

Załącznik nr 2

Dr inż. Magdalena Zielińska-Dawidziak

Katedra Biochemii i Analizy Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

AUTOREFERAT

PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS OSIĄGNIĘĆ I DOROBKU NAUKOWEGO

POZNAŃ 2015 r.

Magdalena Zielińska-Dawidziak

1. IMIĘ I NAZWISKO

Magdalena Zielińska-Dawidziak

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

mgr inż. technolog żywności, specjalność – biotechnologia, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, 1995;

tytuł pracy magisterskiej: *Wpływ właściwości fizykochemicznych roztworów biopolimerów na właściwości mechaniczne kapsulek do immobilizacji materiałów biologicznie aktywnych*; promotor: prof. dr hab. Tomasz Jankowski

mgr inż. biotechnolog, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska, 1996

tytuł pracy magisterskiej: *Produkcja i identyfikacja hybrydomy wyprowadzonej z dwóch ludzkich limfoblastycznych linii komórkowych*; promotor: prof. dr hab. Piotr Kuśnierczyk

dr inż. nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, 2003;

tytuł pracy doktorskiej: *Separacja ferrytyny z *Lupinus luteus* metodą wodnej ekstrakcji dwufazowej*; promotor: prof. dr hab. Tomasz Jankowski

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU

1997-1998 – Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Lesznie;

1998-2003 – Dienne Studium Doktoranckie na Wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu;

01.10.2004 - obecnie – adiunkt, Katedra Biochemii i Analizy Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (do 2007 roku Akademia Rolnicza w Poznaniu);

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Magdalena Zielińska-Dawidziak

Zastosowanie jadalnych kiełków o podwyższonej zawartości ferrytyny roślinnej jako źródła żelaza do wzbogacania żywności

tworzy cykl sześciu prac (pięciu publikacji i patentu):

- 1. Zielińska-Dawidziak M.** (2015) *Plant ferritin — a source of iron to prevent its deficiency*. *Nutrients* 7(2): 1184–1201
IF₂₀₁₄ = 3,27, MNiSW = 30
- 2. Zielińska-Dawidziak M., Twardowski T.** (2015) *Sposób wytwarzania kompozycji o podwyższonej zawartości ferrytyny roślinnej i innych form żelaza, kompozycja i jej zastosowanie do wytwarzania preparatu do suplementowania diety człowieka*. Patent PL 218747
Udział: 90%, IF = 0, MNiSW = 25
- 3. Zielińska-Dawidziak M., Hertig I., Piasecka-Kwiatkowska D., Staniek H., Nowak K.W., Twardowski T.** (2012) *Study on iron availability from prepared soybean sprouts using an iron-deficient rat model*. *Food Chemistry* 135(4):2622-2627
Udział: 55%, IF₂₀₁₂ = 3,33, MNiSW = 40
- 4. Zielińska-Dawidziak M., Hertig I., Staniek H., Piasecka-Kwiatkowska D., Nowak K.W.** (2014) *Effect of iron status in rats on the absorption of metal ions from plant ferritin*. *Plant Foods for Human Nutrition* 69:101–107 (**IF 2,42**)
Udział: 55%, IF₂₀₁₄ = 1,98, MNiSW = 35
- 5. Zielińska-Dawidziak M., Siger A.** (2012) *Effect of elevated accumulation of iron in ferritin on the antioxidant content in soybean sprouts*. *European Food Research and Technology*, 234: 1005-1012.
Udział: 70%, IF₂₀₁₂ = 1,44, MNiSW = 25

- 6. Zielińska-Dawidziak M.,** Piasecka-Kwiatkowska D., Warchalewski J.R., Makowska A., Gawlak M., Nawrot J. (2014). *Sprouted wheat grain with ferritin overexpression as a potential source of iron for cereal product fortification.* European Food Research and Technology 238:829-835 (**IF 1.39**)
Udział: 51%, $IF_{2014} = 1,56$, MNiSW = 25

Sumaryczny **IF 11,58**, ogółem punkty **MNiSW 180**, punkty MNiSW z uwzględnieniem udziału procentowego autora: **124**.

Punkty za publikacje naliczono zgodnie z komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 31.12.2014 w sprawie wykazu czasopism naukowych, z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach oraz, w przypadku patentu, zgodnie z Dziennikiem Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej, poz. 877 Rozporządzenie MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r. (str. 27). Sumaryczny impact factor obliczono, sumując współczynniki z roku wydania publikacji.

Wkład wnioskodawcy w ww. publikacje obejmuje: autorstwo hipotez i koncepcji badań, udział w zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, analizę i opracowanie wyników, wyciągnięcie wniosków, napisanie i redakcję manuskryptów (załączono oświadczenia współautorów).

b) omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Niedobór żelaza (ID) jest obecnie najczęściej występującą na świecie formą niedożywienia. Uważa się, że nawet łagodny i średni poziom niedoboru żelaza, kiedy nie obserwuje się jeszcze rozwoju anemii, prowadzi do poważnych, niekorzystnych konsekwencji, takich jak: (1) zahamowanie rozwoju funkcji kognitywnych i behawioralnych u niemowląt, małych dzieci i dzieci w wieku szkolnym, (2) ograniczenie odporności i zwiększenie śmiertelności z powodu infekcji we wszystkich grupach wiekowych, (3) zmniejszenie wykorzystania źródeł energii przez mięśnie, wywołujące obniżenie wydolności fizycznej oraz wydajności u młodzieży i osób dorosłych, (4) zwiększenie stopnia ryzyka wystąpienia okołoporodowych powikłań u matek i noworodków oraz śmiertelności niemowląt (WHO/UNICEF/UNU, 2001).

Skala problemu jest na tyle poważna, że od lat rozważane są gospodarcze konsekwencje niedoborów żelaza i rozwijane interwencyjne strategie jego zwalczania,

z zaangażowaniem Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), Funduszu Narodów Zjednoczonych na Rzecz Dzieci (UNICEF) oraz władz poszczególnych państw. Problem ID dotyka ludność całego świata, jednak przede wszystkim kobiety i dzieci. W krajach rozwijających się wg szacunków WHO 39% dzieci młodszych niż 5 lat, 48% dzieci w wieku 5-14 lat i 42% wszystkich kobiet cierpi na anemię, z tego połowa na anemię z niedoborów żelaza (IDA), a częstość występowania ID może być nawet 2,5 razy częstsza niż IDA (*WHO/UNICEF/UNU, 2001; DeMaeyer i Adiels-Tegman, 1985*).

ID jest także powszechny w krajach uprzemysłowionych. Dotyka 9-11% niebędących w ciąży kobiet w wieku 16-49 lat w USA, 21% nastolatek i 18% kobiet w wieku 16-64 lat w Wielkiej Brytanii (*Heath i Fairweather-Tait, 2002*). Natomiast dane dotyczące dzieci informują o 29% dzieci w wieku poniżej 2 lat z rozpoznanymi niedoborami żelaza we Francji (*Hercberg i in., 2001*). W krajach uprzemysłowionych zdecydowanie niższy jest odsetek notowanej anemii z niedoborów żelaza w stosunku do rozpoznanych przypadków niedoboru żelaza (*WHO, 2007*).

Z tego względu wśród sześciu globalnych celów przyjętych przez WHO do realizacji do 2025 roku (*WHO programmes*) wskazana jest 50% redukcja przypadków anemii z niedoborów żelaza wśród kobiet w wieku reprodukcyjnym, ponieważ przede wszystkim ta część populacji jest istotnie zagrożona występowaniem IDA. Jednocześnie oczywista jest korelacja pomiędzy niedoborami żelaza w tej grupie i wśród noworodków czy niemowląt karmionych piersią.

Analizując skuteczność wprowadzanych programów interwencyjnych, stwierdzono, że najbardziej efektywną metodą prewencji ID, biorąc pod uwagę osiągnięte rezultaty w stosunku do poniesionych kosztów, jest nie suplementacja diety, lecz fortyfikacja (wzbogacanie) żywności (*WHO, 2001*).

Wyróżnia się dwie zasadnicze strategie fortyfikacji żywności, czyli: 1) wprowadzanie do żywności substancji chemicznych stosowanych często również jako farmaceutyczne suplementy lub 2) poprzez biofortyfikację roślin jadalnych.

Substancje stosowane najczęściej do wzbogacania żywności w żelazo należą do trzech podstawowych grup:

- soli żelaza rozpuszczalnych w wodzie (np. siarczan, glukonian, mleczan żelaza (II), żelaza (III) cytrynian amonu),
- soli żelaza nierozpuszczalnych w wodzie, lecz w rozcieńczonych kwasach (np. fumaran, bursztynian czy sacharynian żelaza),

- substancji nierozpuszczalnych w wodzie i słabo rozpuszczalnych w rozcieńczonych kwasach (np. różne formy żelaza elementarnego – zredukowane, atomowe, czy fosforany Fe(II)).

Prawodawstwo Unii Europejskiej ogranicza dla tych związków dawki, jakie mogą zostać wprowadzone do żywności (EC, 2002), dzięki czemu konsumentom trudniej jest przedawkować żelazo, spożywając fortyfikowane w ten sposób produkty, niż podczas stosowania suplementacji. Jednocześnie, ponieważ żelazo wprowadzane jest do organizmu jako składnik diety, maleje częstość występowania skutków ubocznych, takich jak nudności, bóle brzucha czy biegunki.

Wzbogacana w ten sposób żywność nie zawsze jest jednak akceptowana przez konsumentów, ze względu na wyczuwalne zmiany organoleptyczne, takie jak zmiana barwy czy metaliczny posmak, a przede wszystkim szybkie jęczenie produktów, będące konsekwencją prooksydacyjnego działania żelaza. Producenci żywności ograniczają występowanie tych niepożądanych zmian, kapsułkując preparaty żelaza przed wprowadzaniem ich do żywności.

Drugą strategią fortyfikacji żywności w żelazo jest stosowanie do jej produkcji biofortyfikowanych roślin jadalnych, co może być osiągnięte zarówno poprzez wykorzystanie metod inżynierii genetycznej, jak i naturalnych metod hodowlanych. Najczęściej stosowanym kierunkiem biofortyfikacji roślin jest wzbogacanie ich w ferrytynę roślinną.

Ferrytyna jest białkiem występującym powszechnie w organizmach żywych. Pełni w nich funkcję magazynu żelaza, uczestnicząc w regulacji wewnątrzkomórkowego i tkankowego poziomu żelaza. Jednocześnie uczestniczy w procesach detoksykacji i obrony przed stresem oksydacyjnym. Z punktu widzenia żywieniowego jest to niezwykle interesujące białko. Przede wszystkim zdolność wiązania żelaza przez ferrytynę przewyższa wielokrotnie zdolność innych znanych chelatorów: białkowa muszla apoferrytyny może otaczać nawet do 4500 jonów żelaza (III), chociaż zazwyczaj jedna cząsteczka zawiera w mineralnym rdzeniu mniej niż 3000 jego jonów (Harrison, 1986).

Wprawdzie nie do końca wyjaśniona jest stabilność ferrytyny w przewodzie pokarmowym człowieka, jednak badania prowadzone *in vivo* potwierdzają dobrą przyswajalność żelaza z ferrytyny, niezależną od absorpcji innych form żelaza występujących w diecie. Wyniki doświadczeń *in vivo* dowodzą, że ferrytyna roślinna

może przetrwać nienaruszona proces trawienia w organizmie człowieka, a wówczas jej wchłanianie będzie niezależne od transportera DMT1 i zachodzić będzie na drodze endocytozy zależnej od aktywności podjednostki *mu* w kompleksie 2 (San Martin i in., 2008; Theil i in. 2012).

Z powodu tak unikalnych cech tego białka, obserwuje się rosnące zainteresowanie możliwościami jego wykorzystania do celów żywieniowych. Niestety zawartość ferrytyny w jadalnych częściach roślin jest niewielka, stąd trudno jest tak zwiększyć podaż naturalnych źródeł ferrytyny, aby uzyskać efekt znoszenia niedoborów żelaza.

Dlatego szeroko prowadzone są obecnie badania nad biofortyfikacją jadalnych roślin w ferrytynę. Najczęściej modyfikowany metodami genetycznymi jest ryż, w którym wywoływana jest nadekspresja ferrytyny sojowej. Niestety wydajna ekspresja ferrytyny w ryżu nie gwarantuje jak dotąd osiągnięcia pożądanego z punktu widzenia żywieniowego efektów. Ferrytyna kumuluje się bowiem przede wszystkim w łusce, a więc znaczne jej ilości są usuwane podczas obłuszczania i polerowania ryżu. Ponadto wzrost stężenia ferrytyny w surowcu nie oznacza istotnego zwiększenia w nim zawartości żelaza, ponieważ, jak już wspomniano, zawartość żelaza w mineralnym rdzeniu tego białka jest zmienna. Stąd, nawet jeżeli trzynastokrotnie zwiększono ekspresję ferrytyny, zawartość żelaza w otrzymanym transgenicznym ryżu wzrosła jedynie o 30% (Qu i in., 2005). Te same problemy zaobserwowano podczas modyfikacji innych roślin, np. kukurydzy, pszenicy czy sałaty (Kanobe i in., 2013; Borg i in., 2012).

Wykorzystywanie zmodyfikowanych genetycznie (GM) roślin wiąże się, poza dotąd już wymienionymi, z dodatkowymi trudnościami, przede wszystkim brakiem akceptacji przez konsumentów (ze względu na obawy związane z żywnością GM i jej ceną), a także hodowców (rośliny te mogą być zdegenerowane, przebarwione) czy prawodawstwem poszczególnych krajów dopuszczających, lub nie, żywność GM do obrotu. Stąd nadal atrakcyjniejsze z punktu widzenia zwiększenia zawartości żelaza ferrytynowego w diecie człowieka wydaje się pozyskanie odmian metodami naturalnej selekcji, czy wykorzystując zwiększanie zawartości żelaza w jadalnych częściach poprzez stosowanie odpowiedniego nawożenia i nadekspresję natywnych genów.

Stosowanie specjalnie skomponowanych nawozów od zawsze było najłatwiejszą metodą fortyfikowania roślin w mikroelementy. Niestety rośliny nawożone związkami żelaza też podlegają silnej degeneracji, w konsekwencji występującego stresu abiotycznego. Są mniejsze, poskręcane i przebarwione, a więc nieatrakcyjne dla potencjalnych konsumentów. Ponadto zależność pomiędzy dawkami żelaza wprowadzanymi do gleby a stężeniem żelaza w jadalnych częściach roślin (nasionach, ziarniakach, liściach i owocach) daleka jest od liniowej, co przy obniżonym plonowaniu istotnie wpływa na zwiększenie ceny pozyskiwanych surowców.

Z dostępnych danych literaturowych wiadomo, że ferrytyna roślinna jest dobrym źródłem żelaza w diecie człowieka, w tym szczególnie dla osób z problemami związanymi z absorpcją żelaza z diety, co przyjęto jako tezę badawczą w prezentowanej pracy. Jak dotąd, ze względu na przedstawione problemy związane z otrzymaniem dobrego źródła wypełnionej żelazem fitoferrytyny, kliniczne badania nad jej absorpcją z diety w organizmie człowieka prowadzono z wykorzystaniem natywnych źródeł ferrytyny, tj. przede wszystkim nasion soi. Jednak nasiona roślin strączkowych, pomimo że są uznawane za bardzo dobre źródło ferrytyny roślinnej, zawierają średnio 50-70 mg ferrytyny i około 10 mg żelaza w kg s. m. Taka zawartość żelaza jest niewystarczająca, aby skutecznie fortyfikować żywność w celu znoszenia efektów ID i IDA.

Celem przedstawianej pracy było otrzymanie metodami hodowlanymi wydajnego źródła ferrytyny roślinnej przeznaczonej na cele żywienia człowieka. Realizacja tego celu obejmowała przeprowadzenie następujących doświadczeń:

1. Opracowanie warunków hodowli kiełków roślinnych w pożywkach zawierających podwyższony poziom żelaza oraz ich dalszej obróbki w celu otrzymania wydajnego i stabilnego surowca, przeznaczonego do suplementacji żelaza w diecie człowieka
2. Porównanie efektów suplementacji diety przygotowanym preparatem i preparatem farmaceutycznym w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem modelu anemizowanych szczurów.
3. Zbadanie bezpieczeństwa podaży wielokrotnie wyższych niż dotąd stosowanych dawek preparatu wzbogaconego w ferrytynę roślinną i żelazo

ferrytynowe w badaniach *in vivo* prowadzonych na zwierzętach o prawidłowym i zaburzonym statusie żelaza.

4. Analiza zawartości w otrzymanym preparacie innych substancji o aktywności przeciwutleniającej, które dodatkowo mogą przyczyniać się do ograniczenia ubocznych skutków fortyfikacji żywności związanych z prooksydacyjnym działaniem żelaza.
5. Zbadanie możliwości wykorzystania innych niż rośliny strączkowe surowców do otrzymywania proponowanego preparatu.

Realizacja przedstawionych celów pracy badawczej pozwolić miała na weryfikację następujących hipotez:

- Hodowla w roztworach siarczanu żelaza (II) pozwala na otrzymywanie kiełków roślin jadalnych, które mogą zostać wykorzystane do fortyfikacji żywności lub konstruowania suplementów żelaza.
- Preparat otrzymanych kiełków skutecznie wpływa na znoszenie anemii z niedoborów żelaza.
- Wydajność absorpcji żelaza kompleksowanego przez fitoferrytynę organizmach zwierzęcych zależy od ich aktualnego statusu żelaza.
- Proponowany preparat zawiera inne cenne z punktu żywieniowego substancje, np. przeciwutleniacze, co podnosi jego wartość w porównaniu do izolatów ferrytyny.

Większość koncepcji stanowiących wprowadzenie do sformułowania przyjętych celów i hipotez badawczych zaprezentowano w pierwszej pracy zgłaszanej jako osiągnięcie naukowe: Zielińska-Dawidziak M. (2015) *Plant ferritin - a source of iron to prevent its deficiency*. *Nutrients* 7(2): 1184–1201.

Ad.1.

Kiełki i siewki są od wielu lat składnikiem diety człowieka, przede wszystkim w krajach azjatyckich. Od lat uznawane są za źródło cennych składników odżywczych, mikroelementów, witamin, kwasów tłuszczowych, peptydów i wielu związków o charakterze przeciwutleniającym, które są szczególnie wydajnie syntezowane podczas pierwszych etapów wzrostu roślin. Wiadomo również, że poprzez dobór

odpowiednich warunków podczas rozwoju roślin, można uruchomić w ich komórkach procesy obronne wpływające na skład chemiczny otrzymywanych kielków. Jednocześnie zwiększenie zawartości składników mineralnych w podłożu wzrostowym powoduje wzrost zawartości tych składników w roślinach. Udowodniono także, że podczas kiełkowania np. łubinu (*Lupinus luteus*) istotnie w otrzymanych kielkach wzrasta zawartość żelaza, przede wszystkim związanego w apoferrytynie. Ponadto potwierdzono, że izolat tego białka otrzymany poprzez wykorzystanie procesów ekstrakcji i wysalania jest równie skuteczny, jak standardowy preparat farmaceutyczny (FeSO_4). Podczas suplementacji anemizowanych szczurów obserwowano podniesienie stężenia hemoglobiny we krwi w tym samym czasie, co podczas podawania siarczanu żelaza, do poziomu notowanego u zwierząt zdrowych, tworzących grupę kontrolną (Twardowski i Smól, 2002).

Izolacja ferrytyny ze skielkowanego łubinu jest jednak dość czaso- i kosztochłonna, a izolat przygotowywany podczas tego procesu pozbawiany jest wielu substancji korzystnych dla zdrowia człowieka, zamiast których do diety wprowadzane są wysokie stężenia soli.

Jednocześnie stosowanie świeżych, skielkowanych nasion roślin strączkowych ogranicza zakres ich stosowania w przemyśle spożywczym. Krótki jest termin ich przydatności do spożycia i duża podatność na zakażenie mikrobiologiczne.

Dlatego opracowano warunki kiełkowania nasion i ziarniaków oraz ich utrwalania, aby możliwe było otrzymanie preparatu wzbogaconego w żelazo ferrytynowe o podwyższonej przydatności do produkcji suplementów diety i żywności wzbogaconej w żelazo.

Jadalne kielki roślin strączkowych wzbogaconych w fitoferrytynę i inne związki żelaza można otrzymać podczas kilkudniowego wzrostu roślin na pożywce wzbogaconej w FeSO_4 , który jest substancją tradycyjnie stosowaną do nawożenia roślin, w tym jadalnych, także w uprawach hydroponicznych. Stężenie siarczanu żelaza w pożywce powinno być dostosowane do rodzaju, gatunku i odmiany rośliny, ze względu na różną tolerancję na obecność tego toksycznego metalu w pożywce, przy czym wśród badanych roślin największą tolerancję wykazywały nasiona łubinu i soi (25 mM FeSO_4). Rośliny wydajnie kumulują żelazo w czasie 7-dniowej hodowli, podczas której podlewane są pożywkami zawierającymi Fe(II). W ten sposób mogą być pobudzane do syntezy ferrytyny rośliny strączkowe, krzyżowe czy zbożowe, jednak zgodnie z przeprowadzonymi obserwacjami korzystne jest stosowanie nasion

roślin motylkowych. Otrzymywany w ten sposób preparat (nazywany też kompozycją) zawierał wielokrotnie więcej żelaza całkowitego (od 10- do ponad 380-krotnie), w zależności od rodziny, rodzaju, gatunku i odmiany rośliny oraz stosowanych warunków hodowli (przede wszystkim stężenia FeSO_4 w pożywce, ale także zmienności surowca).

Ze względu na udowodnioną stabilność ferrytyny w temperaturze do 80°C , niskotemperaturowe suszenie kielków po ich hodowli, a następnie ich mielenie pozwoliło na przygotowanie preparatu wzbogaconego w żelazo ferrytynowe o znacznie korzystniejszych cechach z punktu widzenia przechowalności. Aktywność wody obniżano, w zależności od rodzaju botanicznego, do poziomu wskazywanego jako optymalny do przechowywania surowców, tj. suchych ziarniaków lub nasion. Uzyskany preparat jest dzięki temu także korzystniejszy w dozowaniu niż świeże kielki. Może być również zastosowany do przygotowania izolatów ferrytyny.

Kielki, które można przygotować zgodnie z opatentowanym sposobem, proponuje się jako składnik do produkcji zarówno suplementów farmaceutycznych, jak i żywności funkcjonalnej (przede wszystkim do produktów przetwórstwa zbóż, koncentratów spożywczych, przemysłu owocowo-warzywnego).

Zaprezentowane wyniki zawarte zostały w opisie patentowym, który stanowi część wskazywanego osiągnięcia naukowego.

Zielińska-Dawidziak M., Twardowski T. (2015) Sposób wytwarzania kompozycji o podwyższonej zawartości ferrytyny roślinnej i innych form żelaza, kompozycja i jej zastosowanie do wytwarzania preparatu do suplementowania diety człowieka. Patent PL 218747

Ad.2.

Podczas kiełkowania znacznie wzrasta biodostępność składników odżywczych, ale nie następuje całkowita degradacja substancji antyżywnościowych. Stąd wprowadzenie do diety człowieka czy zwierząt laboratoryjnych całych, nieprzetworzonych kielków zamiast oczyszczonej ferrytyny roślinnej, może spowodować jednoczesne wprowadzenie składników pokarmowych ograniczających przyswajanie żelaza, które uprzednio były usuwane podczas przygotowywania izolatów białka (inne związki

mineralne, polifenole, błonnik pokarmowy). Komórki roślinne zawierają przy tym różne związki żelaza, o odmiennej przyswajalności.

Stąd podjęto próbę zastosowania utrwalonych w procesie niskotemperaturowego suszenia kielków roślinnych jako składnika diety anemizowanych szczurów w celu zbadania skuteczności ich podawania na wzrost stężenia hemoglobiny w krwi tych zwierząt oraz innych parametrów świadczących o ich prawidłowym statusie zdrowotnym.

Ze względu na powszechną akceptację Polaków dla nasion soi w diecie, a niewielkie zastosowanie produktów otrzymywanych z nasion łubinu, do omawianego doświadczenia jako źródło ferrytyny wybrano skiełkowane nasiona soi. Szczury laboratoryjne (samce rasy Wistar, o masie $180 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$) poddano 8-tygodniowej anemizacji, stosując metodę ograniczenia w diecie zawartości żelaza, uzyskując w tym okresie spadek średniego stężenia hemoglobiny (HGB) o 25% w porównaniu do grupy kontrolnej (czyli zwierząt spożywających dietę zgodną ze standardem AIN). Następnie zwierzęta z wywołaną anemią zostały podzielone na trzy grupy i suplementowane trzema źródłami żelaza. Pierwszej grupie podawano kielki sojowe przygotowane zgodnie z zaprezentowaną procedurą, drugiej izolat ferrytyny, a trzeciej standardowo stosowany preparat farmaceutyczny (FeSO_4). Podaż żelaza w każdej grupie ustalono na poziomie około 24 mg/kg, a więc i tak niższym, niż wymagany w standardzie AIN. Podczas dwutygodniowej suplementacji omawianymi źródłami żelaza poziom hemoglobiny wzrósł istotnie statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej (tj. spożywającej dietę eliminującą żelazo do końca trwania doświadczenia), odpowiednio o 22% po spożywaniu diety z kielkami sojowymi, 24% z izolat białkowym oraz 23% z FeSO_4 . Jednocześnie stwierdzono, że zwierzęta chętniej spożywały dietę wzbogaconą w kielki zawierające ferrytynę niż w izolat. Status zdrowotny zwierząt spożywających kielki nie różnił się statystycznie istotnie od statusu zwierząt suplementowanych FeSO_4 , a przy tym był zdecydowanie lepszy (na podstawie analizy przyrostu masy oraz subiektywnej oceny zachowania zwierząt) niż osobników, którym podawano izolat ferrytyny, co należy tłumaczyć wzrostem zawartości soli w diecie wzbogaconej w izolat ferrytyny.

Na korzyść stosowania kielków wzbogaconych w ferrytynę w stosunku do przygotowanego metodą wysalania izolatu białkowego świadczyć może także inny parametr morfologiczny, czyli obniżanie stężenia hematokrytu po spożywaniu diety

z izolatem, a więc zawierającej więcej jonów sodu i siarczanu amonu. Efektu tego nie obserwowano podczas podawania diety zawierającej kiełki.

Stan podstawowych narządów wewnętrznych zwierząt suplementowanych kiełkami bogatymi w ferrytynę był prawidłowy. Odnotowano także prawidłowe przyrosty masy ciała u badanych zwierząt, porównywalne z przyrostami w grupie suplementowanej siarczanem żelaza, co sugeruje dobrą ogólną przyswajalność składników diety.

Zaobserwowano jednocześnie efekt korzystny z punktu widzenia odbudowywania zapasów żelaza w organizmach anemizowanych zwierząt po podaniu kiełków wzbogaconych w ferrytynę. Oznaczony poziom szczurzej ferrytyny zarówno w surowicy krwi (2,62 µg/ml) jak i w wątrobie (15,84 µg/ml) był istotnie statystycznie wyższy niż po podaniu FeSO₄ (odpowiednio 2,24 µg/ml i 8,44 µg/ml). Ponieważ rezultat ten odbiegał od efektów uzyskanych po suplementacji FeSO₄, świadczy o lepszym metabolizmie żelaza zwierząt karmionych kiełkami. Ten wynik należy uznać za najbardziej interesujący i obiecujący wśród otrzymanych w ramach zaprezentowanego eksperymentu. Nie uzyskano takiego poziomu zapasów żelaza w wątrobach suplementowanych zwierząt jak u zwierząt z grupy kontrolnej, nieanemizowanej podczas całego doświadczenia (czyli 25,62 µg/ml), mogło to jednak wynikać z krótkiego czasu eksperymentu. Potwierdzono, że **preparat kiełków sojowych wzbogaconych w ferrytynę może być dobrym źródłem przyswajalnego żelaza i skutecznie znosić efekty anemii, podwyższając zarówno poziom hemoglobiny we krwi jak i jego zapasów w organizmie**. Przedstawiane wyniki szczegółowo omówiono w publikacji stanowiącej część osiągnięcia naukowego:

Zielińska-Dawidziak M., Hertig I., Piasecka-Kwiatkowska D., Staniek H., Nowak K.W., Twardowski T. (2012) *Study on iron availability from prepared soybean sprouts using an iron-deficient rat model*. Food Chemistry 135(4):2622-2627.

Ad. 3.

Informacje o odmiennym mechanizmie absorpcji ferrytyny sojowej są niezwykle istotne szczególnie dla tych pacjentów, u których nie występują deficyty żelaza w diecie, lecz zaburzenia jego wchłaniania. Doniesienia związane z absorpcją ferrytyny w badaniach klinicznych nie są jednak do końca zgodne. Jednym z wyjaśnień tych różnic jest nieprawidłowy dobór pacjentów, ponieważ absorpcja żelaza podczas

stanów jego niedoborów zazwyczaj wzrasta dziesięciokrotnie. Stąd rezultaty badań przeprowadzonych na grupie pacjentów wykazujących objawy ID i tych o prawidłowym statusie żelaza mogły się istotnie różnić.

Zaproponowane źródło ferrytyny sojowej, czyli sproszkowane kielki hodowane na roztworach FeSO_4 zawierają wielokrotnie więcej żelaza związanego głównie w formie ferrytynowej niż jakiegokolwiek inne znane do tej pory naturalne źródło roślinne tego białka. Wykonywane dotąd doświadczenia nie zapewniały podaży tak skoncentrowanego źródła ferrytyny roślinnej. Dlatego w kolejnym etapie badań podjęto próbę zweryfikowania hipotezy, że **istnieje mechanizm ograniczania wchłaniania ferrytyny roślinnej w organizmie, w zależności od aktualnego statusu żelaza**. Weryfikacja tej hipotezy jest również istotna jako jeden z pierwszych elementów badania bezpieczeństwa omawianego preparatu. Słaby mechanizm regulujący wchłanianie ferrytyny roślinnej przez enterocyty, mógłby szybko doprowadzić do nadpodaży tego pierwiastka w organizmie, gdyż, dla przypomnienia, absorpcja na drodze endocytozy jednej cząsteczki ferrytyny wprowadza do lizosomów w enterocytach nawet do 4500 atomów żelaza. Nadpodaż ferrytyny mogłaby wówczas w łatwy sposób doprowadzić do stanów zapalnych w samym jelicie.

W kolejnym doświadczeniu przygotowano izolat ferrytyny zawierającej w białkowej muszli apoferrytyny związane jony ołowiu zamiast jonów żelaza. Preparat ten otrzymano poprzez hodowlę kielków w roztworach PbNO_3 , doprowadzając w ten sposób do nadekspresji w roślinach ferrytyny detoksykującej ołów pochodzący ze środowiska wzrostowego. Ponieważ ferrytyna jest tylko jednym spośród wielu związków neutralizujących ołów w komórkach, przeprowadzono izolację tego białka (wykorzystując proces wysalania, termooporność ferrytyny i jej stabilność w szerokim zakresie pH), a następnie dwukrotną filtrację otrzymanego izolatu na filtrach ceramicznych o punkcie odcięcia 100 kDa. Dzięki temu wyodrębniono kompleks ferrytyna-ołów spośród innych związków ołowiu, które mogły zanieczyszczać otrzymany izolat. Przeprowadzona filtracja oddzieliła znaczną część globulin (stężenia białka oznaczone metodą Bradforda w permeacie spadło dwudziestokrotnie) oraz niskocząsteczkowych związków ołowiu (89%). Należy spodziewać się, że podczas tego procesu utracono także część ferrytyny wiążącej ołów, która pozostała uwięziona w porach filtra. Tak przygotowany izolat wprowadzono do diety szczurów skomponowanej zgodnie ze standardem AIN, jednak z wyeliminowaniem cytrynianu żelaza (III). Otrzymane stężenie żelaza w diecie wynosiło 7,8 mg/kg, podczas gdy

stężenie ołowiu 33,4 mg/kg. Przygotowaną dietę podawano przez 21 dni samcom szczurów laboratoryjnych (rasy Wistar, o masie 180 g ± 10 g), o prawidłowym statusie żelaza oraz zanemizowanym poprzez podawanie przez 8 tygodni diety eliminacyjnej (o zawartości żelaza 6,99 mg/kg). Ponieważ udokumentowane są powiązania pomiędzy metabolizmem żelaza i ołowiu w organizmie ssaków, poziom absorpcji ołowiu z ferrytyny z diety może być uznany za wskaźnik poziomu absorpcji żelaza z apoferrytyny.

Najcenniejszych informacji dostarczyła analiza kości zwierząt po zakończeniu doświadczenia. Stwierdzono, że zawartość ołowiu w kościach zwierząt z wywołaną IDA i karmionych dietą zawierającą ołów skompleksowany przez ferrytynę, istotnie różni się od zawartości ołowiu w kościach zwierząt ze wszystkich pozostałych badanych grup, tj. zwierząt zdrowych karmionych dietą AIN, zwierząt anemizowanych przez cały czas trwania doświadczenia (11 tygodni), a przede wszystkim od zwierząt zdrowych o prawidłowym statusie żelaza, które spożywały dietę zawierającą ołów związany w muszli ferrytyny.

Wzrost stężenia ołowiu w kościach zwierząt zanemizowanych był o 45% wyższy w porównaniu do wzrostu zaobserwowanego w kościach zwierząt zdrowych, którym również podawano ferrytynę wypełnioną ołowiem. Należy więc oczekiwać, że także **absorpcja żelaza ferrytynowego podlega regulacji w zależności od statusu żelaza w danym organizmie**. Przeprowadzone doświadczenie nie wyjaśnia wprawdzie, czy absorpcja ta jest regulowana na etapie endocytozy ferrytyny przez enterocyty, czy na etapie uwalniania ołowiu/żelaza z ich lizosomów. Dostarcza jednak kolejnych informacji, przemawiających za możliwością wykorzystania ferrytyny roślinnej w suplementowaniu diety człowieka w żelazo. Omawiane wyniki zostały przedstawione w publikacji:

Zielińska-Dawidziak M., Hertig I., Staniek H., Piasecka-Kwiatkowska D., Nowak K.W. (2014) *Effect of iron status in rats on the absorption of metal ions from plant ferritin*. *Plant Foods for Human Nutrition* 69:101–107.

Ad. 4.

Unikanie procedury izolacji ferrytyny znacznie ogranicza koszty otrzymywania jej preparatu. Proponowana kompozycja zawiera jednak w swoim składzie wszystkie substancje chemiczne obecne w tkankach roślinnych. Dominującą formą żelaza jest to kompleksowane w ferrytynie, ale w materiale znajdują się również inne jego związki (np. sole Fe(II) i Fe(III)). Głównie te związki żelaza mogą działać prooksydacyjnie, zarówno utleniając składniki żywności, jak i wpływając na organizm człowieka, szczególnie dlatego, że koncentracja żelaza w materiale jest wyjątkowo wysoka. Tradycyjnie otrzymywane kielki roślinne są źródłem wielu cennych antyoksydantów, innych niż ferrytyna neutralizująca żelazo. Stąd zbadano, jak **w omawianych warunkach zmienia się zawartość przeciwutleniaczy, które wprowadzane do żywności dodatkowo podnosiłyby wartość żywieniową tego preparatu, ograniczając jego działanie prooksydacyjne.**

Pomimo tego, że ferrytyna jest głównym detoksykującym żelazo związkiem w proponowanych kielkach sojowych, stwierdzono również istotne różnice w syntezie innych związków o charakterze przeciwutleniaczy. Stosowanie do hodowli kielków pożywek o niższych stężeniach żelaza (0-10 mM FeSO₄) nie zmieniło istotnie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej preparatu (wyrażanej w równoważnikach Troloksu i jako zdolność do zmiatania wolnych rodników (ARP)). Natomiast w stężeniach z zakresu 15-25 mM (a więc obejmującym stężenie stosowane do otrzymywania kielków podawanych zwierzętom w badaniach żywieniowych) stwierdzono istotne obniżenie badanych parametrów, nawet poniżej poziomu oznaczanego w suchych nasionach. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że silny stres abiotyczny inhibuje wzrost roślin nawet podczas pierwszych etapów ich rozwoju. Przy stosowaniu najwyższego z badanego zakresu stężeń jonów żelaza (II), czyli 25 mM odnotowano wzrost w zawartości żelaza (II) w stosunku do żelaza ferrytynowego, co sugeruje obniżenie zdolności rośliny do syntezy ferrytyny i intensywnej detoksykacji tego metalu, podczas gdy najwyższą syntezę ferrytyny obserwowano przy stosowaniu 20 mM roztworu.

Oznaczona całkowita zawartość tokochochromanoli (w tym poszczególnych tokoferoli oraz tokotrienoli) zawsze, niezależnie od stosowanego stężenia żelaza, była porównywalna bądź wyższa do zawartości w kielkach hodowanych na wodzie

destylowanej. Spadek zawartości tokochochromanoli w porównaniu do surowych nasion jest typowy podczas kiełkowania. Natomiast zawartość β -karotenu rośnie w kiełkach hodowanych w roztworach Fe(II) tylko do stężenia 10 mM FeSO₄, a więc zawierających o około 30% mniej żelaza, niż preparat proponowany do suplementacji. Nie odnotowano natomiast istotnych statystycznie różnic w syntezie związków fenolowych, w tym flawonoidów, w omawianych warunkach.

Na podstawie przeprowadzonych analiz do suplementacji diety człowieka w żelazo proponowane są kiełki sojowe hodowane w 20 mM roztworze FeSO₄. Otrzymany w ten sposób preparat zapewnia optymalne wiązanie żelaza (w przeważającej części skompleksowanego w ferrytynie). W tych warunkach aktywność przeciwutleniająca otrzymywanych kiełków jest niższa, niż w tradycyjnie stosowanych, jednak synteza innych niż ferrytyna przeciwutleniaczy nie jest całkowicie zahamowana i pomimo tworzenia wolnych rodników w omawianym procesie, **otrzymany preparat nadal jest źródłem innych związków przeciwutleniających, korzystnych dla efektów wzbogacania żywności i diety człowieka żelazem.** Związki te hamują oksydacyjne zmiany w żywności, mogą również ograniczać efekty uboczne suplementacji żelazem. Omawiane wyniki szczegółowo zaprezentowano w publikacji:

Zielińska-Dawidziak M., Siger A. (2012) *Effect of elevated accumulation of iron in ferritin on the antioxidant content in soybean sprouts.* European Food Research and Technology, 234: 1005-1012.

Ad. 5.

Nasiona roślin strączkowych uznawane są za najlepsze źródło ferrytyny do celów żywieniowych. Jednak ze względu na wysokie spożycie, próby wywołania nadekspresji ferrytyny prowadzi się najczęściej w zbożach, przede wszystkim w ryżu. Wykorzystanie proponowanego preparatu sproszkowanych kiełków do projektowania suplementów lub żywności specjalnego przeznaczenia nie zakłada wprowadzenia dużej podaży nasion motylkowych w diecie, ponieważ koncentracja żelaza w omawianym materiale jest bardzo wysoka, jednak nie zawsze możliwe będzie ich zastosowanie do produkcji żywności. Ograniczeniem może być zarówno alergienność roślin strączkowych (zarówno soi jak i łubinu), jak i specyficzny skład chemiczny tych nasion, uniemożliwiający ich zastosowanie do produkcji niektórych rodzajów żywności nawet

w kilkuprocentowym dodatku (np. wysoka zawartość tłuszczu). Dlatego podjęto próbę otrzymania kielków wzbogaconych w ferrytynę z pszenicy. Kielkowanie pszenicy wymagało stosowania znacznie niższych stężeń żelaza w roztworach, ze względu na wyznaczony dla ziarniaków próg tolerancji. Otrzymywane kielki były silnie zdegenerowane i zdecydowanie niższa była zawartość w nich żelaza kompleksowanego przez ferrytynę niż w przypadku strączkowych. Jednak i tak stężenie żelaza w materiale otrzymanym po kielkowaniu ziarniaków pszenicy w 15 mM roztworze FeSO_4 było ponad 50-krotnie wyższe, niż w tradycyjnie otrzymywanych kielkach (czyli podlewanych wodą).

Mąka otrzymywana z wysuszonych kielków istotnie różniła się składem chemicznym od mąki pszennej, a w konsekwencji również odmienne były jej parametry technologiczne (obniżenie zawartości glutenu mokrego o 25%, rozpuszczalności glutenu mokrego o 67%, indeksu glutenowego o 20% i liczby opadania w próbie Hagberga o 75%). Jednak zmiany te nie powinny ograniczać jej stosowania, gdyż z powodu wysokiego stężenia żelaza w preparacie i jednocześnie wysokiej konsumpcji produktów przetwórstwa zbóż w Polsce, dodatek tej mąki do produkcji żywności nie powinien przekraczać kilku procent.

Ze względu na poważne problemy związane ze stratami magazynowymi pszenicy i mąki pszennej, dodatkowo skontrolowano, czy dodatek spreparowanych kielków może wpływać na straty magazynowe tych surowców. Badania wykonano z wykorzystaniem najbardziej uciążliwego szkodnika magazynowego, wołka zbożowego (*Sitophilus granarius* L.).

Pomimo zaobserwowanego wzrostu intensywności żerowania owadów na badanej, skielkowanej pszenicy wzbogaconej w ferrytynę, stwierdzono istotne pogorszenie parametrów rozwojowych szkodnika (po 30 dniach żerowania wzrost tempa rozwoju o ~11 dni, spadek liczby potomstwa o ok. 12 szt., a spadek współczynnika podatności badanego materiału o ~1,7). Należy zatem uznać, że także produkty spożywcze wzbogacone w tak przygotowane kielki pszenicy, oprócz podwyższonej zawartości żelaza nie będą bardziej podatne na zniszczenia wywoływane przez szkodniki owadzie podczas przechowywania niż produkty tradycyjne.

Podsumowując - można uznać, że **pomimo niskiej tolerancji pszenicy na stres wywołany przez jony żelaza podczas kielkowania, jeżeli nie jest możliwe stosowanie preparatu kielków wzbogaconych w ferrytynę otrzymanego z roślin strączkowych, możliwe jest wykorzystanie w tym celu np. kielków pszenicy**

hodowanych w roztworach FeSO₄. Stosowanie tych kielków do produkcji żywności nie zwiększa prawdopodobieństwa zniszczeń żywności przez owady będące szkodnikami magazynowymi. Przedstawione wyniki zawarto w ostatniej z publikacji wskazywanych jako osiągnięcie naukowe:

Zielińska-Dawidziak M., Piasecka-Kwiatkowska D., Warchalewski J.R., Makowska A., Gawlak M., Nawrot J. (2014). *Sprouted wheat grain with ferritin overexpression as a potential source of iron for cereal product fortification.* European Food Research and Technology 238:829-835.

Spis cytowanych źródeł literaturowych:

1. Borg, S.; Brinch-Pedersen, H.; Tauris, B.; Madsen, L.H.; Darbani, B.; Noeparvar, S.; et al. (2012) *Wheat ferritins: improving the iron content of the wheat grain.* J. Cereal Sci. **56**:204–213.
2. DeMaeyer, E.M.; Adiels-Tegman, M. (1985) *The prevalence of anaemia in the world.* Rapp. Trimest. Stat. Sanit. Mond. **38**:302-316.
3. European Commission (2002) *Food Supplements Directive (2002/46/EC).*
4. Harrison, P.M. (1986) *The structure and function of ferritin.* Biochem. Educ. **14**:154-162.
5. Goto, F.; Yoshihara, T.; Saiki, H. (2000) *Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron binding protein ferritin.* Theor. Appl. Genet. **100**:658-664.
6. Heath, A.L.; Fairweather-Tait, S.J. (2002) *Clinical implications of changes in the modern diet: iron intake, absorption and status.* Best Pract. Res. Clin. Haematol. **15**:225–241
7. Hercberg, S.; Preziosi, P.; Galan, P. (2001) *Iron deficiency in Europe.* Public Health Nutr. **4**:537–545.
8. Kanobe, M.N.; Rodermeil, S.R.; Bailey, T.; Scott, M.P. (2013) *Changes in endogenous gene transcript and protein levels in maize plants expressing the soybean ferritin transgene.* Front. Plant Sci. **4**:196-201.

9. Qu, Q.; Yoshihara, T.; Ooyama, A.; Goto, F.; Takaiwa, F. (2005) *Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds*. *Planta* **222**:225–233.
10. San Martin, C.D.; Garri, C.; Pizarro, F.; Walter, T.; Theil, E.C.; Núñez, M.T. (2008) *Caco-2 intestinal epithelial cells absorb soybean ferritin by mu2 (AP2)-dependent endocytosis*. *J. Nutr.* **138**:659-666.
11. Sczekan, S.R.; Joshi, J.G. (1987) *Isolation and characterization of ferritin from soybeans (Glycine max)*. *J. Biol. Chem.* **262**:13780-13788.
12. Theil, E.C.; Chen, H.; Miranda, C.; Janser, H.; Elsenhans, B.; Núñez, M.T.; Pizarro, F.; Schümann, K. (2012) *Absorption of iron from ferritin is independent of heme iron and ferrous salts in women and rat intestinal segments*. *J. Nutr.* **142**:478-483.
13. Twardowski, T.; Smól, J. (2002) – PATENT PL-199671 *Zastosowanie ferrytyny roślinnej*
14. WHO programmes: <http://www.who.int/nutrition/global-target-2025/en>
15. WHO/UNICEF/UNU (2001) *Iron Deficiency Anemia Assessment, Prevention, and Control. A guide for programme managers*. Geneva, Switzerland, World Health Organization.
16. WHO (2007) *Iron status of populations assessing. The second edition including literature reviews report of a Joint World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention Technical Consultation on the Assessment of Iron Status at the Population Level*. Geneva, Switzerland, World Health Organization.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5A. Omówienie osiągnięć naukowo-badawczych przed uzyskaniem stopnia doktora

W roku 1995 ukończyłam studia magisterskie na Akademii Rolniczej w Poznaniu, broniąc pracę magisterską wykonaną w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, na Wydziale Technologii Żywności. Praca prezentowała sposób wytwarzania i badania mechanicznej stabilności koacerwacyjnych kapsulek, otrzymywanych ze skrobi hydroksypropyloamoniowej i alginianów sodu. Potwierdzono wpływ stężenia obu polimerów, chlorku wapnia i glukozy na mechaniczną stabilność otrzymywanych kapsulek, które zaproponowano do procesów immobilizacji mikroorganizmów i enzymów. Praca została nagrodzona nagrodą prof. dr hab. Jerzego Zwolińskiego za najlepszą pracę magisterską z zakresu nauk technicznych w 1995 r. Otrzymane wyniki opublikowano (Zał. 4: B.1.1.3) oraz zaprezentowano na konferencji (Zał. 4: B.1.4.9).

W roku 1996 z wyróżnieniem ukończyłam studia na kierunku Biotechnologia na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej i obroniłam pracę magisterską zrealizowaną w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN.

W ramach realizacji tej pracy dokonałam fuzji komórek dwóch limfoblastycznych linii komórkowych (HAJ i PAJ), wyprowadziłam 32 hodowle komórkowe, których genom porównałam z genomami komórek wyjściowych metodą RFLP. Wśród przebadanych hodowli zidentyfikowano jedną linię hybrydomową i dwie linie zmutowane. W oparciu o uzyskane wyniki opublikowałam 2 prace (Zał. 4: B.1.1.1 i B.1.1.2).

W 1998 r. podjęłam studia doktoranckie w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu. W tym okresie, w roku 1999, dzięki stypendium Fundacji Batorego odbyłam dwumiesięczny staż badawczy na Uniwersytecie Bolońskim we Włoszech, na Wydziale Farmaceutycznym, podczas którego poznawałam techniki separacyjne stosowane do rozdziału aktywnych biologicznie substancji, głównie peptydów i ich inhibitorów.

Pracę doktorską pod tytułem *Separacja ferrytyny z Lupinus luteus metodą wodnej ekstrakcji dwufazowej* wykonywaną pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Jankowskiego obroniłam w październiku 2003 r. Badania realizowałam częściowo w ramach projektu promotorskiego KBN (Zał. 4: C2).

W omawianej pracy podjęłam próbę opracowania metody izolacji i oczyszczania ferrytyny z ekstraktów łubinowych metodą wodnej ekstrakcji dwufazowej w układach glikolu polietylenowego (PEG) z solami i innymi polimerami oraz w układach termoseparujących. Efektem przeprowadzonych badań było wskazanie najkorzystniejszego do separacji układu (złożonego z PEG i skrobi hydroksyetylowej). Nie udało się w proponowanych układach wyizolować czystej ferrytyny, lecz frakcję zawierającą maksymalnie 37% ferrytyny. Stwierdzono wysokie powinowactwo separowanego białka do międzyfazy tworzonych układów oraz glikolu polietylenowego. Omówione rezultaty przedstawiono na konferencjach naukowych (Zał. 4: B.1.3.1, B.1.4.1-B.1.4.3, B.1.4.5-B.1.4.6, B.2.4.45) oraz opublikowano (Zał. 4: B.1.2.1, B.1.2.2, B.2.2.11).

5B. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych

Pozostałe badania nad ferrytyną roślinną syntezowaną podczas kiełkowania i możliwościami jej wykorzystania w produkcji żywności

Większość mojego pozostałego dorobku związana jest z możliwościami pozyskania dobrych źródeł ferrytyny roślinnej i jej wykorzystania do konstruowania żywności specjalnego przeznaczenia. Badania te finansowane były z projektu badawczego N312 029 31/2098 oraz programu wdrożeniowego POIG01.01.02-00-061/09 (Zał. 4: C2). W ramach tych projektów analizowano możliwość wywołania wzrostu syntezy ferrytyny w innych niż omawiane dotąd roślinach motylkowych (lucernie, soczewicy, innych odmianach łubinu oraz soi). Badano właściwości chemiczne zarówno samych nasion jak i otrzymywanych z nich kiełków w celu wskazania cech, które umożliwiłyby dobór najlepszego surowca do procesu kiełkowania. Oznaczano również w otrzymywanych kiełkach zawartość składników pokarmowych i składników wpływających na parametry technologiczne otrzymywanego materiału. Uzyskane rezultaty opublikowano i prezentowano na

konferencjach (Zał. 4: B.2.2.8, B.2.2.10, B.2.2.12-B.2.2.16, B.2.3.2, B.2.3.5, B.2.4.23, B.2.4.31, B.2.4.32, B.2.4.41, B.2.4.44, B.2.4.46-B.2.4.48).

Szczególny nacisk położono na badania nad tworzeniem w otrzymanywach kielkach zarówno substancji przeciwutleniających, jak i wolnych rodników. Ogólna aktywność przeciwutleniająca i zawartość wolnych rodników w badanej kompozycji istotnie wpływa na jej potencjalne zastosowanie ze względu na możliwość utleniania składników żywności (Zał. 4: B.2.4.43). Obecnie zakończono badania nad modyfikacją procesu kiełkowania prowadzonego tak, aby zmaksymalizować syntezę przeciwutleniaczy i zminimalizować formowanie wolnych rodników, przy utrzymaniu wysokiego poziomu wiązania żelaza, wyniki jednak nie zostały jeszcze opublikowane ze względu na składane zgłoszenie patentowe, ale zaprezentowane na konferencji (B.2.4.3, B.2.4.4, B.2.4.19).

Badano również możliwość wykorzystania tańszych źródeł FeSO_4 do przygotowywania pożywek. Niestety z powodu wysokiej zdolności roślin do kumulowania w kielkach wielu zanieczyszczających związków mineralnych (przede wszystkim kadmu i ołowiu), w chwili obecnej uważam, że nie jest możliwe prowadzenie hodowli kielków na pożywkach przygotowywanych ze składników o czystości technicznej. Omawiane wyniki opublikowano (Zał. 4: B.2.2.3, B.2.3.3).

W badaniach uwzględniono kalkulację ekonomiczną proponowanego procesu produkcji, opracowując i publikując rachunek kosztów technologii produkcji omawianych kielków soi (Zał. 4: B.2.2.1). Biorąc pod uwagę zdolność wiązania żelaza, dostępność i cenę surowca jako najlepsze źródło ferrytyny roślinnej wskazuje się kielki łubinowe i sojowe.

Podczas konstruowania żywności wzbogacanej w żelazo ferrytynowe istotny jest taki dobór warunków procesu produkcji, aby zachować żelazo zamknięte w muszli białkowej. Podstawową trudność stanowi fakt, że nie opracowano szybkich metod pozwalających na detekcję żelaza skompleksowanego wewnątrz białkowej muszli ferrytyny. Oznaczanie zawartości apoferrytyny obecnej w produkcie, np. metodami immunochemicznymi nie informuje o ilości związanego z białkiem żelaza, specjacja żelaza nie przynosi odpowiedzi na pytanie o ilość żelaza chelatowanego przez apoferrytynę. W celu rozwiązania problemu podjęłam współpracę z Uniwersytetem im.

Adama Mickiewicza w Poznaniu, Zakładem Chemii Analitycznej na Wydziale Chemii. Dzięki temu opracowano metodę, która pozwala na oszacowanie ilości żelaza kompleksowanego w produkcie spożywczym lub materiale roślinnym, która w przybliżeniu informuje o ilości żelaza związanego w ferrytynie. Metoda, choć na pewno nie jest metodą precyzyjną, jest szybka, tania i pozwala na ocenę stabilności kompleksu żelazo-ferrytyna podczas procesu produkcyjnego. Opis opracowanej metody analitycznej zawarto w publikacji (Zał. 4: B.2.1.2).

W ramach projektu POIG opracowano technologie wytwarzania wielu produktów spożywczych zawierających skiełkowaną, wzbogaconą w żelazo soję (technologie zgłoszone do komercjalizacji w bazach Centrum Innowacji i Transferu Technologii UP w Poznaniu) i wyprodukowano partie tych produktów na skalę przemysłową. Otrzymana żywność przeznaczona była dla pacjentów chorujących na nieswoiste zapalenie jelit i podawana im w badaniach klinicznych (9 tygodni). Produkty kontrolowano pod względem sensorycznym i pod kątem stabilności ferrytyny w procesie przemysłowym. Przy współpracy z Zakładem Technologii Zbóż UP w Poznaniu oraz Zakładem Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych w Poznaniu otrzymano wzbogacone w żelazo ferrytynowe: budynie i kisiele typu instant, chleby bezglutenowe, wafle ryżowe, chrupki kukurydziane, kasze oraz makarony. Niepowodzeniem zakończyła się natomiast próba produkcji pieczywa chrupkiego. Straty w żelazie ferrytynowym podczas procesów produkcyjnych zależały od doboru odpowiednich parametrów procesu technologicznego i w niekorzystnych warunkach osiągały nawet 100%. Ostatecznie jednak udało się dobrać warunki technologiczne w taki sposób, aby zawartość żelaza ferrytynowego w produktach przekraczała 55% (przy wyjściowej zawartości żelaza ferrytynowego w zakresie 60-85% w skiełkowanych nasionach soi). Jedynie w produktach ekstrudowanych (chrupkach kukurydzianych) zawartość żelaza ferrytynowego spadała w niektórych partiach produkcyjnych do poziomu ok. 43%. Wyniki zaprezentowano podczas konferencji naukowych oraz w publikacji (Zał. 4: B.2.2.2, B.2.3.1, B.2.3.4, B.2.4.4, B.2.4.15, B.2.4.16, B.2.4.24, B.2.4.25, B.2.4.35).

Jednym z najważniejszych problemów, jaki wyłonił się podczas badań nad konstruowaniem żywności wzbogaconej w kielki sojowe, okazał się problem zapewnienia odpowiedniego bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów.

Opracowano sposób suszenia tego preparatu, tak aby jednocześnie sprostać wymaganiom mikrobiologicznym dotyczącym żywności specjalnego przeznaczenia medycznego i zapewnić stabilność ferrytyny. Wyniki przygotowane są do opublikowania, zaprezentowane zostały na konferencji w formie plakatu naukowego (Zał. 4: B.2.4.27-B.2.4.28).

W dalszym ciągu prowadzone były badania nad możliwością oczyszczania ferrytyny w wodnych układach dwufazowych. Rezultaty doświadczeń przeprowadzonych w układach modelowych, z wykorzystaniem końskiej ferrytyny prezentowano na konferencji i opublikowano (Zał. 4: B.2.1.4, B.2.4.40).

Badania nad transportem substancji przez monowarstwę komórek nabłonka jelitowego

Bezpośrednio po ukończeniu doktoratu włączyłam się do badań w ramach projektu PBZ-KBN 094/P06/2003/16. W tym czasie prowadziłam badania nad transportem antyoksydantów, witamin z grupy B i związków mineralnych przez monowarstwę komórek nabłonka jelitowego (z wykorzystaniem linii komórkowej Caco-2). W efekcie tych badań opublikowałam 2 prace oryginalne (Zał. 4: B.2.1.6 i B.2.1.7), jeden rozdział w monografii (Zał. 4: B.2.2.7) oraz prezentowałam wyniki na konferencji (Zał. 4: B.2.4.50, B.2.4.51).

Badania nad transportem witamin z grupy B (tiaminy, ryboflawiny oraz pirydoksyny) symulowały sytuację, jaka występuje podczas nadpodaży witamin w organizmie człowieka. Stwierdzono, że podczas nadmiernej suplementacji witamin, kiedy przekroczone zostaje sugerowane dzienne spożycie, możliwe jest zakłócenie mechanizmu transportu tych witamin przez komórki jelita. Podobna szybkość przepływu witamin w obu kierunkach przez monowarstwę komórek nabłonka sugerowała, że następuje wówczas dominacja biernego transportu tych witamin; niskie dawki badanych witamin transportowane są z wykorzystaniem mechanizmów aktywnych.

Natomiast podczas badań z wykorzystaniem omawianego modelu nad transportem jonów Cr(III) potwierdzono, że pobór jonów chromu (III) przez komórki jelita cienkiego jest bardzo niski, zależny od czasu i negatywnie skorelowany ze

stężeniem chromu. Ograniczanie transportu wraz ze wzrostem stężenia w obu kierunkach przez komórki nabłonka tłumaczono inhibicją receptora i/lub innych białek transportowych. Jednocześnie nie zauważono toksycznego działania jonów Cr(III) na badane komórki przy badanych stężeniach.

Z wykorzystaniem modelu Caco-2, przy współpracy z Katedrą Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, kontynuowane są badania nad biodostępnością ferrytyny, ze skompleksowanym żelazem i chromem.

Badania nad hamowaniem rozwoju i detekcją wołka zbożowego

Część omawianego dorobku poświęcona jest badaniom związanym z ograniczaniem strat magazynowych wywoływanych przez żerującego na ziarnach pszenicy wołka zbożowego. Badania obejmowały problem detekcji tego owada we wczesnym stadium larwalnym metodą elektroforetyczną (z wykorzystaniem zymogramów), metodą ELISA czy poprzez badanie zmian w składzie chemicznym ziarna. Zmiany w zawartości białka ekstrahowalnego i skrobi, pozwalają na wykrycie ziarna uszkodzonego przez żerujące owady. Jednak tych zmian nie należy uznawać za specyficzny wskaźnik, ponieważ skład chemiczny ziarna istotnie różni się w zależności od roku zbioru, czasu i warunków magazynowania, czy obszaru upraw zbóż.

Stwierdzono jednak, że metodą elektroforetyczną możliwe jest potwierdzenie obecności nawet śladów żerowania pozostawionych na ziarnie przez dorosłe owady (zarówno samice jak i samce) na podstawie analizy aktywności ich enzymów trawiennych. Charakterystycznym białkiem wydzielanym w ślinie tego owada jest α -amylaza o ruchliwości elektroforetycznej odmiennej od amylaz ziarniaków pszenicy, żyta, pszenżyta i jęczmienia, także tych obecnych w porośniętych zbożach. Metodą tą można także wykazać obecność osobników potomnych we wczesnym stadium larwalnym, kiedy są one niewidoczne we wnętrzu ziarniaków. Jest ona więc niezwykle czuła i szybka, a przy tym nie wymaga stosowania skomplikowanej aparatury czy wyjątkowych kwalifikacji personelu (jak np. metoda rentgenograficzna, rekomendowana w USA).

Wykorzystując immunogenne właściwości α -amylazy wołka, pozyskano również przeciwciała pozwalające na detekcję ziarna porażonego przez te owady.

W porównaniu do metody elektroforetycznej, opracowany sposób immunochemicznej detekcji nie był jednak wystarczająco czuły, m. in. ze względu na obecność poliklonalnych przeciwciał w otrzymanych surowicach. Test ELISA jest również bardziej czasochłonny, trudniejszy do odtworzenia w laboratoriach analitycznych (ograniczona dostępność specyficznych surowic). Wyniki zostały opublikowane (Zał.4: B.2.1.3, B.2.2.6, B.2.2.9, B.2.4.22, B.2.4.30, B.2.4.36).

Analizowano także, o czym już wspomniano, wpływ zwiększenia zawartości żelaza w kielkach pszenicy na hamowanie rozwoju tego owada, ponieważ zmiana składu chemicznego surowców, w tym zwiększenie w nich zawartości metali ciężkich istotnie wpływać może na rozwój żerujących na nim owadów, co szczegółowo omówiono w publikacjach (Zał.4: B.2.2.17, B.2.4.49).

Badania prowadzono m. in. w ramach projektów: 2 PO6T 01727 oraz N312 029 31/2098.

Badania nad detekcją w produktach żywnościowych białek wywołujących alergię lub nietolerancje pokarmowe

Moje zainteresowania badawcze nad białkami żywności kierują się także w stronę ekstrakcji i detekcji białek i peptydów o charakterze substancji antyżywnościowych, występujących w śladowych ilościach w żywności. Prowadzone prace skupione są nad możliwością opracowania uniwersalnej metody wyodrębniania białek glutenowych oraz alergenów mleka, łubinu, soi zarówno z surowców, jak i różnych produktów żywnościowych – począwszy od napojów alkoholowych (piwa, wina), przez wyroby piekarskie, mięsne, koncentraty deserów, sosy, kończąc na czekoladach.

Matryca żywności jest wyjątkowo złożona; białka (w tym alergeny) występują w niej w postaci natywnej i zdenaturowanej, a podczas przetwarzania surowców wchodzi w różne oddziaływania. Stąd należy uznać, że przygotowanie próbki do analizy ma w tym przypadku większe znaczenie, niż sam sposób detekcji białek. Niezwykle istotny jest prawidłowy dobór rozpuszczalnika pozwalającego na ilościowe wydobywanie białek z analizowanej próbki, co zaobserwowano zarówno w badaniach nad ekstrakcją kazeiny, białek sojowych jak i glutenowych z różnych produktów

żywnościowych. Do detekcji białek występujących w śladowych ilościach wykorzystywałam metody ELISA, slot-blot oraz Western blot, natomiast w celu wykrywania obecności w badanym materiale surowców zanieczyszczających - metodę qPCR. Każda z tych metod jest niezwykle czuła, wykrywa jednak inne wskaźniki, świadczące o zanieczyszczeniu, co utrudnia bezwzględne ilościowe oznaczenie zawartości niepożądanych substancji w materiale.

Dodatkowy problem w przypadku analizy substancji alergennych metodami immunochemicznymi stanowi występowanie reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami detekcyjnymi i różnorodnymi antygenami, stąd do ich oznaczania w ramach omawianych prac wykorzystywano różne typy przeciwciał i surowice osób uczulonych na poszczególne grupy białek. Szczególny nacisk na reakcję pomiędzy białkami żywności i surowicami pacjentów uczulonych na podstawowych 8 alergenów położono podczas realizacji projektu POIG 01.01.02-00-061/09, ponieważ do konstruowania żywności bioaktywnej wykorzystywano niekonwencjonalne składniki, takie jak np. morwa, pokrzywa, len, które mogły być źródłem zarówno ukrytych, jak i pan-alergenów. Stwierdzona immunoreaktywność najczęściej jednak była skutkiem braku zachowania odpowiednich procedur w zakładach produkujących badaną żywność i zanieczyszczeniem innymi, nie wykazywanymi na etykietach surowcami. Takie uchybienia wynikają często z braku świadomości producentów żywności, co potwierdzono w badaniach nad obecnością kazeiny w produktach spożywczych, które wykazały ślady obecności tego białka w produktach pozbawionych odpowiednich deklaracji na etykietach.

Wyniki badań dotyczących tego problemu zaprezentowane zostały wielokrotnie na konferencjach (Zał. 4: B.2.3.6, B.2.3.7, B.2.4.1, B.2.4.5-B.2.4.14, B.2.4.17-B.2.4.18, B.2.4.20-B.2.4.21, B.2.4.26, B.2.4.29, B.2.4.33-B.2.4.34, B.2.4.37, B.2.4.39, B.2.4.42) oraz opublikowane (Zał. 4: B.2.1.1, B.2.2.4, B.2.2.5).

Ostatnimi z badanych przeze mnie białek o charakterze antyżywnościowym są inhibitory. Problem aktywności inhibitorów występujących w kiełkach roślin strączkowych ogranicza ich spożywanie w postaci nieprzetworzonej. W przypadku badanego preparatu ze względu na jego niewielki dodatek podczas konstruowania żywności nie ma istotnego znaczenia, tym bardziej że zmiana warunków wzrostu kiełków nie nasiliła aktywności tych związków (Zał. 4: B.2.4.2).

Inhibitory enzymów trawiennych mogą mieć jednak także charakter substancji prozdrowotnych w leczeniu chorób cywilizacyjnych, stąd dobór surowca do produkcji żywności funkcjonalnej uwzględniający aktywność inhibitorów amylaz i trypsyny może zwiększyć atrakcyjność projektowanej żywności. Wśród badanych gatunków i odmian zbóż wskazano odmianę pszenicy (Puma), która istotnie wyróżniała się wysoką zawartością inhibitorów α -amylaz (zarówno ślinowej, jak i trzustkowej), a nie ograniczała aktywności trypsyny. Taka odmiana pszenicy zalecana może być do konstruowania żywności kierowanej dla osób otyłych i chorujących na cukrzycę (Załącznik 4: B.2.1.5).

Podsumowanie

Całkowity dorobek naukowy zaprezentowany w załączniku 4 i obliczony zgodnie z punktacją MNiSW wynosi 521 punktów (w tym 180 stanowi podstawę wniosku habilitacyjnego). Dorobek obejmuje artykuły w czasopismach indeksowanych oraz nieindeksowanych w bazie JCR, monografie, prace opublikowane w materiałach konferencyjnych, komunikaty i referaty konferencyjne, zgłoszenia wynalazku i patent, recenzje artykułów naukowych oraz opracowanie z realizacji projektu badawczego.

Zbiorcze zestawienie dorobku naukowego przedstawiono w tabeli poniżej, uwzględniając podział na poszczególne formy aktywności.

Rodzaj publikacji/aktywności	Liczba osiągnięć		Punkty MNiSW**
	Przed doktoratem	Po doktoracie	
Artykuły w czasopismach indeksowanych w bazie JRC	3*	12	390
Artykuły w czasopismach nieindeksowanych w bazie JRC	2*	11	78
Rozdziały w monografiach i innych opracowaniach zwartych		6	18
Referaty naukowe wygłoszone na konferencjach <ul style="list-style-type: none"> • w j. polskim • w j. angielskim 	1	3 4	
Pozostałe komunikaty prezentowane na konferencjach <ul style="list-style-type: none"> • krajowych • międzynarodowych 	8 1	28 23	
Sprawozdania z realizacji projektu	1	1	
Recenzje		4	
Zgłoszenia patentowe		5	10
Patenty		1	25
RAZEM	16	98	521
RAZEM z pominięciem prac zgłaszanych jako osiągnięcie	16	92	341
Sumaryczny IF z roku wydania publikacji	1,89	22,43	
Sumaryczny 5-letni IF	6,89	26,08	
h-indeks			4
Liczba cytowań (z pominięciem autocytowań)			77

*wg aktualnie obowiązującej listy czasopism

**zgodnie z komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 31.12.2014 w sprawie wykazu czasopism naukowych, z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach oraz, w przypadku patentu i zgłoszeń patentowych,

monografii oraz artykułów nie ujętych w wykazie czasopism zgodnie z *Dziennikiem Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej*, poz. 877 Rozporządzenie MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.

Magdalena Zielińska-Dawidziak