encapsulation of β -carotene by self-assembly of rapeseed meal-derived peptides: Factor optimization and structural characterization. *Food Sci. Technol.* **2021**, *138*, 110456. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Lublin, 17.12.2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam się, że publikacja:

Garbacz, K.; Wawrzykowski, J.; Czelej, M.; Waśko, A. In Silico Proteomic Profiling and Bioactive Peptide Potential of Rapeseed Meal. Foods 2025, 14, 2451.

powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

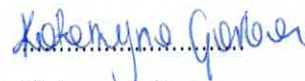
mgr inż. Katarzyna Garbacz – opracowanie koncepcji pracy, opracowanie metodologii badań, przygotowanie materiału do badań i współudział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, archiwizacja i opracowanie uzyskanych wyników, przygotowanie wstępnej wersji roboczej pracy, przygotowanie wersji końcowej pracy, przygotowanie i redagowanie odpowiedzi na recenzje

dr Michał Czelej – udział w walidacji wyników badań, współudział w prowadzeniu analiz laboratoryjnych, współudział w opracowanie uzyskanych wyników;

dr Jacek Wawrzykowski – współudział w opracowaniu koncepcji pracy, współudział w opracowaniu metodologii badań, walidacja wyników badań, redakcja i korekta manuskryptu

hab. dr hab. Adam Waśko – współudział w opracowaniu koncepcji pracy, redakcja i korekta manuskryptu, nadzór merytoryczny.

Wszyscy autorzy zapoznali się z treścią publikacji i wyrazili zgodę na jej opublikowanie.



mgr inż. Katarzyna Garbacz



dr Michał Czelej



dr Jacek Wawrzykowski



prof. dr hab. Adam Waśko

Article

In Silico Proteomic Profiling and Bioactive Peptide Potential of Rapeseed Meal

Katarzyna Garbacz ^{1,2} , Jacek Wawrzykowski ^{3,*} , Michał Czelej ^{1,2} and Adam Waśko ² ¹ Biolive Innovation Sp. z o.o., Dobrzańskiego 3, 20-262 Lublin, Poland² Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; adam.wasko@up.lublin.pl³ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland

* Correspondence: jacek.wawrzykowski@up.lublin.pl

Abstract

Rapeseed meal, a byproduct of oil extraction, is increasingly recognised as a valuable source of plant protein and health-promoting peptides. This study aimed to identify key proteins in cold-pressed rapeseed meal and assess their potential to release bioactive peptides through in silico hydrolysis using plant-derived proteases, namely papain, bromelain, and ficin. Proteomic profiling via two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry revealed cruciferin as the dominant protein, along with other metabolic and defence-related proteins. In silico digestion of these sequences using the BIOPEP database generated thousands of peptide fragments, of which over 50% were predicted to exhibit bioactivities, including ACE and DPP-IV inhibition, as well as antioxidant, neuroprotective, and anticancer effects. Among the evaluated enzymes, bromelain exhibited the highest efficacy, yielding the greatest quantity and diversity of bioactive peptides. Notably, peptides with antihypertensive and antidiabetic properties were consistently identified across all of the protein and enzyme variants. Although certain rare functions, such as anticancer and antibacterial activities, were observed only in specific hydrolysates, their presence underscores the broader functional potential of peptides derived from rapeseed. These findings highlight the potential of rapeseed meal as a sustainable source of functional ingredients while emphasising the necessity for experimental validation to confirm the predicted bioactivities.

Keywords: rapeseed protein; peptide biological activity; in silico digestion

Academic Editors: Ivan Cruz-Chamorro and Guillermo Santos-Sánchez

Received: 30 May 2025

Revised: 8 July 2025

Accepted: 11 July 2025

Published: 12 July 2025

Citation: Garbacz, K.; Wawrzykowski, J.; Czelej, M.; Waśko, A. In Silico Proteomic Profiling and Bioactive Peptide Potential of Rapeseed Meal. *Foods* **2025**, *14*, 2451. <https://doi.org/10.3390/foods14142451>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Rapeseed (*Brassica napus* L., family Brassicaceae) is the second most extensively cultivated oilseed crop globally, following soybean, with an estimated production of 85.1 million tons in 2024/25 [1]. It is predominantly cultivated for its oil-rich seeds, which are integral to major industries, such as edible oil, food processing, and biodiesel production [2]. The European Union alone contributes approximately one-quarter of the global rapeseed production (16.86 million tons) [1], with Poland, France, and Germany being leading producers [2,3]. The process of extracting oil from rapeseeds results in rapeseed meal, a protein-rich co-product that constitutes nearly half of the seed's mass (its typical composition includes approximately 40–50% oil, 15–30% protein, 20–30% fibre, and 5–10% moisture) [4]. Traditionally, rapeseed meal has been utilised as animal feed or fertiliser;

however, there is increasing interest in valorising this abundant resource for food and nutraceutical applications. Rapeseed meal contains approximately 35–40% protein and has a well-balanced amino acid composition, rendering it a promising plant-based protein source for human nutrition [2,5]. Advances in plant breeding—particularly the development of low-glucosinolate “canola” varieties—and processing have significantly reduced the anti-nutritional factors that previously limited the use of rapeseed proteins in food [5]. Oils extracted from rapeseed varieties are characterised by low glucosinolate ($<30 \mu\text{mol/g}$) and erucic acid ($<2\%$) levels in the seeds (i.e., ‘double-zero’ rapeseed) [6]. Consequently, scientific research has intensified efforts to incorporate rapeseed meal or its protein isolates into food products and recover high-value compounds from this co-product [7,8]. This reflects a broader trend in sustainable food systems, wherein oilseed byproducts are increasingly regarded as valuable sources of novel protein ingredients and functional components, rather than low-value waste.

One promising approach to rapeseed meal valorisation is the production of bioactive peptides derived from rapeseed proteins. These peptides, which are short protein fragments typically released through enzymatic hydrolysis, have been demonstrated to possess various health-promoting effects. Rapeseed protein hydrolysates are rich in peptides with significant antioxidant properties, including free radical scavenging and metal ion chelation [9]. Furthermore, peptides derived from rapeseeds exhibit antihypertensive effects by inhibiting angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity both in vitro and in vivo [9]. Additionally, certain peptides from rapeseed proteins show antidiabetic potential by inhibiting dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), thereby extending the action of incretin hormones [10]. Preliminary investigations have suggested that rapeseed proteins may be a source of antimicrobial peptides [11]. Additional studies have demonstrated that rapeseed peptides can reduce pro-inflammatory cytokine and nitric oxide levels, thereby exerting anti-inflammatory effects [12]. Furthermore, rapeseed-derived peptides have been shown to modulate lipid metabolism, resulting in hypolipidaemic and hypocholesterolemic effects [13]. Notably, certain rapeseed peptides have exhibited anticancer activity in vitro by selectively inhibiting tumour cell proliferation with minimal cytotoxicity toward non-tumour cells [14]. Collectively, these findings highlight the significant nutraceutical and functional potential of rapeseed-derived peptides.

In comparison to other plant protein sources, rapeseed meal holds considerable potential for generating bioactive peptides. Soybean meal (*Glycine max*) remains the most prominent plant-based protein source globally, with around a 40% protein content, and its protein hydrolysates have been extensively studied for nutraceutical peptides [15]. For instance, soy-derived peptides exhibit antioxidant, antihypertensive, hypocholesterolemic, and anticancer activities—a notable example is lunasin, a 43-amino-acid peptide reported to have cholesterol-lowering and anticancer effects [16]. Rapeseed protein, with a comparable protein content ($\sim 35\text{--}40\%$) and a well-balanced amino acid profile, has likewise been shown to be of high nutritional quality and similar bioavailability to soy protein in humans [17]. Moreover, rapeseed protein hydrolysates yield a spectrum of bioactive peptides analogous to those from soy—including potent ACE inhibitors, antioxidants, and anti-inflammatory agents—underscoring that rapeseed meal can rival soybean as a source of nutraceutical peptides. Other oilseed meals, such as sunflower and flaxseed, have also been investigated for bioactive peptide production. Sunflower (*Helianthus annuus*) protein hydrolysates, for example, contain peptides with immunomodulatory and anti-inflammatory properties [18]. Nevertheless, soy and rapeseed have generally attracted the greatest research attention in this context, reflecting their higher global production and protein availability.

Papain (EC 3.4.22.2), bromelain (EC 3.4.22.32), and ficin (EC 3.4.22.3) are plant-derived cysteine proteases widely used for the hydrolysis of plant proteins to produce bioactive

peptides, serving as valuable tools in the development of functional and nutraceutical protein ingredients [19]. Bromelain, ficin, and papain are cysteine endopeptidases. Bromelain preferentially cleaves peptide bonds adjacent to aromatic, basic, or hydrophobic amino acids; ficin acts on proteins such as casein and gelatin; and papain exhibits broad substrate specificity [20]. These enzymes demonstrate broad substrate specificity and cleave proteins into smaller peptides rather than free amino acids, thus achieving a high degree of hydrolysis and generating low-molecular-weight peptides with diverse bioactive functions [19]. Enzymatic treatment enhances the solubility, digestibility, and overall nutritional quality of plant proteins [21]. Concurrently, they release peptides that exhibit various health-promoting activities, such as antioxidant and antihypertensive effects [21]. As these proteases are plant-derived, their application is consistent with clean-label and vegan product development, facilitating protein hydrolysis without the introduction of animal-derived additives, thereby maintaining the plant-based integrity of the protein ingredient [19,21]. The primary sources of these enzymes are bromelain, ficin, and papain, which are extracted from pineapple, fig latex, and papaya latex, respectively [22].

In silico analysis has become an invaluable method for the efficient utilisation of bioactive peptides derived from rapeseeds. By applying computational tools, researchers can predict the enzymatic cleavage of rapeseed proteins and identify peptide fragments with potential bioactivities prior to empirical experimentation. This methodology utilises databases of known bioactive sequences, such as BIOPEP-UWM, and software that simulates proteolytic processes, thereby facilitating the rapid screening of rapeseed protein sequences for promising peptide motifs [23]. These predictions inform the selection of specific proteases or hydrolysis conditions that optimise the release of peptides with targeted functionalities, such as ACE-inhibitory or antioxidant effects. Rather than relying on trial-and-error methods, researchers can strategically design enzymatic treatments for rapeseed meal, expediting the discovery and development of value-added functional ingredients. Ultimately, the integration of bioinformatics and protein biochemistry facilitates the full exploitation of rapeseed as a source of bioactive peptides.

This study aimed to identify and characterise rapeseed (*Brassica napus* L.) proteins, evaluate their enzymatic hydrolysis in silico using various plant-derived proteases (papain, bromelain, and ficin), and determine the presence of bioactive peptides in the resulting hydrolysates. By comparing the predicted release of functional peptide sequences under different enzymatic treatments, we sought to identify the most effective protease for generating bioactive peptides from rapeseed meal, thereby providing a sustainable approach to valorising this protein-rich co-product of canola oil production.

2. Materials and Methods

2.1. The Material

The cold-pressed rapeseed meal was provided by AMF Life (Warsaw, Poland). The initial composition of the diet was 34% protein, 3% fat, and 14% dry matter.

2.2. The Extraction of Protein from Rapeseed Press Cake

The rapeseed press cake was first ground using a multigrinder (Royal Catering, Berlin, Germany) and then sieved through a sieve (Multiserw LPzE, Marcyporeba, Poland). Particles smaller than 60 mesh (250 μm) were collected for further analysis. The protein extraction procedure involved four main steps: the first extraction, the second extraction, coagulation, and washing of the precipitate.

Then, 400 g of rapeseed flour (particle size <250 μm) was suspended in 1600 g of distilled water and heated to 50 $^{\circ}\text{C}$ on a magnetic stirrer equipped with a temperature sensor (IKA C-MAG HS 7 control, Staufen, Germany). The pH was adjusted to 12.0 by adding

NaOH, and the suspension was stirred at this temperature for 60 min to facilitate protein solubilisation. Following extraction, the mixture was centrifuged (MPW-380, Warsaw, Poland) at $3300 \times g$ for 15 min.

The resulting sediment was re-suspended in distilled water, and the pH was adjusted to 12.0. The suspension was stirred for another 60 min under the same conditions and then centrifuged at $3300 \times g$ for 15 min. The sediment was discarded, and the supernatants from both extraction steps were combined for coagulation.

The combined supernatant was heated to 50 °C, and its pH was adjusted to 4.5 by adding HCl to induce protein precipitation. The precipitate was separated through centrifugation ($3300 \times g$, 15 min), and the supernatant was discarded. The sediment was re-suspended in water at a 1:1 (*w/w*) ratio without further pH adjustment. Finally, the suspension was subjected to a further centrifugation step ($3300 \times g$, 15 min), yielding a purified protein pellet.

2.3. Electrophoresis

Protein separation was conducted using isoelectric focusing (IEF) followed by SDS-PAGE. Briefly, 50 µg of rapeseed protein was dissolved in 315 µL of rehydration buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 70 mM DTT, and 0.5% ampholytes at a pH of 3–10). The samples were then loaded onto 18 cm IPG ReadyStrips (pH 3–10; Bio-Rad, Warsaw, Poland). IEF was performed up to a total of 30 kVh using a PROTEAN IEF system (Bio-Rad). The IPG strips were then equilibrated for 15 min in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, and 1% DTT and for an additional 15 min in the same buffer supplemented with 2.5% iodoacetamide.

Subsequently, the strips were transferred onto 20 × 20 cm, 1.5 mm thick SDS-polyacrylamide gels (T = 11%, C = 2.6%) prepared according to Laemmli [24]. The second dimension was conducted using a Protean II XI (Bio-Rad, Warsaw, Poland) according to the manufacturer's instructions. Protein spots were visualised through silver staining using a protocol compatible with mass spectrometry analysis [25].

2.4. Protein Spot Excision and Preparation for Mass Spectrometry

Spots of interest were excised from the gels, cut into small fragments, and transferred into 0.5 mL tubes for analysis. The gel pieces were washed three times in 100 µL of 100 mM NH_4HCO_3 (pH 8.5) for 5 min, dehydrated with 100 µL of acetonitrile (ACN), and dried in a CentriVap system (Labconco, Warsaw, Poland) at room temperature for 15 min. They were then rehydrated in 100 µL of 10 mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3 buffer for reduction (56 °C, 60 min). After cooling to room temperature, the solution was replaced with 100 µL of 50 mM iodoacetamide in 50 mM NH_4HCO_3 , and the samples were incubated in the dark for 45 min at RT. The gel pieces were then washed three times with 100 µL of 100 mM NH_4HCO_3 buffer for 5 min at room temperature, dehydrated with 100 µL of ACN, and dried in a CentriVap (Labconco, Warsaw, Poland) for 15 min.

Enzymatic digestion of the proteins was performed on ice through the stepwise addition of 10 µL of 12.5 ng/mL trypsin (Trypsin Gold, mass-spectrometry-grade, Promega, Madison, WI, USA) prepared in 50 mM NH_4HCO_3 buffer to ensure complete rehydration of the gel fragments. Subsequently, 30 µL of 50 mM NH_4HCO_3 buffer was added to maintain gel hydration overnight at 37 °C. Following digestion, the supernatant was collected, and the peptides were extracted three times using 50 µL of 70% ACN with 1.5% TFA, followed by 15 min of sonication at room temperature in an ultrasonic water bath (Ultron U-507, Ultron, Dywity, Poland). The supernatants were pooled and subsequently dried in a CentriVap system (Labconco, local distributor A.G.A Analytical, Warsaw, Poland) for 45 min at 40 °C.

2.5. The MALDI-TOF/TOF Analysis

The peptide pellet was rehydrated in 10 µL of 0.1% TFA and purified using a µC18 ZipTip (Eppendorf, Poznań, Poland) according to the manufacturer's protocol. A 1 µL aliquot of the purified peptide mixture was mixed with HCCA (with 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid), spotted onto an AnchoChip frame (Bruker, Poznań, Poland), and then air-dried at room temperature. The mass spectra were acquired using an Ultraflex III MALDI TOF/TOF spectrometer (Bruker, Poznań, Poland) in positive ion reflector mode with an acceleration voltage of 25 kV. External calibration was performed using a peptide calibration standard (Bruker, Poznań, Poland). FlexAnalysis 3.0 software (Bruker-Daltonics) was used to select monoisotopic peptide masses. The identification of proteins and peptides in the mass spectrometry data was performed using the MASCOT algorithm, querying the UniProtKB database (release 2024_04), restricted to the “Green Plants (Viridiplantae)” taxonomy. The search parameters were set as follows: trypsin as the enzyme, carbamidomethylation of cysteine as a fixed modification, methionine oxidation as a potential modification, and a mass tolerance of 50 ppm.

2.6. In Silico Digestion and Bioactivity Prediction Using the BIOPEP Database

The amino acid sequences of the identified proteins were subjected to in silico enzymatic digestion simulations using the BIOPEP database (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/> (accessed on 5 April 2025)) [23]. The ‘Enzyme(s) action’ tool in the BIOPEP database was employed to digest each protein using plant-derived enzymes, including papain (EC 3.4.22.2), ficin (EC 3.4.22.3), and stem bromelain (EC 3.4.22.32).

The peptide fragments generated in silico were then analysed using the “search for active fragments” tool in the BIOPEP database. This step facilitated the identification of distinct peptide sequences with documented bioactive properties, providing insights into the potential functions of rapeseed-derived peptides.

2.7. Theoretical Prediction of Peptide Bioactivity Using PeptideRanker

All of the peptides produced during the in silico proteolysis outlined in Section 2.6 were subsequently evaluated using PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/> (accessed on 5 July 2025)). The algorithm assigns each sequence a probability score from 0 to 1; in line with the developers' guidance, peptides scoring ≥ 0.50 were classified as “bioactive” [26]. This procedure therefore enabled the theoretical determination of which protease generated the greatest number of potentially bioactive peptides.

3. Results

3.1. Electrophoresis and MALDI-TOF/TOF Protein Identification

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) was used to separate the rapeseed seed protein fractions based on their isoelectric point (a pI range of 3–10) and molecular mass (approximately 10–100 kDa). The resulting gel image (Figure 1) was evaluated qualitatively, so the spot intensities shown are relative rather than quantitative. Fifty of the most intense spots were excised and identified using MALDI-TOF; they are summarised in Table 1.

Table 1. Proteins identified from rapeseed meal using MALDI-TOF.

Spot ID	Protein Name	UniProt Entry Name	Species	Mass	pI
1	Beta-glucosidase 19	BGL19_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	45.3	6.90
2	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	37.3	6.94
3	Leucine aminopeptidase 1	AMPL1_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	36.7	5.84
4	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	37.0	6.67

Table 1. Cont.

Spot ID	Protein Name	UniProt Entry Name	Species	Mass	pI
5	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	37.0	6.70
6	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	34.9	7.17
7	Bifunctional enolase 2/transcriptional activator	ENO2_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	31.3	5.95
8	Cytosolic isocitrate dehydrogenase [NADP]	ICDHC_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	30.9	6.71
9	Myrosinase	MYRO_BRANA	<i>Brassica napus</i>	29.2	6.12
10	3-isopropylmalate dehydrogenase, chloroplastic	LEU3_BRANA	<i>Brassica napus</i>	28.6	5.64
11	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	24.9	6.33
12	Vicilin-like seed storage protein At2g28490	VCL22_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	24.7	6.69
13	Malate dehydrogenase 1, cytoplasmic	MDHC1_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	24.9	6.50
14	Malate dehydrogenase 1, cytoplasmic	MDHC1_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	24.6	6.70
15	Cruciferin CRU1	CRU3_BRANA	<i>Brassica napus</i>	21.3	7.21
16	NADPH-dependent aldehyde reductase 1, chloroplastic	ADRC1_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20.4	6.10
17	NADPH-dependent aldehyde reductase 1, chloroplastic	ADRC1_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20.3	6.32
18	NADPH-dependent aldehyde reductase 1, chloroplastic	ADRC1_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20.4	6.48
19	Jacalin-related lectin 36	JAL36_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20.2	6.38
20	Oil-body-associated protein 1A	OBP1A_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20.4	5.97
21	Oil-body-associated protein 1A	OBP1A_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20.1	6.18
22	Oil-body-associated protein 1A	OBP1A_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	19.8	6.42
23	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	20.2	7.56
24	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	20.1	8.15
25	Oil-body-associated protein 1A	OBP1A_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	17.6	5.97
26	Oil-body-associated protein 1A	OBP1A_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	17.5	6.06
27	Oil-body-associated protein 1A	OBP1A_ARATH	<i>Arabidopsis thalian</i>	17.8	6.43
28	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	17.8	6.64
29	Superoxide dismutase [Mn] 2, mitochondrial	SODM2_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	17.7	6.68
30	Superoxide dismutase [Mn] 2, mitochondrial	SODM2_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	17.4	6.67
31	Cruciferin	CRUA_BRANA	<i>Brassica napus</i>	17.7	6.92
32	Cruciferin	CRUA_BRANA	<i>Brassica napus</i>	17.7	7.09
33	Cruciferin	CRUA_BRANA	<i>Brassica napus</i>	17.9	7.27
34	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	17.0	6.92
35	Superoxide dismutase [Mn] 2, mitochondrial	SODM2_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	17.0	7.09
36	Superoxide dismutase [Mn] 2, mitochondrial	SODM2_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	17.0	7.14
37	Cruciferin BnC1	CRU1_BRANA	<i>Brassica napus</i>	16.0	5.30
38	Cruciferin	CRUA_BRANA	<i>Brassica napus</i>	15.9	6.00
39	Cruciferin	CRUA_BRANA	<i>Brassica napus</i>	15.1	6.25
40	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	15.1	7.81
41	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	13.5	5.70
42	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	13.6	8.74
43	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	13.6	8.95
44	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	13.6	9.98
45	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	13.6	9.44
46	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	13.6	9.70
47	Jacalin-related lectin 36	JAL36_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13.3	7.07
48	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	13.0	6.69
49	Cruciferin CRU4	CRU4_BRANA	<i>Brassica napus</i>	12.4	5.29
50	Cruciferin BnC1	CRU1_BRANA	<i>Brassica napus</i>	10.1	5.97

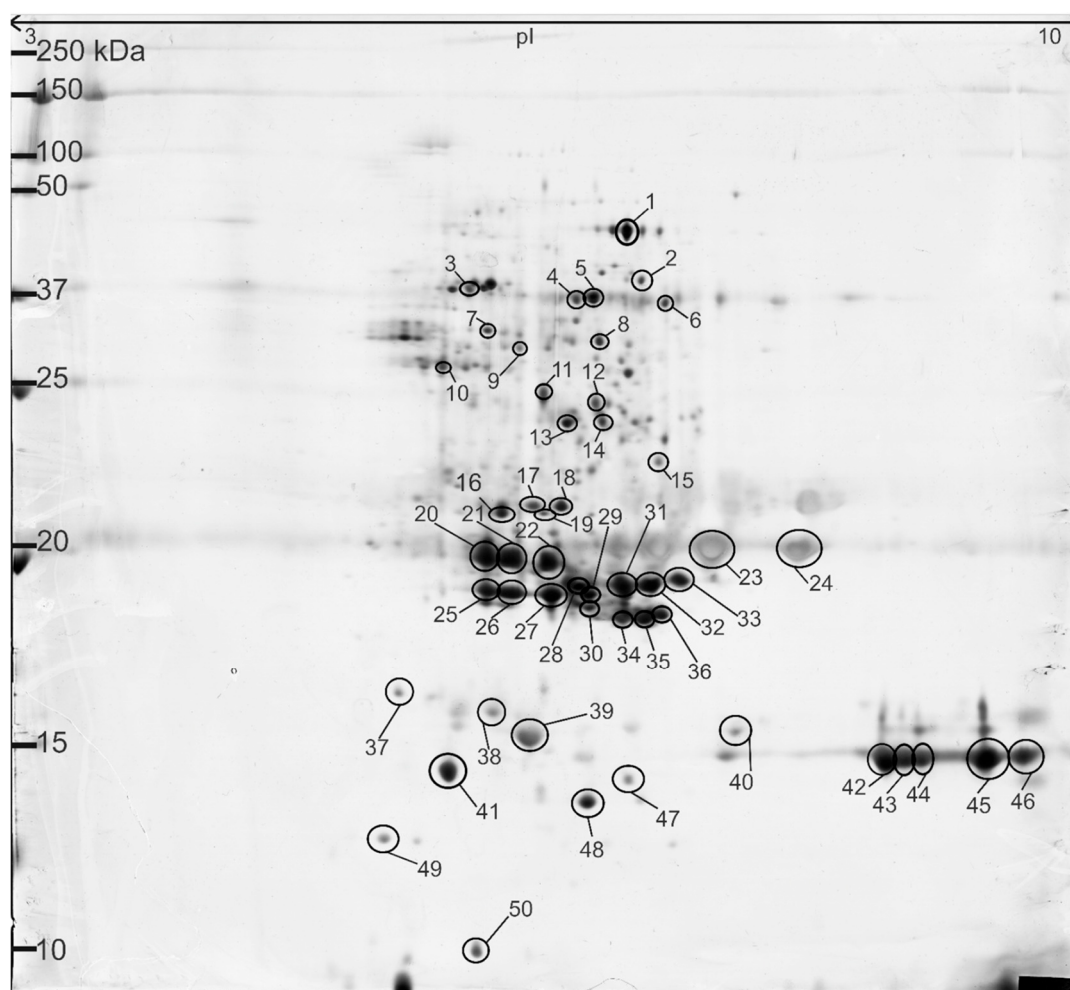


Figure 1. Example of 2D-PAGE gel of rapeseed meal proteins. Proteins were separated in the first dimension on an IPG strip with a pH = 3.0–10.0 and in the second dimension on a 12.5% acrylamide SDS-gel. The numbered spots correspond to the identifications presented in Table 1.

The table delineates the protein name, UniProt Entry Name, estimated physicochemical parameters (molecular weight and isoelectric point, as determined from the gel), and the species from which the reference sequence was derived, specifically *Brassica napus* or *Arabidopsis thaliana*. The identification of *A. thaliana* proteins among rapeseed proteins is attributable to the close phylogenetic relationship between these two species and their substantial sequence homology. Given that *A. thaliana* is a widely studied model organism for cruciferous plants, its reference protein sequences are extensively represented in databases, frequently resulting in the assignment of homologous *B. napus* proteins to *A. thaliana* [27,28].

The findings revealed that the predominant proteins in the 2D-PAGE profile (26 out of 50 spots) were different forms of cruciferin. Numerous spots (e.g., nos. 4–6, 31–33, 37–46, and 48–50), corresponding to cruciferin subunits (~20–30 kDa), were identified, indicating substantial diversity in isoforms and post-translational modifications. Cruciferin, the major storage protein in *Brassica napus*, is a complex that comprises six monomers. It demonstrates low pH instability in its tertiary structure and exhibits distinct solubility behaviour depending on the pH when intact within the seed cellular matrix [29]. Notably, a vicilin-like protein (a 7S globulin) was identified (spot no. 12; vicilin-like seed storage protein At2g28490) which has been infrequently reported in cruciferous species. In addition to these storage proteins, several metabolic enzymes were detected on the electrophoresis

gels. The identified proteins include cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (spot no. 8), cytoplasmic malate dehydrogenase (spots nos. 13–14), and 3-isopropylmalate dehydrogenase (spot no. 10). Additionally, defence-related proteins, such as myrosinase (spot no. 9) and jacalin-related lectins (JAL36; spots nos. 19, 47), were detected alongside mitochondrial manganese-dependent superoxide dismutase (spots nos. 29–30, 35–36), indicating potential antioxidant functions. Furthermore, oil body proteins were identified, including oil-body-associated protein 1A (spots nos. 20–22 and 25–27), which corresponded to oleosins.

These findings underscore the functional complexity of the protein fraction in rape-seeds, which encompasses storage proteins, metabolic enzymes, defence-related proteins, and oil-body-associated proteins.

3.2. In Silico Analysis Using the BIOPEP Database and PeptideRanker

Subsequent to the in silico proteolysis conducted within the BIOPEP database, wherein the protein sequences were enzymatically digested using papain, ficin, and stem bromelain via the “Enzyme(s) action” tool, all resultant peptide fragments were evaluated for bioactive properties through the “search for active fragments” function. Table 2 summarises the total number of peptides generated and those identified as bioactive.

Table 2. Total number of peptides and bioactive peptides generated through in silico digestion of proteins with papain, ficin, and bromelain using BIOPEP database.

Protein Name	Papain Digestion		Ficin Digestion		Bromelain Digestion	
	Total Peptides	Bioactive Peptides	Total Peptides	Bioactive Peptides	Total Peptides	Bioactive Peptides
ADRC1_ARATH	139	49	143	55	149	57
AMPL1_ARATH	164	75	174	107	188	119
BGL19_ARATH	176	80	198	95	199	116
CRU1_BRANA	211	150	213	115	216	149
CRU3_BRANA	215	125	218	76	222	77
CRU4_BRANA	197	142	204	98	207	133
CRUA_BRANA	211	151	213	123	216	141
ENO2_ARATH	164	53	168	60	174	76
ICDHC_ARATH	147	102	152	73	170	121
JAL36_ARATH	176	70	193	117	199	110
LEU3_BRANA	173	92	171	86	183	110
MDHC1_ARATH	131	52	136	80	149	66
MYRO_BRANA	166	93	182	94	183	98
OBP1A_ARATH	83	36	88	59	91	53
SODM2_ARATH	87	44	97	43	103	45
VCL22_ARATH	160	110	174	129	180	121
in total	2600	1424	2724	1410	2829	1592

In this study, an in silico methodology was used to assess the bioactive potential of the peptides derived from the proteolytic digestion of selected plant proteins using three plant-derived proteases: papain, bromelain, and ficin. The occurrence of bioactive fragments in each hydrolysate was predicted using two different tools: the BIOPEP-UWM “Search for Active Fragments” module and PeptideRanker. Both predictors agreed that bromelain generated the richest pool of putatively bioactive sequences (Figure 2), identifying 1592 peptides with BIOPEP (Table 2) and 1146 high-scoring peptides with PeptideRanker (Table 3). By comparison, papain produced 1424 (BIOPEP) and 999 (PeptideRanker) putative bioactives, while ficin yielded 1410 and 1086, respectively. Bromelain also produced

the highest deterministic counts of total and bioactive peptides; however, as only single simulations were performed, this difference was not tested for statistical significance.

Table 3. Number of PeptideRanker-predicted bioactive peptides (score ≥ 0.50) generated through in silico digestion of rapeseed proteins with papain, ficin, and bromelain.

Protein	Papain Digestion	Ficin Digestion	Bromelain Digestion
ADRC1_ARATH	51	42	53
AMPL1_ARATH	70	45	102
BGL19_ARATH	52	96	41
CRU1_BRANA	77	79	76
CRU3_BRANA	58	69	96
CRU4_BRANA	85	81	91
CRUA_BRANA	63	78	74
ENO2_ARATH	48	58	49
ICDHC_ARATH	59	67	55
JAL36_ARATH	58	66	45
LEU3_BRANA	63	66	91
MDHC1_ARATH	36	35	53
MYRO_BRANA	98	111	112
OBP1A_ARATH	36	41	39
SODM2_ARATH	30	34	38
VCL22_ARATH	115	118	131
In total	999	1086	1146

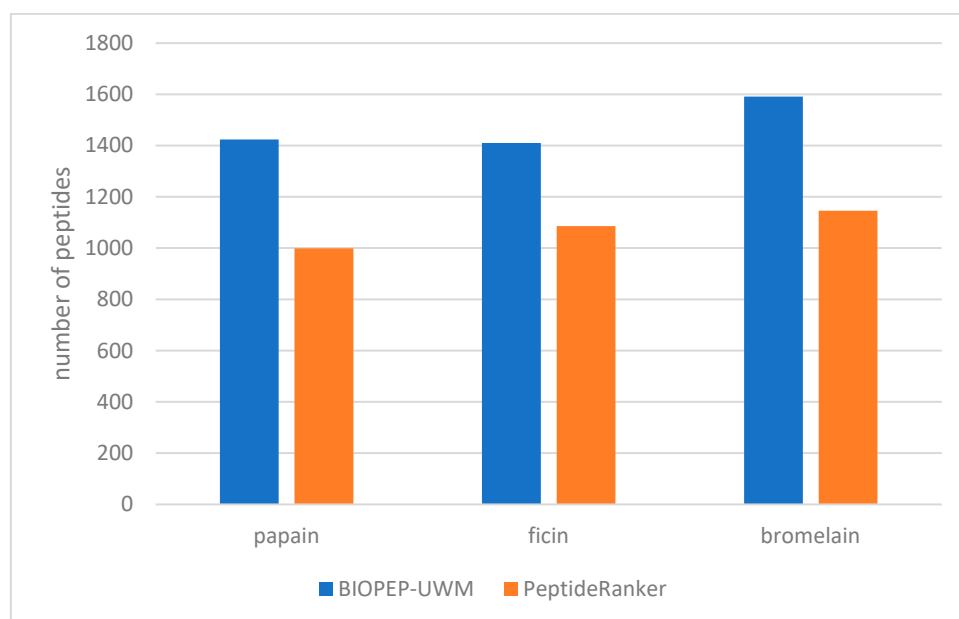


Figure 2. A comparison of the number of potentially bioactive peptides obtained after digestion of identified plant proteins using papain, ficin, and bromelain, predicted using the BIOPEP-UWM “Search for Active Fragments” tool and the PeptideRanker algorithm.

The resulting hydrolysates exhibited a remarkably extensive range of peptide biological activities, with 39 distinct types of bioactivities identified through the analysis in the BIOPEP-UWM “Search for Active Fragments” module (Table 4). On average, each hydrolysate contained peptides with 15–17 biological functions. Even the substrate that produced the fewest peptides (36 peptides from OBP1A_ARATH digested by papain) exhibited as many as 11 distinct activities, including a unique anticancer property specific to this protein. In contrast, the bromelain-digested BGL19_ARATH hydrolysate displayed

the highest functional diversity, with 23 different bioactivities among the 116 identified peptides. These findings suggest a positive correlation between the total number of released peptides and the diversity of their biological functions. Larger proteins that yield more fragments tend to exhibit a broader spectrum of potential health-promoting effects.

Table 4. Predicted bioactive peptide activities resulting from *in silico* enzymatic hydrolysis of identified rapeseed proteins using papain, ficin, and bromelain, showing the number of peptide sequences associated with each predicted activity and the total number of peptides generated by each enzyme.

Bioactivity	Papain Digestion	Ficin Digestion	Bromelain Digestion
ACE inhibitor	446	428	464
ACE2 inhibitor	11	9	12
activating ubiquitin-mediated proteolysis	0	0	3
alanine carboxypeptidase inhibitor	0	0	13
alpha-glucosidase inhibitor	9	6	22
antiamnestic	10	13	17
antibacterial	0	1	0
anticancer	1	1	1
anti-inflammatory	3	3	0
antioxidative	40	74	63
antithrombotic	8	11	17
bacterial permease ligand	1	0	0
binding	15	25	26
calpain I inhibitor	8	11	0
CaMPDE inhibitor	9	19	25
citrate lyase deacetylase inhibitor	3	0	0
dipeptidyl peptidase III inhibitor	38	38	94
dipeptidyl peptidase IV inhibitor	597	528	610
glutamate carboxypeptidase II inhibitor	14	5	23
glutamate carboxypeptidase inhibitor	5	0	0
HMG-CoA reductase inhibitor	2	3	0
hypolipidemic	5	10	8
hypotensive	0	9	0
hypouricemic	4	16	6
immunostimulating	3	0	6
inhibitor of tripeptidyl peptidase II	37	29	0
lactocepin inhibitor	8	8	11
neprilysin 2 inhibitor	8	11	0
neuropeptide	32	33	50
PAM inhibitor	8	11	17
pancreatic lipase inhibitor	5	8	1
peptidylprolyl isomerase inhibitor	4	0	0
phospholipase A2 inhibitor	1	3	0
regulating	16	18	17
renin inhibitor	34	36	42
stimulating	21	21	20
thymidylate synthase inhibitor	3	0	0
tubulin-tyrosine ligase inhibitor	5	12	12
xaa-pro inhibitor	10	10	11
Total peptides	1424	1410	1592

Among the hydrolysates analysed, the peptides most frequently detected were those that inhibited angiotensin I-converting enzyme (ACE), blocked dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), or exhibited antioxidant properties; these activities were present in 100% of

the samples, regardless of the protease employed (Figure 3). Collectively, these peptides represent the most abundant group of bioactive molecules in the human body. For example, the bromelain-derived CRU1_BRANA hydrolysate yielded 149 identified peptides, of which 60 inhibited DPP-IV, 49 inhibited ACE, and 4 demonstrated antioxidant properties. Similarly, the papain-derived CRUA_BRANA hydrolysate produced 151 peptides, of which 62, 52, and 3 exhibited the aforementioned activities. Additionally, renin inhibitors and neuropeptides were frequently observed, along with DPP-III inhibitors and peptides characterised as “stimulating” or “binding”.

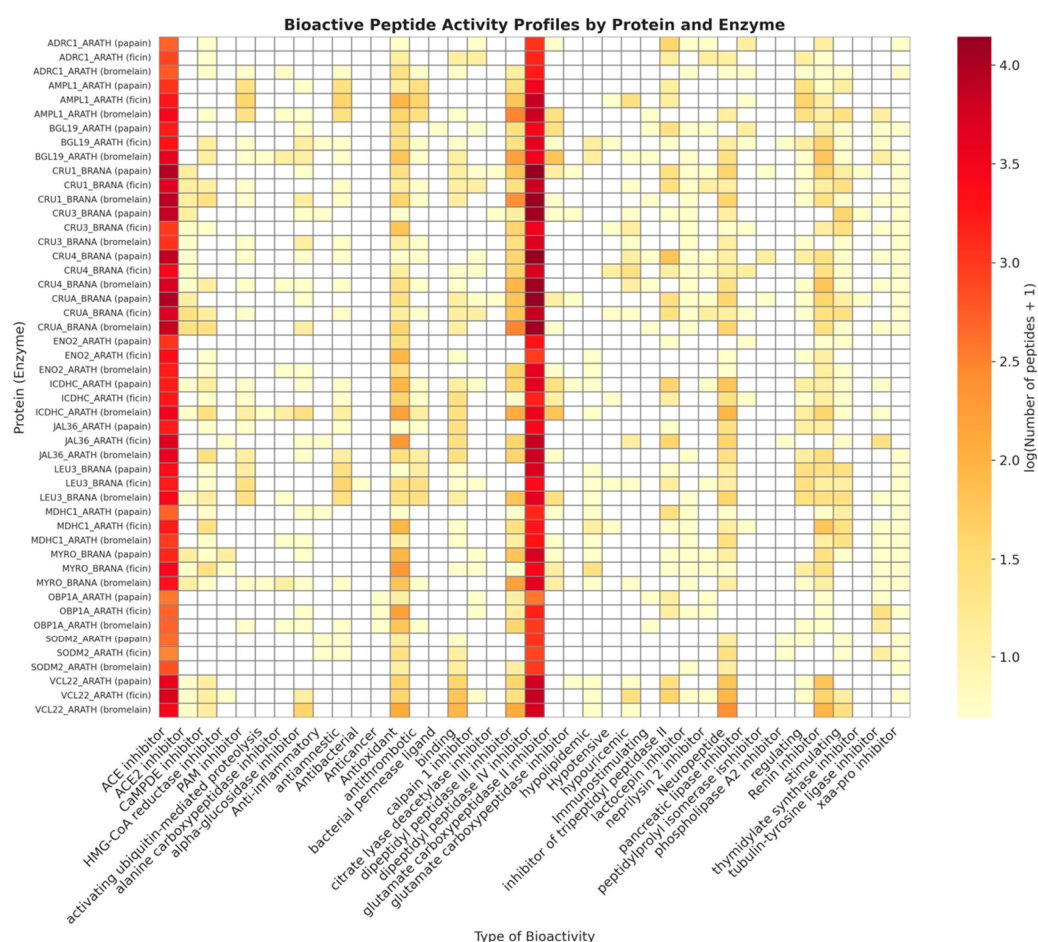


Figure 3. A heatmap illustrating the predicted bioactive peptide activity profiles resulting from the *in silico* enzymatic hydrolysis of identified rapeseed proteins.

Infrequent but potentially significant biological functions were observed sporadically. Anticancer activity was identified exclusively in the hydrolysates of OBP1A_ARATH, where each of the three enzymes—papain, ficin, and bromelain—released precisely one peptide exhibiting this activity. Antibacterial activity was similarly rare, represented by a single peptide in the ficin-digested LEU3_BRANA hydrolysate. Other peptides exerting effects on bacterial cells through alternative mechanisms, such as a permease ligand identified solely in the papain-digested BGL19_ARATH hydrolysate, were infrequently observed. Furthermore, only a limited number of hydrolysates contained peptides that inhibited critical enzymes, including thymidylate synthase (essential for DNA synthesis and a potential anticancer target), HMG-CoA reductase (involved in cholesterol metabolism), and phospholipase A₂ (which may have anti-inflammatory effects). Although only a few of these specialised peptides were identified (1–2 per hydrolysate), their presence

underscores the potential to obtain not only major functional groups but also less common yet biologically significant peptides from the investigated plant proteins.

4. Discussion

Cruciferin, the predominant storage protein in rapeseeds, is classified within the 11S globulin family and constitutes approximately 60% of the total seed protein content [30]. This study identified multiple spots corresponding to various cruciferin isoforms, such as CRU1, CRU4, and CRUA, catalogued in the UniProt database. Structurally, cruciferin is a hexamer consisting of six subunits with a molecular weight of approximately 300–360 kDa. It is composed of pairs of polypeptides, a heavier α chain (~30 kDa) and a lighter β chain (~20 kDa), which are linked by a disulfide bond [31,32]. Under 2D-PAGE conditions, this complex dissociates into its subunits, resulting in numerous spots in the ~20–30 kDa range, corresponding to individual α/β chains and their post-translational modifications, as noted by Nietzel et al. [33]. Rapeseed contains multiple forms of cruciferin, with over 30 distinct variants identified, including various α and β isoforms and post-translational modifications. Gu et al. [34] observed multiple spots corresponding to individual α/β subunits and their modifications, further highlighting the extensive heterogeneity of this storage protein family.

Napin (2S albumin, ~17 kDa) is the second most abundant storage protein in rapeseeds, constituting approximately 20% of the total protein content in canola seeds [31,32]. Notably, typical napin spots were not observed on the two-dimensional gel. This absence may be attributed to methodological limitations, as napin is highly basic (pI ~10.5) [35], potentially placing it outside of the pH 3–10 gradient range used during isoelectric focusing.

Notably, one location within the analysed material was identified as a vicilin-like protein, which is a member of the 7S globulin family. Vicilins are predominantly associated with leguminous plants and are infrequently documented in cruciferous species [36]. Nevertheless, recent proteomic studies have confirmed the presence of vicilin-like proteins in *Brassica rapa* seeds [37]. Consequently, the detection of a vicilin-like protein in rapeseed meal implies that 7S globulins may also exist at trace levels in this crop.

Among the metabolic enzymes identified on the two-dimensional gel were those associated with the tricarboxylic acid cycle (the Krebs cycle), specifically cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and cytoplasmic malate dehydrogenase. Additionally, 3-isopropylmalate dehydrogenase, which is involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids, was identified. The presence of these dehydrogenase enzymes in seeds was substantiated by Gu et al. [34] in their study on the protein expression during rapeseed germination.

Rapeseed seeds contain defence proteins that protect them against pests and pathogens. Among these proteins is myrosinase, a thioglucosidase enzyme that catalyses the hydrolysis of glucosinolates into toxic compounds, such as isothiocyanates, upon tissue damage [38]. Thangstad et al. [39] have reported that myrosinases represent a group of isoenzymes found in Brassicaceae species, including *Brassica napus*. Similarly, Geshi et al. [40] confirmed the presence of multiple myrosinase isoforms in Brassica species.

The jacalin-related lectin family is another crucial component of plant defence mechanisms. These lectins, induced in response to stress and damage, play essential roles in plant immunity [41]. Supporting this notion, Gu et al. [34] identified a jacalin-like lectin protein in their two-dimensional gels of germination-related proteins, underscoring the importance of these lectins to the defence mechanisms of rapeseed.

Rapeseed meal is also characterised by the presence of enzymes that alleviate oxidative stress and its derivatives. Notably, mitochondrial manganese-dependent superoxide dismu-

tase acts as the primary defence mechanism against reactive oxygen species by scavenging superoxide radicals, thereby safeguarding seed cells from oxidative damage [42].

The protein profile of rapeseed meal, as elucidated through 2D-PAGE, revealed a complex composition predominantly characterised by the storage protein cruciferin, alongside metabolic and defensive enzymes typical of canola seeds [43]. This profile aligns with the established rapeseed seed proteome; however, the identification of a vicilin-like protein presents an intriguing opportunity for further research.

In silico digestion of rapeseed proteins identified in this study, followed by an analysis of the resultant bioactive peptides, demonstrated a diverse array of potential activities, including the inhibition of ACE and DPP-IV, as well as antioxidant, antibacterial, and anticancer properties. Studies with the three plant cysteine proteases showed that bromelain released the highest number of peptides overall—including the greatest number of putatively bioactive sequences—compared with papain and ficin—including putatively bioactive sequences—when compared with papain and ficin. The higher number of bioactive peptides generated during bromelain hydrolysis can be explained by the complementarity between its substrate specificity and the amino acid composition of the major rapeseed proteins. Bromelain preferentially cleaves the peptide bonds adjacent to lysine, tyrosine, and hydrophobic residues [44], which are abundantly present in the sequence of cruciferin, the primary storage protein of rapeseed. This alignment between the enzyme's cleavage preferences and the distribution of residues in rapeseed proteins results in a greater number of accessible cleavage sites than those available to ficin, which favours arginine at the P₁ position, or papain, which targets predominantly hydrophobic motifs [21]. Consequently, bromelain seems to generate more short peptides with potential biological activity. The subsequent analysis of these peptides indicated a diverse range of predicted functions, including inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) and dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV), alongside antioxidant, antibacterial and anticancer properties.

Notably, the predominant category of identified peptides consisted of those with potential antihypertensive and antidiabetic properties, as enzymatic hydrolysis liberated numerous ACE- and DPP-IV-inhibitory peptides from each of the analysed proteins. Angiotensin-converting enzyme (ACE) and dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) are integral to the pathogenesis of hypertension and type 2 diabetes mellitus, respectively. Consequently, the inhibition of ACE and DPP-IV by specific peptides has emerged as a novel therapeutic approach to complementing the pharmacological treatments for both conditions [45]. In their investigation of oilseed plants, Han et al. [45] digested rapeseed cruciferin and napin in silico using pepsin. Their findings indicate that oilseed proteins, including those derived from rapeseed, are promising sources of peptides with ACE- and DPP-IV-inhibitory activities, underscoring their potential utility in the management of hypertension and diabetes. Similarly, Duan et al. [46] employed bioinformatic methodologies to assess the bioactive peptides within rapeseed protein. These results corroborate the aforementioned findings, demonstrating that rapeseed protein holds significant potential for generating various biologically active peptides, particularly those with DPP-IV- and ACE-inhibitory properties. Furthermore, You et al. [47] simulated gastrointestinal digestion of rapeseed proteins and subsequently isolated the most promising DPP-IV-inhibitory peptides. These peptides were synthesised and confirmed to inhibit DPP-IV activity in vitro, underscoring rapeseed protein hydrolysates as a rich source of peptides with potential antidiabetic effects, as predicted by bioinformatic analyses and verified in experimental studies. Recent in vivo studies support the antihypertensive and antidiabetic potential of rapeseed-protein-derived peptides. In spontaneously hypertensive rats, oral administration of these peptides reduced their systolic blood pressure, with a more pronounced and prolonged effect when combined with captopril. This synergistic action was not associated with additional ACE inhibition

but likely involved enhanced nitric oxide production and endothelial function [48]. In type 2 diabetic mouse models, specific hydrolysates (RCP-3, RNPP-1) improved glycaemic control and lipid metabolism through the stimulation of GLP-1 secretion via the activation of the intestinal calcium-sensing receptors and subsequent PI3K/Akt pathway activation [49]. Encapsulation of the peptides into biopolymeric nanoparticles further enhanced their hypoglycaemic effect, indicating improved gastrointestinal stability and bioavailability [50].

Among the identified peptides, several exhibited uncommon biological activities, including potential anticancer properties. Ma et al. [51] investigated a peptide derived from rapeseed proteins for its effects on HepG2 liver cancer cells. Their findings demonstrated that this peptide significantly inhibited cancer cell proliferation, suggesting that enzymatic hydrolysis of rapeseed proteins may yield peptides with antitumour activities. Ferrero et al. [52] reported the presence of polypeptides and oligosaccharides in enzymatic hydrolysates of rapeseed proteins that inhibited the growth of the MCF-7 breast cancer cell line with moderate cytotoxicity to human cells. In a murine breast cancer model, nanocomplexes releasing pro-apoptotic peptides in response to tumour-associated cathepsin B significantly improved the efficacy of doxorubicin, reducing tumour growth by up to 91% [53]. This indicates the potential application of these hydrolysates in cancer treatment; however, further research is required.

Although our study identified only one antibacterial peptide, the existing literature indicates that rapeseed is a promising source of antimicrobial peptides. For example, Duan et al. [11] utilised an *in silico* approach to generating antibacterial peptides from rapeseed proteins. Additionally, Rahman et al. [54] discussed the antimicrobial properties of rapeseed storage proteins, suggesting a correlation between their spatial structure and antimicrobial efficacy, and confirmed that these proteins retained their properties following enzymatic hydrolysis. Through digestion simulation using various enzymes, 26 peptide sequences were identified to have potential antimicrobial activity, with trypsin proteolysis producing the greatest number of candidates. These findings suggest that rapeseed seed proteins are a theoretically abundant source of antimicrobial peptides, meriting further empirical investigation.

Additional peptide activities predicted in our *in silico* analysis have been substantiated by the existing literature. For example, He et al. [55] validated the antioxidant properties of rapeseed-derived peptides produced via fermentation or sequential enzymatic hydrolysis. Similarly, Yang et al. [56] identified rapeseed peptides with significant hypolipidaemic effects.

Our findings align with the existing literature, corroborating the significant potential of rapeseed proteins as a source of bioactive peptides. However, it is important to note that *in silico* predictions, while instrumental in guiding experimental design, do not replicate the actual enzymatic conditions encountered in the laboratory. Tools such as BIOPEP-UWM perform “virtual” proteolysis under the simplifying assumption of ideal and complete hydrolysis—every peptide bond that matches the stored recognition motif of a selected protease is cleaved [23]. In practice, hydrolysis is rarely exhaustive; the steric hindrance imposed by the native tertiary/quaternary structure of plant proteins; competition between multiple cleavage sites; and incomplete enzyme–substrate contact can all prevent the formation of some of the theoretically predicted peptides, generating false positive results. Conversely, the specificity matrices embedded into BIOPEP-UWM are compiled from a finite set of experimentally verified cleavage sites; any gaps in this knowledge may lead to false negative omissions, particularly for less studied plant proteases or storage proteins rich in disulfide-bonded domains [23]. Moreover, the current algorithms do not model the kinetic or environmental parameters—enzyme concentration, reaction time,

pH, temperature, ionic strength, or post-translational modifications—so they yield only a qualitative inventory of putative fragments rather than a quantitative profile of the peptide release. Variables such as enzyme specificity, substrate interactions, and the presence of other macromolecules can influence peptide release and functionality. An additional layer of uncertainty is introduced when the predictions are ranked using PeptideRanker, which assigns probabilistic bioactivity scores based solely on primary sequence features learned from known peptides; this approach may miss novel activities outside of the training set and produce high-scoring false positives if contextual factors such as the peptide conformation, stability, or bioavailability are unfavourable *in vivo* [26]. Because PeptideRanker does not distinguish between different modes of action and relies on a user-defined score threshold, its output should likewise be interpreted as a prioritisation aid rather than definitive evidence of bioactivity. In accordance with the above considerations and the recent literature [57,58], *in silico* predictions should be regarded as an efficient preliminary screening approach to prioritising experimental targets; however, they are not sufficient to substantiate biological activity without subsequent *in vitro* and *in vivo* validation.

The *in vivo* efficacy of the rapeseed-derived peptides predicted herein is contingent on their bioaccessibility within the gastrointestinal milieu, their resistance to peptidases, and their subsequent transepithelial transport in an intact, biologically active form [59]. Although many oligopeptides are rapidly hydrolysed or display limited paracellular permeability, certain di- and tripeptides can cross the enterocyte via the PepT1 transporter and enter the bloodstream intact [60]. Key physicochemical parameters—such as molecular mass, charge, and hydrophobicity—govern these processes; hence, simulated gastrointestinal digestion followed by Caco-2 monolayer assays constitutes a critical next step in ranking peptides [61]. From a toxicological standpoint, peptides derived from edible proteins are generally regarded as low-risk. Nevertheless, every novel fraction must be rigorously screened for both allergenicity and cytotoxicity. In the study by Ferrero et al. mentioned earlier [52], rapeseed protein hydrolysates exhibited marked antiproliferative activity against tumour cell lines while causing only marginal cytotoxicity in normal human fibroblasts, indicating a favourable preliminary safety window. Despite these promising results, exhaustive *in vitro* and *in vivo* investigations remain essential before these bioactive peptides can be responsibly integrated into functional foods or nutraceutical formulations.

5. Conclusions

The findings of this study substantiate that rapeseed meal is a promising source of bioactive peptides. The proteomic analysis has identified cruciferin as the predominant storage protein. *In silico* digestion using papain, ficin, and bromelain released a variety of peptides exhibiting ACE-inhibitory, DPP-IV-inhibitory, and antioxidant activities. Bromelain generated the largest number of putative bioactive peptides in our single-run simulations; future replicated studies are required to confirm whether this difference is statistically significant. While these results highlight the nutraceutical value of rapeseed meal, further *in vitro* and *in vivo* investigations are required to validate the predicted health benefits of these peptides *in vivo*.

Author Contributions: Conceptualisation: K.G., J.W., and A.W.; methodology: K.G. and J.W.; validation: M.C. and J.W.; formal analysis: K.G.; investigation: K.G. and M.C.; resources: K.G. and A.W.; data curation: K.G. and A.W.; writing—original draft preparation: K.G.; writing—review and editing: J.W. and A.W.; visualisation: K.G. and M.C.; supervision: A.W.; project administration: K.G.; funding acquisition: K.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Implementation PhD VKT/DW/2/2020.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: Authors Katarzyna Garbacz and Michał Czelej were employed by Biolive Innovation Sp. z o.o. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Available online: <https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity-group/oilseeds> (accessed on 1 March 2025).
2. Di Lena, G.; Sánchez del Pulgar, J.; Lucarini, M.; Durazzo, A.; Ondrejčíková, P.; Oancea, F.; Frincu, R.-M.; Aguzzi, A.; Ferrari Nicoli, S.; Casini, I.; et al. Valorization Potentials of Rapeseed Meal in a Biorefinery Perspective: Focus on Nutritional and Bioactive Components. *Molecules* **2021**, *26*, 6787. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Będycka-Bórawska, A.; Jankowski, K.J.; Rokicki, T.; Gostkowski, M. Area under Rapeseed Cultivation as a Factor Differentiating the Economic Performance of Biodiesel Producers. *Energies* **2021**, *14*, 8568. [\[CrossRef\]](#)
4. Chew, S.C. Cold-pressed rapeseed (*Brassica napus*) oil: Chemistry and functionality. *Food Res. Int.* **2020**, *131*, 108997. [\[CrossRef\]](#)
5. Chmielewska, A.; Kozłowska, M.; Rachwał, D.; Wnukowski, P.; Amarowicz, R.; Nebesny, E.; Rosicka-Kaczmarek, J. Canola/Rapeseed Protein—Nutritional Value, Functionality and Food Application: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 3836–3856. [\[CrossRef\]](#)
6. Ye, Z.; Liu, Y. Polyphenolic compounds from rapeseeds (*Brassica napus* L.): The major types, biofunctional roles, bioavailability, and the influences of rapeseed oil processing technologies on the content. *Food Res. Int.* **2023**, *163*, 112282. [\[CrossRef\]](#)
7. Cháirez-Jiménez, C.; Castro-López, C.; Serna-Saldívar, S.; Chuck-Hernández, C. Partial characterization of canola (*Brassica napus* L.) protein isolates as affected by extraction and purification methods. *Heliyon* **2023**, *9*, 21938. [\[CrossRef\]](#)
8. Singh, R.; Langyan, S.; Sangwan, S.; Rohtagi, B.; Khandelwal, A.; Shrivastava, M. Protein for Human Consumption from Oilseed Cakes: A Review. *Front. Sustain. Food Syst.* **2022**, *6*, 856401. [\[CrossRef\]](#)
9. He, R.; Alashi, A.M.; Malomo, S.A.; Girgih, A.T.; Chao, D.; Ju, X.; Aluko, R.E. Antihypertensive and Free Radical Scavenging Properties of Enzymatic Rapeseed Protein Hydrolysates. *Food Chem.* **2013**, *141*, 153–159. [\[CrossRef\]](#)
10. Xu, F.; Yao, Y.; Xu, X.; Wang, M.; Pan, M.; Ji, S.; Wu, J.; Jiang, D.; Ju, X.; Wang, L. Identification and Quantification of DPP-IV-Inhibitory Peptides from Hydrolyzed Rapeseed Protein-Derived Napin: Analysis of Interactions Between Key Residues and the Enzyme. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3679–3690. [\[CrossRef\]](#)
11. Duan, X.; Zhang, M.; Chen, F. Prediction and Analysis of Antimicrobial Peptides from Rapeseed Protein Using In Silico Approach. *J. Food Biochem.* **2021**, *45*, e13598. [\[CrossRef\]](#)
12. Garbacz, K.; Wawrzykowski, J.; Czelej, M.; Czernecki, T.; Waśko, A. Recent Trends in the Application of Oilseed-Derived Protein Hydrolysates as Functional Foods. *Foods* **2023**, *12*, 3861. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Chen, R.; Zheng, J.; Liu, X.; Ni, C. Screening and Identification of Hypolipidemic Peptides from Rapeseed (*Brassica napus*) Albumin Hydrolysates by LC-MS/MS. *J. Food Sci.* **2020**, *85*, 2559–2567. [\[CrossRef\]](#)
14. Ahmad, A.; Hayat, I.; Arain, M.A.; Khalil, I.A.; Pasha, I. Enhanced Antiproliferative Activities of Peptides Isolated from Enzymatic Hydrolysates of Canola Meal. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2019**, *74*, 545–551. [\[CrossRef\]](#)
15. Kim, I.-S.; Yang, W.-S.; Kim, C.-H. Beneficial Effects of Soybean-Derived Bioactive Peptides. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8570. [\[CrossRef\]](#)
16. Hernández-Ledesma, B.; de Lumen, B.O. Lunasin: A novel cancer preventive seed peptide. *Perspect. Medicin Chem.* **2008**, *2*, 75–80. [\[CrossRef\]](#)
17. Fleddermann, M.; Fechner, A.; Rößler, A.; Bähr, M.; Pastor, A.; Liebert, F.; Jahreis, G. Nutritional evaluation of rapeseed protein compared to soy protein for quality, plasma amino acids, and nitrogen balance—A randomized cross-over intervention study in humans. *Clin. Nutr.* **2013**, *32*, 519–526. [\[CrossRef\]](#)
18. Velliquette, R.A.; Fast, D.J.; Maly, E.R.; Alashi, A.M.; Aluko, R.E. Enzymatically derived sunflower protein hydrolysate and peptides inhibit NF- κ B and promote monocyte differentiation to a dendritic cell phenotype. *Food Chem.* **2020**, *319*, 126563. [\[CrossRef\]](#)
19. Matkawala, F.; Nighojkar, S.; Nighojkar, A. Next-Generation Nutraceuticals: Bioactive Peptides from Plant Proteases. *BioTechnology* **2022**, *103*, 397–408. [\[CrossRef\]](#)
20. Vatić, S.; Mirković, N.; Milošević, J.R.; Jovčić, B.; Polović, N. Broad range of substrate specificities in papain and fig latex enzymes preparations improve enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *334*, 108851. [\[CrossRef\]](#)

21. Domokos-Szabolcsy, É.; Alshaal, T.; Elhawat, N.; Kovács, Z.; Kaszás, L.; Béni, Á.; Kiss, A. Enhanced Oligopeptide and Free Tryptophan Release from Chickpea and Lentil Proteins: A Comparative Study of Enzymatic Modification with Bromelain, Ficin, and Papain. *Plants* **2024**, *13*, 3100. [\[CrossRef\]](#)
22. Venetikidou, M.; Lykartsis, E.; Adamantidis, T.; Prokopiou, V.; Ofrydopoulou, A.; Letsiou, S.; Tsoupras, A. Proteolytic Enzyme Activities of Bromelain, Ficin, and Papain from Fruit By-Products and Potential Applications in Sustainable and Functional Cosmetics for Skincare. *Appl. Sci.* **2025**, *15*, 2637. [\[CrossRef\]](#)
23. Minkiewicz, P.; Iwaniak, A.; Darewicz, M. BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5978. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850–858. [\[CrossRef\]](#)
26. Mooney, C.; Haslam, N.J.; Pollastri, G.; Shields, D.C. Towards the improved discovery and design of functional peptides: Common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 45012. [\[CrossRef\]](#)
27. Giavalisco, P.; Kapitza, K.; Kolasa, A.; Buhtz, A.; Kehr, J. Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics* **2006**, *6*, 896–909. [\[CrossRef\]](#)
28. Li, W.; Lu, J.; Yang, C.; Xia, S. Identification of receptor-like proteins induced by *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 944763. [\[CrossRef\]](#)
29. Perera, S.P.; McIntosh, T.C.; Wanasundara, J.P.D. Structural Properties of Cruciferin and Napin of *Brassica napus* (Canola) Show Distinct Responses to Changes in pH and Temperature. *Plants* **2016**, *5*, 36. [\[CrossRef\]](#)
30. Crouch, M.L.; Sussex, I.M. Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos *in vivo* and *in vitro*. *Planta* **1981**, *153*, 64–74. [\[CrossRef\]](#)
31. Yang, C.; Wang, Y.; Vasanthan, T.; Chen, L. Impacts of pH and heating temperature on formation mechanisms and properties of thermally induced canola protein gels. *Food Hydrocoll.* **2014**, *40*, 225–236. [\[CrossRef\]](#)
32. Aquilia, S.; Rosi, L.; Pinna, M.; Bianchi, S.; Giurlani, W.; Bonechi, M.; Ciardelli, F.; Papini, A.M.; Bello, C. Study of the Preparation and Properties of Chemically Modified Materials Based on Rapeseed Meal. *Biomolecules* **2024**, *14*, 982. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Nietzel, T.; Dudkina, N.V.; Haase, C.; Denolf, P.; Semchonok, D.A.; Boekema, E.J.; Braun, H.-P.; Sunderhaus, S. The native structure and composition of the cruciferin complex in *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 2238–2245. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Gu, J.; Chao, H.; Gan, L.; Guo, L.; Zhang, K.; Li, Y.; Wang, H.; Raboanatahiry, N.; Li, M. Proteomic Dissection of Seed Germination and Seedling Establishment in *Brassica napus*. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1482. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Georgiev, R.; Kalaydzhiev, H.; Ivanova, P.; Silva, C.L.M.; Chalova, V.I. Multifunctionality of Rapeseed Meal Protein Isolates Prepared by Sequential Isoelectric Precipitation. *Foods* **2022**, *11*, 541. [\[CrossRef\]](#)
36. Ateeq, M.; Adeel, M.M.; Kanwal, A.; Tahir ul Qamar, M.; Saeed, A.; Khaliq, B.; Saeed, Q.; Atiq, M.N.; Bilal, M.; Alharbi, M.; et al. In Silico Analysis and Functional Characterization of Antimicrobial and Insecticidal Vicilin from Moth Bean (*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal) Seeds. *Molecules* **2022**, *27*, 3251. [\[CrossRef\]](#)
37. Rahman, M.; Guo, Q.; Baten, A.; Mauleon, R.; Khatun, A.; Liu, L.; Barkla, B.J. Shotgun proteomics of *Brassica rapa* seed proteins identifies vicilin as a major seed storage protein in the mature seed. *PLoS ONE* **2021**, *16*, 0253384. [\[CrossRef\]](#)
38. Jhingan, S.; Harloff, H.J.; Abbadi, A. Reduced glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by random mutagenesis of BnMYB28 and BnCYP79F1 genes. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 2344. [\[CrossRef\]](#)
39. Thangstad, O.P.; Gilde, B.; Chadchawan, S.; Seem, M.; Husebye, H.; Bradley, D.; Bones, A.M. Cell Specific, Cross-Species Expression of Myrosinases in *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* **2004**, *54*, 597–611. [\[CrossRef\]](#)
40. Geshi, N.; Brandt, A. Two jasmonate-inducible myrosinase-binding proteins from *Brassica napus* L. seedlings with homology to jacalin. *Planta* **1998**, *204*, 295–304. [\[CrossRef\]](#)
41. Esch, L.; Schaffrath, U. An Update on Jacalin-Like Lectins and Their Role in Plant Defense. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1592. [\[CrossRef\]](#)
42. Su, W.; Raza, A.; Gao, A.; Jia, Z.; Zhang, Y.; Hussain, M.A.; Mehmood, S.S.; Cheng, Y.; Lv, Y.; Zou, X. Genome-Wide Analysis and Expression Profile of Superoxide Dismutase (SOD) Gene Family in Rapeseed (*Brassica napus* L.) under Different Hormones and Abiotic Stress Conditions. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1182. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Zhu, H.; Wang, L.; Li, X.; Shi, J.; Scanlon, M.; Xue, S.; Nosworthy, M.; Vafaei, N. Canola Seed Protein: Pretreatment, Extraction, Structure, Physicochemical and Functional Characteristics. *Foods* **2024**, *13*, 1357. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Pavan, R.; Jain, S.; Shraddha Kumar, A. Properties and therapeutic application of bromelain: A review. *Biotechnol. Res. Int.* **2012**, *2012*, 976203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Han, R.; Maycock, J.; Murray, B.S.; Boesch, C. Identification of angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides derived from oilseed proteins using two integrated bioinformatic approaches. *Food Res. Int.* **2019**, *115*, 283–291. [[CrossRef](#)]
46. Duan, X.; Dong, Y.; Zhang, M.; Li, Z.; Bu, G.; Chen, F. Identification and molecular interactions of novel ACE inhibitory peptides from rapeseed protein. *Food Chem.* **2023**, *422*, 136085. [[CrossRef](#)]
47. You, H.; Zhang, Y.; Wu, T.; Li, J.; Wang, L.; Yu, Z.; Liu, J.; Liu, X.; Ding, L. Identification of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from rapeseed proteins. *LWT* **2022**, *160*, 113255. [[CrossRef](#)]
48. Wang, Y.; Li, Y.; Ruan, S.; Lu, F.; Tian, W.; Ma, H. Antihypertensive effect of rapeseed peptides and their potential in improving the effectiveness of captopril. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 3049–3055. [[CrossRef](#)]
49. Ji, T.; Xu, G.; Wu, Y.; Wang, Y.; Xiao, C.; Zhang, B.; Xu, B.; Xu, F. Amelioration of Type 2 Diabetes Mellitus Using Rapeseed (*Brassica napus*)-Derived Peptides through Stimulating Calcium-Sensing Receptor: Effects on Glucagon-Like Peptide-1 Secretion and Hepatic Lipid Metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **2024**, *2024*, 72. [[CrossRef](#)]
50. Wang, Q.; Dong, X.; Castañeda-Reyes, E.D.; Wu, Y.; Zhang, S.; Wu, Z.; Wang, Z.; Dai, L.; Xu, B.; Xu, F. Chitosan and sodium alginate nanocarrier system: Controlling the release of rapeseed-derived peptides and improving their therapeutic efficiency of anti-diabetes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *265*, 130713. [[CrossRef](#)]
51. Ma, K.; Wang, Z.; Ju, X.; Huang, J.; He, R. Rapeseed peptide inhibits HepG2 cell proliferation by regulating the mitochondrial and P53 signaling pathways. *J. Sci. Food Agric.* **2023**, *103*, 1474–1483. [[CrossRef](#)]
52. Ferrero, R.L.; Weinstein-Opppenheimer, C.R.; Cabrera-Muñoz, Z.; Zúñiga-Hansen, M.E. The Antiproliferative Activity of a Mixture of Peptide and Oligosaccharide Extracts Obtained from Defatted Rapeseed Meal on Breast Cancer Cells and Human Fibroblasts. *Foods* **2023**, *12*, 253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wang, Z.; Zhang, R.X.; Zhang, T.; He, C.; He, R.; Ju, X.; Wu, X.Y. In Situ Proapoptotic Peptide-Generating Rapeseed Protein-Based Nanocomplexes Synergize Chemotherapy for Cathepsin-B Overexpressing Breast Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 41056–41069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rahman, M.; Browne, J.J.; Van Crugten, J.; Hasan, M.F.; Liu, L.; Barkla, B.J. In Silico, Molecular Docking and In Vitro Antimicrobial Activity of the Major Rapeseed Seed Storage Proteins. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1340. [[CrossRef](#)]
55. He, R.; Ju, X.; Yuan, J.; Wang, L.; Girgih, A.T.; Aluko, R.E. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 432–438. [[CrossRef](#)]
56. Yang, F.; Huang, J.; He, H.; Ju, X.; Ji, Y.; Deng, F.; Wang, Z.; He, R. Study on the hypolipidemic activity of rapeseed protein-derived peptides. *Food Chem.* **2023**, *423*, 136315. [[CrossRef](#)]
57. Rivero-Pino, F.; Millán-Linares, M.C.; Montserrat-de la Paz, S. Strengths and limitations of in silico tools to assess physicochemical properties, bioactivity, and bioavailability of food-derived peptides. *Trends Food Sci. Technol.* **2023**, *133*, 433–440. [[CrossRef](#)]
58. Du, Z.; Comer, J.; Li, Y. Bioinformatics approaches to discovering food-derived bioactive peptides: Reviews and perspectives. *Trends Anal. Chem.* **2023**, *158*, 116891. [[CrossRef](#)]
59. Amigo, L.; Hernández-Ledesma, B. Current Evidence on the Bioavailability of Food Bioactive Peptides. *Molecules* **2020**, *25*, 4479. [[CrossRef](#)]
60. Dai, C.; Zhang, W.; He, R.; Xiong, F. Protein Breakdown and Release of Antioxidant Peptides during Simulated Gastrointestinal Digestion and Absorption of Rapeseed Proteins. *LWT* **2017**, *86*, 175–183. [[CrossRef](#)]
61. Patil, P.J.; Usman, M.; Zhang, C.; Mehmood, A.; Zhou, M.; Teng, C.; Li, X. An updated review on food-derived bioactive peptides: Focus on the regulatory requirements, safety, and bioavailability. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2022**, *21*, 1732–1776. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

PROCEDURA TECHNOLOGICZNA

Wytwarzanie biologicznie aktywnych peptydów z makuchów roślin oleistych

1. Cel i zakres procedury

Celem niniejszej procedury jest szczegółowy opis procesu technologicznego wytwarzania biologicznie aktywnych peptydów (proteoptydów) z makuchów roślin oleistych w warunkach przemysłowych. Procedura opisuje trzy warianty procesu, różniące się rodzajem zastosowanego makuchu (rzepakowy, słonecznikowy, z ostropestu). W zależności od użytego surowca otrzymuje się odpowiednio: proteoptydy z rzepaku, proteoptydy ze słonecznika lub proteoptydy z ostropestu.

Procedura obejmuje etapy:

- zakup, przyjęcie i przechowywanie surowców oraz odczynników,
- przygotowanie surowców i odczynników,
- ekstrakcję białka z makuchu,
- hydrolizę enzymatyczną białek,
- zateżnianie hydrolizatu,
- suszenie rozpyłowe,
- pakowanie i przechowywanie produktu końcowego,
- podstawowe wymagania dotyczące dokumentacji oraz kontroli jakości.

2. Wykaz surowców, odczynników i enzymów

W procesie wytwarzania proteoptydów stosuje się następujące surowce i odczynniki:

2.1. Surowiec główny – makuchy roślinne

- makuch rzepakowy lub
- makuch słonecznikowy lub
- makuch z ostropestu
 - Dostawca: AMF Life

- Opakowanie: worek 500 kg.

2.2. Odczynniki chemiczne

1. Wodorotlenek sodu (NaOH), granulki
 - Dostawca: Biomus sp. z o.o.
 - Opakowanie: worek polietylenowy 25 kg.
2. Kwas chlorowodorowy (kwas solny), 35–38% (HCl)
 - Dostawca: Chempur
 - Opakowanie: karnister HDPE 20 L.
3. Enzym - papaina – PERFORMASE® 30000 USP-U/mg
 - Dostawca: Enzybel International
 - Opakowanie: opakowania polietylenowe 20 kg.

2.3. Dokumentacja surowców

Dokumentacja dotycząca dostaw (zamówienia, specyfikacje, certyfikaty analizy – COA, karty charakterystyki i karty produktów) przechowywana jest w formie elektronicznej w lokalizacji: HEKATE\Stany magazynowe + certyfikaty, analizy, karty produktów\Dokumenty do surowców - archiwum\Peptydy.

3. Wymagania BHP i ochrony środowiska

3.1. Bezpieczeństwo pracy

Praca z kwasem chlorowodorowym, wodorotlenkiem sodu, enzymami proteolitycznymi, wysokimi temperaturami oraz urządzeniami próżniowymi wymaga:

- stosowania środków ochrony indywidualnej (okulary/ochrona oczu, rękawice odporne chemicznie, odzież robocza, obuwie ochronne),
- prowadzenia operacji z użyciem stężonych roztworów HCl i NaOH pod wyciągiem,
- uwzględnienia ryzyka uczulenia na papainę (silny alergen) – podczas odmierzania/przesypywania enzymu pracować pod wyciągiem i stosować półmaskę przeciwpyłową (P2/P3), minimalizując pylenie; po pracy umyć ręce i oczyścić stanowisko.
- przestrzegania zakładowych instrukcji BHP dla substancji żrących i pracy z aparaturą ciśnieniową,
- szkolenia pracowników w zakresie bezpiecznej obsługi wirówek, wyparki podciśnieniowej i suszarki rozpyłowej.

3.2. Ochrona środowiska

- Ścieki procesowe (supernatanty, destylaty) oraz odpady stałe (pellet, osady) należy zagospodarowywać zgodnie z obowiązującą w zakładzie procedurą postępowania z odpadami.
- Niedopuszczalne jest odprowadzanie do kanalizacji ścieków o skrajnych wartościach pH bez wcześniejszej neutralizacji.

4. Opis procesu technologicznego

4.1. Zakup, przyjęcie i przechowywanie surowców oraz odczynników

4.1.1. Zakup surowców i odczynników

Zakup surowców i odczynników odbywa się zgodnie z obowiązującą w zakładzie procedurą zaopatrzeniową, z uwzględnieniem:

- aktualnych specyfikacji jakościowych surowców,
- wymaganych certyfikatów analizy i kart charakterystyki,
- warunków transportu i przechowywania deklarowanych przez producenta.

4.1.2. Przyjęcie surowców i odczynników

Po dostawie każdą partię surowców/odczynników należy:

1. Skontrolować opakowania

- sprawdzić opakowania zbiorcze i jednostkowe pod kątem uszkodzeń, nieszczelności, śladów zawilgocenia i zanieczyszczeń,
- wszystkie niezgodności zapisać w protokole przyjęcia.

2. Udokumentować przyjęcie w protokole przyjęcia, podając co najmniej:

- datę przyjęcia,
- numer serii/partii produkcyjnej,
- datę ważności/minimalnej trwałości,
- nazwę producenta i dostawcy,
- wynik kontroli opakowań i ewentualne uwagi.

Dokumentacja z dostawy przechowywana jest elektronicznie:

HEKATE\Stany magazynowe + certyfikaty, analizy, karty produktów\Dokumenty do surowców - archiwum\Peptydy.

4.1.3. Przechowywanie surowców i odczynników

Przyjęte surowce należy oznakować datą dostawy i umieścić w magazynie w warunkach wskazanych w dokumentacji producenta. W przypadku ich braku stosuje się następujące wytyczne:

1. **Makuchy roślinne** – przechowywać w magazynie surowców w temperaturze otoczenia, w suchym i zacienionym miejscu, zabezpieczone przed wilgocią i szkodnikami.
2. **Wodorotlenek sodu (NaOH), granulki** – przechowywać w magazynie surowców w temperaturze otoczenia, w szczelnie zamkniętym opakowaniu, chronić przed wilgocią.
3. **Kwas chlorowodorowy 35–38% (HCl)** – przechowywać w magazynie surowców w temperaturze otoczenia, w wydzielonej strefie dla substancji żrących, z właściwą wentylacją.
4. **Enzymy proteolityczne** – przechowywać w lodówce magazynu surowców w temperaturze 4°C, w oryginalnych, szczelnie zamkniętych opakowaniach.

Przy przechowywaniu w warunkach chłodniczych należy:

- kontrolować rejestrator temperatury,
- odnotowywać wszystkie przekroczenia temperatury przechowywania, w szczególności > 8°C,
- w razie poważnych odchyłń rozpatrzyć przydatność surowca do użycia.

Dokumentacja dot. przyjęcia i przechowywania surowców jest prowadzona elektronicznie:

HEKATE\produkcja\peptydy.

4.2. Przygotowanie surowców i odczynników

4.2.1. Rozdrabnianie i homogenizacja makuchów roślinnych

1. Makuch roślinny rozdrobnić przy użyciu młyna bijakowego.
2. W trakcie mielenia kontrolować wizualnie stopień rozdrobnienia; w razie potrzeby powtórzyć cykl.
3. Rozdrobniony materiał przesiać na przesiewaczu wibracyjnym, stosując sita ze stali nierdzewnej o granulacji 60 mesh.
4. Frakcję zatrzymaną na sicie zawracać do ponownego mielenia aż do uzyskania wymaganej granulacji całej partii.
5. Uzyskany materiał dokładnie wymieszać w czystych, suchych pojemnikach w celu homogenizacji.
6. Rozdrobnione i zhomogenizowane makuchy umieścić w szczelnie zamykanych pojemnikach z tworzywa sztucznego, oznakować (rodzaj makuchu, data, numer partii) i przechowywać w magazynie surowców do czasu ekstrakcji białka.

4.2.2. Przygotowanie 6 M roztworu kwasu chlorowodorowego (HCl)

1. Za pomocą pompy perystaltycznej z przepływomierzem odmierzyć 5 L 37% HCl do cylindra miarowego.

2. Do zbiornika zawierającego 5 L wody destylowanej (pod wyciągiem) powoli wlewać odmierzoną objętość kwasu, stale mieszając mieszadłem laboratoryjnym.
3. Po zakończeniu rozcieńczania roztwór pozostawić do wyrównania temperatury.
4. Pojemnik roboczy oznakować: nazwą odczynnika, stężeniem (6 M HCl), datą przygotowania oraz numerem partii surowca użytego do sporządzenia roztworu.
5. Dokumentację z przygotowania roztworu (dziennik przygotowania odczynników) przechowywać elektronicznie:
HEKATE\produkcja\peptydy.
6. Roztwór przechowywać w temperaturze otoczenia, nie dłużej niż 7 dni.

W przypadku konieczności sporządzenia większej ilości roztworu ilości odczynników należy zwiększać proporcjonalnie.

4.2.3. Przygotowanie 5 M roztworu wodorotlenku sodu (NaOH)

1. Odważyć 2,0 kg NaOH (granulki) do pojemnika odpornego chemicznie.
2. Naważkę przenieść ilościowo do zbiornika zawierającego 10 L wody destylowanej.
3. Całą procedurę prowadzić pod wyciągiem, mieszając roztwór mieszadłem laboratoryjnym do całkowitego rozpuszczenia NaOH i wyrównania temperatury.
4. Pojemnik roboczy oznakować: nazwą odczynnika, stężeniem (5 M NaOH), datą przygotowania oraz numerem partii surowca.
5. Dokumentację z przygotowania roztworu przechowywać elektronicznie:
HEKATE\produkcja\peptydy.
6. Roztwór przechowywać w temperaturze otoczenia, nie dłużej niż 7 dni.

Przy sporządzaniu większych ilości roztworu zachować te same proporcje masy i objętości.

4.3. Ekstrakcja białka z makuchów roślinnych

Przed przystąpieniem do procesu upewnić się, że urządzenia pomiarowe są skalibrowane. Opis dotyczy oczyszczania **40 kg zmielonego makuchu** w jednym procesie. W ramach jednego procesu technologicznego należy stosować wyłącznie jeden rodzaj makuchu spośród wymienionych powyżej. Dobór surowca determinuje wariant otrzymywanego hydrolizatu białkowego.

Tabela 1. Warunki ekstrakcji białka z makuchów roślinnych

Surowiec	Temperatura	pH
Rzepak	50 °C	12
Słonecznik	40 °C	12
Ostropest	50 °C	12

4.3.1. Ekstrakcja – etap I

1. Do zbiornika o pojemności 300 L wprowadzić 150 L wody destylowanej.
2. Uruchomić mieszadło i układ grzewczy, ustawiając temperaturę zgodnie z Tabelą 1.
3. Do zlewki szklanej odważyć 1200 g NaOH i dodać do podgrzewanej wody; mieszać do całkowitego rozpuszczenia.
4. Po osiągnięciu zadanej temperatury zatrzymać mieszadło i wsypać 40 kg przygotowanego makuchu (zmielonego i przesianego).
5. Zawartość zbiornika zhomogenizować przy użyciu homogenizatora do uzyskania jednolitej mieszaniny (ok. 15 min).
6. Zmierzyć pH. W razie odchylenia od wartości zadanej (Tabela 1) skorygować pH roztworem 6 M HCl lub 5 M NaOH, używając homogenizatora do jednolitego rozprowadzenia odczynników w mieszaninie.
7. Po ustawieniu pH uruchomić mieszadło (75 obr./min) i kontynuować homogenizację przez kolejne 45 min.
8. Zawiesinę przepompować do wirówki dekantacyjnej.
9. Separację prowadzić przy $4000 \times g$ i przepływie 25 L/min, do przetworzenia całej objętości wsadu.
10. Supernatant zawierający frakcję białkową zebrać do zbiornika pośredniego.
11. Pellet zważyć i przekazać do etapu II.

W przypadku konieczności przerwania procesu półprodukty (supernatant i pellet) przechowywać w 4°C, nie dłużej niż 24 h.

4.3.2. Ekstrakcja – etap II

1. Do zbiornika 300 L wprowadzić taką ilość wody destylowanej, aby po dodaniu pelletu z etapu I łączna masa zawartości wynosiła 200 kg.
2. Uruchomić mieszadło i układ grzewczy, ustawiając temperaturę zgodnie z Tabelą 1.
3. Do zlewki odważyć 360 g NaOH i dodać do podgrzewanej wody; mieszać do całkowitego rozpuszczenia.
4. Po osiągnięciu zadanej temperatury wyłączyć mieszadło i przenieść pellet z etapu I do zbiornika.
5. Zhomogenizować mieszaninę przy użyciu homogenizatora (ok. 15 min).
6. Zmierzyć pH. W razie odchylenia od wartości zadanej skorygować je roztworem 6 M HCl lub 5 M NaOH, używając homogenizatora do jednolitego rozprowadzenia odczynników w mieszaninie.
7. Po korekcie pH uruchomić mieszadło (75 obr./min) i kontynuować homogenizację przez kolejne 45 min.
8. Zawiesinę przepompować do wirówki dekantacyjnej i prowadzić separację przy $4000 \times g$ oraz przepływie 25 L/min.

9. Supernatant po etapie II zebrać do zbiornika pośredniego, łącząc go z supernatantem z etapu I.
10. Pellet przeznaczyć do utylizacji zgodnie z procedurą postępowania z odpadami.

Po zakończeniu etapu II wirówkę dekantacyjną i zbiornik 300 L umyć przy użyciu właściwych środków myjących i przepłukać wodą destylowaną.

W razie przerwania procesu półprodukty przechowywać w 4°C, nie dłużej niż 24 h.

4.3.3. Strącanie białka – etap III

1. Supernatanty z etapów I i II przepompować do zbiornika 300 L. Jeżeli sumaryczna objętość supernatantów przekracza 250 L, etap ten należy wykonać w dwóch partiach.
2. Uruchomić mieszadło i pH-metr.
3. Przy włączonym mieszadle dodawać porcjami roztwór 6 M HCl, monitorując pH.
4. Po zbliżeniu do pH 4,5 w razie potrzeby skorygować pH roztworem 6 M HCl lub 5 M NaOH, tak aby uzyskać wartość pH = 4,5.
5. Mieszać zawiesinę przez 30 min w stałej temperaturze procesu.
6. Przepompować zawiesinę do wirówki dekantacyjnej i prowadzić separację przy 4000 × g i przepływie 25 L/min do przetworzenia całości.
7. Pellet zawierający wytrącone białko zebrać, umieścić w zbiorniku pośrednim i zważyć.
8. Supernatant przeznaczyć do utylizacji zgodnie z procedurą zakładową.

W razie konieczności przerwania procesu pellet przechowywać w 4°C, nie dłużej niż 24 h.

4.3.4. Płukanie osadu białkowego – etap IV

1. Osad białkowy z etapu III przenieść do zbiornika 300 L.
2. Dodać wodę destylowaną w stosunku 1:1 (woda:osad, w/w).
3. Zhomogenizować mieszaninę przy użyciu homogenizatora (ok. 15 min).
4. Przepompować zawiesinę do wirówki dekantacyjnej; prowadzić separację przy 4000 × g i przepływie 25 L/min.
5. Pellet zawierający białko zebrać, umieścić w pojemniku pośrednim i zważyć.
6. Supernatant przeznaczyć do utylizacji.

Z różnych miejsc pojemnika pośredniego pobrać 3 próbki (ok. 10 g każda) do probówek stożkowych typu falcon w celu oznaczenia

- zawartości białka,
- zawartości cukrów,
- zawartości tłuszczu,
- zawartości suchej masy,

zgodnie z odrębną procedurą analityczną obowiązującą w zakładzie.

Na pojemniku z półproduktem zanotować: datę procesu oraz masę otrzymanego półproduktu.

Wyizolowany ekstrakt białkowy:

- w miarę możliwości kierować bezpośrednio do hydrolizy,
- w razie potrzeby wstrzymania procesu przechowywać w 4°C, nie dłużej niż 72 h,
- dla dłuższego przechowywania zamrozić w -20°C i przechowywać nie dłużej niż 60 dni; po rozmrożeniu zużyć natychmiast, bez ponownego zamrażania.

Dokumentację z procesu ekstrakcji przechowuje się elektronicznie:

HEKATE\produkcja\peptydy.

4.4. Hydroliza ekstraktu białkowego

Przed przystąpieniem do procesu upewnić się, że urządzenia pomiarowe są skalibrowane.

Proces dotyczy hydrolizy ekstraktu białkowego z rzepaku, słonecznika lub ostropestu w objętości 700 L. Parametry obciążenia zbiornika zależą od rodzaju surowca (Tabela 2).

Hydrolizę prowadzi się w zbiorniku reakcyjnym o pojemności 1000 L, wyposażonym w układ grzewczy/chłodzący i mieszadło.

Tabela 2. Naważka ekstraktu i objętość wody destylowanej w zależności od surowca

Surowiec	Naważka ekstraktu	Objętość wody
Rzepak	90 kg	610 L
Słonecznik	50 kg	650 L
Ostropest	55 kg	645 L

4.4.1. Przebieg hydrolizy

1. Do zbiornika reakcyjnego wlać 300 L wody destylowanej.
2. Włączyć układ grzewczy i ustawić temperaturę 70°C.
3. Przygotować partiami zawiesinę ekstraktu białkowego:
 - do pojemnika 50 L wprowadzić 10 kg oczyszczonego ekstraktu białkowego,
 - dodać 30 L wody destylowanej i homogenizować do uzyskania jednorodnej mieszaniny,
 - zawiesinę przelać do zbiornika reakcyjnego.
4. Procedurę powtarzać aż do wprowadzenia całej naważki ekstraktu przewidzianej w Tabeli 2, następnie uzupełnić wodę destylowaną do objętości 700 L.
5. W zlewce szklanej odważyć 800 g papainy, co odpowiada 5% (m/m) w przeliczeniu na zawartość hydrolizowanego białka.
6. Zmierzyć pH hydrolizatu. Ustalić pH=6,0 używając roztworów 6 M HCl lub 5 M NaOH. Korekcję pH można prowadzić automatycznie przy użyciu kontrolera, sprawdzając pH po każdej dodanej porcji białka.

7. Po osiągnięciu temperatury 70°C i stabilnym pH = 6,0 dodać odważoną porcję papainy do zbiornika reakcyjnego.
8. Prowadzić hydrolizę przez 3 h, stale mieszając zawartość i monitorując temperaturę oraz pH.
9. Po upływie 3 h dezaktywację enzymu przeprowadzić przez podgrzanie hydrolizatu do 100°C i utrzymywanie tej temperatury przez 10 min.
10. Następnie roztwór przepompować przez wymiennik ciepła do zbiornika pośredniego, schładzając do 80°C; wydajność pompowania ok. 50 L/min.

W trakcie hydrolizy należy rejestrować:

- profil temperaturowy (czas nagrzewania, czas hydrolizy, czas i warunki inaktywacji enzymu),
- wartości pH w kluczowych punktach procesu,
- ilości zużytych surowców i odczynników (ekstrakt, woda, enzym, roztwory 6 M HCl i 5 M NaOH),
- numery partii surowców.

Dokumentacja z przygotowania odczynników i przeprowadzenia hydrolizy przechowywana jest elektronicznie:

HEKATE\produkcja\peptydy.

4.5. Zatężanie hydrolizatu w wyparce podciśnieniowej

Celem etapu jest zwiększenie udziału suchej masy przed suszeniem rozpyłowym.

1. Otrzymany hydrolizat przepompować do wyparki podciśnieniowej o pojemności 300 L (z mieszadłem), porcjami po ok. 200 L roztworu.
2. Na panelu sterowania ustawić:
 - temperaturę 80°C,
 - ciśnienie w zbiorniku skraplacza (prawy zbiornik) 200 mbar.
3. Sprawdzić poprawność pracy wytwornicy pary, uruchomić mieszadło oraz obieg wody chłodniczej.
4. Po osiągnięciu zadanych parametrów zweryfikować przez okienko inspekcyjne, czy zawartość zbiornika delikatnie wrze.
5. W razie konieczności korekty ciśnienia w zbiorniku głównym otworzyć zawór pompy próżniowej, skorygować ciśnienie i ponownie zamknąć zawór po uzyskaniu właściwej wartości.
6. Nie dopuszczać do nadmiernego obniżenia ciśnienia, które może powodować gwałtowne pienienie i zanieczyszczenie chłodnicy.
7. Proces zatężania prowadzić do odzyskania ok. 100 L destylatu z każdej partii 200 L hydrolizatu.

8. Po zakończeniu zatężania roztwór zawierający białko przepompować do zbiornika pośredniczącego suszarki rozpyłowej i kontynuować proces dla kolejnych partii hydrolizatu.
9. Destylat można odprowadzać w sposób ciągły, pamiętając o wyrównaniu ciśnienia w odbieralniku przed otwarciem zaworu spustowego.

W trakcie procesu zatężania należy rejestrować:

- temperaturę procesu,
- czas trwania,
- ciśnienie robocze,
- objętość odzyskanego destylatu.

Dokumentacja z procesu zatężania przechowywana jest elektronicznie:

HEKATE\produkcja\peptydy.

4.6. Suszenie zatężonego hydrolizatu w suszarce rozpyłowej

4.6.1. Przygotowanie urządzenia

1. Sprawdzić kompletność i szczelność połączeń rurociągów i przewodów, w szczególności:
 - podłączenie pompy perystaltycznej,
 - wylot wentylatora wyciągowego.
2. Otworzyć dopływ wody chłodzącej silnik atomizera.
3. Na panelu sterowania ustawić:
 - temperaturę wlotową (inlet) – 210°C,
 - wydajność pompy perystaltycznej – 100 mL/min,
 - częstotliwość pracy atomizera – 400 Hz.
4. Włączyć wentylator, następnie grzanie i atomizer.
5. Po osiągnięciu zadanej temperatury wlotowej rozpocząć podawanie zatężonego hydrolizatu.

4.6.2. Przebieg suszenia

1. Suszenie prowadzić przy zadanych parametrach do przetworzenia całej partii zatężonego hydrolizatu.
2. Po zakończeniu podawania produktu przepuścić przez układ ok. 200 mL wody destylowanej, w celu przepłukania instalacji.
3. Następnie zatrzymać podawanie, wyłączyć atomizer i grzanie.
4. Po obniżeniu temperatury wlotowej do 50°C wyłączyć wentylator i zakręcić dopływ wody chłodzącej silnik atomizera.

5. Wyszuszony produkt wyjąć z końcowego zbiornika (odbieralnika) i przenieść do odpowiednio oznakowanego pojemnika.

W trakcie pracy możliwe jest okresowe opróżnianie odbieralnika:

- zamknąć zawór odbieralnika,
- szybko przenieść zawartość do docelowego pojemnika z produktem,
- po opróżnieniu ponownie podłączyć odbieralnik do suszarki i otworzyć zawór, aby zgromadzony produkt mógł opaść do odbieralnika.

Pojemnik z produktem należy szczelnie zamknąć i oznakować (nazwa produktu, numer partii, data wytworzenia).

Produkt może być przechowywany w temperaturze otoczenia przez 12 miesięcy od daty wytworzenia.

W trakcie procesu suszenia należy rejestrować:

- czas suszenia,
- temperatury suszenia (inlet/outlet),
- szybkość podawania produktu,
- częstotliwość pracy atomizera oraz inne kluczowe parametry pracy suszarki.

W gotowym produkcie oznacza się zawartość:

- suchej masy,
- białka,
- tłuszczu,
- cukrów

zgodnie z odrębną procedurą analityczną obowiązującą w zakładzie. W gotowym produkcie oznacza się zawartość:

- * suchej masy,
- * białka,
- * tłuszczu,
- * cukrów

zgodnie z odrębną procedurą analityczną obowiązującą w zakładzie. Dodatkowo próbki produktu końcowego należy przekazać do laboratorium mikrobiologicznego celem wykonania badań mikrobiologicznych zgodnie z procedurą obowiązującą w zakładzie. Dokumentację z procesu suszenia przechowuje się elektronicznie:

HEKATE\produkcja\peptydy.

4.7. Warianty produktu końcowego

W jednym cyklu technologicznym proces prowadzony jest z użyciem wyłącznie jednego rodzaju makuchu roślinnego. Otrzymywany produkt końcowy występuje w trzech wariantach:

- Proteopeptydy z rzepaku,
- Proteopeptydy ze słonecznika
- Proteopeptydy z ostropestu

4.8. Pakowanie produktu końcowego

1. Pakowanie prowadzić w wydzielonej, zamkniętej strefie pakowania, w warunkach zapewniających higienę i ochronę produktu przed zanieczyszczeniem. Personel wykonujący czynności pakowania musi stosować odzież ochronną (fartuch/odzież roboczą, nakrycie głowy, rękawice jednorazowe; w razie potrzeby maskę), a przed rozpoczęciem prac należy potwierdzić czystość i przygotowanie stanowiska (czyste, zdezynfekowane powierzchnie robocze i elementy mające kontakt z produktem).
2. Otrzymany sproszkowany hydrolizat białkowy pakować do pojemników jednostkowych zgodnie z zamówieniem i planem produkcyjnym. Nazwa produktu oraz oznaczenie partii muszą jednoznacznie identyfikować zastosowany surowiec („Proteopeptydy z rzepaku”, „Proteopeptydy ze słonecznika”, „Proteopeptydy z ostropestu”).
3. Każdy pojemnik jednostkowy oznakować co najmniej:
 - nazwą produktu,
 - numerem partii (powiązany z datą produkcji),
 - datą minimalnej trwałości / datą przydatności do spożycia,
 - masą netto.
4. Dokumentację z procesu pakowania (zestawienia ilościowe, numery partii, powiązanie z wynikami kontroli jakości) przechowywać elektronicznie:
HEKATE\produkcja\peptydy.
5. Z każdej partii gotowego produktu wybrać losowo 2 pojemniki i przekazać do archiwum jako próbki referencyjne.

4.9. Przechowywanie produktu końcowego

Produkt końcowy, w opakowaniach jednostkowych i/lub zbiorczych, przechowywać:

- w magazynie produktów gotowych,
- w temperaturze otoczenia,
- w suchym i zaciemnionym miejscu,
- w warunkach uniemożliwiających kontakt z wilgocią, zanieczyszczeniami i obcymi zapachami.

Okres przechowywania nie powinien przekraczać 12 miesięcy od daty produkcji, z zastrzeżeniem wyników badań stabilności i obowiązujących w zakładzie wymagań jakościowych.

5. Punkty krytyczne procesu i kontrola jakości (zarys)

Do kluczowych punktów kontrolnych procesu należą:

1. Jakość surowców wejściowych

- zgodność z kartą specyfikacji (zawartość białka, wilgotność, zanieczyszczenia),
- zgodność z COA producenta.

2. Parametry ekstrakcji białka

- pH = 12 podczas ekstrakcji,
- temperatura procesu (Tabela 1),
- czas homogenizacji i warunki wirowania.
- pH = 4,5 w etapie III,
- czas mieszania po regulacji pH.

3. Parametry hydrolizy

- temperatura 70°C,
- pH = 6,0,
- czas hydrolizy 3 h,
- prawidłowa inaktywacja enzymu (100°C, 10 min).

4. Parametry zateżania i suszenia

- ciśnienie i temperatura w wyparce (80°C, 200 mbar),
- parametry suszarki rozpyłowej (temperatura wlotowa 210°C, wydajność pompy, częstotliwość atomizera),
- zapobieganie przypaleniu i degradacji produktu.

5. Kontrola jakości półproduktów i produktu końcowego

- oznaczenia zawartości suchej masy, białka, tłuszczu i cukrów,
- weryfikacja zgodności z zakładowymi wymaganiami jakościowymi (zakresy akceptacji, kryteria odrzutu).

Szczegółowe kryteria akceptacji oraz sposób postępowania z partiami niezgodnymi określają odrębne procedury kontroli jakości obowiązujące w zakładzie.

6. Postępowanie z odpadami

- Supernatanty po procesach wirowania oraz destylaty po zateżaniu traktuje się jako ścieki procesowe i zagospodarowuje zgodnie z obowiązującą procedurą zakładową.

- Pellet, osady procesowe i inne odpady stałe przekazuje się do utylizacji lub zagospodarowania zgodnie z obowiązującą procedurą zakładową oraz decyzjami środowiskowymi i obowiązującymi regulacjami.
- Przed odprowadzeniem ścieków do systemu kanalizacyjnego należy zweryfikować i w razie potrzeby skorygować pH (neutralizacja).

7. Dokumentacja i archiwizacja

- Wszystkie dane procesowe (parametry, naważki, numery partii, daty) dokumentuje się w karcie procesu.
- Dokumentacja z poszczególnych etapów (przyjęcie surowców, przygotowanie odczynników, ekstrakcja, hydroliza, zateżanie, suszenie, pakowanie) przechowywana jest w formie elektronicznej, w lokalizacji: HEKATE\produkcja\peptydy.
- Okres archiwizacji dokumentacji określają wewnętrzne regulacje zakładu.

Tabela 1. Liczba potencjalnych peptydów bioaktywnych uzyskanych w wyniku proteolizy in silico zidentyfikowanych białek z próbki rzepaku trawionych papainą, ficyną i bromelainą, z podziałem na główne klasy aktywności biologicznej.

Białko (enzym)	inhibitor ACE	inhibitor ACE2	inhibitor CaMPDE	HMG-CoA reductase inhibitor	inhibitor PAM	aktywator proteolizy zależnej od ubiquityny	inhibitor karboksypeptydazy alaninowej	inhibitor alfa-glukozydazy	przeciwpalący	antwonnastyczny	przeciwbakteryjny	przeciwnowotworowy	przeciwutleniający (antwoxycydujący)	przeciwwzakrzepowy	ligand permeazy bakteryjnej	wiązujący	inhibitor kalpainy I	inhibitor liaz ATP-cytrnianinowej	inhibitor dipeptydyllopeptydazy III	inhibitor dipeptydyllopeptydazy IV	inhibitor karboksypeptydazy glutaminianowej II	inhibitor karboksypeptydazy glutaminianowej	hipolipidemiczny	hipotensyjny	hipourykemiczny	immunostymulujący	inhibitor dipeptydyllopeptydazy II	inhibitor laktocepin (lactocidin)	inhibitor neuropeptydów II	neuropeptyd	inhibitor lipazy trzustkowej	inhibitor izomerazy pentadecyno-prolinowej	inhibitor fosfolipazy A2	regulator	inhibitor reniny	stymulujący	inhibitor syntazy tymidylanowej	inhibitor ligazy tubuliny-tyrozyny	inhibitor xaa-pro	
ADRC1_ARATH (papaina)	14	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	20	1	0	0	0	0	0	4	1	1	0	2	0	0	0	2	0	0	0	1	
ADRC1_ARATH (bromelaina)	15	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	3	1	0	1	0	0	2	24	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	
ADRC1_ARATH (ficyna)	17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	22	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0	0	2	1	0	0	0	0	
AMPL1_ARATH (papaina)	20	0	0	0	3	0	0	1	0	3	0	0	2	3	0	0	0	0	3	32	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	0	0	0
AMPL1_ARATH (bromelaina)	31	0	1	0	3	0	1	1	0	3	0	0	4	3	0	1	0	0	11	44	3	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	3	2	3	0	2	0	
AMPL1_ARATH (ficyna)	25	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	6	4	0	0	0	0	5	46	0	0	0	1	3	0	2	0	0	0	1	0	0	4	2	0	0	0	0	
BGL19_ARATH (papaina)	24	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	1	0	1	0	3	31	3	0	0	0	0	1	3	1	1	0	2	0	0	0	2	1	0	1	1	
BGL19_ARATH (bromelaina)	35	0	2	0	1	1	2	2	0	1	0	0	5	1	0	2	0	0	8	33	5	0	2	0	1	1	0	1	0	3	0	0	0	1	5	1	0	2	1	
BGL19_ARATH (ficyna)	26	0	2	0	1	0	0	2	1	1	0	0	3	1	0	1	0	0	3	37	1	0	2	1	0	0	1	0	0	2	1	0	1	2	4	1	0	1	0	
CRU1_BRANA (papaina)	51	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	2	1	1	5	62	2	1	0	0	0	0	3	1	1	4	0	1	0	1	4	2	1	0	1	
CRU1_BRANA (bromelaina)	49	2	3	0	1	0	0	2	0	1	0	0	4	1	0	2	0	0	10	60	1	0	0	0	0	1	0	1	0	4	0	0	0	1	3	1	0	1	1	

CRU1_BRANA (ficyna)	38	2	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	2	2	0	3	45	0	0	0	0	1	0	3	1	2	2	0	0	0	1	2	3	0	0	1
CRU3_BRANA (papaina)	46	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	58	1	1	0	0	1	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	4	1	0	1
CRU3_BRANA (bromelaina)	20	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	2	1	0	0	0	0	3	39	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	1	0	1	0	0	1
CRU3_BRANA (ficyna)	19	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	33	0	0	0	1	2	0	0	1	0	1	1	0	0	0	2	3	0	1	1
CRU4_BRANA (papaina)	47	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	4	62	0	0	0	0	2	1	5	1	1	2	0	2	0	2	3	1	0	1	1
CRU4_BRANA (bromelaina)	41	1	2	0	1	0	1	1	0	1	0	0	3	1	0	1	0	0	6	58	0	0	0	0	2	1	0	1	0	3	0	0	0	1	5	1	0	1	1
CRU4_BRANA (ficyna)	30	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	4	41	0	0	0	2	3	0	2	1	1	2	2	0	0	0	3	1	0	0	1
CRUA_BRANA (papaina)	52	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	2	1	1	5	62	2	1	0	0	0	0	3	1	1	4	0	1	0	1	4	2	1	0	1
CRUA_BRANA (bromelaina)	45	3	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	0	2	0	0	11	58	1	0	0	0	0	1	0	1	0	4	0	0	0	0	3	1	0	1	1
CRUA_BRANA (ficyna)	39	3	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	2	2	0	5	46	0	0	0	1	1	0	3	1	2	2	1	0	0	1	3	3	0	0	1
ENO2_ARATH (papaina)	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
ENO2_ARATH (bromelaina)	24	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	4	36	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0
ENO2_ARATH (ficyna)	28	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	1	0	0	0	19	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0
ICDHC_ARATH (papaina)	24	1	2	0	1	0	0	1	0	1	0	0	6	1	0	2	1	0	4	37	3	1	1	0	0	0	4	0	1	5	0	0	0	2	2	1	0	1	0
ICDHC_ARATH (bromelaina)	33	1	3	0	2	1	2	3	0	2	0	0	8	2	0	3	0	0	7	34	5	0	1	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	2	4	1	0	1	0
ICDHC_ARATH (ficyna)	25	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	4	1	0	3	0	0	1	23	2	0	0	1	0	0	2	0	0	3	1	0	0	1	2	1	0	0	0
JAL36_ARATH (papaina)	24	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	3	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	2	2	0	0	0	0
JAL36_ARATH (bromelaina)	35	0	3	0	2	0	0	1	0	2	0	0	3	2	0	3	0	0	4	44	1	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	2	3	0	0	0	1
JAL36_ARATH (ficyna)	38	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	9	0	0	3	0	0	4	45	0	0	0	0	2	0	4	0	0	4	0	0	1	0	0	1	0	3	0
LEU3_BRANA (papaina)	28	0	1	0	2	0	0	0	0	3	0	0	1	2	0	1	0	0	0	40	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	3	3	3	0	0	1
LEU3_BRANA (bromelaina)	30	1	2	0	3	0	1	0	0	3	0	0	3	3	0	2	0	0	5	37	3	0	1	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	3	3	3	0	1	1

LEU3_BRANA (ficyna)	24	0	1	0	3	0	0	0	0	4	1	0	3	3	0	1	1	0	0	29	0	0	1	1	1	0	2	0	1	2	0	0	0	3	2	2	0	0	1	
MDHC1_ARATH (papaina)	14	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	22	1	0	1	0	0	0	3	1	0	1	0	0	0	0	1	2	0	0	1	
MDHC1_ARATH (bromelaina)	19	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	2	26	1	0	1	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	2	3	0	1	1	
MDHC1_ARATH (ficyna)	24	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	1	0	0	3	25	0	0	2	1	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0	5	3	0	1	1	
MYRO_BRANA (papaina)	22	2	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	6	0	0	0	1	0	5	40	1	0	1	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	3	1	0	1	1	
MYRO_BRANA (ficyna)	30	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	1	1	0	1	31	2	0	3	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	2	3	0	0	1	1	
MYRO_BRANA (bromelaina)	26	2	1	0	1	1	2	1	0	1	0	0	5	1	0	0	0	0	8	37	2	0	1	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	1	2	0	0	1	1	
OBP1A_ARATH (papaina)	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	2	12	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
OBP1A_ARATH (bromelaina)	14	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	5	1	0	0	0	0	4	19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0
OBP1A_ARATH (ficyna)	14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	8	0	0	0	1	0	2	23	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	3	1	
SODM2_ARATH (papaina)	13	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	1	0	0	1	
SODM2_ARATH (bromelaina)	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	19	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
SODM2_ARATH (ficyna)	11	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0	0	2	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	2	1	
VCL22_ARATH (papaina)	35	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0	0	4	43	0	1	1	0	1	0	3	0	0	5	0	0	0	1	5	0	0	0	0	
VCL22_ARATH (bromelaina)	31	1	2	0	0	0	0	4	0	0	0	0	7	0	0	6	0	0	7	42	0	0	1	0	1	0	0	0	0	10	0	0	0	0	6	3	0	0	0	
VCL22_ARATH (ficyna)	40	1	2	1	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	0	5	1	0	3	46	0	0	1	0	3	0	4	1	1	6	0	0	0	1	4	2	0	0	1	

Tabela 2. Liczba potencjalnych peptydów bioaktywnych uzyskanych w wyniku proteolizy in silico zidentyfikowanych białek z próbki słonecznika trawionych papainą, ficyną i bromelainą, z podziałem na główne klasy aktywności biologicznej.

Białko (enzym)	inhibitor dipeptydylopeptydazy IV	inhibitor ACE	inhibitor reniny	neuropeptyd	przeciwutleniający (antyoksydacyjny)	wiążący	inhibitor CaMPDE	stymulujący	inhibitor karboksypeptydazy glutaminianowej II	inhibitor neprylizyny	inhibitor dipeptydylopeptydazy II	inhibitor laktocepin (lactocelin)	inhibitor liazy ATP-cytrynianowej	hipourykemiczny	inhibitor karboksypeptydazy glutaminianowej	antyamnestyczny	inhibitor Xaa-Pro	inhibitor PAM	inhibitor lipazy trzustkowej	inhibitor alfa-glukozydazy	regulujący	przeciwzakrzepowy	inhibitor syntazy tymidylanowej	inhibitor dipeptydylopeptydazy III	hipotensyjny	inhibitor kalpainy I	inhibitor neprylizyny II	inhibitor ligazy tubuliny-tyrozyny	aktywator proteolizy zależnej od ubikwityny	immunostymulujący	inhibitor reduktazy HMG-CoA	inhibitor karboksypeptydazy alaninowej
11S3_HELAN (papaina)	57	33	5	5	5	5	3	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11S3_HELAN (bromelaina)	46	33	5	7	6	5	4	2	1	2	0	2	0	1	0	1	2	1	1	3	1	1	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0
11S3_HELAN (ficyna)	36	27	2	6	4	5	1	1	0	0	2	1	0	3	0	1	1	1	2	1	1	1	0	3	1	1	1	1	0	0	0	0
ACT1_ARATH (papaina)	17	23	0	1	1	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	1	0	1	0	0
ACT1_ARATH (bromelaina)	34	28	3	3	4	0	0	7	0	3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	4	2	0	0	3	0	1	0	2
ACT1_ARATH (ficyna)	29	28	2	4	4	1	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	2	0	0	2	0	0	1	0
RR13_ARATH (papain)	10	10	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RR13_ARATH (bromelaina)	10	7	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RR13_ARATH (ficyna)	11	7	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela X. Liczba potencjalnych peptydów bioaktywnych uzyskanych w wyniku proteolizy in silico zidentyfikowanych białek z próbki ostropestu trawionych papainą, ficyną i bromelainą, z podziałem na główne klasy aktywności biologicznej.

Białko (enzym)	inhibitor ACE	inhibitor dipeptydylopeptydazy IV	przeciwutleniający (antyoksydacyjny)	inhibitor dipeptydylopeptydazy III	inhibitor dipeptydylopeptydazy II	immunostymulujący	przeciwnowotworowy	inhibitor reniny	inhibitor kalpainy I	inhibitor neprylizyny II	inhibitor ligazy tubuliny-tyrozyny	inhibitor alfa-glukozydazy	inhibitor Xaa-Pro	inhibitor laktocepiny (lactocepin)	antyannestyczny	przeciwnzakrzepowy	regulujący	inhibitor PAM	inhibitor karboksypeptydazy alaninowej	neuropeptyd	inhibitor karboksypeptydazy glutaminianowej II	stymulujący	inhibitor ACE2	wiążący	inhibitor karboksypeptydazy glutaminianowej	inhibitor liazy ATP-cytrynianowej	inhibitor syntazy tymidylanowej	inhibitor izomerazy peptydylo-prolilowej	inhibitor CaMPDE	hipourykemiczny	przeciwzapalny	hipotensyjny	inhibitor lipazy trzustkowej	inhibitor neprylizyny
OBP1A_ARATH (papaina)	12	12	2	2	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OBP1A_ARATH (bromelaina)	14	19	5	4	0	1	1	1	0	0	2	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OBP1A_ARATH (ficyna)	14	23	8	2	2	0	1	1	1	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CRU1_BRANA (papaina)	51	62	3	5	3	0	0	4	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	4	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
CRU1_BRANA (bromelaina)	49	60	4	10	0	1	0	3	0	0	1	2	1	1	1	1	1	1	0	4	1	1	2	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
CRU1_BRANA (ficyna)	38	45	2	3	3	0	0	2	2	2	0	0	1	1	1	1	1	1	0	2	0	3	2	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
CRU3_BRANA (papaina)	46	58	1	2	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	2	1	4	2	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
CRU3_BRANA (bromelaina)	20	39	2	3	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	1	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CRU3_BRANA (ficyna)	19	33	5	4	0	0	0	2	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	3	1	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1	0
CRU4_ARATH (papaina)	29	44	1	2	4	0	0	3	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	2	2	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	5

CRU4_ARATH (bromelaina)	30	42	3	7	0	1	0	2	0	0	1	4	1	1	0	0	0	0	4	1	2	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	
CRU4_ARATH (ficyna)	12	22	2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
CRU4_BRANA (papaina)	47	62	1	4	5	1	0	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	
CRU4_BRANA (bromelaina)	41	58	3	6	0	1	0	5	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	3	0	1	1	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	
CRU4_BRANA (ficyna)	30	41	2	4	2	0	0	3	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	3	0	2	2	0	
CRUA_BRANA (papaina)	52	62	3	5	3	0	0	4	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	4	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
CRUA_BRANA (bromelaina)	45	58	4	11	0	1	0	3	0	0	1	2	1	1	0	0	0	0	4	1	1	3	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	
CRUA_BRANA (ficyna)	39	46	2	5	3	0	0	3	2	2	0	0	1	1	1	1	1	1	0	2	0	3	3	2	0	0	0	0	2	1	0	1	1	0