

## Załącznik 2

dr inż. Aleksander Siger  
Katedra Biochemii i Analizy Żywności  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

# AUTOREFERAT

## dotyczący działalności naukowo-badawczej



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 2016

*Aleksander Siger*

## 1. Imię i nazwisko: Aleksander Siger

## 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- Magister inżynier technologii żywności, specjalizacja Biotechnologia żywności, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, 2000 r.
  - tytuł pracy magisterskiej: „Ocena antymikrobiologicznych właściwości związków fenolowych łubinu”,
  - promotor: prof. dr hab. Eleonora Lampart-Szczapa.
- Doktor nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, 2007 r.
  - tytuł rozprawy doktorskiej: „Natywne przeciwutleniacze rzepaku i ich przemiany w wybranych procesach technologicznych”,
  - promotor: prof. dr hab. Małgorzata Nogala-Kałucka.

## 3. Przebieg pracy zawodowej

- 06.1995 – 09.1995 asystent, Rejonowy Urząd Poczty Poznań
- 06.1999 – 09.1999 asystent, Rejonowy Urząd Poczty Poznań
- 06.2000 – 09.2007 starszy referent techniczny w Katedrze Biochemii i Analizy Żywności, Wydział Technologii Żywności (od 2005r. Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu), Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu
- 10.2007 – 09.2008 asystent w Katedrze Biochemii i Analizy Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
- 10.2008 – obecnie adiunkt w Katedrze Biochemii i Analizy Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

## 4. Działalność naukowo-badawcza

### 4.1. Wskazanie osiągnięcia, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.)

Osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, jest cykl pięciu monotematycznych prac ujętych pod wspólnym tytułem:

#### **„Pochodne kwasu sinapowego – związki fenolowe nasion rzepaku istotnie wpływające na jakość oraz wartość żywieniową oleju tłoczonego na zimno”**

- i. **Siger A., Nogala-Kałucka M., Lampart-Szczapa E. (2008).** The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15, 2, 137-149 (*if* = 0,662; 25 pkt. MNiSW; liczba cytowań: 73)

- ii. **Siger A.**, Czubiński J., Dwiecki K., Kachlicki P., Nogala-Kałucka M. (2013). Identification and antioxidant activity of sinapic acid derivatives in *Brassica napus* L. seed meal extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 10, 1130-1138 (if = 2,033; 25 pkt. MNiSW; liczba cytowań: 3)
- iii. **Siger A.**, Kaczmarek A., Rudzińska M. (2015). Antioxidant activity and phytochemical content of cold-pressed rapeseed oil obtained from roasted seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 1225-1237, (if = 2,093; 25 pkt. MNiSW; liczba cytowań: 0)
- iv. **Siger A.**, Michalak M., Rudzińska M. (2015). Canolol, tocopherols, plastochromanol-8 and phytosterols content in residual oil extracted from rapeseed expeller cake obtained from roasted seed. *European Journal of Lipid Science and Technology*, DOI: 10.1002/ejlt.201500314, (if = 2,093; 25 pkt. MNiSW; liczba cytowań: 0)
- v. **Siger A.**, Michalak M. (2015). The long-term storage of cold-pressed oil from roasted rapeseed: Effects on antioxidant activity and levels of canolol and tocopherols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, DOI: 10.1002/ejlt.201500183, (if = 2,093; 25 pkt. MNiSW; liczba cytowań: 0)

- Sumaryczny IF – 8,974
- Punkty MNiSW – 125
- Suma cytowań – 76

Punkty za publikacje naliczono zgodnie z komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 23.12.2015r. w sprawie wykazu czasopism naukowych, z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach.

Mój wkład w w/w publikacje obejmuje: autorstwo hipotez i koncepcji badań, udział w wykonaniu doświadczeń oraz większości oznaczeń, analizę i opracowanie wyników, wyciągnięcie wniosków, napisanie i redakcję manuskryptów (załączono oświadczenia współautorów).

## **4.2. Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników wskazanego osiągnięcia**

### **4.2.1. Wprowadzenie**

Rosnące wymagania konsumentów co do jakości spożywanej żywności wymuszają na producentach dostarczanie produktów o zwiększonej atrakcyjności pod względem żywieniowym. Współczesny konsument coraz częściej sięga po produkty ekologiczne i naturalne. Sprzyja to rozwojowi rynku żywności ekologicznej, oznaczonej często jako „organic food”, „safe

food”, w tym także segmentu olejów tłoczonych na zimno. Istnieje pogląd, że oleje te posiadają wyższą wartość odżywczą i są lepszej jakości. Ograniczeniem ich produkcji na dużą skalę jest niska wydajność procesu tłoczenia (duża zawartość w wytlókach oleju resztkowego) oraz trudności z uzyskaniem stałej jakości produktu. W Polsce głównym źródłem pozyskiwania oleju do celów spożywczych są nasiona rzepaku. O dużej wartości żywieniowej oleju rzepakowego nazywanego „Oliwą Północy” decyduje skład kwasów tłuszczowych oraz obecność związków biologicznie aktywnych takich jak – tokoferole, karotenoidy, fitosterole i związki fenolowe.

Olej rzepakowy zaraz po oleju lnianym zawiera najwięcej kwasów tłuszczowych n-3. Jednocześnie charakteryzuje się odpowiednim, z żywieniowego punktu widzenia, stosunkiem kwasu linolowego (C18:2 n-6) do linolenowego (C18:3 n-3), który wynosi 2:1. Ostatnio szczególnie podkreślana jest ważna fizjologiczna i prozdrowotna rola kwasów n-3, zwłaszcza w prewencji chorób układu krążenia oraz w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu układu nerwowego. Równie mocno eksponowana jest prozdrowotna rola kwasu linolenowego, zwłaszcza w odniesieniu do chorób o podłożu zapalnym i alergicznym (Simopoulos i in. 2000).

Jednymi z istotniejszych związków bioaktywnych obecnych w oleju rzepakowym są tokoferole (-T). Ważną rolą tych substancji jest działanie przeciwutleniające – ochrona przed utlenianiem polienowych kwasów tłuszczowych. Nie mniej ważna rola tokoferoli w organizmie człowieka wynika z pełnienia przez nie roli silnego fizjologicznego przeciwutleniacza i zabezpieczania organizmu przed długookresowym ryzykiem dla zdrowia związanym ze stresem oksydacyjnym. W oleju rzepakowym obecny jest także plastochromanol-8 (PC-8), który charakteryzuje się wyższą aktywnością antyoksydacyjną w porównaniu do  $\alpha$ -T. Inną grupę związków bioaktywnych stanowią sterole roślinne – fitosterole. Przypisuje się im zdolność obniżania poziomu cholesterolu we krwi, poprzez współzawodniczenie z nim podczas wchłaniania. Obecnie w wielu ośrodkach naukowych trwają badania w kierunku poznania determinacji genetycznej związków bioaktywnych (tokoferoli i fitosteroli) oraz zwiększenia ich zawartości wykorzystując do tego celu metody konwencjonalne, biotechnologiczne jak i transformację genetyczną (Marwede i in. 2004; Raclaru i in. 2006; Bartkowiak-Broda i in. 2008; Wang i in. 2012; Siger i in. 2015).

W produkcji żywności coraz częściej można spotkać takie pojęcia jak: restytucja, fortyfikacja, wzbogacanie, standaryzacja i nutrifikacja mające na celu uzupełnienie lub wyrównanie niedoborów różnych składników bioaktywnych w żywności. Ma to ograniczać rozwój chorób tzw. cywilizacyjnych, wynikających z nadmiernej produkcji reaktywnych form

tlenu i azotu. Dostarczanie wraz z pożywieniem do organizmu naturalnych substancji o aktywności przeciwutleniającej może wspomagać naturalne mechanizmy ochronne. Cechą szczególną nasion rzepaku jest 10-krotnie wyższa zawartość związków fenolowych w porównaniu do innych nasion roślin oleistych. Związki te mają duży, nie wykorzystany do tej pory, potencjał antyoksydacyjny, z tego względu, że po procesie tłoczenia oleju pozostają w wyciekach. Mimo antyżywnościowego działania związków fenolowych, jakim jest wiązanie aminokwasów, głównie metioniny i lizyny, związkom tym przypisuje się specyficzne właściwości bioaktywne, m.in. przeciwmiażdżycowe, przeciwnowotworowe, antymutagenne, przeciwpatogenne, cytoochronne, przeciwzapalne i antyoksydacyjne. Główne związki fenolowe nasion rzepaku to kwas sinapowy i jego pochodne (sinapina, glukopiranosol sinapiny), a w dalszej kolejności kwasy *p*-hydroksybenzoesowy, wanilinowy, protokatechowy, gentyzynowy, kawowy, syringinowy, *p*-kumarowy, ferulowy i chlorogenowy.

Na jakość spożywanego oleju rzepakowego oraz zawartość związków bioaktywnych wpływ ma przede wszystkim stan nasion użytych do jego produkcji, warunki i parametry tłoczenia oraz warunki dalszego przechowywania gotowego produktu. Z chwilą rozpoczęcia przeze mnie badań istniało bardzo niewiele doniesień naukowych dotyczących zawartości przeciwutleniaczy hydrofilowych w olejach roślinnych oraz ich aktywności antyoksydacyjnej. Dostępne w tym okresie publikacje dotyczyły głównie badań nad oliwą z oliwek, uważaną za najbogatszą w związki fenolowe (Montedoro i in. 1992; Servili i Montedoro 2002; Tripoli i in. 2005). W ostatnich latach można zauważyć wzrost prac naukowych dotyczących identyfikacji nowych pochodnych kwasu sinapowego obecnych w nasionach rzepaku (Zadernowski i Kozłowska 1983; Thiyam i in. 2009; Khattab i in. 2010; Engels i in. 2012). Szczególnie zainteresowanie przypisuje się produktowi dekarboksylacji kwasu sinapowego, którym jest 4-winył-2,6-dimetoksyfenol (canolol). Głównym czynnikiem przyczyniającym się do powstawania tego związku jest zastosowanie podwyższonego ciśnienia i temperatury w procesie wydobywania oleju z nasion, jak również stosowanie przed wydobyciem oleju takich zabiegów jak prażenie nasion czy działanie mikrofal. Związkowi temu przypisuje się wysoką aktywność przeciwutleniającą, właściwości antymutagenne, antynowotworowe, cytoochronne i przeciwzapalne (Koski i in. 2003, Wakamatsu i in. 2005, Galano i in. 2011; Moltke-Sörensen i in. 2013; Matthäus i in. 2014; Aachary i in. 2014). W literaturze naukowej brakowało danych dotyczących zawartości związków bioaktywnych, szczególnie związków fenolowych, w tym także produktu dekarboksylacji kwasu sinapowego, w oleju rzepakowym tłoczonym na zimno.

#### 4.2.2. Cel badań

Celem badań realizowanych w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego była analiza zawartości przeciwutleniaczy hydrofilowych obecnych w niepolarniej matrycy jaką są oleje roślinne tłoczone na zimno, identyfikacja nowych pochodnych kwasu sinapowego – związków fenolowych nasion rzepaku oraz określenie wpływu procesu prażenia nasion rzepaku na tempo dekarboksylacji kwasu sinapowego i efektywność jego przechodzenia do oleju podczas procesu tłoczenia na zimno. Jednocześnie konieczne było prowadzenie równoległych badań dotyczących wpływu zastosowanej obróbki termicznej nasion na obecne w rzepaku pozostałe związki biologicznie aktywne, ich stabilność podczas dalszego przechowywania oraz przeprowadzenie analizy sensorycznej gotowych produktów.

Szczegółowe cele pracy to:

1. Izolacja i ilościowa analiza polarnych przeciwutleniaczy z olejów roślinnych tłoczonych na zimno oraz oznaczenie aktywności przeciwutleniającej frakcji polarnej olejów.
2. Identyfikacja i ilościowa analiza nowych pochodnych kwasu sinapowego - związków fenolowych nasion rzepaku oraz określenie ich potencjału antyoksydacyjnego.
3. Wpływ temperatury i czasu prażenia nasion rzepaku na jakość oleju tłoczonego na zimno, proces dekarboksylacji kwasu sinapowego oraz na pozostałe związki bioaktywne i ich aktywność przeciwutleniającą.
4. Analiza zawartości związków bioaktywnych w olejach reszkowych (ekstrahowanych z wytlóków), otrzymanych z nasion poddanych prażeniu oraz ocena ich potencjału antyoksydacyjnego.
5. Analiza sensoryczna olejów rzepakowych otrzymanych z surowca uprzednio poddanego obróbce termicznej, ocena ich stabilności oksydacyjnej w teście długotrwałego przechowywania w warunkach chłodniczych oraz określenie zmian w zawartości natywnych przeciwutleniaczy.

#### **Ad 1. Izolacja i ilościowa analiza polarnych przeciwutleniaczy w olejach roślinnych tłoczonych na zimno oraz oznaczenie aktywności przeciwutleniającej frakcji polarnej.**

Badaniu poddano 9 olejów toczonych na zimno: sojowy, słonecznikowy, kukurydziany, konopny, lniany, z otrąb ryżowych, z pestek winogron, z pestek dyni oraz rzepakowy. Do izolacji związków fenolowych z niepolarniej matrycy jakim jest olej zastosowano technikę ekstrakcji do

fazy stałej wykorzystując kolumnienki wypełnione sorbentem diolowym. W polarnej frakcji olejów analizowano zawartość związków fenolowych ogółem metodą Folina-Ciocalteu oraz określono profil ich zawartości za pomocą RP-HPLC. Określono także aktywność antyoksydacyjną frakcji polarnej badanych olejów. Wykazano, że w badanych olejach roślinnych obecne są związki fenolowe, a najwyższą zawartością fenoli ogółem charakteryzował się olej z pestek dyni (2,46 mg/100g) oraz konopny (2,45 mg/100g). Zawartość związków fenolowych ogółem w oleju rzepakowym tłoczonym na zimno wynosiła 1,31 mg/100g oleju. Zastosowana metoda Folina-Ciocalteu nie jest specyficzna tylko w stosunku do związków fenolowych, lecz w reakcji biorą udział wszystkie związki o właściwościach redukujących. Dlatego kolejnym etapem było określenie profilu związków fenolowych. W analizowanych olejach zidentyfikowano kwasy: protokatechowy, *p*-hydroksybenzoesowy, wanilinowy, kawowy, *p*-kumarowy, ferulowy i sinapowy. Wykazano, że olej rzepakowy charakteryzuje się najwyższą zawartością kwasów fenolowych w szczególności kwasu sinapowego, którego zawartość wynosiła 236 µg/100g oleju. W pozostałych olejach zawartość kwasów fenolowych była około 10-krotnie niższa. Aktywność antyoksydacyjna frakcji polarnej wykazała, że najwyższe właściwości przeciwutleniające miały związki fenolowe obecne w olejach z pestek dyni, konopnym i rzepakowym. W dwóch pierwszych przypadkach aktywność antyoksydacyjna korelowała z zawartością związków fenolowych ogółem. W przypadku oleju rzepakowego aktywność przeciwutleniająca związana była z wysoką zawartością kwasów fenolowych (szczególnie kwasu sinapowego). Obecność związków fenolowych w olejach w znaczący sposób może wpływać na jego stabilność oksydacyjną poprzez oddziaływanie synergistyczne z innymi przeciwutleniaczami. Obecność na chromatogramach pików związków niezidentyfikowanych, nie będących kwasami fenolowymi, przyczyniła się do podjęcia badań mających na celu ich identyfikację w nasionach rzepaku.

*Publikacja:*

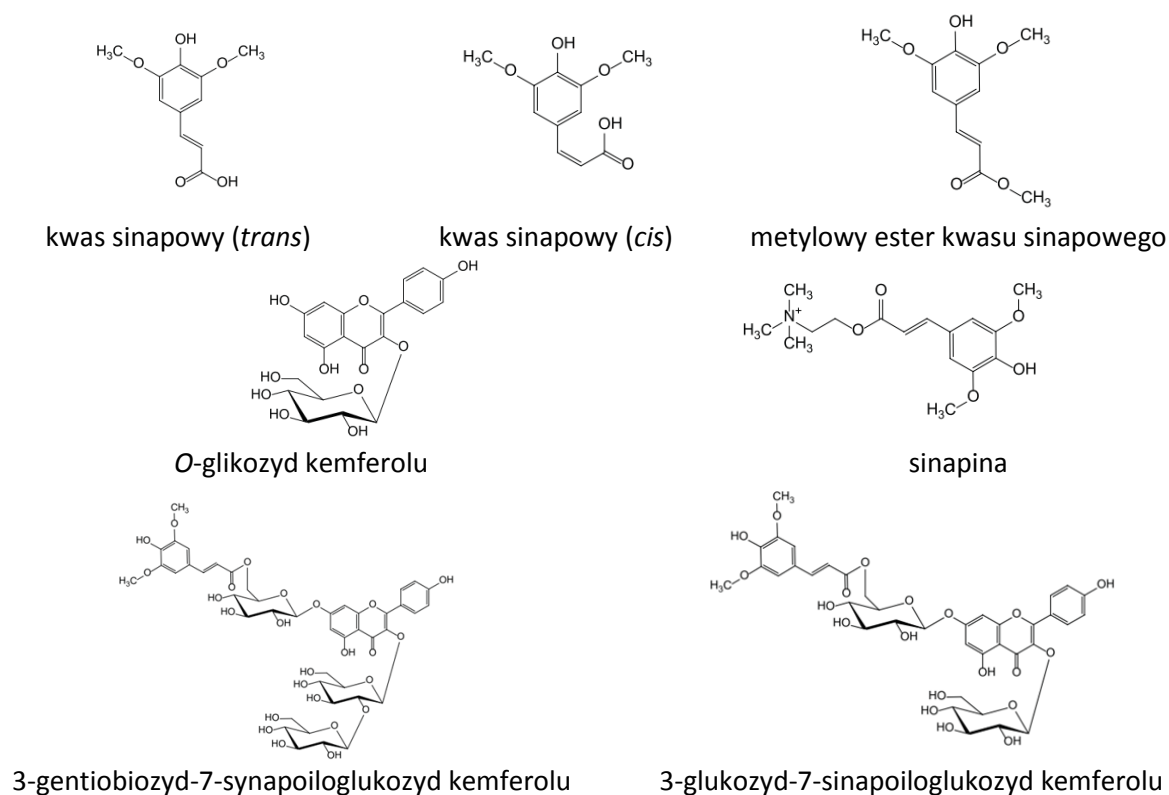
Siger A., Nogala-Kałużka M., Lampart-Szczapa E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15, 2, 137-149.

## Ad 2. Identyfikacja i ilościowa analiza nowych pochodnych kwasu sinapowego - związków fenolowych nasion rzepaku oraz określenie ich potencjału antyoksydacyjnego.

Pochodne kwasu sinapowego to główne związki fenolowe nasion rzepaku, jednakże nie wszystkie z nich zostały zidentyfikowane. Brakuje również ujednoliconej procedury analizy tych substancji (ekstrakcja, hydroliza, różne warunki chromatograficzne). Celem pracy była identyfikacja i analiza pochodnych kwasu sinapowego nasion dwóch odmian rzepaku w ekstraktach metanolowych (ekstrakt surowy, hydroliza zasadowa i kwasowa oraz wolne kwasy fenolowe). Identyfikacji dokonano za pomocą LC/ESI/MS<sup>n</sup>, a zawartość poszczególnych związków oznaczono techniką RP-HPLC-DAD. Analizowano także aktywność przeciwutleniającą badanych ekstraktów. Badając wolne kwasy fenolowe (izolacja za pomocą techniki SPE) wykazano, że na otrzymanych chromatogramach dominowały dwa piki o czasie retencji (RT) 27,03 min. oraz 31,18 min. Związek o RT = 27,03 min. to kwas sinapowy, który zidentyfikowano poprzez zastosowanie standardu wewnętrznego tego związku (izomer *trans* kwasu sinapowego). Analiza MS wykazała, że oba związki charakteryzowały się taką samą fragmentacją ([225] 207, 175) - oderwanie od cząsteczki kwasu wody z grupy hydroksylowej (18 Da) oraz CH<sub>3</sub>OH (32 Da). Widma UV-Vis tych związków także były identyczne, dzięki czemu stwierdzono, że związek o RT = 31,18 min. to kwas sinapowy o konfiguracji *cis*. Analizując zawartość izomerów *cis* i *trans* kwasu sinapowego wykazano wyższą zawartość izomeru *cis* kwasu sinapowego w obu badanych odmianach rzepaku (odmiana Bellevue - 78,98 mg/100g, odmiana Visby - 57,77 mg/100g). Hydroliza zasadowa powodowała 41-krotny (655,9 mg/100g) wzrost zawartości izomeru *trans* oraz niespełna 2-krotny w przypadku izomeru *cis* kwasu sinapowego. Po hydrolizie zasadowej dominował pik o RT = 42,9 min. Analiza MS wykazała, że jon podstawowy tego związku wynosi m/z 239, a dalsza fragmentacja dała sygnał m/z 207 i 175, charakterystyczny dla kwasu sinapowego, co potwierdziło, że jest to jego pochodna. Oderwaniu uległy dwie jednostki o 32D (CH<sub>3</sub>OH) co oznacza, że jest to metylowy ester kwasu sinapowego. Wykazano, że zawartość tego związku stanowi ponad 2,5% odtłuszczonej masy nasion rzepaku. Brak zawartości w ekstrakcie sinapiny może wskazywać, że podczas hydrolizy zasadowej została ona przekształcona do metylowego estru kwasu sinapowego. W ekstrakcie poddanym hydrolizie zasadowej zidentyfikowano także 3-gentiobiozyd-7-synapoiloglukozyd kemferolu (profil fragmentacji [979] 817, 655, 449, 287), którego zawartość wynosiła około 30 mg/100g w przypadku obu badanych odmian rzepaku. Wykazano także obecność dwóch niezidentyfikowanych związków, których



widma UV-Vis (RT = 20,36 min  $\lambda_{\max}$  = 265, 342 nm oraz RT = 36,53 min  $\lambda_{\max}$  = 264, 363 nm) sugerują, że są to flawonoidy.



Ryc. 1. Zidentyfikowane pochodne kwasu sinapowego w nasionach rzepaku.

Największą różnorodność związków fenolowych wykazano w wyniku hydrolizy kwasowej. Dominowała zawartość sinapiny, następnie metylowego estru kwasu sinapowego, których ilość nie przekraczała 1% masy odtłuszczonych nasion. Zawartość izomeru *trans* kwasu sinapowego nie przekroczyła 736 mg/100g, natomiast izomeru *cis* 100 mg/100g. W analizowanych ekstraktach zidentyfikowano również O-glikozyd kemferolu (fragmentacja [449] 287, 153) oraz pochodne kwasu sinapowego w połączeniu z kemferolem: 3-gentiobiozyd-7-synapoiloglukozyd kemferolu (fragmentacja [979] 817, 655, 449, 287) oraz 3-glukozyd-7-synapoiloglukozyd kemferolu (fragmentacja [817] 655, 369, 207) (Ryc. 1). Oprócz opisanych powyżej związków w ekstraktach po hydrolizie kwasowej obecnych było jeszcze 8 substancji, których identyfikacja nie była możliwa. Analizując widma UV-Vis tych związków można przypuszczać że 5 z nich to pochodne kwasu sinapowego, a trzy z nich w swojej strukturze mają cząsteczkę flawonoidu. Sumaryczna zawartość związków o niezidentyfikowanej budowie chemicznej w przeliczeniu na kwas sinapowy wynosiła dla nasion odmiany Visby 180,5 mg/100g oraz w przypadku odmiany

Bellevue 220,83 mg/100g. Oznaczona aktywność antyoksydacyjna wykazała, że ekstrakty poddane hydrolizie kwasowej charakteryzowały się 5-krotnie wyższą aktywnością w porównaniu do ekstraktu surowego. W przypadku prób poddanych hydrolizie zasadowej ich aktywność była o około 10% niższa niż w przypadku hydrolizy kwasowej.

Podjęte badania pozwoliły pierwszy raz oznaczyć nowe pochodne kwasu sinapowego obecne w nasionach rzepaku, wskazując także na szereg związków, które oczekują jeszcze na pełną identyfikację. Jednocześnie wykazano wysoką aktywność przeciwutleniającą związków fenolowych, która może mieć istotne znaczenie w ograniczaniu procesów utleniania lipidów.

*Publikacja:*

Siger A., Czubiński J., Dwiecki K., Kachlicki P., Nogala-Kałużka M. (2013). Identification and antioxidant activity of sinapic acid derivatives in *Brassica napus* L. seed meal extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 10, 1130-1138.

**Ad 3. Analiza zawartości związków bioaktywnych w olejach tłoczonych na zimno, otrzymanych z nasion poddanych prażeniu oraz ocena ich potencjału antyoksydacyjnego.**

We wcześniejszych badaniach wykazano że olej rzepakowy charakteryzuje się wysoką zawartością kwasów fenolowych, jednakże przeważająca większość związków fenolowych pozostaje w wyciekach. Prace z ostatnich lat wskazują na możliwość zastosowania obróbki termicznej nasion rzepaku w celu zwiększenia zawartości pochodnych kwasu sinapowego w wyciekach oleju. Dekarboksylacja kwasu sinapowego powoduje powstanie canololu, który łatwiej przechodzi do oleju. Dane literaturowe omawiające tematykę związaną z procesem prażenia nasion z rodzaju *Brassica* odnoszą się do próbek oleju uzyskanego metodą ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi (eter naftowy) z niewielkiej partii nasion (Spielmeyer i in. 2009; Shrestha i in. 2012; Shrestha i De Meulenaer 2014). Kierując się panującym na rynku trendem dotyczącym wzrostu popularności olejów tłoczonych na zimno, podjąłem badania dotyczące wpływu procesu prażenia nasion rzepaku na zawartość związków bioaktywnych i aktywność antyoksydacyjną oleju uzyskanego metodą tłoczenia na zimno. Prażono całe nasiona rzepaku w temperaturach 140, 160 i 180°C i czasie 5, 10 i 15 min. Próbą kontrolną był olej tłoczony na zimno uzyskany z nasion nieprażonych. Olej tłoczono następnego dnia z nasion o ustalonej stałej wilgotności (7%). Z powodu braku dostępności standardu canololu w pierwszym etapie pracy opracowano metodykę jego ilościowego oznaczania (NP-HPLC-FL) oraz przygotowano standard canololu stosując technikę semi-preparatywnej chromatografii cieczowej. Czystość oraz

identyfikację otrzymanego związku zbadano wykorzystując LC/ESI/MS<sup>n</sup>. Profil fragmentacji canololu był następujący: [181] 161, 149, 121. Wykazano, że w oleju z nasion nie poddanych procesowi prażenia obecny jest canolol w ilości 11,54 µg/g. W oleju z nasion prażonych w temperaturze 180°C przez 15 min zawartość tego związku była ponad 50-krotnie wyższa w porównaniu z olejem z nasion nieprażonych. Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ zarówno czasu, jak i temperatury prażenia nasion ( $p < 0,0001$ ) na stopień dekarboksylacji kwasu sinapowego. Równocześnie konieczne było przeprowadzenie równoległych badań dotyczących wpływu procesu prażenia nasion na obecne w rzepaku pozostałe związki biologicznie aktywne (tokoferole, PC-8, fitosterole, związki fenolowe oraz skład kwasów tłuszczowych) oraz na jakość uzyskanego oleju. Stwierdzono, że skład kwasów tłuszczowych olejów uzyskanych z nasion poddanych prażeniu nie różnił się statystycznie istotnie ( $p > 0,05$ ) od próby kontrolnej i był typowy dla oleju rzepakowego. Badane oleje tłoczone na zimno uzyskane z nasion prażonych charakteryzowały się udziałem procentowym kwasów nasyconych poniżej 6,2%, jednonienasyconych w przedziale 63-63,4% i polienowych 31,3-31,7%. Analiza zawartości tokoferoli wykazała, że proces prażenia istotnie statystycznie wpływał na zawartość tej grupy związków w otrzymanych olejach. W przypadku homologu  $\alpha$ -T wykazano spadek jego zawartości od 2,4 do 6,3% w olejach otrzymanych odpowiednio z nasion prażonych w temperaturze 180°C przez 15 min. oraz 160°C przez 10 min. Spadek homologu  $\gamma$ -T stwierdzono tylko w przypadku temperatury prażenia 140°C. Wzrost temperatury prażenia powodował wzrost zawartości tego homologu tokoferolu nawet o 37% dla próby otrzymanej z nasion prażonych w temperaturze 180°C przez 15 min. Przełożyło się to na sumaryczną zawartość tokoferoli. Podobną zależność wykazano dla zawartości PC-8. Po początkowym spadku tego związku w otrzymanych olejach (temperatura prażenia nasion 140°C) obserwowano jego wzrost – szczególnie w olejach otrzymanych z nasion poddanych prażeniu w temperaturze 180°C. Analizując skład fitosteroli stwierdzono, że temperatura i czas tłoczenia mają istotny statystycznie ( $p < 0,0001$ ) wpływ na ich poziom o trzymany oleju. Wykazano, że prażenie nasion w temperaturze 180°C przez 15 min. powodowało istotny statystycznie spadek zawartości takich fitosteroli jak: kampesterol,  $\beta$ -sitosterol i awenasterol. Analizując zawartość przeciwutleniaczy hydrofilowych wykazano w frakcji polarnej badanych olejów obecność: kwasu ferulowego, kwasu sinapowego (izomeru *trans* i *cis*), sinapiny oraz dwóch niezidentyfikowanych pochodnych kwasu sinapowego. W oleju z nasion nieprażonych zawartość kwasu sinapowego wyniosła 497,44 µg/100g (izomer *trans*) i

5,67  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (izomer *cis*). W olejach z nasion prażonych w temperaturze 140°C zawartość kwasu sinapowego *cis* wzrosła do 26,57  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (czas prażenia 10 min.). Znaczący wzrost zawartości kwasu sinapowego *trans* zanotowano w olejach prażonych w temperaturze 180°C. Analiza statystyczna wykazała istotny ( $p < 0,0001$ ) wpływ czasu i temperatury prażenia nasion rzepaku na aktywność antyoksydacyjną olejów tłoczonych na zimno. Wpływ ten był wprost proporcjonalny i korelował z zawartością canololu w badanych próbach. Współczynnik korelacji Pearsona wyniósł  $r = 0,97$  ( $p < 0,0001$ ). W stosunku do zawartości  $\gamma$ -T i PC-8 współczynnik korelacji wyniósł odpowiednio  $r = 0,91$  ( $p < 0,001$ ) i  $r = 0,58$  ( $p = 0,0214$ ). Natomiast dla  $\alpha$ -T, wykazano brak statystycznie istotnej korelacji ( $p > 0,05$ ). Analizując zawartość związków fenolowych obecnych w olejach wykazano ujemną korelację pomiędzy sumą zawartości związków fenolowych a aktywnością antyoksydacyjną ( $r = -0,52$ ;  $p < 0,0001$ ). Może to sugerować, że wraz ze wzrostem temperatury i czasu prażenia zawartość związków fenolowych (pochodnych kwasu sinapowego) obecnych w oleju maleje, jednocześnie ulegając dekarboksylacji tworząc canolol. Należy jednak pamiętać, że w wytlókach pozostaje większość związków fenolowych i nie cały canolol przechodzi do oleju w czasie tłoczenia. Należy mieć także na uwadze, iż na wzrost aktywności antyoksydacyjnej wpływ mogą mieć także produkty reakcji Maillarda, które wykazują działanie przeciwutleniające, co udowodniono w wielu układach modelowych, a także w niektórych produktach żywnościowych zawierających lipidy. Jakość otrzymanych olejów tłoczonych na zimno z nasion poddanych prażeniu określano poprzez oznaczenie liczby nadtlencowej (LOO) i kwasowej (LK). Wartości liczby kwasowej jakie uzyskano dla olejów rzepakowych wytlóczonych z nasion poddanych procesowi prażenia mieściły się w przedziale 0,51 – 0,68 mg KOH/g i nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w porównaniu do próby kontrolnej. Liczba nadtlencowa wahała się w granicach pomiędzy 2,03 – 3,48 meq  $\text{O}_2/\text{kg}$  dla olejów otrzymanych z nasion prażonych. Wartość liczby nadtlencowej dla próby kontrolnej wynosiła 3,11 meq  $\text{O}_2/\text{kg}$ . Według Codex Alimentarius (1999), olej rzepakowy tłoczony na zimno, powinien charakteryzować się liczbą kwasową na poziomie  $\text{LK} < 4$  mg KOH/kg, natomiast liczbą nadtlencową  $\text{LOO} < 15$  meq  $\text{O}_2/\text{kg}$ . Wartości LOO i LK uzyskanych olejów nie przekraczały maksymalnych dopuszczalnych wartości.

*Publikacja:*

Siger A., Kaczmarek A., Rudzińska M. (2015). Antioxidant activity and phytochemical content of cold-pressed rapeseed oil obtained from roasted seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 1225-1237.

**Ad 4. Analiza zawartości związków bioaktywnych w olejach resztkowych (ekstrahowanych z wytlóków), otrzymanych z nasion poddanych prażeniu oraz ocena ich potencjału antyoksydacyjnego.**

Brak danych dotyczących zawartości canololu w oleju resztkowym z wytlóków uniemożliwia obliczenie efektywności przechodzenia tego związku do oleju podczas procesu tłoczenia na zimno oraz wytypowanie optymalnych warunków procesu prażenia pozwalających zmaksymalizować zawartość tego związku w oleju tłoczonym na zimno. Dlatego też kolejnym etapem pracy była analiza zawartości canololu i innych substancji bioaktywnych zawartych w oleju ekstrahowanym z wytlóków. Zawartość tłuszczu resztkowego w wytlókach uzyskanych po tłoczeniu oleju z nasion nie prażonych wynosiła 24,3%. Analiza statystyczna wykazała, że w wytlókach z nasion poddanych prażeniu zawartość tłuszczu była statystycznie istotnie większa ( $p < 0,0001$ ). Zawartość tłuszczu wahała się od 25,6% (nasiona prażone w temperaturze 160°C przez 10 min.) do 29,1% (nasiona prażone w temperaturze 140°C przez 10 min.).

Szczegółowa analiza zawartości canololu w oleju resztkowym wykazała, że podczas tłoczenia oleju z nasion prażonych w temperaturze 180°C większość tego związku przechodzi do oleju w trakcie tłoczenia. Odwrotną zależność stwierdzono w przypadku prób nasion prażonych w temperaturze 140 i 160°C, gdzie większość canololu pozostaje w wytlókach. Biorąc pod uwagę wydajność tłoczenia, zawartość tłuszczu w nasionach oraz zawartość tłuszczu resztkowego w wytlókach, obliczono całkowitą zawartość canololu jaka przypada na jeden gram tłuszczu w nasionach. W przypadku nasion nieprażonych zawartość canololu wyniosła 17,89 µg/g tłuszczu w nasionach. W próbach poddanych prażeniu obliczona zawartość canololu wahała się od 55,56 do 396,16 µg/g tłuszczu w nasionach. Wykazano, że w granicach stosowanych temperatur i czasów prażenia dany poziom canololu w przeliczeniu na całkowitą zawartość tłuszczu w nasionach rzepaku można uzyskać przez zwiększenie temperatury prażenia lub wydłużenie jego czasu w niższej temperaturze.

W analizowanych próbach oleju resztkowego nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w procentowym składzie kwasów tłuszczowych pomiędzy olejem uzyskanym z wytlóków z nasion nieprażonych vs. prażonych. Jednakże w oleju ekstrahowanym z wytlóków wykazano obecność kwasu erukowego, którego nie oznaczono w oleju tłoczonym na zimno. Wykazano, że olej resztkowy wyekstrahowany z wytlóków nasion rzepaku poddanych procesowi prażenia charakteryzował się niższą zawartością tokoferoli (szczególnie w przypadku prób prażonych w

temperaturze 160 i 180°C). Natomiast zawartość PC-8 w oleju resztkowym była o 4 mg/100g wyższa niż w oleju tłoczonym na zimno. Również zawartość fitosteroli była wyższa w oleju resztkowym niż w oleju tłoczonym na zimno. Zawartość fitosteroli wahała się od 4141,9 do 4826,1 µg/g oleju. Analiza statystyczna potwierdziła, że badane oleje resztkowe uzyskane z wytlóków różnią się pod kątem zawartości substancji biologicznie aktywnych od olejów tłoczonych na zimno, co potwierdzono wykorzystując analizę składowych głównych (PCA).

*Publikacja:*

*Siger A., Michalak M., Rudzińska M. (2015). Canolol, tocopherols, plastochromanol-8 and phytosterols content in residual oil extracted from rapeseed expeller cake obtained from roasted seed. European Journal of Lipid Science and Technology, DOI: 10.1002/ejlt.201500314*

**Ad 5. Analiza sensoryczna oraz ocena stabilności oksydacyjnej olejów tłoczonych z nasion poddanych prażeniu w teście długotrwałego przechowywania w warunkach chłodniczych oraz określenie zmian w zawartości natywnych przeciwutleniaczy.**

Brak opracowań naukowych dotyczących wpływu procesu prażenia nasion rzepaku na profil sensoryczny otrzymanych z nich olejów przyczynił się do podjęcia tej tematyki jako kolejnego etapu pracy. Ocenę sensoryczną oparto na metodzie profilowej, która znalazła szerokie zastosowanie w analizie żywności, m.in. w opracowaniu nowych produktów. Wykazano, że zapach typowy dla nasion, tzw. „zielony” oraz „sianowo/zbożowy” to wyróżniki jakie zostały przypisane do oleju tłoczonego z nasion nieprażonych. Prażenie nasion powodowało spadek wyczuwalności wyróżników charakterystycznych dla próby kontrolnej. Oleje tłoczone na zimno z nasion prażonych w temperaturze 140°C charakteryzowały się głównie zapachem „orzechowym” oraz „opiekanych orzechów/nasion”. W temperaturze 160°C stwierdzono wzrost wyczuwalnego zapachu „opiekanych orzechów/nasion”, natomiast próby z nasion prażonych w temperaturze 180°C charakteryzowały się spadkiem wyczuwalności zapachu „orzechowego” na korzyść „opiekanych orzechów/nasion” oraz wyraźnym wzrostem wyróżnika „prażonych/przypalonych nasion”. Analizując smak, wykazano, że olej z nasion nieprażonych został scharakteryzowany wyróżnikami: „sianowo/zbożowy” oraz „pochodzący od nasion”. Smak „orzechowy” i „opiekanych orzechów/nasion” charakteryzował oleje tłoczone z nasion prażonych w temperaturze 140 i 160°C. Wyróżniki „prażone/przypalone nasiona” były wyczuwalne w olejach z nasion prażonych w najwyższej temperaturze. Ogólna ocena olejów uzyskanych z nasion poddanych prażeniu była wyższa w porównaniu do próby kontrolnej.

W kolejnym etapie badań określono stabilność oksydacyjną olejów tłoczonych z nasion prażonych w teście długotrwałego przechowywania. Badania dotyczące stabilności oksydacyjnej najczęściej prowadzi się za pomocą tzw. testów przyspieszonych, które przeprowadza się w wysokich temperaturach (Rancimat, Oxidograph test). Jednakże w wysokich temperaturach reakcje polimeryzacji i cyklizacji wysuwają się na pierwszy plan, i nie są porównywalne z reakcjami przebiegającymi w warunkach normalnych. Przeprowadzone badania pozwoliły na prześledzenie zmian podczas przechowywania oleju w warunkach przechowalniczo-chłodniczych oraz stopień degradacji składników bioaktywnych. Wykazano, że po 6 i 12 miesiącach przechowywania LOO dla próby kontrolnej wzrosła odpowiednio do 12,79 i 38,27 meq O<sub>2</sub>/kg. Proces prażenia nasion wpływał istotnie statystycznie ( $p < 0,0001$ ) na wartość liczby nadtlenkowej w badanych olejach. W przypadku olejów uzyskanych z nasion prażonych w temperaturze 140 i 160°C wykazano, że na wartość LOO wpływa zarówno temperatura, jak i czas prażenia nasion. W przypadku olejów wytłoczonych z nasion prażonych w temperaturze 180°C czas prażenia nasion nie wpływał istotnie statystycznie na wartości LOO, szczególnie po 12 miesiącach przechowywania. Wartości LOO w olejach z nasion prażonych w temperaturze 160 i 180°C po 12 miesiącach przechowywania wahały się od 14,74 do 18,96 meq O<sub>2</sub>/kg. Wykazano znacznie dłuższy okres przydatności do spożycia olejów uzyskanych z nasion prażonych (oprócz wariantu prażenia w temperaturze 140°C przez 5 min.). Oleje te dopiero po roku przechowywania przekroczyły maksymalne dopuszczalne wartości podawane przez Codex Alimentarius. Natomiast próba kontrolna już po 6 miesiącach przechowywania osiągnęła wartość (12,79 meq O<sub>2</sub>/kg) zbliżoną do maksymalnej dopuszczalnej przez normy. W przypadku LK wykazano, że wszystkie badane oleje uzyskane z nasion prażonych charakteryzowały się niższymi zawartościami wolnych kwasów tłuszczowych w porównaniu do próby kontrolnej. W trakcie przechowywania badanych olejów wykazano spadek zawartości związków biologicznie aktywnych. W próbie kontrolnej zawartość canololu zmniejszyła się o 15% po przechowywaniu przez 6 miesięcy oraz 61% po przechowywaniu przez 12 miesięcy. Stwierdzono, że po 6 miesięcznym przechowywaniu w olejach uzyskanych z nasion prażonych spadek zawartości canololu wyniósł: 8-27% (prażenie w 140°C), 13-18% (prażenie w 160°C), 17-23% (prażenie w 180°C). Po 12 miesiącach przechowywania wykazano, że ubytek canololu w olejach tłoczonych z nasion prażonych był niższy niż dla próby kontrolnej i wyniósł: 31-45% (prażenie w 140°C), 17-22% (prażenie w 160°C), 18 do 33% (prażenie w 180°C). Obserwowano także spadek zawartości tokoferoli w badanych olejach. W przypadku próby kontrolnej po 6 miesiącach przechowywania

stwierdzono 15,9% spadek  $\delta$ -T. W przypadku homologu  $\alpha$ -T i  $\gamma$ -T spadek ten wyniósł odpowiednio 4,4 i 4,8%. Po roku przechowywania stwierdzono, że najwięcej ubywało homologu  $\alpha$ -T oraz  $\delta$ -T (ubytek odpowiednio o 36,6 i 35,4%, w stosunku do próby kontrolnej zaraz po wytłoczeniu oleju). W przypadku homologu  $\gamma$ -T spadek ten wyniósł 17,5%. Analizując zawartość PC-8 w próbie kontrolnej wykazano, że jego zawartość zmalała o 19,6 i 39,8%, odpowiednio po 6 i 12 miesiącach przechowywania. Zawartość tokoferoli w olejach tłoczonych z nasion prażonych po 6 miesiącach zmniejszyła się od 3,6 do 10,6%. Wykazano wyższy ubytek  $\delta$ -T – spadki tego homologu w większości przypadków były wyższe niż w próbie kontrolnej i wynosiły od 10,5 do 32,6%. W przypadku olejów uzyskanych z nasion prażonych w temperaturze 180°C wykazano wyższy ubytek homologu  $\gamma$ -T niż  $\alpha$ -T. Zawartość PC-8 zmniejszyła się od 27 do 30,6%. Po roku przechowywania wykazano najwyższy ubytek homologu  $\alpha$ -T, którego spadek wyniósł od 32,6 do 36,2% jednakże był niższy niż w przypadku próby kontrolnej. W olejach przechowywanych przez 12 miesięcy otrzymanych z nasion prażonych w temperaturze 160 i 180°C wykazano statystycznie istotnie ( $p < 0,0001$ ) wyższą zawartość tego homologu w porównaniu do próby kontrolnej. W przypadku PC-8 wykazano że w olejach otrzymanych z nasion prażonych w temperaturze 180°C ubytek zawartości tego związku był najwyższy i przekraczał 40% po roku przechowywania. W pozostałych próbach łącznie z próbą kontrolną spadek PC-8 po 12 miesiącach przechowywania nie przekraczał 40%. W trakcie przechowywania olejów tłoczonych na zimno z nasion poddanych procesowi prażenia obserwowano także spadek aktywności antyoksydacyjnej, jednakże był on mniejszy niż w przypadku próby kontrolnej. Po pół roku przechowywania wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną a zawartością canololu ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,0001$ ), zawartością  $\gamma$ -T ( $r = 0,95$ ;  $p < 0,0001$ ), sumą tokoferoli ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,0001$ ). Podobne zależności zanotowano dla prób po 12 miesiącach przechowywania. Przeprowadzona analiza statystyczna potwierdziła że stabilność oksydacyjna prób olejów uzyskanych z nasion prażonych, szczególnie w temperaturze 180°C jest znacząco wyższa w stosunku do próby kontrolnej, co obrazuje analiza składowych głównych.

*Publikacja:*

Siger A., Michalak M. (2015). *The long-term storage of cold-pressed oil from roasted rapeseed: Effects on antioxidant activity and levels of canolol and tocopherols. European Journal of Lipid Science and Technology, DOI: 10.1002/ejlt.201500183.*



## Podsumowanie

Uzyskane wyniki mają zarówno charakter poznawczy jak i aplikacyjny. Do głównych osiągnięć przeprowadzonych przez mnie badań należą:

- Określenie pełnego profilu zawartości związków fenolowych oleju rzepakowego oraz nasion rzepaku, a także identyfikacja nowych pochodnych kwasu sinapowego obecnych w nasionach rzepaku: 3-gentiobiozyd-7-synapoiloglukozyd kemferolu oraz 3-glukozyd-7-synapoiloglukozyd kemferolu.
- Opracowanie metody pozyskiwania standardu canololu przy pomocy semi-preparatywnej chromatografii cieczowej, co pozwoliło na jego dokładną analizę w badanych próbach.
- Wskazanie możliwości otrzymania „nowego” produktu jakim jest olej rzepakowy tłoczony na zimno wzbogacony w canolol przez zastosowanie zabiegu prażenia nasion przed tłoczeniem.
- Stwierdzenie, że zarówno temperatura i czas prażenia nasion przed tłoczeniem oleju istotnie wpływają na zawartość canololu w wytłoczonym z nich oleju - do ponad 50-krotnego zwiększenia zawartości tego związku w oleju tłoczonym z nasion prażonych.
- Wykazanie, że podczas tłoczenia nasion prażonych w temperaturze 180°C większość canololu przechodzi do oleju. Podczas tłoczenia oleju z nasion prażonych w temperaturze 140 i 160°C większość tego związku pozostaje w wytlókach.
- Stwierdzenie, że proces prażenia nasion rzepaku nie wpływał negatywnie na poziom innych natywnych związków biologicznie aktywnych zawartych w tłoczonym oleju rzepakowym, jednocześnie oleje te charakteryzowały się dwukrotnie wyższą aktywnością antyoksydacyjną.
- Stwierdzenie, że oleje uzyskane z nasion prażonych charakteryzują się odmiennym profilem sensorycznym, a ogólna ich ocena była wyższa niż oleju z nasion nieprażonych.
- Udowodnienie, że oleje wzbogacone w zawartość canololu charakteryzują się znacznie wyższą stabilnością oksydacyjną, co powoduje wydłużenie terminu przydatności do spożycia o pół roku w porównaniu do próby kontrolnej.

## Wykaz cytowanej literatury

1. Achary A.A., Chen Y., Eskin N.M.A., Thiyam-Holländer U. Effect of crude canolol and canola distillate extracts on the stability of refined canola oil during deep-fat frying. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2014, 116, 1467–1476.
2. Bartkowiak-Broda I., Cegielska-Taras T., Spasibionek S., Mikołajczyk K., Piętka T., Piotrowska A., Matuszczak M. Breeding strategies for improvement quality of winter oilseed rape (*Brassica napus*

- L.) yield seeds. Modern variety breeding for present and future needs – 18th EUCARPIA General Congress, Valencia 2008, 540-545.
3. Codex Alimentarius Commission: Fats, Oils & Related Products. Codex Alimentarius Commission: Codex Standard for Edible Fats and Oils Not Covered by Individual Standards (CODEX STAN 210–1999).
  4. Engels C., Schieber A., Gänzle M. G. Sinapic acid derivatives in defatted oriental mustard (*Brassica juncea* L.) seed meal extracts using UHPLC-DAD-ESI-MS and identification of compound with antibacterial activity. *Eur. Food Res. Technol.*, 2012, 234, 535-542.
  5. Galano A., Francisco-Marquez M., Alvarez-Idaboy J.R. Canolol: a promising chemical agent against oxidative stress. *J. Phys. Chem.*, 2011, 115, 8590-8596.
  6. Khattab R., Eskin M., Aliani M., Thiyam U. Determination of sinapic acid derivatives in canola extracts using high-performance liquid chromatography. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 2010, 87, 147-155.
  7. Koski A., Pekkarinen S., Hopia A., Wähälä K., Heinonen M. Processing of rapeseed oil: Effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *Eur. Food Res. Technol.*, 2003, 217, 110–114.
  8. Marwede V., Schierholt A., Mollers C., Becker H.C., Genotype x environment interactions and heritability of tocopherol contents in canola. *Crop Sci.*, 2004, 44, 728-731.
  9. Matthäus B., Pudiel F., Chen Y., Achary A., Thiyam-Holländer U. Impact of canolol-enriched extract from heat-treated canola meal to enhance oil quality parameters in deep-frying: A comparison with rosemary extracts and TBHQ-fortified oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2014, 91, 2065–2068.
  10. Moltke-Sørensen A.D., Friel J., Winkler-Moser J.K., Jacobsen C., Huidrom D., Reddy N., Thiyam-Holländer U. Impact of endogenous canola phenolics on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2013, 115, 501–512.
  11. Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, 1571–1576.
  12. Raclaru M., Gruber J., Kumar R, Sadre R., Luhs W. Increase of the tocochromanol content in transgenic *Brassica napus* seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. *Mol. Breed.* 2006, 18, 93-107.
  13. Servili M., Montedoro G.F. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2002, 104, 602-613.
  14. Shrestha K., De Meulenaer B. Effect of seed roasting on canolol, tocopherol, and phospholipid contents, Maillard type reactions, and oxidative stability of mustard and rapeseed oils. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, 62, 5412–5419.
  15. Shrestha K., Stevens C.V., De Meulenaer B. Isolation and identification of a potent radical scavenger (canolol) from roasted high erucic mustard seed oil from Nepal and its formation during roasting. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 7506–7512.
  16. Siger A., Michalak M., Cegielska-Taras T., Szała L., Lembicz J., Nogala-Kałucka M. Genotype and environment effects on tocopherol and plastochromanol-8 contents of winter oilseed rape doubled haploid lines derived from F1 plants of the cross between yellow and black seeds. *Ind. Crops Prod.*, 2015, 65, 134-141.
  17. Simopoulos A.P., Leaf A., Salem Jr. N. Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Prostag. Leukotr. Ess. Fatty Acids.*, 2000, 63, 119–121.
  18. Spielmeier A., Wagner A., Jahreis G. Influence of thermal treatment of rapeseed on the canolol content. *Food Chem.*, 2009, 112, 944–948.
  19. Thiyam U., Pickardt C., Ungewiss J., Baumert A. De-oiled rapeseed and a protein isolate: characterization of sinapic acid derivatives by HPLC-DAD and LC-MS. *Eur. Food Res. Technol.*, 2009, 229, 825-831.
  20. Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S., La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.*, 2005, 18, 98-112.

21. Wakamatsu D., Morimura S., Sawa T., Kida K., Nakai C., Maeda H. Isolation, identification, and structure of a potent alkyl-peroxyl radical scavenger in crude canola oil, canolol. *Biosc. Biotech. Biochem.*, 2005, 69, 1568–1574.
22. Wang X., Zhang C., Li L., Fritsche S., Endrigkeit J., Zhang W., Long Y., Jung C., Meng J. Unraveling the genetic basis of seed tocopherol content and composition in rapeseed (*Brassica napus* L.). *PLoS ONE*, 2012, 7, 11, 1-15.
23. Zadernowski R., Kozłowska H. Phenolic acids in soybean and rapeseed flours. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 1983, 16, 110-114.

### **4.3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

#### **4.3.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk rolniczych**

Początek mojej pracy badawczej związany jest z realizacją pracy magisterskiej w Katedrze Biochemii i Analizy Żywności Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, gdzie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Eleonory Lampart-Szczapy prowadziłem badania dotyczące zawartości związków fenolowych nasion łubinu i ich właściwości przeciwbakteryjnych. W pracy magisterskiej pt. „Ocena antymikrobiologicznych właściwości związków fenolowych łubinu” wykazałem hamujący wpływ natywnych związków fenolowych ekstrahowanych z nasion łubinu, na rozwój bakterii *Escherichia coli* oraz *Bacillus subtilis*. Uzyskane wyniki były prezentowane na konferencjach naukowych dotyczących roślin strączkowych, w tym jednej o zasięgu międzynarodowym (A.3.1., A.4.1.), a także opublikowano je w czasopiśmie *Nahrung/Food* (A.1.1.). Zaraz po ukończeniu studiów w czerwcu 2000 roku rozpocząłem pracę w Katedrze Biochemii i Analizy Żywności, Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu na stanowisku starszego referenta technicznego. W tym czasie aktywnie włączałem się w badania prowadzone w Katedrze dotyczące biosyntezy i właściwości tokochromanoli, ich zawartości w wybranych olejach jadalnych i tłuszczach roślinnych oraz przemianami rodnikowymi w procesie autooksydacji lipidów. Efekty mojej pracy przedstawiono w publikacjach naukowych (A.1.2., A.2.4., A.2.5., A.2.6., A.2.8., A.2.10.) oraz doniesieniach konferencyjnych (A.3.2., A.4.2., A.4.3., A.4.4., A.4.5., A.4.6., A.4.11., A.4.13.). W 2001 roku za osiągnięcia w pracy zespołowej zostałem wyróżniony nagrodą J.M. Rektora Akademii Rolniczej w Poznaniu. W tym samym roku rozpocząłem Niestacjonarne Studia Doktoranckie przy Wydziale Technologii Żywności. Tematyka badawcza dotyczyła natywnych przeciwutleniaczy rzepaku. Prowadziłem badania dotyczące biosyntezy lipofilnych i hydrofilnych antyoksydantów rzepaku. Analizowałem różne części anatomiczne w kolejnych fazach rozwojowych rośliny. Wykazałem, że w zielonych częściach w

większej ilości zachodziła biosynteza homologu  $\alpha$ -T, natomiast  $\gamma$ -T głównie tworzył się w nasionach. Zawartość związków fenolowych wzrastała w końcowym etapie dojrzewania zarówno w liściach jak i nasionach. W badaniach dotyczących wpływu suszenia rzepaku na degradację przeciwutleniaczy wykazałem, że niezależnie od zastosowanej temperatury i czasu suszenia nasion następował ubytek przeciwutleniaczy lipofilnych. Zawartość tokoferoli i PC-8 zmniejszyła się o 10%, a  $\beta$ -karotenu o 20%. W trakcie dalszego przechowywania przez 12 miesięcy w nasionach rzepaku następował dalszy ubytek przeciwutleniaczy – wyższy dla antyoksydantów lipofilnych (46%) i minimalny dla hydrofilnych (2%). Kolejny etap moich badań to wpływ rafinacji i utwardzania na profil natywnych przeciwutleniaczy oleju rzepakowego. Stwierdziłem, że ubytek homologicznych tokoferoli w procesie rafinacji wynosił 18% i nie był równocenny w poszczególnych etapach. W stosunku do początkowej ilości, w oleju surowym zawartość PC-8 obniżyła się o 38%, a  $\beta$ -karotenu o 95%. Proces utwardzania działał drastycniej na tokoferole niż rafinacja powodując dalsze obniżenie ich zawartości o 31%, przy czym najwięcej rozkładało się homologu  $\alpha$ -T (około 35%). Ubytek PC-8 w tym procesie wynosił 88%. Jednocześnie ze spadkiem zawartości przeciwutleniaczy statystycznie istotnie malała aktywność antyrodnikowa. W ostatnim etapie prowadziłem badania dotyczące ogrzewania i smażenia produktów - wysokobiałkowego i wysokoskrobiowego na zawartość przeciwutleniaczy. Wykazałem, istotny wpływ wysokiej temperatury na rozkład homologicznych tokoferoli w medium tłuszczowym, których ilość obniżała się statystycznie istotnie. Poziom i tempo destrukcji tokoferoli zależały od stopnia przetworzenia użytego oleju rzepakowego. W przypadku smażenia produktu wysokoskrobiowego wykazałem całkowity ubytek tokoferoli już po pierwszym cyklu smażenia (po 8 godzinach), natomiast dla produktu wysokobiałkowego ilość tokoferoli w oleju obniżyła się do 2% początkowej zawartości po szóstym cyklu smażenia (po 48 godzin). Badania te prowadzone były w ramach projektu badawczego, zamawianego pt. „Weryfikacja zasad technologii wytwarzania i wykorzystania żywności bogatej w naturalne antyoksydanty, pod względem jej działania prozdrowotnego”. Pracę doktorską pt. „Natywne przeciwutleniacze rzepaku i ich przemiany w wybranych procesach technologicznych” przygotowałem pod opieką Pani prof. dr hab. Małgorzaty Nogali-Kałuckiej i obroniłem w 2007 roku. W czasie trwania Studiów Doktoranckich uczestniczyłem w warsztatach „Metody immunochemiczne w badaniach i analizie żywności”, w szkoleniu „Zastosowanie chromatografii gazowej i cieczowej w badaniach medycznych i farmakologii”, a także ukończyłem Kurs Pedagogiczny w ramach Studium Doktoranckiego. W trakcie Studiów Doktoranckich potrafiłem pogodzić pracę na stanowisku

starszego referenta technicznego z pracą naukową, czego dowodem są liczne publikacje (A.2.1., A.2.2., A.2.3., A.2.7., A.2.9., A.4.7., A.4.8., A.4.9., A.4.10., A.4.12.) oraz dwie nagrody przyznane przez J.M. Rektora Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu za osiągnięcia w pracy zawodowej – w 2003 i 2005 roku. W trakcie pracy i Studiów Doktoranckich brałem także udział w badaniach prowadzonych w ramach projektu badawczego pt. „Zastosowanie metod fizycznych do badania właściwości przeciwutleniających natywnych antyoksydantów (tokochromanoli i flawonoli) w membranach lipidowych”. W ramach projektu opracowałem metodykę oznaczania wodoronadtlenków w emulsjach przy zastosowaniu chromatografii cieczowej, po wcześniejszym przygotowaniu standardów tych związków. Badano różne układy modelowe (kwasy tłuszczowe, tokoferole, związki fenolowe) i różne generatory wolnych rodników (AAPH, CuSO<sub>4</sub>). Uzyskane wyniki przedstawiono w pracach opublikowanych w czasopismach z listy JCR Food Research International i European Journal of Lipid Science and Technology (B.1.1., B.1.3.). W trakcie Studiów Doktoranckich i pracy na stanowisku starszego referenta technicznego brałem także aktywny udział w przygotowywaniu i prowadzeniu zajęć ze studentami z takich przedmiotów jak: Metody analizy żywności i Wybrane zagadnienia z enzymologii z elementami biochemii, zarówno na studiach stacjonarnych jak i niestacjonarnych.

#### **4.3.2. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych**

Pracując w Katedrze Biochemii i Analizy Żywności uzyskałem doświadczenie zawodowe przygotowujące mnie do przeprowadzenia badań w laboratorium chemicznym w szczególności z zakresu analityki żywności. Przyczyniło się to także do wypracowania własnego warsztatu badawczego oraz ukształtowania zainteresowań naukowych, w których można wyodrębnić pięć głównych obszarów:

1. Wykorzystanie niekonwencjonalnych źródeł (surowców) do otrzymywania produktów bogatych w związki bioaktywne.
2. Wpływ warunków obróbki pozbiorowej nasion rzepaku na zmiany zawartości natywnych przeciwutleniaczy.
3. Opracowanie nowych metod analitycznych oznaczania związków bioaktywnych oraz wykorzystania ich do wykrywania zafałszowania żywności.

4. Badania dotyczące determinacji genetycznej związków bioaktywnych zawartych w nasionach rzepaku oraz zwiększenia ich zawartości poprzez zastosowanie podwojonych haploidów w hodowli rzepaku.
5. Analiza zawartości związków fenolowych w surowcach roślinnych i ich oddziaływanie z innymi składnikami matrycy.

#### Ad. 1.

W ramach badań statutowych prowadzonych w Katedrze pod kierunkiem pani prof. dr hab. Małgorzaty Nogali-Kałużkiej prowadzono wspólne badania dotyczące analizy zawartości natywnych przeciwutleniaczy oraz ich aktywności antyoksydacyjnej w niekonwencjonalnych nasionach roślin oleistych: żmijowiec zwyczajny, ogórecznik lekarski, rokitnik pospolity, czarnuszka, dzika róża, wiesiołek, pigwa, krokosz barwierski. Badania wykazały, że najwięcej tokochromanoli występuje w nasionach ogórecznika lekarskiego, natomiast fitosteroli w żmijowcu zwyczajnym. Najwyższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się nasiona wiesiołka co było skorelowane z wysoką zawartością związków fenolowych (B.1.6., B.6.14., B.6.25.). Moje doświadczenie w analizie związków bioaktywnych zaowocowało współpracą z Zakładem Chemii Żywności i Analizy Instrumentalnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Z panią dr hab. Magdaleną Rudzińską i stypendystami z Egiptu (Hassanien M.M.M., Abdel-Razek A.G.) wykonaliśmy badania dotyczące analizy związków fitochemicznych i stabilności oksydacyjnej olejów otrzymanych z nietradycyjnych źródeł, takich jak nasiona czarnuszki, kiełki pszenicy, pestki pomidorów, pestki grejpfruta, nasiona moreli oraz ich mieszanek z olejem rzepakowym. Oleje scharakteryzowano pod kątem zawartości tokoferoli, tokotrienoli, fitosteroli, fitostanoli. Zbadano także stabilność oksydacyjną uzyskanych prób olejów tłoczonych na zimno. Wykazano, że olej z pestek moreli charakteryzował się najwyższym udziałem kwasu oleinowego (67%). W pozostałych olejach dominował kwas linolowy (C18:2 n-6). Analizując fitosterole wykazano, że  $\beta$ -sitosterol dominował we wszystkich badanych olejach. Jednocześnie stwierdzono, że olej z kiełków pszenicy zawierał go ponad 10-krotnie więcej niż pozostałe badane oleje. Oleje z pestek winogron oraz z nasion czarnuszki zawierały najwyższą zawartość tokotrienoli, jednocześnie charakteryzowały się najniższą stabilnością oksydacyjną (B.1.26., B.1.42.).

W 2013 roku odbyłem 6 tygodniowy staż naukowy w Łotewskim Państwowym Instytucie Uprawy Owoców w Dobele (Łotwa) pt. "Design the functional food enriched with fruit by-

products – from concept to marketplace”. W ramach stażu podjąłem próbę zaprojektowania żywności funkcjonalnej z wykorzystaniem produktów odpadowych. Po odbytym stażu w dalszym ciągu kontynuuję współpracę z Instytutem w Dobele w ramach podpisanej umowy (A.5). Jednym z badanych w ramach współpracy surowców były nasiona pigwy (produkt odpadowy), które wykorzystano do produkcji oleju tłoczonego na zimno. Uzyskany olej analizowano pod kątem zawartości związków biologicznie aktywnych (skład kwasów tłuszczowych, tokoferole, PC-8, fitosterole, związki fenolowe) oraz dokonano pełnej jego fizyko-chemicznej charakterystyki (m. in. barwa, indeks refrakcji, gęstość, zawartość  $\beta$ -karotenu, chlorofilu, chemiczne wskaźniki właściwości oleju). Porównano także zawartość bioaktywnych składników w oleju z nasion pigwy z 9 innymi popularnymi olejami tłoczonymi na zimno. Wykazano, że pod kątem wartości odżywczych olej ten znacząco się wyróżniał. Charakteryzował się wyższą zawartością tokoferoli,  $\beta$ -karotenu, związków fenolowych, co przełożyło się także na wyższą aktywność antyoksydacyjną. Przeprowadzona analiza sensoryczna wykazała, że olej z nasion pigwy uzyskał podobny poziom akceptowalności jak inne badane oleje. Wykazano, że nasiona pigwy jako produkt odpadowy przemysłu owocowo-warzywnego można wykorzystać do produkcji oleju tłoczonego na zimno, bogatego w natywne bioskładniki (B.1.17., B.1.23.). Kolejnym badanym surowcem był rokitnik pospolity (*Hippophae rhamnoides* L.). Jest to gatunek rośliny z rodziny oliwnikowatych ceniony za owoce, które bogate są w witaminy, składniki mineralne i przeciwutleniacze. W badaniach wykazano, że również liście tej rośliny można wykorzystać jako potencjalne źródło natywnych przeciwutleniaczy (tokoferole, PC-8, związki fenolowe i  $\beta$ -karoten), a ich zawartość zależy od pory zbioru – liście zebrane jesienią charakteryzowały się ponad 2-krotnie wyższą zawartością tokoferoli niż liście zbierane latem. Wyższą zawartość przeciwutleniaczy zanotowano także w liściach zbieranych z drzew żeńskich. Podczas badań oceniono również wpływ metody suszenia liści rokitnika na straty natywnych przeciwutleniaczy. Najmniejsze straty tych związków wykazano podczas liofilizacji i suszenia mikrofalowego (B.1.25., B.1.35.).

W ramach współpracy z Instytutem Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie przeanalizowałem grupę roślin oleistych pod kątem możliwości zastosowania klasycznej metody pozyskiwania oleju. Celem badań było określenie tzw. punktu olejowego, czyli podatności nasion na wyolejenie. Badaniu poddano nasiona: pigwy, krokosza, czarnuszki, rzeżuchy siewnej, maziczki, fałdzistki, rokitnika, ogórecznika, wiesiołka, gorczyca białej, żmijowca, dzikiej róży, Inianki, Inu, rzepiku, katranu abisyńskiego, słonecznika i rzodkwi. Materiał referencyjny

stanowiły nasiona kilku odmian rzepaku. Badania pozwoliły na sklasyfikowanie nasion roślin oleistych na siedem głównych grup pod względem podatności na wyolejenie określone za pomocą wyznaczenia ciśnienia punktu olejowego. Informacje te są bardzo istotne ponieważ urządzenia do pozyskiwania oleju metodą tłoczenia na zimno zazwyczaj dedykowane są do pewnego zakresu ciśnień roboczych (B.1.8.).

W latach 2010-2015 pracowałem w projekcie, który realizowany był w ramach funduszy strukturalnych POIG nr: 01.01.02-00-061/09, pt. „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych”, (kierownik – prof. dr hab. Józef Korczak) (B.9.5.). W projekcie tym prowadziłem badania dotyczące oceny podstawowego składu chemicznego oraz substancji bioaktywnych ( tokoferole, tokotrienole, PC-8, związki fenolowe, solanina, chakonina) w surowcach oraz gotowych produktach. W ramach grantu i współpracy z dr inż. Magdaleną Zielińską-Dawidziak analizowałem zmianę profili natywnych przeciwutleniaczy w kiełkach sojowych i łubinowych otrzymywanych poprzez hodowlę w roztworze  $\text{FeSO}_4$ . Kiełki te bogate w białko - ferrytynę, wykorzystywane są do produkcji produktów przeznaczonych dla chorych na anemię. Hodowla kiełków w roztworach  $\text{FeSO}_4$  powoduje stres oksydacyjny, co pociągało za sobą konieczność przeprowadzenia analizy wpływu warunków hodowli na natywne przeciwutleniacze obecne w nasionach soi i łubinu. W kiełkach nasion odmiany Lord i Baron hodowanych na wodzie stwierdzono ponad dwukrotny wzrost zawartości fenoli ogółem w porównaniu do ich zawartości w nasionach. W przypadku hodowli prowadzonej na 20-25 mM roztworze  $\text{FeSO}_4$  stwierdzono spadek zawartości związków fenolowych ogółem w porównaniu do kiełków hodowanych na wodzie. Jednakże ich ilość i tak była wyższa niż w nasionach nieskiełkowanych. Kiełki hodowane z siarczanem żelaza w pożywce charakteryzowały się mniejszą zawartością kwasów fenolowych niż nasiona badanych łubinów. Nasiona łubinu charakteryzowały się najwyższą zawartością pochodnych apigeniny (głównie 6,8-di-C- $\beta$ -glukopiranozyd apigeniny oraz 7-O- $\beta$ -apiofuranozyd-6,8-di-C- $\beta$ -glukopiranozyd apigeniny). Podczas kiełkowania nasion łubinu wykazano zmianę profilu związków fenolowych, odnotowując szereg związków o niezidentyfikowanej strukturze. Analiza LC/ESI/MS<sup>n</sup> wykazała, że w kiełkach obecne są następujące związki: 4,7'-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny; 6,8-C- $\beta$ -diglukozylopiranozyd apigeniny; 7-O- $\beta$ -apiofuranozo-6,8-C- $\beta$ -diglukozylopiranozyd apigeniny; 4,7'-O-diglukozyd genisteiny, glukozyd 2'-hydroksygenisteiny; malonylowy glukozyloamnozyd genisteiny; malonylowy O-glukozyd apigeniny. W skiełkowanych nasionach łubinu stwierdzono



znacznie więcej pochodnych genisteiny niż pochodnych apigeniny, które obecne są w nasionach łubinu nieskiełkowanego (B.1.12, B.6.9., B.6.47., B.6.52.).

## Ad. 2.

Pozyskiwany z nasion rzepaku olej jest cennym źródłem związków biologicznie aktywnych takich jak sterole, tokoferole. Związki te mogą ulec znacznej degradacji podczas poszczególnych etapów obróbki pozbiorowej rzepaku (suszenia i przechowywania).

Pierwsze badania prowadzone w tym temacie dotyczyły wpływu zastosowanej metody suszenia oraz dalszego przechowywania rzepaku na degradację tokoferoli. Były one prowadzone we współpracy z Panią dr hab. Marzeną Gawrysiak-Witulską z Zakładu Inżynierii i Aparatury Przemysłu Spożywczego. Podczas przeprowadzonych doświadczeń suszono nasiona trzech odmian rzepaku czarnonasiennego powietrzem ogrzanym do temperatury 60, 80 i 100°C oraz metodą niskotemperaturową. Podczas suszenia niskotemperaturowego do grubej nieruchomej warstwy nasion (od kilkudziesięciu centymetrów do kilku metrów) wdmuchiwane jest powietrze o potencjale suszącym zmieniającym się w sposób stochastyczny zależnie od warunków pogodowych. Proces ten trwa zwykle od kilku do kilkunastu dni. Jego podstawową zaletą są niskie koszty suszenia. Wykazano, że proces suszenia nasion metodą niskotemperaturową spowodował spadek zawartości tokoferoli o 6–18%, natomiast ogrzanym powietrzem od 3 do 8%. Nasiona następnie przechowywano w temperaturze 10°C przez 12 miesięcy. Po 6 miesiącach przechowywania sumaryczna zawartość tokoferoli w suszonych nasionach uległa obniżeniu o 11-18%, a po 12 miesiącach o kolejne 10–14%. Straty tokoferoli podczas przechowywania były porównywalne dla wszystkich trzech suszonych odmian rzepaku oraz zastosowanych warunków suszenia (B.1.5.).

Obecnie na szeroką skalę prowadzone są badania mające na celu zmniejszenie w nasionach rzepaku zawartości włókna pokarmowego i związków polifenolowych oraz podwyższenia zawartości tłuszczu i białka. Odmianami, które spełniają te wymagania okazują się wyhodowane odmiany rzepaku żółtonasiennego. Wykonaliśmy badania mające na celu określenie wpływu temperatury suszenia na degradację steroli i tokoferoli w nasionach rzepaku żółtonasiennego. Podczas suszenia w temperaturze 40 i 80°C wystąpiły straty tych związków były jednak statystycznie nieistotne. Podczas suszenia powietrzem ogrzanym do 120°C straty fitosteroli osiągnęły poziom 29% natomiast tokoferoli 23% (B.1.29.).

W ostatnim czasie rozszerzono badania o analizę degradacji steroli i tokoferoli podczas niekorzystnych warunków przechowywania rzepaku (np. podczas wystąpienia zjawiska samonagrzewania nasion). Badania te prowadziliśmy w specjalnej komorze termostatycznej (skonstruowanej w Zakładzie Inżynierii i Aparatury Przemysłu Spożywczego), wyposażonej w aparaty higrostatyczne umożliwiające utrzymanie wilgotności nasion na stałym poziomie. Próby nasion o wilgotności ok. 10, 12,5 oraz 15,5% przechowywano w temperaturze 25 i 30°C. Uzyskane wyniki wykazały znaczący wpływ temperatury i wilgotności nasion rzepaku na tempo degradacji zawartych w nich steroli i tokoferoli. Najszybciej degradacja tych związków przebiegała w nasionach o wilgotności 15,5%, przechowywanych w temperaturze 30°C. Po 18 dniach przechowywania w tych warunkach, straty sumy steroli wynosiły 58%. Podczas przechowywania w tych samych warunkach rzepaku odnotowano ubytek tokoferoli na poziomie 14,4%. Uzyskane wyniki badań umożliwiły wyznaczenie stałych szybkości degradacji tokochromanoli. W nasionach o wilgotności 15,4% podczas przechowywania w temperaturze 25°C stała degradacji tokoferoli była trzykrotnie większa niż w nasionach o wilgotności 10,2%, natomiast podczas przechowywania w temperaturze 30°C wartość ta była czterokrotnie większa. Uzyskane wyniki przedstawiono w publikacjach naukowych o zasięgu międzynarodowym (B.1.5., B.1.7., B.1.13., B.1.29., B.4.1.), krajowym (B.2.7., B.5.5., B.5.9.), a także w postaci doniesień konferencyjnych (B.6.13., B.6.17., B.6.23., B.6.38., B.6.39., B.6.48.). Wygłoszono także dwa referaty na konferencjach naukowych (B.7.3., B.7.5).

### Ad. 3.

Nasiona rzepaku oprócz tokoferoli zawierają także plastochromanol-8 (PC-8), który uznawany jest za naturalny homolog  $\gamma$ -T3, posiadający dłuższy łańcuch boczny. Analiza chromatograficzna tego związku jest utrudniona z uwagi na brak jego standardu i konieczność przeliczania jego zawartości na ekwiwalent  $\gamma$ -T lub  $\gamma$ -T3. Ponadto na chromatogramach uzyskanych podczas standardowej analizy jest on często mylony z tokotrienolami ( $\beta$ -T3 lub  $\gamma$ -T3) ze względu na zbliżony czas retencji. Z uwagi na to, że przeciwutleniacze rzepaku pozostają w kręgu mojego zainteresowania naukowego, postanowiłem opracować procedurę analityczną pozwalającą oznaczyć ilościowo PC-8 w olejach roślinnych. Pierwszym etapem badań było pozyskanie standardu tego związku - izolowałem i oczyszczałem PC-8 z oleju lnianego (gdzie występuje on w największej ilości) wykorzystując semi-preparatywną chromatografię cieczową. Następnie oznaczono czystość i dokonano identyfikacji przy zastosowaniu LC-MS<sup>n</sup>. W

spektrometrii mas zastosowano ujemną chemiczną jonizację APCI. Jon podstawowy dla PC-8 to 749,4 m/z, który w kolejnych etapach ulegał następującej fragmentacji na jony: 734,4 tracąc grupę  $-CH_3$  – prawdopodobnie z pierścienia. Następnie badana cząsteczka uległa fragmentacji na jeden jon o masie 69 i siedem o masie 68. W tym przypadku nastąpił podział łańcucha bocznego na osiem cząsteczek izoprenu, co dowodzi, że badany związek to PC-8. Ilość uzyskanego standardu (ponad 30 mg) pozwoliła na oszacowanie molowego współczynnika absorpcji PC-8, który, jak wyliczono, wynosi  $3616,5 M^{-1}cm^{-1}$ . Mając do dyspozycji standard tego związku w następnym etapie dokonałem optymalizacji etapu przygotowania prób oraz rozdziału PC-8 wraz tokochromanolami na HPLC w normalnym układzie faz. W pracy optymalizowałem parametry procesu zmydlania (ilość 60% KOH, ilość pirogalolu oraz czas zmydlania) oraz parametry procesu ekstrakcji substancji niezmydlających (ilość rozpuszczalnika, ilość dodatku octanu etylu, czas ekstrakcji). Wykazałem że najlepsze rezultaty otrzymano stosując zmydlanie w układzie: 250 mg pirogalolu, 2 ml 60% KOH oraz czas zmydlania 15 min. Natomiast w przypadku ekstrakcji optymalny układ to: mieszanina ekstrakcyjna składająca się z *n*-heksanu i 10% dodatku octanu etylu, ilość rozpuszczalnika używana do ekstrakcji to 50 ml oraz czas wytrząsania 45 min. Testując 10 różnych wariantów fazy ruchomej i różne szybkości jej przepływu wykazałem, że optymalny rozdział chromatograficzny tokochromanoli i PC-8 następuje w układzie, w którym zastosowano mieszaninę *n*-heksanu i 1,4-dioksanu (96:4 v/v) przy prędkości przepływu 1 ml/min. W pełni zoptymalizowaną metodę zwalidowałem, a szczegółowe wyniki badań zamieściłem w publikacji w czasopiśmie *European Journal of Lipid Science and Technology* (B.1.21.).

Dynamiczny rozwój przemysłu mleczarskiego to różnorodność nowych produktów pojawiających się na naszym rynku. Jednak wśród szerokiej gamy produktów mlecznych, zalecanych w codziennej diecie zdrowego człowieka, z uwagi na najlepszą strawność i przyswajalność jego bioaktywnych składników jest masło oraz ser. Cena tłuszczu mlecznego jest wielokrotnie wyższa od tłuszczu roślinnego. Może być to przyczyną zastępowania tłuszczu mlecznego w wytwarzanych produktach tłuszczami roślinnymi. Zmniejsza to koszt wytworzenia produktu, ale narusza jego prawidłowy skład chemiczny. Stąd autentyczność produktów mleczarskich z uwagi na dobro konsumenta powinno podlegać stałej, precyzyjnej kontroli. W 2008 i 2009 roku łącznie z Katedrą Mleczarstwa UP w Poznaniu oraz panią prof. dr hab. Małgorzatą Nogalą-Kałużką prowadziłem badania dotyczące wykrywania zafałszowań produktów mleczarskich (masło, ser) olejami roślinnymi. Tłuszcz mleczny charakteryzuje się

obecnością tokochromanoli, a głównym homologiem jest  $\alpha$ -T. Dodatek tłuszczów roślinnych (np. oleju rzepakowego, sojowego i in.) powoduje wyraźny wzrost zawartości homologicznych tokoferoli. Dodatek oleju palmowego do tłuszczu mlecznego powoduje także pojawienie się na chromatogramie homologów tokotrienoli (-T3). Na tej podstawie przeprowadzono analizy 30 kostek masła typu Ekstra, Śmietankowego oraz masła Osełkowego. Żaden z producentów nie deklaruje na opakowaniu dodatku oleju roślinnego. W przypadku serów analizie poddano łącznie 30 prób oraz 6 produktów seropodobnych z zadeklarowanym dodatkiem oleju roślinnego. Zastosowana metoda wykorzystująca analizę zawartości tokochromanoli w NP-HPLC wykazała, że wielu producentów podaje nieprawdę lub niepełne informacje na opakowaniach masła, deklarując tylko procent tłuszczu mlecznego. W przypadku masła wyprodukowanego z tłuszczu mlecznego zawartość tokoferoli (głównie  $\alpha$ -T) nie przekracza 5 mg/100g. W 9 kostkach masła wykazano wysoką zawartość tokoferoli oraz tokotrienoli (od 20,41 do 69,40 mg/100g), co sugeruje obecność tłuszczu palmowego, którego skład kwasów tłuszczowych jest zbliżony do składu kwasów tłuszczowych masła. Analizując wyroby seropodobne wykazano obecność wszystkich homologów tokoferoli i tokotrienoli. W 26 próbach sera obecny był tylko homolog  $\alpha$ -T w ilości nie przekraczającej 4 mg/100g. W 4 próbach wykazano zawartość od 10 do 62 mg/100g tokochromanoli, co świadczy o nieprawidłowościach. Taka praktyka jest niezgodna z prawem. Istnieje potrzeba ciągłego monitorowania przemysłu np. mleczarskiego w celu wykrywania fałszowanych produktów i ich nierzetelnych producentów, chroniąc tym samym dobro konsumenta (B.2.3., B.2.5., B.6.3., B.6.11.). Badania dotyczące autentyczności masła prowadzono także w ramach współpracy z zespołem dr Daliji Segliny z Łotwy w 2013 roku. Przeprowadzono badania porównawcze dotyczące zafałszowania masła w dwóch krajach EU (Polska i Łotwa). Wynikiem współpracy było dopracowanie metody wykrywania zafałszowania masła, polegającej na chromatograficznej analizie zawartości tokochromanoli w odwróconym układzie faz. Procedura ta pozwala w szybki i łatwy sposób przygotować próby do analizy HPLC. Przygotowanie próby polega tylko na rozpuszczeniu próbki masła w 2-propanolu i nastrzyku na kolumnę z fazą stacjonarną pentafluoropropionową w układzie RP-HPLC. Opracowana metoda została zoptymalizowana i poddana walidacji. Wykazano, tylko w jednym przypadku nieprawidłowości dotyczące zawartości tokochromanoli w maśle. Procedura ta znalazła także zastosowanie do oznaczania zawartości tokochromanoli w margarynach o różnym procentowym składzie wody. Analiz takich nie można wykonać w normalnym układzie faz bez wcześniejszego

przygotowania prób polegającego na zmydłaniu próby i ekstrakcji substancji niezmydlających się. Szczegółowe wyniki przedstawiono w publikacjach B.1.24., B.1.33.

Zawartość tokochromanoli w kawie to kolejny przykład wykorzystania tej analizy do identyfikacji jej gatunków. Arabica charakteryzuje się ponad 2-krotnie wyższą zawartością tokoferoli (28,7 mg/100g) niż Robusta (10,9 mg/100g). Wykazano, że gatunki kawy różnią się między sobą także stosunkiem zawartości poszczególnych homologów tokoferoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -T). W przypadku gatunku Arabica stosunek ten wynosi 1,4:4,7:0,1 oraz 2,6:8,1:0,1 odpowiednio dla kawy zielonej i palonej. Robusta zielona i palona charakteryzowała się stosunkiem odpowiednio 1,2:1,4:0,1 oraz 1,7:2,0:0,1. Szczegółowa analiza dotycząca zawartości tokochromanoli w kawie przedstawiona została w publikacji B.1.19., B.1.27.

Oleje roślinne tłoczone na zimno są głównym polem mojego zainteresowania. W 2013 roku prowadziłem badania dotyczące zawartości związków bioaktywnych w olejach roślinnych tłoczonych na zimno. Badania prowadzono równolegle w dwóch ośrodkach (Katedra Biochemii i Analizy Żywności oraz Łotewski Państwowy Instytut Uprawy Owoców w Dobele - Łotwa). Oleje tłoczono w prywatnej manufakturze z 13 różnych surowców: z nasion pigwy, czarnuszki, Inu, rzepaku, konopi, z orzechów ziemnych, słonecznika, z pestek dyni, z orzechów włoskich, z maku, z orzechów laskowych, z migdałów i sezamu. Badano oleje wytłoczone w roku 2011 i 2012. Oprócz oznaczenia poziomu związków bioaktywnych (tokoferole, tokotrienole, karotenoidy, związki fenolowe) stwierdzono we wszystkich badanych olejach obecność sezaminy i sesamoliny - lignanów obecnych tylko w nasionach sezamu. Zawartość lignanów była zróżnicowana i wahała się od 0,66 do 141,63 mg/100g (odpowiednio dla oleju z nasion pigwy i oleju z migdałów) w roku 2011. Natomiast w 2012 roku od 0,37 do 120,91 mg/100g (odpowiednio dla oleju z nasion pigwy i oleju z maku). W przypadku oleju sezamowego sumaryczna zawartość tych związków wynosiła 1133 i 1330 mg/100g odpowiednio w roku 2011 i 2012. W badaniach tych dowiedziono, iż tłocząc olej z nasion sezamu bardzo łatwo zanieczyścić inne oleje roślinne (sezaminą i sesamolimą) pomimo iż każdorazowo po wytłoczeniu jednego surowca cała aparatura była myta przy użyciu detergentów (B.1.22., B.1.23.).

Ad. 4.

Cechy jakościowe nasion rzepaku są w dalszym ciągu ulepszone. W przypadku tokoferoli prace mają na celu modyfikację proporcji poszczególnych homologów tokoferoli. Zwiększenie zawartości  $\alpha$ -T pozwoliłoby zaliczyć rzepak do źródeł żywności funkcjonalnej, a wzrost

zawartości homologu  $\gamma$ -T poprawił by stabilność oksydacyjną. Jednakże, zawartość tokoferoli w nasionach rzepaku jest cechą w wysokim stopniu modyfikowaną przez zmienne warunki środowiska, toteż postęp prac genetyków jest utrudniony przez silny wpływ interakcji genotyp-środowisko. Zastosowanie podwojonych haploidów (DH) w hodowli roślin zwiększa efektywność selekcji cech jakościowych, a przede wszystkim ilościowych. Kultura izolowanych mikrospor jest metodą wydajną, stosunkowo tanią, a zastosowanie jej w cyklu hodowli może go skrócić o kilka lat. W dużej populacji linii podwojonych haploidów wyprowadzonych z jednego mieszańca obserwuje się genotypy o znacznie zróżnicowanych cechach. Linie DH pochodzące z mieszańca pokolenia F1 reprezentują szeroką skalę możliwych genetycznych rekombinacji cech linii rodzicielskich i stanowią idealny materiał do selekcji. Wraz z Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Poznaniu w latach 2008-2011 zaangażowany byłem w realizację projektu pt. „Badania nad czynnikami wpływającymi na zmienność endogennych substancji biologicznie czynnych w populacjach linii DH rzepaku ozimego” jako główny wykonawca (B.9.2.). Przedmiotem badań była populacja linii podwojonych haploidów (DH) rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) otrzymanych metodą kultury in vitro izolowanych mikrospor. Populacje te otrzymano z dwóch mieszańców F1 (formy rodzicielskie) przez odwrotne krzyżowanie podwojonych haploidów żółto-nasiennego (Z-114) i czarno-nasiennego (H2-26) rzepaku ozimego. Materiał biologiczny stanowiły nasiona 25 różnych linii DH (populacja ZxH), nasiona 17 różnych linii DH (populacja HxZ) oraz dwie linie rodzicielskie. Doświadczenia polowe przeprowadzono w sezonie 2008/2009; 2009/2010 i 2010/2011. Analizując źródła zmienności zawartości poszczególnych tokoferoli wykazano istotny wpływ genotypu dla  $\alpha$ -T,  $\gamma$ -T, sumy-T oraz PC-8. Na zawartość  $\beta$ -T oraz  $\delta$ -T wpływ głównie miało środowisko. Zmienność środowiskowa jak i interakcja genotyp x środowisko okazały się statystycznie istotne dla wszystkich analizowanych parametrów (zawartość poszczególnych tokoferoli i PC-8). Przeprowadzenie doświadczeń w różnych lokalizacjach, charakteryzujących się odmiennymi warunkami siedliskowymi, pomaga dogłębnie zweryfikować znaczenie modyfikującego wpływu czynników niedziedzicznych na zawartość tokoferoli w badanej populacji DH. Wysokie współczynniki  $h^2$  (odziedziczalność) dla  $\alpha$ -T,  $\gamma$ -T oraz PC-8 sugeruje możliwość prowadzenia skutecznej selekcji na podstawie fenotypu oraz uzyskanie genotypów o stabilnej ekspresji cech. Potwierdziły to analizy statystyczne zawarte w prezentowanych badaniach, których szczegóły zamieszczono w licznych publikacjach naukowych (B.1.30., B.2.10., B.4.2., B.5.2., B.5.5., B.5.10.) i doniesieniach konferencyjnych (B.6.6., B.6.15., B.6.20., B.6.30., B.6.32., B.6.36., B.6.37., B.6.40., B.6.41., B.6.44., B.7.1., B.7.2.). Prace te nadal

trwają i mają na celu wyhodowanie nowych odmian rzepaku o różnej zawartości związków bioaktywnych głównie tokochromanoli.

Ad. 5.

Od początku swojej kariery naukowej dużą uwagę poświęcam związkom fenolowym obecnym w produktach i surowcach roślinnych. Współpracując w dalszym ciągu z promotorem mojej pracy magisterskiej z panią prof. dr hab. Eleonora Lampart-Szczapą oraz dr inż. Jarosławem Czubińskim kontynuuję badania dotyczące zawartości związków fenolowych nasion łubinu i ich oddziaływań z białkami. W dotychczas prowadzonych badaniach wykorzystano trzy gatunki łubinu: *L. albus* (odmiana Butan, Boros), *L. luteus* (odmiana Lord, Parys), *L. angustifolius* (odmiana Bojan, Zeus). Współpraca zaowocowała publikacją w czasopiśmie *Journal of Food Composition and Analysis* w 2012 roku (B.1.10.), jednocześnie wyniki przedstawiono na Międzynarodowej Konferencji Łubinowej (B.6.35.). W wyniku tych badań wykazano, że główne związki nasion łubinu to 6,8-di-C- $\beta$ -glukopiranozyd apigeniny i 7-O- $\beta$ -apiofuranozyd-6,8-di-C- $\beta$ -glukopiranozyd apigeniny. Zawartość tych pochodnych apigeniny najwyższa jest w łubinie żółtym (od 124,61 do 150,83 mg/100 g), a najniższa w nasionach łubinu białego (od 37,85 do 40,05 mg/100 g). W łubinie wąskolistnym wynosi od 68,74 do 73,13 mg/100 g (w przeliczeniu na witeksynę).

Badano także zawartość związków fenolowych w różnych preparatach łubinowych, a wyniki przedstawiono w pracach naukowych: B.2.1., B.2.6., B.6.12. Wykazano, że zmiany w zawartości związków polifenolowych po ekstruzji są zdeterminowane cechami gatunkowymi analizowanych preparatów. Proces ten redukuje zawartość tanin łubinowych w każdej z badanych odmian, powodując tym samym pogorszenie ich funkcjonalności. Jednak wzrost zawartości fenoli ogółem w odmianach łubinu żółtego i wąskolistnego oraz zmiany w profilu wolnych kwasów fenolowych badanego łubinu można ocenić pozytywnie z żywieniowego punktu widzenia.

Dalsze badania dotyczące związków fenolowych dotyczą ich oddziaływań z innymi związkami obecnymi w matrycy. Związki te mogą tworzyć odwracalne, jak i nieodwracalne kompleksy z białkami. Większość danych literaturowych opisuje zjawisko interakcji związków fenolowych z białkami bazując na potencjalnych oddziaływaniach niekwalencyjnych pomiędzy partnerami tworzącymi kompleks. Mechanizmy odpowiadające za interakcje białek ze związkami fenolowymi wykorzystują m.in. tworzenie wiązań: wodorowych, hydrofobowych oraz jonowych. Oddziaływania pomiędzy białkami a związkami fenolowymi mogą być rozpatrywane w dwóch

aspektach. Interakcje ze związkami fenolowymi powodują zmiany fizyko-chemicznych właściwości białek. Formowanie tych kompleksów może prowadzić do obniżania wartości żywieniowej białek poprzez zmiany ich rozpuszczalności, termicznej stabilności i strawności. Równocześnie, fakt tworzenia połączeń z białkami może istotnie obniżyć prozdrowotny potencjał związków fenolowych poprzez maskowanie ich przeciwutleniających właściwości (B.1.11., B.1.20., B.1.38.).

W ramach współpracy z Katedrą Żywienia Człowieka UP w Poznaniu analizowano zawartość natywnych związków fenolowych i ich aktywność antyoksydacyjną w liściach *Ginkgo biloba*. Wynikiem współpracy są publikacje naukowe i doniesienia konferencyjne: B.1.4., B.2.12., B.6.24., B.6.27., B.6.28. Badano wpływ warunków ekstrakcji na wydajność i skład wybranych ekstraktów z liści zielonych i żółtych miłorzębu dwuklapowego (*Ginkgo biloba* L.). Wykonano trzyetapowe ekstrakcje do których użyto wody, roztworu acetonu i wody oraz alkoholu etylowego. Efektywność ekstrakcji oznaczono poprzez ocenę zawartości polifenoli ogółem. Następnie oceniono wydajność wybranych procesów ekstrakcji oraz zawartość w nich kwasów fenolowych. Badane ekstrakty charakteryzowały się dużą zawartością kwasów fenolowych. Największą ich sumę stwierdzono w ekstrakcie acetonowo-wodnym z liści zielonych oraz wodnym z liści żółtych. W ekstraktach z liści zielonych dominującym kwasem był kwas protokatechowy, natomiast w ekstraktach z żółtych liści oznaczono największą ilość kwasu *p*-hydroksybenzoesowego. Wykazano także, że wodno-acetonowe ekstrakty z liści miłorzębu wykazywały silne właściwości przeciwutleniające w badanych układach modelowych. Ekstrakty z liści żółtych charakteryzowały się wyższą zawartością aglikonów flawonoidów (mirycetyna, kwercetyna, kempferol, izoramnetyna, and moryna). Zawartość tych związków korelowała z właściwościami przeciwutleniającymi badanych preparatów (test DPPH, siła redukująca) oraz z właściwościami chelatującymi.

Kolejnym zagadnieniem badawczym będącym w kręgu moich zainteresowań naukowych jest wpływ związków fenolowych na aktywność lipooksygenazy. Badania prowadzono na natywnych związkach fenolowych nasion łubinu i rzepaku. Enzym również izolowano odpowiednio z nasion rzepaku i łubinu. Stwierdzono, że związki fenolowe występujące w rzepaku (głównie kwas sinapowy i jego pochodne) wykazywały efekt prooksydacyjny i antyoksydacyjny. Efekt prooksydacyjny wynikał z ich utlenienia i powstawania chinonów, a ich aktywność antyoksydacyjna wynikała ze zdolności do zmiatania wolnych rodników. Jednocześnie zaobserwowano, że w lipooksygenazie następuje redukcja  $Fe^{+3}$  do  $Fe^{+2}$ , co skutkowało inhibicją



jego aktywności. W przypadku nasion łubinu zaobserwowano, że powstające ze związków fenolowych (głównie flawonoidy) wolne rodniki obniżają inhibicyjne właściwości polifenoli w stosunku do aktywności lipooksygenazy. Nie wykazano działania prooksydacyjnego w przypadku związków fenolowych łubinu (B.1.9., B.1.15., B.6.21., B.6.45.).

Od 2014 roku współpracuję z dr hab. Sylwią Mildner-Szkudlarz uczestnicząc jako główny wykonawca w kierowanym przez nią projekcie badawczym pt. „Badanie kinetyki tworzenia produktów reakcji Maillarda w modelowych produktach zbożowych wzbogaconych w wytloki gronowe” (B.9.9). Badania ostatnich lat wskazują, iż w reakcji Maillarda powstaje grupa związków o działaniu kancerogennym i mutagennym. Związki te są spożywane przez ludzi w codziennej diecie. Ich ilość w produkcie uzależniona jest od zastosowanego surowca i technologii. Zaobserwowano, iż związki fenolowe mogą być pomocne w zapobieganiu powstawania niekorzystnych produktów reakcji Maillarda dzięki silnym zdolnościom do zmiatania wolnych rodników. W realizowanym projekcie badawczym określaliśmy wpływ poszczególnych składników ciasta oraz dodatku wytlóków gronowych na stężenie karoksymetylolizyny (CML) w modelowym pieczywie typu muffiny. Wykazano, że skórki z wytlóków gronowych dodane do pieczywa cukierniczego typu muffiny w ilości 20% wykazywały znakomitą zdolność do inhibicji CML, nie zmieniając profilu sensorycznego prób. Uzyskano ujemne korelacje pomiędzy zawartością katechiny ( $r = -0,89$ ;  $p < 0,0001$ ), epikatechiny ( $r = -0,81$ ;  $p < 0,0001$ ) i kwasu galusowego ( $r = -0,80$ ;  $p < 0,0001$ ) a stężeniem CML, udowadniając tym samym, że to właśnie związki fenolowe wytlóków gronowych uczestniczyły w blokowaniu oksydacyjnej degradacji produktów przegrupowania Amadori. Szczegółowe wyniki dotyczące powyższych badań zaprezentowano w czasopiśmie Food Chemistry (B.1.28.).

#### **4.4. Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego**

W trakcie swojej pracy po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych pięciokrotnie byłem wyróżniany przez J.M. Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, nagrodami I° i II° za oryginalne i twórcze osiągnięcia naukowe udokumentowane publikacjami naukowymi. Mój całkowity dorobek naukowy wg punktacji MNiSW wynosi 1509 punktów (w tym 125 stanowi podstawę wniosku habilitacyjnego). Sumaryczny Impact Factor (IF) dla opublikowanych prac wynosi 80,519. Liczba cytowań z pominięciem autocytowań wg bazy Web of Science Core Collection – 297. Index Hirscha -12.

Dotychczas opublikowałem 169 prac, z czego 140 po uzyskaniu stopnia doktora. Na dorobek składa się:

- 44 (42 po uzyskaniu stopnia doktora) artykuły w czasopismach uwzględnionych w bazie JCR,
- 23 (13 po uzyskaniu stopnia doktora) artykuły w czasopismach o zasięgu krajowym, nieposiadających współczynnika wpływu IF, wymienionych w części B wykazu MNiSW,
- 2 artykuły w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, nieposiadających współczynnika wpływu IF, nieobjęte wykazem MNiSW,
- 4 (2 po uzyskaniu stopnia doktora) prace opublikowane w całości w materiałach konferencyjnych,
- 12 rozdziałów w monografiach,
- 66 komunikatów konferencyjnych (w tym 30 na konferencjach o zasięgu międzynarodowym),
- 6 referatów wygłoszonych na międzynarodowych lub krajowych konferencjach tematycznych,
- 1 wykład wygłoszony na zaproszenie,
- 3 ekspertyzy,
- 8 opracowań z realizacji projektów badawczych, w których brałem udział.

Aleksander Siger