

AUTOREFERAT

OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

DR INŻ. ROBERT BODKOWSKI

ZAKŁAD HODOWLI OWIEC I ZWIERZĄT FUTERKOWYCH
INSTYTUT HODOWLI ZWIERZĄT
WYDZIAŁ BIOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT
UNIwersytet PRZYRODNICZY WE WROCLAWIU

WROCLAW 2014

Spis treści

1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
3. Prace stanowiące szczególne osiągnięcie naukowe	4
4. Opis szczególnych osiągnięć naukowych pod tytułem: Izomeryzowane oleje roślinne - dodatki paszowe redukujące otłuszczenie i zawartość tłuszczu w mięsie jagniąt oraz zwiększające udział CLA w tkankach tłuszczowych	4
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	11
5.1. DODATKI PASZOWE OBNIŻAJĄCE ZAWARTOŚĆ TŁUSZCZU W PRODUKTACH POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO ORAZ KORZYSTNIE MODYFIKUJĄCE SKŁAD KWASÓW TŁUSZCZOWYCH	11
5.1.1 Modyfikacja składu kwasów tłuszczowych tłuszczu mięsa i mleka owczego w wyniku zastosowania dodatków „chronionych” nasion roślin oleistych	11
5.1.2 Preparaty lipidowe redukujące otłuszczenie i obniżające zawartość tłuszczu w mleku oraz zwiększające w tłuszczu tkankowym i mlecznym zawartość CLA	12
5.1.3 Poprawa prozdrowotnych właściwości produktów mlecznych (mleko, ser), w wyniku suplementacji diety krów preparatami roślinno-rybnymi wzbogaconymi w aktywne biologicznie kwasy tłuszczowe	13
5.2. ZAWARTOŚĆ BIOAKTYWNYCH ZWIĄZKÓW W PRODUKTACH POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO I ROŚLINNEGO ORAZ METODY ICH OZNACZANIA, WZBOGACANIA, SYNTEZY I IZOLACJI	15
5.2.1 Monitoring zawartości bioaktywnych związków w produktach pochodzenia zwierzęcego, w tym w szczególności w produktach owczych (wpływ czynników genetycznych, fizjologicznych, żywieniowych)	15
5.2.2 Opracowanie lub modyfikacja metod oznaczania, wzbogacania, syntezy i izolacji aktywnych biologicznie związków w(z) produktach(ów) pochodzenia zwierzęcego i roślinnego	16
5.3. OPRACOWANIE KOMPOZYCJI NATURALNYCH BIOAKTYWNYCH KOMPLEKSÓW POD KĄTEM MOŻLIWOŚCI ICH STOSOWANIA W PROFILAKTYCE I TERAPII CHOROÓB „CYWILIZACYJNYCH	22
5.3.1. Opracowanie kompozycji naturalnych bioaktywnych kompleksów lipidowych (BKL _n) jako nutraceutyków w profilaktyce i terapii chorób układu krążenia i chorób nowotworowych	22
5.3.2 Technologia pozyskiwania bioaktywnych tłuszczów i peptydów oraz ich pochodnych jako składników aktywnych komponentów żywności funkcjonalnej	23

1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

Urodziłem się 7 października 1965 r. we Wrocławiu. W roku 1980 ukończyłem szkołę podstawową, a następnie naukę kontynuowałem w Liceum Ogólnokształcącym nr XII we Wrocławiu, w klasie o profilu biologiczno-chemicznym.

Po ukończeniu szkoły średniej i uzyskaniu świadectwa dojrzałości, w latach 1986-1991 studiowałem na Wydziale Zootechnicznym Akademii Rolniczej we Wrocławiu /obecnie Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu/, w trakcie których ukończyłem Międzywydziałowe Studium Pedagogiczne.

Pracę magisterską pt. "Ocena ekonomicznej efektywności w fermie lisów w Pietrzykowicach", której promotorem był dr hab. Janusz Kuźniewicz, wykonałem w Katedrze Hodowli Owiec i Zwierząt Futerkowych i obroniłem 22 lipca 1991 r. uzyskując dyplom mgr inż. zootechniki.

W dniu 21.12.1998 r. na podstawie przedstawionej dysertacji pt. "Próba modyfikacji składu kwasów tłuszczowych tłuszczu jagniąt poprzez dodatek do diety chronionych nasion roślin oleistych (rzepak, słonecznik)", której promotorem była dr hab. Bożena Patkowska-Sokoła, Rada Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Akademii Rolniczej we Wrocławiu jednomyślnie nadała mi stopień naukowy doktora nauk rolniczych w zakresie zootechniki, wyróżniając na wniosek recenzentów pracę doktorską oraz obronę.

W trakcie swojej dotychczasowej pracy ukończyłem kilka kursów m.in. z zakresu „Funkcjonowania rynków hurtowych i giełd towarowych”, „Zarządzania gospodarstwem rolnym w pierwszych latach po integracji z Unią Europejską”, „Dostosowania gospodarstw rolnych do standardów obowiązujących w UE” i „Upowszechniania przepisów unijnych”. Uczestniczyłem również w zorganizowanym przez Stowarzyszenie Naukowo-Techniczne Inżynierów i Techników Rolnictwa semestralnym kursie z zakresu towaroznawstwa skór garbarskich i futrzarskich uzyskując dyplom kwalifikatora w zakresie oceny skór garbarskich i futerkowych oraz okrywy włosowej, a także zdobyłem uprawnienia rzeczoznawcy SITR – jako doradca w zakresie produkcji rolniczej.

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Z dniem 17 lutego 1992 roku zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze Hodowli Owiec i Zwierząt Futerkowych. 1 lutego 1999 r. otrzymałem mianowanie na stanowisko adiunkta, na którym zatrudniony jest do chwili obecnej w Instytucie Hodowli Zwierząt, Zakładzie Hodowli Owiec i Zwierząt Futerkowych, Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Mój dorobek naukowy obejmuje 214 prac (łącznie z pracami stanowiącymi szczególne osiągnięcie naukowe), w tym 93 oryginalne prace twórcze (21 w bazie Journal Citation Reports), 23 prace w materiałach z konferencji i sympozjów, 3 rozdziały w monografiach, 77 doniesień konferencyjnych o zasięgu międzynarodowym i krajowym, 11 artykułów popularnonaukowych oraz 3 patenty i 2 zgłoszenia patentowe. Sumaryczny Impact Factor wszystkich opublikowanych prac w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports wynosi 12,921, a suma punktów wg listy MNiSW - 672. Całkowita liczba cytowań w bazie Web of Science - 22, indeks Hirscha - 3.

3. Prace stanowiące szczególne osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.), pod wspólnym tytułem: **Izomeryzowane oleje roślinne - dodatki paszowe redukujące otluszczenie i zawartość tłuszczu w mięsie jagniąt oraz zwiększające udział CLA w tkankach tłuszczowych**

3.1 **Bodkowski R.**, Patkowska-Sokoła B. 2009. Senkung des Fettgehalts im Fleisch von Lämmern - Fettreduzierung bei Lämmern durch den Einsatz von isomerisiertem Sonnenblumenöl, angereichert mit konjugierten Linolsäuren (CLA). Fleischwirtschaft, 8, 90-93.

3.2 **Bodkowski R.**, Patkowska-Sokoła B. 2009. Einfluss der Ernährung auf des Fettsäurenprofil von Lämmern – Effect von isomerisiertem, mit konjugierten Linolsäuren angereichertem Sonnenblumenöl auf die Fettzusammensetzung unterschiedlicher Gewebe bei Lämmern. Fleischwirtschaft, 9, 119-122.

3.3 **Bodkowski R.**, Patkowska-Sokoła B. 2013. Modification of fatty acids composition of lambs' fat by supplementation isomerised grapeseed oil (part I). Animal Science Papers and Reports, vol. 31, no. 2, 147-158.

3.4 **Bodkowski R.**, Patkowska-Sokoła B. 2013. Reduction of body fatness and meat fat content in lambs by supplementation of isomerised grapeseed oil (part II). Animal Science Papers and Reports, vol. 31, no. 3, 219-238.

4. Opis szczególnych osiągnięć naukowych pod tytułem: Izomeryzowane oleje roślinne - dodatki paszowe redukujące otluszczenie i zawartość tłuszczu w mięsie jagniąt oraz zwiększające udział CLA w tkankach tłuszczowych

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zapadalności na choroby „cywilizacyjne”. Największy wpływ na to mają: tryb życia, stres oraz dieta. Szczególnie niebezpieczne jest wysokie spożycie kwasów tłuszczowych nasyconych, których głównym źródłem w diecie człowieka są tłuszcze pochodzenia zwierzęcego. Kwasy te powodują wzrost poziomu trójglicerydów oraz cholesterolu i jego frakcji LDL w krwi, co prowadzi do zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych i sprzyja chorobom układu krążenia (Siri-Tarino i wsp. 2010). Wysokie spożycie kwasów nasyconych skorelowane jest również ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia niektórych nowotworów (Rose 1997) oraz otyłości (Bray i wsp. 2002). W świetle tych badań należy ograniczyć spożycie tłuszczów zwierzęcych.

Z drugiej strony żywność przestaje być postrzegana jedynie jako źródło składników odżywczych, służących pokryciu potrzeb pokarmowych człowieka, ale coraz częściej zwraca się uwagę na jej właściwości funkcjonalne. W badaniach nad składem produktów żywnościowych poszukuje się związków wykazujących pozytywne oddziaływanie na organizm człowieka, starając się zwiększyć ich poziom. Szacuje się, że w ciągu najbliższych 20-30 lat żywność funkcjonalna stanowić może nawet 30% całej produkowanej żywności.

Sprężone dieny kwasu linolowego znane są od dawna, jednakże do połowy lat 80-tych niewiele było wiadomo na temat ich właściwości chemicznych oraz działania. Dopiero badania przeprowadzone przez Parizę i wsp. (1983) doprowadziły do odkrycia w ekstraktach tłuszczowych surowego i smażonego mięsa wołowego związków hamujących mutagenezę u bakterii, co potwierdziły późniejsze badania *in vivo* na myszach i szczurach (Pariza i Hargraves 1985).

Okazało się, że związkami tymi były sprężone dieny kwasu linolowego (CLA). Od tego czasu poznano wielu nowych biologicznych oraz fizjologicznych ich funkcji.

Sprężony kwas linolowy (CLA)¹ jest terminem określającym mieszaninę pozycyjnych (8 i 10, 9 i 11, 10 i 12 lub 11 i 13) oraz geometrycznych (*cis* i *trans*) izomerów kwasu oktadekadienowego, w których w odróżnieniu od kwasu linolowego *cis*-9,*cis*-12 C18:2 wiązania podwójne izolowane są tylko jednym wiązaniem pojedynczym (Eulitz i wsp. 1999). W produktach naturalnych dominują izomery o konfiguracji *cis*-9,*trans*-11 oraz *trans*-10,*cis*-12, którym przypisuje się szczególną aktywność biologiczną (Pariza i wsp. 2001).

Podstawowym mechanizmem powstawania CLA jest bakteryjna biohydrogenacja, głównie kwasu linolowego oraz linolenowego, zachodząca w żwaczu zwierząt przeżuwających (Harfoot i Hazelewood 1988). Izomery te syntetyzowane są także w tkankach tłuszczowych i gruczole mlekowym ssaków z kwasu *trans* wakcenenowego *t*11 C18:1, przy udziale enzymu Δ^9 desaturazy (Corl i wsp. 2001). Mogą one również powstawać w trakcie termicznego przetwarzania żywności (Pariza i wsp. 1979) oraz katalitycznego wodorowania olejów roślinnych (Reaney i wsp. 1999).

W diecie człowieka podstawowym źródłem CLA są produkty pochodzące od zwierząt przeżuwających (mięso i mleko), w których zawartość ich wynosi od 0.3 do 1.4% (Patkowska-Sokoła i wsp. 2002, 2004). Izomery te nie występują w tłuszczach pochodzenia roślinnego.

W organizmie człowieka sprężone dieny kwasu linolowego ulegają przekształceniu w formy furanowe o silnych właściwościach antyoksydacyjnych, a także inkorporowane są w struktury błon komórkowych wpływając modyfikująco na ich właściwości (płynność, przepuszczalność).

Dotychczas najwięcej badań poświęcono antykancerogennemu działaniu CLA. Związki te, a zwłaszcza izomer *cis*-9,*trans*-11, opóźniają albo zmniejszają rozwój nowotworów skóry, sutka, okrężnicy i żołądka (Lipkowski i wsp. 2003; Corl i wsp. 2003; Palomobo i wsp. 2002). Ich korzystne działanie nie ogranicza się tylko do hamowania mutagenyzy i kancerogenezy, ale jest szersze i bardziej wielokierunkowe m.in.: antymiażdżycowe (Kritchevsky i wsp. 2002), hamujące rozwój osteoporozy (Brownbill i wsp. 2005), opóźniające rozwój cukrzycy (Hauseknecht i wsp. 1998).

W ostatnim latach obserwuje się wzrost zainteresowania sprężonymi dienami kwasu linolowego w związku z ich korzystnym wpływem na metabolizm lipidów i możliwością redukcji tkanki tłuszczowej.

Nie do końca poznany został mechanizm działania sprężonego kwasu linolowego jako czynnika redukującego otluszczenie. Niektóre badania sugerują, że CLA zwiększa zapotrzebowanie na energię poprzez zwiększenie zużycia tlenu (Choi i wsp. 2004) lub w wyniku zwiększenia ekspresji białek (Ealey i wsp. 2002). Mechanizm ten może również polegać na redukcji masy komórek tłuszczowych i/lub ich liczby w wyniku hamowania lipazy lipoproteinowej w komórkach tłuszczowych (Lin i wsp. 2001), hamowania aktywności desaturazy stearylo-CoA (Ntambi i wsp. 1999), zwiększenia apoptozy preadipocytów i adipocytów (Tsuboyama-Kasaoka i wsp. 2000) lub modulowania adipokin i cytokin (Akahoshi i wsp. 2002). Zjawisko to tłumaczone jest również zwiększoną β -oksydacją kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych (Pariza i wsp. 2001). Nie ma zatem jednoznacznego wyjaśnienia w jaki sposób CLA lub ich metabolity redukują zawartość tłuszczu w masie ciała, a przedstawiane wyniki sugerują jedynie ewentualny przebieg tych procesów.

Wiadomo natomiast, że za zmniejszenie otluszczenia odpowiedzialny jest izomer o konfiguracji *trans*-10,*cis*-12 ponieważ wpływa na preadipocyty zmniejszając w nich zawartość trójglicerydów, a także hamuje syntezę *de novo* kwasów tłuszczowych i estryfikację

¹ W autoreferacie jako synonimów używano określeń: sprężony kwas linolowy, sprężone dieny kwasu linolowego, sprężone izomery kwasu linolowego, CLA, izomery CLA, dieny CLA.

trójglicerydów przyczyniając się do zmniejszenia objętości tkanki tłuszczowej (Brown i wsp. 2001; Rodriguez i wsp. 2002).

Większość prac na temat wpływu CLA na stopień otłuszczenia stanowią badania na zwierzętach laboratoryjnych (Akahoshi i wsp. 2002; Delany i wsp. 1999) oraz monogastrycznych (Ostrowska i wsp. 2003). Znacznie mniej jest badań na zwierzętach przeżuwających i dotyczą one przede wszystkim stosowania CLA w formie chronionej (Gassman i wsp. 2000; Gillis i wsp. 2004) lub ich wpływu na zawartość tłuszczu w mleku (Baumgard i wsp. 2001; Lock i wsp. 2006). Niewiele prac poświęconych jest również wpływowi CLA na skład kwasów tłuszczowych tkanek tłuszczowych zwierząt przeżuwających i w większości dotyczą one ich stosowania w formie chronionej (Wynn i wsp. 2006).

Niewielka liczba prac na temat możliwości stosowania izomerów CLA w żywieniu przeżuwaczy, korzystne właściwości izomeru *trans*-10,*cis*-12 C18:2, a także zalecenia lekarzy i dietetyków stanowiły główną przesłankę do zainteresowania się problematyką badawczą oraz realizacji badań stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe.

Celem przeprowadzonych badań było zsyntetyzowanie z olejów roślinnych sprzężonych dienów kwasu linolowego oraz ich zastosowanie w żywieniu jagniąt i ocena ich wpływu na stopień otłuszczenia, zawartość tłuszczu w mięsie oraz skład kwasów tłuszczowych tkanek tłuszczowych, w tym zawartość aktywnych biologicznie kwasów tłuszczowych.

I. Synteza izomerów CLA oraz opracowanie kompozycji dodatku paszowego

W ramach pierwszego etapu badań, w oparciu o zmodyfikowaną metodykę i zoptymalizowane warunki, z olejów roślinnych zsyntetyzowano sprzężone dieny kwasu linolowego oraz opracowano kompozycję dodatku paszowego, ułatwiającego stosowanie uzyskanych preparatów olejowych w żywieniu jagniąt.

Na ilość syntetyzowanych w drodze izomeryzacji sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA) istotny wpływ ma profil kwasów tłuszczowych substratu wyjściowego. O jego przydatności decyduje przede wszystkim wysoka zawartość kwasu linolowego *c9,c12* C18:2, który jest głównym substratem w procesie syntezy tych izomerów oraz niska kwasów tłuszczowych nasyconych.

Stosowane w badaniach oleje roślinne (słonecznikowy, z pestek z winogron), podobnie jak większość nieprzetworzonych olejów pochodzenia roślinnego, nie zawierały w swoim składzie sprzężonych dienów kwasu linolowego. Charakteryzowały się natomiast korzystnym, z punktu widzenia możliwości ich syntezy, profilem kwasów tłuszczowych tzn. zawierały znaczną ilość kwasu linolowego ok. 59.5% (olej słonecznikowy) i 69% (olej winogronowy)² oraz mało kwasów tłuszczowych nasyconych, odpowiednio: ok. 9.5 i 13%.

W eksperymencie I jako substrat do syntezy CLA użyto olej słonecznikowy, który poddano procesowi alkalicznej izomeryzacji w środowisku NaOH (**prace: 3.1, 3.2**).

W wyniku tego procesu w kwasie linolowym *cis*-9,*cis*-12 C18:2 nastąpiła zmiana rozmieszczenia wiązań podwójnych (położeniowa) oraz ustawienia rodników w stosunku do osi wiązania podwójnego (geometryczna), co doprowadziło do powstania nie występujących naturalnie w oleju słonecznikowym izomerów o konfiguracji *cis*-9,*trans*-11 i *trans*-10,*cis*-12 C18:2 w ilości odpowiednio: 25.2 i 27.8%. Oprócz 53% CLA, w skład preparatu (IOS)³ wchodziły również kwasy tłuszczowe nasycone (ok. 11%) oraz kwasy tłuszczowe nienasycone: oleinowy, linolowy i linolenowy w ilościach odpowiednio: 28.7, 4.8 i 1.5%.

W eksperymencie II (**prace: 3.3, 3.4**) do syntezy sprzężonych dienów kwasu linolowego użyto olej z pestek z winogron, który poddano procesowi alkalicznej izomeryzacji w środowisku KOH oraz kompleksowania z mocznika.

² W autoreferatu zamiennie stosowano określenia olej z pestek z winogron i olej winogronowy.

³ IOS - izomeryzowany olej słonecznikowy.

W wyniku alkalicznej izomeryzacji, w nieznacznie zmienionych w stosunku do eksperymentu I warunkach, z oleju winogronowego zsyntetyzowano 3 izomery CLA o konfiguracji *cis-9,trans-11*, *trans-10,cis-12* i *cis-11,trans-13* w ilościach odpowiednio: 32.9, 30.8 i 3.2%. Z kolei w wyniku zastosowania procesu kompleksowania z mocznikiem, w niskiej temperaturze w postaci stałego adduktu z mocznikiem wykrystalizowała większość nasyconych kwasów tłuszczowych, które usunięto w procesie filtracji, uzyskując w ten sposób wzrost koncentracji CLA. W wyniku tych procesów uzyskano preparat (IOW)⁴ zawierający sprzężone dieny kwasu linolowego w ilości: 38.3% (*cis-9,trans-11*), 35.6% (*trans-10,cis-12*) i 3.7% (*cis-11,trans-13*). Oprócz 77.6% CLA w skład preparatu wchodziły również kwasy tłuszczowe nasycone (0,4%) oraz nienasycone: oleinowy, linolowy i linolenowy w ilościach odpowiednio: 20.5, 1.6 i 0.1%.

W celu łatwiejszego skarmiania opracowanych preparatów olejowych (IOS, IOW) w żywieniu jagniąt napyłano je na preparat mineralny w ilości 20% oleju na 1 kg nośnika i w takiej formie stosowano w badaniach aplikacyjnych na zwierzętach (**prace: 3.1, 3.2, 3.3, 3.4**). W niniejszych badaniach jako nośnik użyto preparat humusowo-mineralny „Humokarbowit”, charakteryzujący się wysoką zdolnością sorpcyjną oraz właściwościami przeciwutleniającymi. W skład tego preparatu wchodzi naturalne surowce: kwasy huminowe i ich sole, bituminy, hemiceluloza, lignina, wosk, żywica, fitohormony, fitoenzymy, białka i aminokwasy, wielocukry oraz bogaty zestaw makro- i mikroelementów. Ze względu na właściwości biostymulujące i profilaktyczne (stabilizujące florę bakteryjną przewodu pokarmowego) preparat ten stosowny jest w żywieniu drobiu, trzody chlewnej, bydła i owiec.

II. Badania aplikacyjne na zwierzętach

W drugiej części badań oceniono wpływ suplementacji dawki pokarmowej jagniąt izomeryzowanymi olejami roślinnymi (2 eksperymenty z różnymi poziomami dodatku) na stopień odtuszczenia, zawartość tłuszczu w mięsie oraz profil kwasów tłuszczowych, w szczególności zawartość aktywnych biologicznie kwasów tłuszczowych.

W obu eksperymentach zwierzęcy materiał doświadczalny stanowiły tryczki rasy merynos polski o masie ciała ok. 20-22 kg, które podzielono na 2 równoliczne grupy po 20 szt. każda - kontrolną i doświadczalną. Wszystkie zwierzęta żywiono systemem alkierzowym w oparciu o: w eksperymencie I (**prace: 3.1, 3.2**) - TMR (stosowany w żywieniu krów) oraz siano łąkowe, w eksperymencie II (**prace: 3.3, 3.4**) - mieszankę (opartą o komponenty zbożowe, poekstrakcyjną śrutę rzepakową i susz z zielonek) oraz siano łąkowe. Dodatkowo jagnięta z grup doświadczalnych otrzymywały codziennie dodatki zawierające izomeryzowane oleje roślinne w ilości: 50g/szt./dzień (eksperyment I) i 100 g/szt./dzień (eksperyment II), natomiast z grup kontrolnych sam preparat mineralny (Humokarbowit) w analogicznej ilości. W eksperymencie I (**prace: 3.1, 3.2**) jako preparat doświadczalny zastosowano izomeryzowany olej słonecznikowy (IOS), w ilości ok. 3g/szt./dzień w przeliczeniu na izomer *trans-10,cis-12* C18:2, natomiast w eksperymencie II (**prace: 3.3, 3.4**) izomeryzowany olej winogronowy (IOW) w ilości ok. 6.5g/szt. dziennej dawki izomeru *trans-10,cis-12*. Po 6 tygodniach i przy masie ciała ok. 32-35 kg wszystkie jagnięta poddano ubojowi oraz wykonano następujące pomiary i oznaczenia:

- grubość tłuszczu podskórnego nad okiem połędwicy (mm);
- ilość tłuszczu okołonerkowego z okolicy krezki nerkowej (g);
- ilość tłuszczu podskórnego i międzymięśniowego w udźcu (g) oraz skład ich kwasów tłuszczowych (%);
- zawartość tłuszczu wewnątrzmięśniowego w mięśniu najdłuższym grzbietu (*musculus longissimus dorsi*) i m. półścięgnistym (*musculus semitendinosus*) oraz skład ich kwasów tłuszczowych (%).

⁴ IOW - izomeryzowany olej winogronowy.

Dodatkowo w eksperymencie II (dodatek IOW) określono dobowe przyrosty masy ciała oraz przeprowadzono pomiary w zakresie cech użytkowości mięsnej.

Wpływ izomeryzowanych olejów roślinnych na stopień otluszczenia, zawartość tłuszczu w mięsie oraz cechy użytkowości mięsnej

Ograniczenie spożycia tłuszczów pochodzenia zwierzęcego jest o tyle ważne, że to właśnie one postrzegane są jako jeden z głównych czynników sprzyjających wystąpieniu i rozwojowi wielu chorób np. miażdżycy, układu krążenia, nowotworów oraz otyłości.

W wyniku suplementacji dawki pokarmowej jagniąt izomeryzowanym olejem słonecznikowym (IOS) (**praca 3.1**) oraz winogronowym (IOW) (**praca 3.4**) zmniejszeniu uległa grubość tłuszczu podskórnego nad okiem połędwicy o odpowiednio: 15.1% ($P \leq 0.05$) oraz 24.5% ($P \leq 0.01$). Dodatki izomeryzowanych olejów roślinnych spowodowały także obniżenie ilości tłuszczu podskórnego oraz międzymięśniowego w udźcu o odpowiednio: 15.8% ($P \leq 0.05$) i 27.4% ($P \leq 0.01$) (dodatek IOS) oraz 19.2% ($P \leq 0.05$) i 23.5% ($P \leq 0.01$) (dodatek IOW). W wyniku wzbogacenia dawki pokarmowej jagniąt opracowanymi preparatami obniżeniu uległa również zawartość tłuszczu w tkance mięśniowej. W mięśni najdłuższym grzbiecie (*m. longissimus dorsi*) zawartość tłuszczu wewnątrzmięśniowego spadła o 17.2 pp⁵ (IOS) i 22.2 pp (IOW) (różnice istotne na poziomie $P \leq 0.01$), natomiast w półścięgnistym (*m. semitendinosus*) o odpowiednio: 13.2 i 17.1 pp (różnice istotne na poziomie $P \leq 0.05$) (**praca: 3.1, 3.4**).

Dodatek izomeryzowanego oleju roślinnego nie wpłynął natomiast na wielkość przyrostów dobowych masy ciała oraz masę tuszki i masę, szerokość i wysokość mięśnia najdłuższego grzbiecie (**praca 3.4**).

Reasumując, w wyniku suplementacji dawki pokarmowej jagniąt izomeryzowanymi olejami roślinnymi nastąpiła redukcja ich otluszczenia oraz spadek zawartości tłuszczu w mięsie, co prawdopodobnie związane jest z obecnością w opracowanych preparatach sprzężonych dienów kwasu linolowego, w tym izomeru *t10,c12*, który odpowiedzialny jest za metabolizm lipidów. Szczególnie istotny był spadek zawartości tłuszczu wewnątrzmięśniowego tzw. „ukrytego”, którego nie można usunąć podczas obróbki kulinarnej mięsa, a w związku z tym spożywany jest w całości. Ponadto stwierdzono, że zastosowanie wyższego poziomu izomeru *trans-10,cis-12* w dawce pokarmowej jagniąt (dodatek IOW) wpłynęło na większą redukcję ich otluszczenia i zmniejszenie udziału tłuszczu w mięsie.

Wpływ izomeryzowanych olejów roślinnych na skład kwasów tłuszczowych tłuszczu, w tym zawartość aktywnych biologicznie kwasów tłuszczowych

Większość tłuszczów pochodzenia zwierzęcego charakteryzuje się niekorzystnym, z prozdrowotnego punktu widzenia, profilem kwasów tłuszczowych (dominują kwasy nasycone). Problem ten dotyczy również tłuszczu owczego, w którym wysoki udział kwasu palmitynowego (C16:0) najprawdopodobniej odpowiedzialny jest za specyficzny jego zapach, który przez większość konsumentów oceniany jest negatywnie ograniczając popyt na ten gatunek mięsa. Choć tłuszcz przeżuwaczy w szczególności owczy, charakteryzują się wyższą niż innych zwierząt zawartością sprzężonych dienów kwasu linolowego, ich poziom jest zbyt niski aby związki te wykazały korzystne biologiczne właściwości.

W oparciu o wykonane analizy chromatograficzne stwierdzono, korzystny wpływ suplementacji dawki pokarmowej jagniąt izomeryzowanymi olejami roślinnymi na skład kwasów tłuszczowych tkanek tłuszczowych (**praca: 3.2, 3.3**). Szczególnie istotne, dla przeprowadzonych badań, były zmiany w zakresie zawartości w tkankach tłuszczowych kwasów tłuszczowych o prozdrowotnych właściwościach tj. sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA) oraz izomeru kwasu oleinowego *t11* (VA).

⁵ Punkty procentowe.

W eksperymencie I (**praca 3.2**) w wyniku zastosowania w żywieniu jagniąt izomeryzowanego oleju słonecznikowego w tłuszczu podskórnym i międzymięśniowym udźca nastąpił wzrost zawartości kwasu wakcenenowego $t_{11} C_{18:1}$ o odpowiednio: 115 i 42 pp ($P \leq 0.01$) oraz izomerów kwasu linolowego o konfiguracji $cis-9,trans-11$ o: 43 i 55 pp ($P \leq 0.01$) i $trans-10,cis-12$ o: 84 i 86 pp ($P \leq 0.01$), a także wzrosła całkowita zawartość CLA o: 47 pp ($P \leq 0.01$) i 30 pp ($P \leq 0.05$). Z kolei w eksperymencie II (**praca 3.3**) w wyniku wzbogacenia dawki pokarmowej jagniąt izomeryzowanym olejem winogronowym (w 2-krotnie wyższej niż w eksperymencie I dawce izomeru $t_{10,c12}$), w obu rodzajach tkanek tłuszczowych, wzrosła zawartość kwasu wakcenenowego $t_{11} C_{18:1}$ o: 108 i 78 pp, izomeru $cis-9,trans-11 C_{18:2}$ o: 75 i 63 pp, izomeru $trans-10,cis-12 C_{18:2}$ o: 95 i 129 pp i całkowita zawartość CLA o: 76 i 68 pp (wszystkie różnice statystycznie wysokoistotne).

W obu eksperymentach wzrostowi aktywnych biologicznie kwasów tłuszczowych towarzyszył spadek zawartości aterogennych i trombogennych kwasów tłuszczowych tj. laurynowego ($C_{12:0}$), mirystynowego ($C_{14:0}$) i palmitynowego ($C_{16:0}$). Ponadto korzystniej, z prozdrowotnego punktu widzenia, poprawie uległ stosunek kwasów tłuszczowych nasyconych do nienasyconych oraz indeks aterogenny tłuszczu.

Podobny charakter miały zmiany w składzie kwasów tłuszczowych tłuszczu wewnątrzmięśniowego mięśnia najdłuższego grzbietu (*musculus longissimus dorsi*) i mięśnia półścięgniastego (*musculus semitendinosus*) (**praca 3.2 i 3.3**).

W wyniku suplementacji dawki pokarmowej jagniąt IOS i IOW w tłuszczu wewnątrzmięśniowym m. najdłuższego grzbietu i półścięgniastego wzrosła zawartość kwasu $t_{11} C_{18:1}$ o: 131 i 121 pp (IOS) oraz 149 i 173 pp (IOW), izomeru $c_{9,t11} C_{18:2}$ o: 38 i 48 pp (IOS) oraz 60 i 59 pp (IOW), izomeru $t_{10,c12} C_{18:2}$ o: 106 i 76 pp (IOS) oraz 70 i 67 pp (IOW) oraz całkowita zawartość CLA o: 42 i 51 pp (IOS) oraz 59 i 58 pp (IOW) (wszystkie różnice statystycznie istotne na poziomie $P \leq 0.01$).

Zaobserwowane, w obu eksperymentach, zmiany w profilu kwasów tłuszczowych związane są prawdopodobnie z zastosowaniem w żywieniu jagniąt izomeryzowanych olejów roślinnych oraz obecnością w nich sprzężonych dienów kwasu linolowego i ich przemianami. Większość izomerów CLA, przy udziale mikroorganizmów żwaczowych, uległa procesowi biouwodorowania najpierw do kwasu $trans-11 C_{18:1}$ (izomer $cis-9,trans-11$) oraz $trans-10 C_{18:1}$ (izomer $trans-10,cis-12$), a następnie do kwasu stearynowego $C_{18:0}$ (Bauman i wsp. 1999) i w takiej postaci wysyciła tkanki tłuszczowe. Część w niezmienionej formie przeszła do dalszych odcinków przewodu pokarmowego, gdzie uległa wchłanianiu, a następnie wbudowana została do tkanek tłuszczowych (Griinari i Bauman 1999). Ponadto kwas wakcenyowy $t_{11} C_{18:1}$, będący produktem pośrednim biouwodorowania izomeru $cis-9,trans-11$, posłużył w tkankach tłuszczowych jako substrat do endogennej syntezy CLA przy udziale enzymu Δ^9 desaturazy (Corl i wsp. 2001). W wyniku tych procesów w tkankach tłuszczowych jagniąt istotnie wzrosła zawartość CLA i VA, co wpłynęło na poprawę wartości biologicznej i właściwości funkcjonalnych tłuszczu.

Podsumowanie

- Oleje roślinne bogate w kwas linolowy $c_{9,c12} C_{18:2}$, stanowią mogą substrat do otrzymywania w drodze syntezy sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA).
- Alkaliczna izomeryzacja spowodowała zmianę rozmieszczenia wiązań podwójnych (położeniowa) oraz ustawienia rodników (geometryczna) w łańcuchu kwasu linolowego i powstanie jego sprzężonych dienów (CLA).
- W wyniku procesu alkalicznej izomeryzacji oleju słonecznikowego wobec NaOH zsyntetyzowano ok. 53% CLA, natomiast oleju z pestek z winogron wobec KOH ok. 67% CLA.
- Kompleksowanie z mocznika spowodowało wykrystalizowanie w postaci stałego adduktu większości kwasów tłuszczowych nasyconych, które usunięto w procesie filtracji.

- W wyniku procesu alkalicznej izomeryzacji i kompleksowania z mocznika z oleju winogronowego uzyskano preparat olejowy (IOW) zawierający ok. 78% CLA.
- Poprzez napylenie izomeryzowanych olejów roślinnych na nośnik humusowo-mineralny „Humokarbowit” w ilości 20% jego s.m. opracowano kompozycję dodatku paszowego.
- Wzbogacenie dawki pokarmowej jagniąt izomeryzowanymi olejami roślinnymi zredukowało ich otluszczenie (od 15 do 27%).
- Dodatek izomeryzowanych olejów roślinnych obniżył zawartość tłuszczu w mięsie (od 13 do 22 pp).
- Suplementacja dawki pokarmowej jagniąt izomeryzowanymi olejami roślinnymi korzystnie zmodyfikowała skład kwasów tłuszczowych tłuszczu (spadła zawartość kwasów nasyconych oraz wzrosła wielonienasyconych).
- Zastosowanie izomeryzowanych olejów roślinnych w żywieniu jagniąt obniżyło w ich tkankach tłuszczowych udział kwasu laurynowego (C12:0), mirystynowego (C14:0) i palmitynowego (C16:0) oraz wpłynęło na poprawę wartości indeksu aterogennego tłuszczu.
- W wyniku skarmiania izomeryzowanych olejów roślinnych w tkankach tłuszczowych jagniąt istotnie wzrosła zawartość sprzężonych dienów kwasu linolowego *c9,t11* (od 38 do 75 pp) i *t10,c12* (od 67 do 129 pp) oraz kwasu wakcenowego *t11C18:1* (od 42 do 173 pp).
- Stwierdzono zależność pomiędzy poziomem izomeru *t10,c12C18:2* w dawce, a stopniem redukcji otluszczenia i obniżeniem zawartości tłuszczu w mięsie.
- Zastosowanie 2-krotnie wyższej ilości CLA w dawce pokarmowej tylko nieznacznie zwiększyło zawartość biologicznie aktywnych kwasów tłuszczowych w tkankach tłuszczowych jagniąt.

Wniosek

W związku ze znaczną redukcją otluszczenia i obniżeniem zawartości tłuszczu w mięsie oraz korzystną modyfikacją profilu kwasów tłuszczowych w tkankach tłuszczowych, w tym zwiększeniem udziału CLA, można zarekomendować stosowanie w żywieniu jagniąt dodatków paszowych zawierających izomeryzowane oleje roślinne.

Piśmiennictwo⁶

⁶ Wykaz cytowanego piśmiennictwa w załączniku 5.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. DODATKI PASZOWE OBNIŻAJĄCE ZAWARTOŚĆ TŁUSZCZU W PRODUKTACH POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO ORAZ KORZYSTNIE MODYFIKUJĄCE SKŁAD KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

5.1.1 Modyfikacja składu kwasów tłuszczowych tłuszczu mięsa i mleka owczego w wyniku zastosowania dodatków „chronionych” nasion roślin oleistych

Jedną z metod pozwalających na poprawę niekorzystnych proporcji w udziale grup kwasów tłuszczowych o różnym stopniu nasycenia w mleku i mięsie, jest skarmianie tłuszczów roślinnych bogatych w kwasy nienasycone. W przypadku zwierząt przeżuwających, z uwagi na specyficzną budowę ich układu pokarmowego oraz mikroflorę żwacza, większość dostarczanych tą drogą nienasyconych kwasów tłuszczowych ulega procesowi biouwodorowania do kwasów nasyconych i w takiej postaci odkładana jest w tkankach tłuszczowych.

Celem przeprowadzonych badań było ograniczenie procesów biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu oraz modyfikacja składu kwasów tłuszczowych tłuszczu owiec poprzez skarmianie preparowanych nasion roślin oleistych.

W pierwszym etapie, na przetokowanych owcach metodą „*in sacco*” z użyciem poliamidowych woreczków, oceniono skuteczność różnych zabiegów preparowania (termicznego, chemicznego oraz termiczno-chemicznego (*własne rozwiązanie*)) nasion roślin oleistych na ograniczenie zachodzących w żwaczu procesów biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych. W drugiej części badań na tuczonych jagniętach oraz maciorkach w laktacji oceniono wpływ suplementacji ich dawki pokarmowej „chronionymi”⁷ nasionami roślin oleistych na skład kwasów tłuszczowych tłuszczu tkankowego i mlecznego.

Najważniejsze obserwacje z przeprowadzonych badań

- Zastosowanie obróbki termicznej, chemicznej i termiczno-chemicznej ograniczyło tempo i wielkość rozkładu suchej masy, lipolizę tłuszczu oraz biouwodorowanie nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu.
- Najlepsze efekty uzyskano przy metodzie termiczno-chemicznej (*własne rozwiązanie*), najmniej skuteczna była natomiast metoda termiczna.
- Suplementacja dawki pokarmowej preparowanymi nasionami roślin oleistych korzystnie zmodyfikowała skład kwasów tłuszczowych tłuszczu tkankowego i mlecznego - wzrosła zawartość kwasów tłuszczowych nienasyconych oraz obniżyła się nasyconych.
- W wyniku zastosowania „chronionych” nasion rzepaku w tłuszczu tkankowym i mlecznym wzrósł udział kwasu oleinowego (C18:1), nasion słonecznika – kwasu linolowego (C18:2), nasion lnu – kwasu linolenowego (C18:3). Spektrum zmian zależało od wielkości dodatku oraz czasu stosowania.
- Dodatek „chronionych” nasion roślin oleistych poprawił sensoryczne cechy (smakowe i zapachowe) mięsa i tłuszczu jagniąt.
- Wzbogacenie tłuszczu mlecznego w nienasycone kwasy tłuszczowe, w wyniku suplementacji dawki pokarmowej maciorek „chronionymi” nasionami roślin oleistych, nie miało wpływu na szybkość zachodzących w nim zmian oksydacyjnych.
- Sery z mleka owiec otrzymujących „chronione” nasiona roślin oleistych charakteryzowały się korzystniejszym i zbliżonym składem kwasów tłuszczowym jak użyty do ich produkcji surowiec.

⁷ Termin „chronione” używano w stosunku do nasion poddanych obróbce termicznej, chemicznej lub termiczno-chemicznej.

Wyniki badań dotyczące przedstawionej tematyki badawczej opublikowane zostały w formie prac (II.A.1, II.D-II.6, II.D-II.7, II.D-II.10, II.D-II.13, II.D-II.23, II.D-II.24, II.D-II.43, II.D-II.49, II.D-II.68, II.D-II.69, II.D-III.2, II.D-III.17, II.D-III.18) oraz doniesień na konferencjach krajowych i zagranicznych, a także ulotek wdrożeniowych (III.B.37, III.B.73, I.1, I.2, I.4, I.5).⁸ Część zagadnień była również tematem pracy doktorskiej. Badania zrealizowano w ramach projektu KBN nr 554129102 oraz środków statutowych.⁹

5.1.2 Preparaty lipidowe redukujące otluszczenie i obniżające zawartość tłuszczu w mleku oraz zwiększające w tłuszczu tkankowym i mlecznym zawartość CLA

Tłuszcze pochodzenia zwierzęcego są jednym z głównych czynników sprzyjających wystąpieniu i rozwojowi wielu chorób określanych mianem „cywilizacyjnych”. Metabolizm lipidów regulować mogą sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA), a zwłaszcza izomer o konfiguracji *t10,c12* C18:2.

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie na bazie olejów roślinnych wzbogaconych w CLA kompozycji dodatków paszowych i zastosowanie ich w żywieniu zwierząt w celu obniżenia zawartości tłuszczu (tkankowego i mlecznego) oraz zwiększenia w nich udziału aktywnych biologicznie kwasów tłuszczowych.

W ramach badań określono przydatność różnych dodatków mineralnych, jako nośników dla preparatów olejowych oraz ustalono optymalny stopień ich wysycenia tymi preparatami (10, 20 i 30% napylenia). W części doświadczalnej na bukatkach, jagniętach, tuczniki oraz krowach, owcach i kozach w laktacji oceniono wpływ suplementacji ich dawki pokarmowej dodatkami zawierającymi izomeryzowane oleje roślinne na stopień otluszczenia i zawartość tłuszczu w mięsie, zawartość tłuszczu w mleku oraz profil kwasów tłuszczowych tłuszczu tkankowego i mlecznego.

Najważniejsze obserwacje

- Jako nośnik dla izomeryzowanych olejów roślinnych stosowane mogą być preparaty mineralne charakteryzujące się wysoką zdolnością sorpcyjną, np. Humokarbomit, wermikulit lub bentonit sodowy.
- Za optymalny poziom wysycenia nośnika preparatami olejowymi uznano 20% jego s.m. (nie zmieniał konsystencji nośnika, a jednocześnie pozwalał na zastosowanie większej ilości preparatu olejowego przy mniejszej ilości dodatku mineralnego).
- Dodatek izomeryzowanych olejów roślinnych do paszy dla jagniąt, bukatów oraz tuczników spowodował redukcję ich otluszczenia od 13 do 28% oraz obniżenie udziału tłuszczu w mięsie od 12 do 24 pp.
- Zastosowanie izomeryzowanych olejów roślinnych korzystnie zmodyfikowało skład kwasów tłuszczowych tłuszczu tkankowego (spadł udział kwasów tłuszczowych nasyconych oraz wzrósł jedno- i wielonienasyconych).
- W wyniku wzbogacenia dawki pokarmowej opasanych zwierząt izomeryzowanymi olejami roślinnymi w tkankach tłuszczowych wzrosła zawartość sprzężonych dienów kwasu linolowego o konfiguracji *cis-9,trans-11* od 20 do 350 pp i *trans-10,cis-12* od 55 do 330 pp oraz izomeru kwasu oleinowego *trans11* od 27 do 280 pp.
- Większy wzrost zawartości CLA, jako efekt skarmiania izomeryzowanych olejów roślinnych, stwierdzono w tkankach tłuszczowych zwierząt monogastrycznych niż przeżuwaczy.

⁸ Wykaz prac naukowych, doniesień konferencyjnych, ulotek wdrożeniowych i informacyjnych, dotyczących przedstawionej tematyki badawczej, w załączniku 6.

⁹ Wykaz projektów badawczych, patentów i zgłoszeń patentowych oraz nagród, dotyczących przedstawionej tematyki badawczej, w załączniku 6.

- U zwierząt użytkowanych mlecznie (owce, krowy, kozy) dodatek izomeryzowanych olejów roślinnych obniżył zawartość tłuszczu w mleku (od 19 do 33 pp) oraz korzystnie zmodyfikował profil jego kwasów tłuszczowych – zmniejszyła się zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych (głównie krótkołańcuchowych od 12 do 20 pp) oraz wzrosła wielonienasyconych (głównie izomerów kwasu linolowego $c9,t11$ od 45 do 80 pp i $t10,c12$ od 125 do 350 pp) i jednonienasyconych (głównie $t11$ C18:1 od 230 do 410 pp).

Na opracowany dodatek paszowy w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej przyznany został **patent** nr PL 386645.⁹ Powyższe badania wyróżnione zostały także **2 nagrodami na Międzynarodowych Wystawach Wynalazczości** (Genewa 2009 r., Warszawa 2009 r.) oraz **nagrodą I stopnia w Konkursie FSNT NOT** i **nagrodą zespołową I stopnia Rektora UP we Wrocławiu**.⁹

Wyniki badań zamieszczone zostały w publikacjach (II.A.2, II.A.1.2, II.D-II.48, II.D-II.56, II.D-II.58, II.D-II.59, II.D-II.60) oraz doniesieniach na konferencjach zagranicznych i krajowych, a także w formie ulotek informacyjnych (III.B.55, III.B.63, III.B.68, III.B.70, III.B.74, III.B.77, III.B.83, I.7).⁸ Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego KBN nr 3 T09B 130 29.⁹

5.1.3 Poprawa prozdrowotnych właściwości produktów mlecznych (mleko, ser), w wyniku suplementacji diety krów preparatami roślinno-rybnymi wzbogaconymi w aktywne biologicznie kwasy tłuszczowe

Związkami o korzystnych właściwościach są sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA) oraz kwasy ω -3 PUFA¹⁰, w szczególności kwas eikozapentaenowy C20:5 (EPA) i dokozaheksaenowy C22:6 (DHA). W mleku krowim ich zawartość jest niska lub poniżej progu oznaczalności dlatego coraz częściej w ich żywieniu stosuje się różnego rodzaju dodatki paszowe, w tym substancje aktywne biologiczne.

Celem badań było, opracowanymi lub zmodyfikowanymi metodami, zsyntetyzowanie z olejów roślinnych izomerów CLA oraz wzbogacenie olejów rybnych w kwasy ω -3 i opracowanie na ich bazie kompozycji preparatów roślinno-rybnych (PR-R_n) oraz ich zastosowanie w żywieniu krów w celu zwiększenia w mleku zawartości kwasów tłuszczowych o prozdrowotnych właściwościach.

Na bazie oleju winogronowego z solami wapniowymi CLA, zsyntetyzowanymi metodą z wykorzystaniem katalizatora tlenkowego oraz oleju rybnego wzbogaconego w kwasy EPA i DHA, metodą krystalizacji niskotemperaturowej opracowano kompozycję bioaktywnego preparatu roślinno-rybnego (PR-R₁) zawierającego sole CaCLA w ilości ok. 3.6% ($c9,t11$; $t10,c12$ i $c11,t13$) oraz EPA + DHA w ilości ok. 22%. Z kolei na bazie oleju winogronowego z izomerami CLA, zsyntetyzowanymi metodą alkalicznej izomeryzacji i kompleksowania z mocznika oraz oleju rybnego wzbogaconego w kwasy EPA i DHA, metodą alkalicznej hydrolizy i kompleksowania z mocznika opracowano kompozycję bioaktywnego preparatu roślinno-rybnego (PR-R₂), zawierającego ok. 38.2% CLA ($c9,t11$; $t10,c12$ i $c11,t13$) oraz ok. 36.5% EPA i DHA.

Badania aplikacyjne przeprowadzono na krowach rasy HF, które przez miesiąc dostawały preparaty lipidowe oraz PR-R_n w ilościach 200 i 400g/szt./dzień. W trakcie badań 3-krotnie pobrano próbki mleka, z których wyprodukowano sery podpuszczkowe i serwatkowe i oznaczono podstawowy skład chemiczny mleka i serów oraz profil kwasów tłuszczowych ich tłuszczu.

¹⁰ Kwasy tłuszczowe wielonienasycone (polyunsaturated fatty acids).

Najważniejsze obserwacje z przeprowadzonych badań

- Wszystkie preparaty lipidowe oraz uzyskane na ich bazie bioaktywne kompleksy roślinno-rybne nie miały wpływu na skład chemiczny mleka i serów, natomiast korzystnie zmodyfikowały profil kwasów tłuszczowych tłuszczu tych produktów.
- W wyniku suplementacji dawki pokarmowej krów wzbogaconymi olejami rybnymi w tłuszczu mleka i serów wzrosła zawartość kwasów EPA i DHA oraz CLA.
- Korzystniejsze zmiany uzyskano przy dodatku oleju rybnego wzbogaconego metodą alkalicznej hydrolizy i kompleksowania z mocznika (wyższa koncentracja kwasów EPA i DHA) niż krystalizacji niskotemperaturowej. Pierwsza z metod wymaga jednak specjalistycznej aparatury i jest bardziej czas- i pracochłonna.
- Nie stwierdzono niekorzystnego wpływu skarmiania wzbogaconych olejów rybnych na sensoryczną jakość produktów mlecznych (niewyczuwalny był w nich zapach oleju rybnego).
- W wyniku zastosowania izomeryzowanych olejów roślinnych w tłuszczu mleka i serów wzrosła zawartość sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA) i kwasu wakcenenowego (VA). Większy wzrost tych kwasów uzyskano przy preparacie zawierającym izomery CLA zsyntetyzowane metodą alkalicznej izomeryzacji i kompleksowania z mocznika niż w postaci soli wapniowych CLA zsyntetyzowanych przy zastosowaniu katalizatora tlenkowego.
- Najkorzystniejsze zmiany w składzie kwasów tłuszczowych uzyskano przy biopreparatach roślinno-rybnych (PR-R_n), co prawdopodobnie wynika z synergistycznego współdziałania zawartych w nich kwasów tłuszczowych.
- W wyniku zastosowania PR-R_n w tłuszczu produktów mlecznych (mleko, ser) spadł udział kwasów tłuszczowych nasyconych od 1.5 do 5.6 pp oraz wzrósł kwasów jednonienasyconych od 0.3 do 9.4 pp i wielonienasyconych od 29.1 do 69.3 pp.
- Wzbogacenie dawki krów preparatami roślinno-rybnymi (PR-R_n) wpłynęło na wzrost w tłuszczu mleka i produktów mlecznym kwasów tłuszczowych o prozdrowotnych właściwościach, tj. izomeru *c*9,*t*11 C18:2 (CLA) (od 67 do 266 pp), izomeru *t*10,*c*12 C18:2 (CLA) (od 66 do 250 pp), kwasu *t*11 C18:1 (VA) (od 35 do 168 pp), kwasu eikozapentaenowego C20:0 (EPA) (od 200 do 733 pp) oraz kwasu dokozaheksaenowego C22:6 (DHA) (obecny w ilości od 0.05 do 0.16%).
- Korzystniejsze zmiany uzyskano przy preparacie PR-R₂ niż PR-R₁, co prawdopodobnie wynika z wyższej koncentracji w nim aktywnych biologicznie kwasów tłuszczowych, tj. CLA, EPA, DHA.
- O charakterze i wielkości zmian w składzie kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka i serów decydował rodzaj dodatku (izomeryzowany olej roślinny, wzbogacony olej rybny, PR-R_n), jego dawka (200 lub 400g/szt./dzień) oraz czas stosowania (tydzień, 2 tygodnie, miesiąc).

Na opracowany preparat roślinno-rybny (PR-R₁) w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej złożony został opis **zgłoszenia patentowego** nr P 398771.⁹ Za opracowanie kompozycji preparatów roślinno-rybnych PR-R_n i ich wpływ na skład produktów mlecznych autorzy otrzymali **złoty medal na Wystawie Wynalazczości w Genewie w 2012r.**⁹

Wyniki badań opublikowano w formie prac (II.A.13, II.D-III.20, II.D-III.22, II.D-III.23) oraz doniesień (III.B.96, III.B.108, III.B.109, III.B.110).⁸ Badania zrealizowano w ramach projektu współfinansowanego przez Unię Europejską nr POIG.01.01.02-14-090/09 oraz projektu KBN 3 T09B 059 26.⁹

5.2. ZAWARTOŚĆ BIOAKTYWNYCH ZWIĄZKÓW W PRODUKTACH POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO I ROŚLINNEGO ORAZ METODY ICH OZNACZANIA, WZBOGACANIA, SYNTEZY I IZOLACJI

5.2.1 Monitoring zawartości bioaktywnych związków w produktach pochodzenia zwierzęcego, w tym w szczególności w produktach ovczych (wpływ czynników genetycznych, fizjologicznych, żywieniowych)

Powstanie i rozwój nauki o składnikach i właściwościach funkcjonalnych żywności pociąga za sobą istotne zmiany w świadomości producentów żywności, a także konsumentów. Żywność przestaje być już postrzegana jedynie jako źródło składników odżywczych, służących pokryciu odpowiednich potrzeb pokarmowych człowieka, ale coraz częściej zwraca się uwagę na jej właściwości funkcjonalne, a więc zdolność pozytywnego oddziaływania. W badaniach nad składem produktów zwierzęcych poszukuje się zatem nowych związków wykazujących pozytywne oddziaływanie na organizm człowieka i stanowiących wyróżnik gatunkowy lub będących wynikiem ich żywienia.

Sprzężony kwas linolowy (CLA) - stanowi mieszaninę pozycyjnych oraz geometrycznych izomerów kwasu oktadekadienowego, w których wiązania podwójne izolowanymi tylko jednym wiązaniem pojedynczym.

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływ gatunku, rasy, rodzaju tkanki mięśniowej oraz żywienia na zawartość CLA w produktach pochodzenia zwierzęcego.

Najważniejsze obserwacje z przeprowadzonych badań

- Najwyższą zawartością CLA charakteryzował się tłuszcz przeżuwaczy, natomiast śladowe ilości zawierał tłuszcz zwierząt monogastrycznych i ryb.
- Stwierdzono istotny wpływ gatunku przeżuwacza na zawartość CLA w tłuszczu tkankowym i mlecznym. Najwyższą zawartością charakteryzowało się mięso jagnięce i mleko owcze.
- Stwierdzono wpływ rasy owiec na zawartość CLA w tłuszczu tkankowym.
- Zawartość CLA różniła się w zależności od rodzaju tkanki tłuszczowej (najwięcej zawierał tłuszcz wewnątrzmięśniowy, najmniej okołonerkowy).
- Tłuszcz zwierząt żywionych paszami z dominacją zielonki pastwiskowej oraz mieszanki treściwej z udziałem nasion roślin oleistych charakteryzował się wyższą zawartością CLA niż żywionych mieszanką CJ. Ponieważ skarmiane pasze nie zawierały w swoim składzie CLA dowodzi to, że związek ten w całości pochodzi z przemian żwaczowych i biosyntezy własnej organizmu.

Wyniki badań opublikowane zostały w formie prac (II.A.1.1, II.D-II.16, II.D-II.17, II.D-II.19, II.D-II.21, II.D-II.22, II.D-II.33, II.D-II.34, II.D-II.36, II.D-II.50, II.D-III.6, II.D-III.7, II.D-III.8, II.D-III.10, II.D-III.11, II.D-III.12, II.D-III.15) oraz doniesień na konferencjach zagranicznych i krajowych (III.B.9, III.B.10, III.B.16, III.B.17, III.B.23, III.B.43, III.B.87).⁸ Badania zrealizowano w ramach projektu KBN nr 5 P06E 026 19 oraz grantu wewnętrznego 101/GW/99.⁹

Karnityna jest czwartorzędowym związkiem amonowym zaliczanym do substancji witaminopochodnych. Zaledwie $\frac{1}{4}$ zapotrzebowania człowieka pochodzi z własnej syntezy i absorpcji zwrotnej, natomiast pozostała część musi być dostarczona wraz z dietą. Najważniejszym egzogennym źródłem L-karnityny w diecie człowieka są mięso (głównie zwierząt przeżuwających) oraz produkty mleczne. W śladowych ilościach związek ten występuje w produktach pochodzenia roślinnego. Najlepiej poznana została rola L-karnityny w metabolizmie lipidów, związana przede wszystkim z transportem długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, w wyniku czego powstaje energia konieczna do prawidłowego funkcjonowania komórek. Związek ten wykazuje również zdolność do obniżania poziomu triacylogliceroli

i cholesterolu w krwi, a także redukuje poziom kwasu mlekowego, przez co zwiększa możliwości wysiłkowe organizmu.

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu gatunku, fazy laktacji, rodzaju tkanki mięśniowej oraz czynników żywieniowych na zawartość L-karnityny w mięsie i mleku przeżuwaczy.

Najważniejsze obserwacje z przeprowadzonych badań

- Stwierdzono wpływ genotypu na kształtowanie się zawartości całkowitej i wolnej L-karnityny w mleku i mięsie przeżuwaczy. Najwięcej L-karnityny zawierało mleko owcze, kolejno krowie i najmniej kozie, natomiast w przypadku mięsa: jagnięcina, wołowina i koźlina.
- Bogatsze źródło L-karnityny w diecie człowieka stanowi mięso niż mleko. Zawarta w nim karnityna charakteryzuje się także większą biodostępnością (korzystniejszym stosunkiem formy wolnej : całkowitej).
- Najwięcej L-karnityny zawierało mleko z początkowej fazy laktacji (do 7 dnia).
- W tkance mięśniowej ilość L-karnityny wzrastała z wiekiem (masą ubojową).
- Na zawartość L-karnityny wpływ miał rodzaj tkanki mięśniowej (najwięcej zawierał mięsień sercowy, natomiast najmniej półbłoniasty i półścięgnisty).
- Suplementacja dawki pokarmowej owiec paszami bogatymi w lizynę i metioninę (śruta sojowa i rzepakowa) wpłynęła na wzrost zawartości wolnej i całkowitej L-karnityny w mleku i mięsie.
- Dodatek do diety owiec syntetycznych aminokwasów, będących prekursorami L-karnityny, tj. lizyny i metioniny tylko nieznacznie zwiększył zawartość tego związku w mleku i mięsie.

Wyniki badań dotyczące przedstawionej tematyki badawczej opublikowane zostały w formie prac (II.A.10, II.A.12, II.D-I.3, II.D-II.20, II.D-II.27, II.D-II.70, II.D-III.13) oraz doniesień konferencyjnych (III.B.24, III.B.85, III.B.87, III.B.94, III.B.97, III.B.98, III.B.99, III.B.103, III.B.104, III.B.105).⁸ Badania zrealizowano w ramach projektu MNiSW nr N N311 019537 oraz grantu interdyscyplinarnego 101/GW/01.⁹

5.2.2 Opracowanie lub modyfikacja metod oznaczania, wzbogacania, syntezy i izolacji aktywnych biologicznie związków w(z) produktach(ów) pochodzenia zwierzęcego i roślinnego

Już dziś można zauważyć intensyfikację badań, mających na celu wzbogacenie produktów żywnościowych w aktywne biologicznie związki, a szacuje się, że w przyszłości żywność funkcjonalna stanowić będzie nawet połowę rynku żywności. Ważne jest zatem opracowanie tanich i prostych procedur pozwalających na szybką i łatwą jakościową i ilościową ich identyfikację, a także metod pozwalających na zwiększenie koncentracji tych związków w produktach żywnościowych.

5.2.2.1 Dopracowanie procedur badawczych dotyczących przygotowania i wykonania oznaczeń zawartości całkowitej i wolnej L-karnityny w mleku i mięsie przy użyciu metod spektroskopowych (spektrofotometryczna, spektrofluorymetryczna) oraz HPLC

Współczesne metody służące do oznaczania L-karnityny i jej estrów, w większości opierają się na wykorzystaniu specyficznych dla tego związku enzymów, różnią się natomiast metodami detekcji powstających produktów. Większość opracowanych metod służy do oznaczania zawartości tego związku w moczu i osoczu krwi.

W ramach przeprowadzonych badań wielokrotnie modyfikowano sposób przygotowania materiału biologicznego do oznaczeń, w przeciwieństwie bowiem do innych prób biologicznych, np. krwi, oznaczenie zawartości tego związku w mleku i tkance mięśniowej wymaga

wcześniejszego jej przeprowadzenia do wolnej cząsteczki lub zestryfikowanej kwasami tłuszczowymi. Określono również wpływ procesów technologicznych na kształtowanie się zawartości tego związku w produktach pochodzenia zwierzęcego.

Podsumowanie

- Dopracowano procedury badawcze i metody analityczne dotyczące przygotowania i oznaczeń zawartości całkowitej i wolnej L-karnityny w materiale biologicznym (mleko, mięso).
- Przy wszystkich metodach analitycznych (spektrofotometrycznej, spektrofluorymetrycznej, HPLC) uzyskano podobną dokładność i powtarzalność wyników.
- Ze względu na sposób przygotowania materiału do badań, mniej restrykcyjne warunki prowadzenia analiz, niższe koszty oraz mniejszą pracochłonność najbardziej przydatna, do oznaczania zawartości całkowitej i wolnej L-karnityny w mleku i mięsie, jest metoda enzymatyczno-chemiczna z zastosowaniem enzymu CAT oraz chemicznego odczynnika Ellmana (DTNB).
- Procesy obróbki technologicznej mleka (pasteryzacja) oraz mięsa (gotowanie) wpłynęły na spadek zawartości obu form L-karnityny w tych produktach.

Wyniki badań opublikowane zostały w formie prac (II.A.10, II.D-I.3) oraz doniesień (III.B.89, III.B.91).⁸ Badania zrealizowano w ramach projektu MNiSW nr N N311 019537.⁹

5.2.2.2 Optymalizacja procesów zwiększania koncentracji kwasów ω -3 PUFA w olejach rybnych

W ostatnich latach coraz większe znaczenie, jako składniki mieszanek paszowych dla zwierząt lub dodatki żywieniowe, odgrywają surowce uzyskiwane z ryb i ubocznych produktów rybnych. Stosowanie olejów rybnych w żywieniu zwierząt wynika przede wszystkim z ich korzystnego wpływu na wzrost zawartości kwasów ω -3 w tłuszczu mlecznym i tkankowym, a także ograniczenia u zwierząt przeżuujących procesów biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych, w wyniku czego w ich tkankach tłuszczowych wzrasta zawartość CLA. Skarmianie większych ilości olejów rybnych w żywieniu zwierząt użytkowanych mlecznie może jednak pogarszać walory sensoryczne mleka nadając mu „rybny” zapach. Poprzez zwiększenie koncentracji kwasów ω -3 w oleju rybnym można jednak ograniczyć jego ilość w dawce pokarmowej.

I. Proces wzbogacania metodą krystalizacji niskotemperaturowej

Celem badań była optymalizacja warunków prowadzenia procesu poprzez dobór rozpuszczalnika (heksan, aceton, mieszanina heksan/aceton 4:1), temperatury wymrażania (-18°C i -70°C) oraz ilości rozpuszczalnika w stosunku do oczyszczanego oleju (1:2.5 i 1:5).

Najważniejsze wnioski

- Stosunek wagowy rozpuszczalnika do oleju (1:2.5 i 1:5) nie miał wpływu na efektywność procesu niskotemperaturowej krystalizacji oraz stopień wzbogacenia oleju w kwasy ω -3 (EPA i DHA).
- Na wzrost koncentracji kwasów EPA i DHA wpływ miała temperatura zamrażalnicza – znaczący wzrost uzyskano przy temp. -70°C , natomiast niewielki przy temp. -18°C .
- Oceniając wpływ zastosowanego rozpuszczalnika organicznego lub ich mieszaniny najlepsze wyniki uzyskano przy acetonie oraz jego mieszaninie z heksanem.
- W zoptymalizowanych warunkach zawartość kwasów EPA + DHA w paszowym oleju rybnym wzrosła z 21.5 do 41.5%.

II. Proces wzbogacania metodą kompleksowania z mocznika

W porównaniu z danymi literaturowymi, na podstawie własnych prób laboratoryjnych, zmniejszono stosunek mocznika do kwasów tłuszczowych z 4.5 do 3 oraz czas i temperaturę krystalizacji - z 24 godz. w temp. -10°C do 5 godz. w temp. pokojowej ok. 20°C, a następnie przez 18 godz. w temp. 4°C.

Najważniejsze wnioski

- Na efektywność procesu kompleksowania z mocznika istotny wpływ miał: stosunek mocznika do ilości wolnych kwasów tłuszczowych oraz czas i temperatura krystalizacji, a także sposób i intensywność mieszania kwasów tłuszczowych z roztworem mocznika.
- W zoptymalizowanych warunkach w uzyskanym oleju rybnym zawartość kwasów PUFA wzrosła z 40.1 do 96.6%, w tym kwasów ω -3 z 35.6 do 86.9%, natomiast kwasów EPA + DHA z 25.1 do 70.7%.
- Z nie zmydloną frakcją usunięte zostały zanieczyszczenia zaliczane do ksenobiotyków (np. polichlorowane bifenyle czy dioksyny).

III. Proces wzbogacania metodą aminopropyłowej ekstrakcji kolumnowej na złożu stałym

W celu zoptymalizowania warunków prowadzenia tego procesu przeprowadzono próby polegające na doborze ilości wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) nanoszonych na odpowiednią masę wypełnienia (0.6:100; 1.5:100; 3:100; 6:100; 12:100) oraz ilości powtórzeń wymywania na tej samej kolumnie. Pod uwagę brano również wydajność procesu (odzysk kwasów EPA i DHA).

Najważniejsze wnioski

- W wyniku zastosowania metody ekstrakcji do fazy stałej w dichlorometanowej frakcji oleju rybnego znacząco wzrosła zawartość kwasów PUFA z odpowiednio 41.3% do 76.9-97.7%, w tym EPA i DHA z 31.6% do 61-86.2%
- Najlepsze efekty uzyskano przy stosunku masy wolnych kwasów tłuszczowych do masy wypełnienia wynoszącym 1.5:100. Wysoki odzysk uzyskano również przy stosunku 3:100.
- Kilkakrotne przepuszczenie próby przez tą samą kolumnę, w porównaniu z pojedynczym procesem, nie miało wpływu na wzrost koncentracji EPA i DHA, znacząco jednak poprawiało efektywność samej metody (zmniejszyło zużycie jej wypełnienia).

Wyniki badań dotyczące przedstawionej tematyki badawczej opublikowane zostały w formie prac (II.A.3, II.A.8, II.A.15, II.A-II.63).⁸ Badania dotyczące metod wzbogacania olejów rybnych w kwasy ω -3 zrealizowano w ramach projektów MNiSW nr R 050 54 02 oraz NCBiR NR05-0002-10/2011.⁹

5.2.2.3 Synteza sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA) z olejów roślinnych bogatych w kwas linolowy *cis*-9,*cis*-12 C18:2

Podstawowym mechanizmem powstawania CLA jest bakteryjna biohydrogenacja kwasu linolowego zachodząca w żwaczu zwierząt przeżuwających oraz w mniejszym stopniu w jelicie grubym zwierząt monogastrycznych. Dieny te powstają również z kwasu wakcenenowego ϵ 11 C18:1 w tkankach tłuszczowych ssaków i gruczole mlekowym przy udziale enzymu delta-9-desaturazy. Ich źródłem może być również proces termicznego przetwarzania żywności oraz katalicznego wodorownia olejów roślinnych, stosowanego w przemyśle tłuszczowym.

I. Synteza metodą alkalicznej izomeryzacji i kompleksowania z mocznika

Celem badań była synteza sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA) w wyniku zastosowania procesu alkalicznej izomeryzacji w środowisku KOH oraz kompleksowania z mocznika. Jako substrat do syntezy CLA użyto oleje winogronowy i makowy, zawierające odpowiednio ok. 69 i 74% kwasu linolowego.

Najważniejsze wnioski

- W wyniku procesu alkalicznej izomeryzacji z kwasu linolowego zsyntetyzowano jego sprzężone dieny o konfiguracji *cis-9,trans-11*, *trans-10,cis-12* oraz *cis-11,trans-13* w ilości ok. 66-70%.
- Zastosowanie procesu kompleksowania z mocznika zwiększyło koncentrację CLA w końcowym produkcie do ok. 76-82%.

II. Synteza z wykorzystaniem katalizatora tlenkowego

Niekorzystne zjawisko biouwodowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu przeżuwaczy można ograniczyć poprzez skarmianie tłuszczów chronionych „by-pass fat”. Sole wapniowe kwasów tłuszczowych można otrzymywać metodą podwójnej wymiany w reakcji soli sodowej kwasu tłuszczowego z solą wapnia np. chlorkiem wapnia, bądź w bezpośredniej reakcji WKT-CLA z wodnym roztworem tlenku wapnia.

Celem przeprowadzonych badań było otrzymanie soli wapniowych izomerów CLA (Ca-CLA) w jednostopniowej reakcji izomeryzacji kwasu linolowego z wykorzystaniem katalizatora tlenkowego (CaO) w środowisku bezwodnym (glikolu etylenowego lub gliceryny).

Najważniejsze wnioski

- Reakcja izomeryzacji kwasu linolowego, związanego w triacyloglicerolu, prowadzona wobec tlenku wapnia przebiegała z dużo niższą wydajnością niż alkaliczna izomeryzacja wobec wodorotlenku potasu.
- W wyniku procesu izomeryzacji olejów roślinnych wobec tlenku wapnia jako katalizatora otrzymano sole wapniowe CLA w ilości od 1.5 do 5.5%.
- Większą ilość izomerów CaCLA zsyntetyzowano prowadząc proces w środowisku glikolu etylenowego niż gliceryny.
- Ograniczenie warunków prowadzenia reakcji do pojedynczego etapu obniżyło koszty i czas syntezy CLA, natomiast zastosowanie procesu dwuetapowego pozwoliło na uzyskanie preparatu o znacznie wyższej zawartości CaCLA.

Badania zrealizowano w ramach projektów KBN 3 T09B 059 26 i 3 T09B 130 29⁹ oraz projektu rozwojowego MNiSW nr R 050 54 02⁹ i przedstawiono w formie prac (II.A.4, II.A.9, II.D-II.44, II.D-II.45, II.D-II.51)⁸ oraz doniesień konferencyjnych (III.B.62, III.B.64)⁸.

5.2.2.4 Wzbogacanie tłuszczu mlecznego w izomery kwasu linolowego i oleinowego

Celem badań było zwiększenie koncentracji sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA) i kwasu wakcenenowego (VA) w owozym tłuszczu mlecznym w wyniku usunięcia z niego kwasów tłuszczowych nasyconych.

I. Proces kompleksowania z mocznika i ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla

- W wyniku procesu kompleksowania z mocznika i ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla w tłuszczu mlecznym ok. 10-krotnie wzrosła koncentracja CLA i VA.
- W procesie krystalizacji jako rozpuszczalnik organiczny stosowany może być węglowodór alifatyczny, alkohol alifatyczny lub ich mieszanina. Najlepsze efekty uzyskano przy mieszaninie alkoholu etylowego i metylowego.
- Dla większej efektywności procesu korzystniejsze jest zastosowanie dwustopniowej niż jednostopniowej krystalizacji kwasów tłuszczowych z roztworu zawierającego mocznik.
- Przed poddaniem filtratu ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla należy najpierw usunąć rozpuszczalnik, natomiast proces ekstrakcji najlepiej prowadzić w temp. 40-75°C i pod ciśnieniem dwutlenku węgla 15-20 MPa.

- Tylko zachowanie powyższej kolejności tj. najpierw krystalizacji z zastosowaniem mocznika, a następnie ekstrakcji w warunkach nadkrytycznych zapewnia efektywne rozdzielanie mieszaniny naturalnych kwasów tłuszczowych i wzbogacenie tłuszczu w CLA i VA.

Na opracowany sposób wydzielania z naturalnych kwasów tłuszczowych frakcji bogatej w izomery kwasu linolowego ze sprzężonymi podwójnymi wiązaniami i kwasu oleinowego w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej przyznany został **patent** PL 195040.⁹

II. Proces kompleksowania z mocznika i krystalizacji niskotemperaturowej

- W wyniku procesu kompleksowania z mocznika i krystalizacji niskotemperaturowej w tłuszczu mleka ok. 9-krotnie wzrosła zawartość izomeru *c9,t11* C18:2 oraz ok. 8-krotnie *t11* C18:1.
- W uzyskanym preparacie lipidowym ponad 10-krotnie spadła zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych, głównie kwasu palmitynowego i stearynowego.
- W trakcie wzbogacania tłuszczu mleka przedstawioną metodą nie stosowano procesów wpływających na strukturę chemiczną związków wyjściowych.

Wyniki dotyczące przedstawionej tematyki badawczej opublikowane zostały w formie prac (II.A.1.1, II.D-II.39, II.D-II.45) oraz doniesień konferencyjnych (III.B.15, III.B.50, III.B.71, III.B.76).⁸ Badania zrealizowano w ramach projektu KBN 3 T09B 059 26 oraz projektu rozwojowego MNiSW nr R 05 054 02.⁹

5.2.2.5 Opracowanie sposobu wydzielania peptydów oraz ich częściowej lub całkowitej hydrolizy do aktywnych fragmentów - biopeptydów

Coraz częściej białka oprócz swojej podstawowej roli tj. odżywczej i budulcowej postrzegane są również jako potencjalne źródło prekursorów biologicznie aktywnych peptydów - biopeptydów. Fragmenty białek nieaktywne w sekwencjach swoich prekursorów, po uwolnieniu przez enzymy proteolityczne mogą oddziaływać z odpowiednimi receptorami oraz regulować fizjologiczne funkcje organizmu.

Wysoką aktywnością biologiczną charakteryzują się peptydy białek mleka. W sekwencjach kazeiny zidentyfikowano kilkadziesiąt fragmentów odpowiadających różnym bioaktywnym peptydom, w tym najwięcej o aktywności przeciwnadciśnieniowej, opioidowej, antyoksydacyjnej i przeciwzakrzepowej. Białka serwatkowe zawierają sekwencje odpowiadające m.in. aktywności obniżającej ciśnienie krwi, regulującej przepływ jonów oraz immunomodulującej. Również białka roślinne, w szczególności nasion i zielonych części roślin, mogą stanowić źródło sekwencji peptydowych o biologicznym działaniu.

I. Wydzielanie peptydów mlekowych z białek kazeinowych i serwatkowych

W wyniku degradacji białek kazeinowych i serwatkowych uwalniane są peptydy o różnej wielkości, sekwencji i aktywności. Na stopień degradacji wpływ mają warunki i czas prowadzenia procesu oraz dobór enzymów. Im wyższy stopień hydrolizy tym mniejsze właściwości alergizujące hydrolizatu oraz większy udział peptydów o sekwencjach wykazujących biologiczne funkcje.

Celem badań było otrzymanie rozpuszczalnych peptydów z mleka owczego, poprzez zastosowanie dwuetapowego procesu: enzymatycznej degradacji oraz fermentacji z udziałem drożdży *Sacharomyces cerevisiae* Anka B.

Podsumowanie

- Enzymatyczna hydroliza stanowi efektywną metodę degradacji białek do krótkich peptydów o pierwszorzędowych sekwencjach.

- W wyniku zastosowania tego procesu następuje naturalna fragmentacja w miejscach zdefiniowanych dla zastosowanego enzymu.
- Uwalnianiu peptydów z białek kazeinowych towarzyszy wzrost stężenia wolnych aminokwasów nadających produktowi nieprzyjemny gorzko-metaliczny smak.
- Zastosowanie fermentacji drożdżowej pozwala na eliminację gorzkich składników hydrolizatu poenzymatycznego i wzrost wydajności procesu.
- W przypadku serwatki proces enzymatycznej hydrolizy można zastąpić procesem fermentacji prowadzącym do produktów o średniej wielkości peptydów, podobnej do zawartych w produktach pochodzących z hydrolizy enzymatycznej z następczą fermentacją.

II. Wydzielanie peptydów roślinnych

Współwystępowanie różnych komponentów oraz różna procentowa zawartość białka, wymagają różnego postępowania przy izolowaniu peptydów z nasion i zielonych części roślin. Nasiona roślin z rodziny *Brassicaceae* zawierają niewielką ilość białka o wysokiej aktywności biologicznej oraz znaczną ilość glukozynolanów, z których powstają reaktywne i ostre w smaku produkty rozkładu, mogące dezaktywować enzymy hydrolizujące. Z kolei liście szpinaku i trawy, charakteryzują się wysoką zawartością białka biorącego udział w procesie fotosyntezy, które jednak trudno poddaje się enzymatycznej hydrolizie pepsyną.

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie sposobu otrzymywania rozpuszczalnych peptydów z nasion i zielonych części roślin.

Podsumowanie

- Przy użyciu pepsyny opracowano zmodyfikowany sposób wydzielenia peptydów z nasion roślin.
- W wyniku zastosowania tego procesu z nasion rzepaku i gorzycy uzyskano frakcje zawierające odpowiednio ok. 80 i 85% peptydów.
- W przypadku zielonych części roślin do ekstrakcji wybrano octan etylu, a z enzymów pankreatynę.
- W wyniku tego procesu z liści szpinaku uzyskano ok. 80% peptydów rozpuszczalnych w wodzie, natomiast z trawy ok. 65% peptydów.

Sposób wydzielenia z białek zwierzęcych i roślinnych peptydów oraz ich częściowej lub całkowitej hydrolizy do aktywnych fragmentów biopeptydów i aminokwasów opracowano w ramach projektu rozwojowego NCBiR NR05-0002-10/2011⁹ i opublikowano w formie doniesienia (III.B.101)⁸.

5.3. OPRACOWANIE KOMPOZYCJI NATURALNYCH BIOAKTYWNYCH KOMPLEKSÓW POD KĄTEM MOŻLIWOŚCI ICH ZASTOSOWANIA W PROFILAKTYCE I TERAPII CHOROÓB „CYWILIZACYJNYCH”

5.3.1. Opracowanie kompozycji naturalnych bioaktywnych kompleksów lipidowych (BKL_n) jako nutraceutyków w profilaktyce i terapii chorób układu krążenia i chorób nowotworowych

Kwasy tłuszczowe, pochodzące ze spożywanych tłuszczów, stanowią jeden z ważniejszych elementów niezbędnych dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu. Obok podstawowego źródła energii, pełnią one ważną funkcję jako elementy strukturalne błon komórkowych oraz jako inhibitory i aktywatory przemian metabolicznych.

Organizm człowieka w niewielkim stopniu jest w stanie sam syntetyzować kwasy tłuszczowe z rodziny ω -3, dlatego muszą być one dostarczane wraz z dietą. Poprzez obniżenie poziomu trójglicerydów oraz cholesterolu całkowitego i frakcji LDL, ciśnienia krwi oraz zmniejszenie jej krzepnięcie, kwasy te wykazują korzystny wpływ na układ krążenia. Korzystne właściwości m. in. antymiażdżycowe i antykancerogenne wykazują również sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA).

Celem przeprowadzonych badań było wzbogacenie preparatów lipidowych w aktywne biologicznie kwasy tłuszczowe i opracowanie na ich bazie bioaktywnych kompleksów lipidowych (BKL_n) oraz ocena ich aktywności w obniżaniu wskaźników lipidowych krwi i ograniczaniu niekorzystnych zmian w mięśniu sercowym (badania na szczurach) oraz hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych (badania *in vitro* na liniach raka okrężnicy, piersi, płuc, białaczki promielocytarnej, czerniaka).

Oceniono aktywność następujących preparatów: wzbogaconego oleju rybnego (ok. 19% EPA i 52% DHA), izomeryzowanego oleju z winogron (ok. 72% CLA), wzbogaconego tłuszczu mleka owczego (ok. 17% CLA i 23% VA) oraz bioaktywnych kompleksów lipidowych: BKL₁ (ok. 36% CLA i 35% EPA + DHA) i BKL₂ (ok. 35% EPA i DHA oraz 8.5% CLA i 11% VA).

Podsumowanie

- Dieta wysokotłuszczowa, bogata w kwasy tłuszczowe nasycone, miała niekorzystny wpływ na wartość parametrów gospodarki lipidowej krwi oraz wskaźniki morfometryczne serca.
- W wyniku zastosowania preparatów lipidowych w krwi obniżył się poziom trójglicerydów od 12 do 40%, cholesterolu całkowitego od 16 do 26% i chol-LDL od 18 do 44%. Najlepsze efekty uzyskano przy bioaktywnych kompleksach lipidowych (BKL_n) oraz wzbogaconym oleju rybnym.
- Preparaty lipidowe ograniczyły wzrost grubości ścian komór serca (od 30 do 45%) i wielkości miocytów (od 25 do 35%) oraz zahamowały spadek powierzchni łożyska naczyniowego (od 20 do 50%). Kardioprotekcyjne działanie wykazały bioaktywne kompleksy lipidowe (BKL_n) oraz wzbogacony olej rybny.
- Aktywność antyproliferacyjną dla większości linii komórkowych wykazał biopreparat BKL₁, natomiast synergistyczne współdziałanie z referencyjnym cytostatykiem oprócz BKL₁ również wzbogacony w aktywne biologicznie kwasy tłuszczowe olej rybny i tłuszcz mleczny.

Na sposób otrzymywania preparatów o antynowotworowym działaniu autorzy opracowania uzyskali w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej **patent** nr PL 199216, natomiast na naturalny bioaktywny kompleks lipidowy złożony został opis **zgłoszenia patentowego** nr P 387021.⁹ Powyższe badania wyróżnione zostały także **5 nagrodami na Międzynarodowych Wystawach Wynalazczości** (Bruksela 2002 r., Malezja 2003 r., Genewa 2004 i 2009 r., Warszawa 2009 r.).⁹

Wyniki badań opublikowane zostały w formie prac (II.A.6, II.D-I.1, II.D-II.18, II.D-II.25, II.D-II.29, II.D-II.61, II.D-III.14) oraz doniesień na konferencjach zagranicznych i krajowych (III.B.21, III.B.22, III.B.25, III.B.35, III.B.41, III.B.57, III.B.78, III.B.79, III.B.82, III.B.84).⁸ Badania zrealizowano w ramach projektów KBN T09B 059 26 i MNiSW nr R0505402 oraz grantów interdyscyplinarnych nr 101/GW/00 i 101/GW/02 i badań statutowych.⁹

5.3.2 Technologia pozyskiwania bioaktywnych peptydów i tłuszczów oraz ich pochodnych jako składników aktywnych komponentów żywności funkcjonalnej

W ramach badań opracowano sposób wydzielania peptydów z białek zwierzęcych i roślinnych oraz ich częściowej lub całkowitej hydrolizy do aktywnych biopeptydów, a także pozyskiwania kwasów trinitienasyconych z olejów roślinnych oraz wzbogacania olejów rybnych w kwasy ω -3.

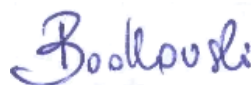
Na szczurach żywionych dietą wysokotłuszczową oceniono aktywność preparatów peptydowych i lipidowych w obniżaniu wskaźników lipidowych krwi, hamowaniu niekorzystnych zmian morfometrycznych w mięśniu sercowym i redukcji otłuszczenia. Na 5 liniach komórkowych w badaniach *in vitro* oceniono także aktywność antyproliferacyjną.

Podsumowanie:

- Poziom trójglicerydów, cholesterolu całkowitego i frakcji LDL w krwi najbardziej obniżyły wzbogacony olej rybny oraz izomeryzowany w środowisku gliceryny olej tungowy (od 12 do 36%). Spadek aterogennych frakcji lipidowych uzyskano również przy peptydach kazeinowych i serwatkowych mleka owczego po enzymatycznej hydrolizie i fermentacji drożdżowej oraz peptydach z nasion rzepaku (od 2 do 10%).
- Niekorzystne zmiany morfometryczne w mięśniu sercowym (wzrost grubości ścian obu komór serca i wielkości miocytów oraz spadek łożyska naczyniowego) najbardziej ograniczyły wzbogacony olej rybny, izomeryzowany olej z nagietka i z pestek z winogron oraz wzbogacony tłuszcz mleczny o odpowiednio: od 12 do 34% i od 6.8 do 35% oraz od 9.5 do 32%. Kardioprotekcyjnego działania nie wykazały preparaty peptydowe.
- Otłuszczenie szczurów (ilości tłuszczu okołonerkowego i najądrza) najbardziej zredukował dodatek izomeryzowanego oleju z pestek z winogron i z orzecha włoskiego (od 9 do 23%) oraz białka serwatkowe poddane procesowi fermentacji drożdżowej i frakcja peptydowa uzyskana z liści szpinaku (od 3 do 7%).
- Aktywność antyproliferacyjną, dla większości linii komórkowych, wykazał wzbogacony olej winogronowy, natomiast wobec komórek ludzkiego raka gruczołu sutkowego również peptydy kazeinowe po enzymatycznej hydrolizie i fermentacji drożdżowej.

Obecnie prowadzone są badania nad opracowaniem kompozycji bioaktywnych kompleksów aminolipidowych oraz ocenie ich aktywności. Planowane jest również opracowanie receptur komponentów żywności funkcjonalnej i nutraceutyków.

Wyniki dotyczące przedstawionej tematyki opublikowane zostały w formie oryginalnych prac (II.A.14, II.A.17) oraz doniesień na konferencjach krajowych (III.B.100, III.B.106, III.B.107).⁸ Badania realizowane są w ramach projektu rozwojowego NCBiR NR05-0002-10/2011.⁹



Wrocław, 07 stycznia 2014 r.

dr inż. Robert Bodkowski