

Załącznik 2

Autoreferat

dr inż. Wiesław Wiczowski
Zakład Chemii i Biodynamiki Żywności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Olsztyn 2016

Spis treści

I. Dane osobowe.	3
II. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.	3
III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.	3
IV. Proponowane osiągnięcie naukowe.	4
1) Tytuł osiągnięcia naukowego, jego syntetyczny opis oraz wnioski.	4
2) Wykaz prac dokumentujący osiągnięcie naukowe.	5
3) Omówienie celu oraz wyników prac dokumentujących osiągnięcie naukowe.	6
a) Wstęp.	6
b) Materiały.	9
c) Metody.	10
d) Omówienie wyników.	13
e) Literatura.	30
V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.	35
1) Aktywność naukowo-badawcza, dydaktyczna i organizacyjna przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.	35
2) Aktywność naukowo-badawcza, dydaktyczna i organizacyjna po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.	37
VI. Podsumowanie działalności naukowo-badawczej, dydaktycznej i organizacyjnej.	48

I. Dane osobowe.

Imię i Nazwisko: **Wiesław Wiczowski**

Miejsce pracy: **Zakład Chemii i Biodynamiki Żywności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
Olsztyn, ul. Tuwima 10
10-748 Olsztyn
tel. +48 89 523 46 04, fax. +48 89 524 01 24**

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Dyplom doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, chemii żywności i żywienia człowieka uzyskany na Wydziale Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (11.05.2005).

Temat pracy doktorskiej: „Porównanie biodostępności kwercetyny i jej glukozydów z cebuli oraz określenie wpływu ich spożycia na stabilność oksydacyjną estrów cholesterolu osocza krwi konsumenta”.

Promotor: Prof. dr hab. Mariusz Piskula

Dyplom magistra inżyniera rolnictwa w zakresie ochrona roślin uzyskany na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (11.05.2000).

Temat pracy magisterskiej: „Produktywność rzepaku jarego, wartość technologiczna nasion i ich produktów w aspekcie stosowanych środków ochrony roślin”.

Promotor: Prof. dr hab. Danuta Murawa.

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

01.01.2010 – obecnie

Odpowiedzialny za funkcjonowanie Pracowni Metabolomiki w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

01.12.2005 – obecnie

Adiunkt w Zakładzie Chemii i Biodynamiki Żywności (wcześniej Zakład Podstaw Technologii Żywności) Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

14.01.2005 – 30.11.2005

Technolog w Zakładzie Podstaw Technologii Żywności Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

IV. Osiągnięcie naukowe proponowane, jako podstawa do wszczęcia postępowania habilitacyjnego zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

1) Tytuł osiągnięcia naukowego, jego syntetyczny opis oraz wnioski.

„Charakterystyka struktury chemicznej, profilu, aktywności przeciwutleniającej oraz biodostępności i przemian metabolicznych antocyjanów kapusty czerwonej”

Osiągnięciem naukowym jest znaczące poszerzenie wiedzy o składnikach kształtujących naturalne zabarwienie i właściwości przeciwutleniające produktów roślinnych a także o przemianach jakim te składniki podlegają w organizmach ludzi po spożyciu, udokumentowane na przykładzie badań nad antocyjanami kapusty czerwonej z wykorzystaniem najnowszych metod analitycznych oraz technik *in vitro* i badań *in vivo*, w których wykazano, m.in., że:

- podstawową strukturą antocyjanów kapust czerwonych jest 3-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny, którego reszty cukrowe mogą być nieacylowane oraz monoacylowane i diacylowane kwasami fenolowymi: ferulowym, synapinowym, kawowym i p-kumarowym;
- antocyjany kapust czerwonych wykazują wysoką aktywność przeciwutleniającą, zależną od rodzaju podstawnika acylowego przyłączonego do cząsteczki 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny, ponadto rodzaj podstawnika acylowego wpływa również na stabilność tych antocyjanów w trakcie stosowanych procesów technologicznych;
- profil i zawartość antocyjanów w kapustach czerwonych oraz w uzyskanych produktach spożywczych (kapuście duszonej i fermentowanej) zależy od odmiany kapusty, przebiegu i długości okresu wegetacji i przechowywania oraz zastosowanych procesów technologicznych;
- pojemność przeciwutleniająca kapusty czerwonej oraz uzyskanych produktach spożywczych (kapusty duszonej i fermentowanej) zależy od odmiany kapusty, przebiegu i długości okresu wegetacji i przechowywania, zastosowanych procesów technologicznych oraz jest skorelowana z zawartością antocyjanów w kapuście czerwonej;
- antocyjany są wchłaniane po spożyciu świeżej i fermentowanej kapusty czerwonej co potwierdzono zidentyfikowaniem w osoczu krwi i moczu ochotników 18 natywnych form antocyjanów i 12 metabolitów tych związków (glukuronowanych, metylowanych, siarczanowanych i kombinowanych pochodnych cyjanidyny), przy czym metylowane formy cyjanidyny są dominującymi pochodnymi wśród zidentyfikowanych metabolitów;
- proces fermentacji kapusty czerwonej wpływa na biodostępność antocyjanów, przy czym matryca pokarmowa i wysycenie mechanizmu absorpcji są głównymi czynnikami decydującymi o przebiegu procesu wchłaniania antocyjanów a rozmiar cząsteczki i powinowactwo do wody antocyjanów wpływają na akumulację tych związków w moczu po spożyciu kapusty czerwonej;
- na całkowitą pojemność przeciwutleniającą osocza krwi ochotników po spożyciu kapusty czerwonej wpływa matryca spożytej kapusty, która determinuje stężenie pochodnych cyjanidyny – silnych związków przeciwutleniających – w osoczu krwi ochotników po spożyciu kapusty.

2) Wykaz prac dokumentujący osiągnięcie naukowe.

Osiągnięcie naukowe jest zawarte w poniższym cyklu czterech publikacji naukowych powiązanych tematycznie:

W1. **Wiczowski W.**, Szawara-Nowak D., Topolska J. Red cabbage anthocyanins: profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food Research International*, **2013**, 51, 303-309. IF = 3,050. 40 pkt. MNiSW. Cytowania: 16.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu hipotez i koncepcji badań, wiodącym udziale w wykonaniu doświadczeń i oznaczeń, analizie, opracowaniu i interpretacji wyników oraz napisaniu i redakcji manuskryptu. Jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym w/w pracy. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

W2. **Wiczowski W.**, Topolska J., Honke J. Anthocyanins profile and antioxidant capacity of red cabbages are influenced by genotype and vegetation period. *Journal of Functional Foods*, **2014**, 7, 201-211. IF = 3,574. 45 pkt. MNiSW. Cytowania: 5.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu hipotez i koncepcji badań, wiodącym udziale w wykonaniu doświadczeń i oznaczeń, analizie, opracowaniu i interpretacji wyników oraz napisaniu i redakcji manuskryptu. Jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym w/w pracy. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

W3. **Wiczowski W.**, Szawara-Nowak D., Topolska J. Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing. *Food Chemistry*, **2015**, 167, 115-123. IF = 3,391. 40 pkt. MNiSW (IF wg 2014 a pkt. MNiSW wg 2015). Cytowania: 4.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu hipotez i koncepcji badań, wiodącym udziale w wykonaniu doświadczeń i oznaczeń, analizie, opracowaniu i interpretacji wyników oraz napisaniu i redakcji manuskryptu. Jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym w/w pracy. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

W4. **Wiczowski W.**, Szawara-Nowak D., Romaszko J. The impact of red cabbage fermentation on bioavailability of anthocyanins and antioxidant capacity of human plasma. *Food Chemistry*, **2016**, 190, 730-740. IF = 3,391. 40 pkt. MNiSW (IF wg 2014 a pkt. MNiSW wg 2015). Cytowania: 0.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu hipotez i koncepcji badań, wiodącym udziale w wykonaniu doświadczeń i oznaczeń, analizie, opracowaniu i interpretacji wyników oraz napisaniu i redakcji manuskryptu. Jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym w/w pracy. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

- Sumaryczny Impact Factor (IF) wg roku opublikowania w/w publikacji: 13,406;
- Suma punktów MNiSW w/w publikacji: 165;
- Suma cytowań w/w publikacji (na dzień 20.01.2016): 25 (19 bez autocytowań).

Prace dokumentujące osiągnięcie naukowe znajdują się w Załączniku 4 a oświadczenia współautorów tych prac w Załączniku 5.

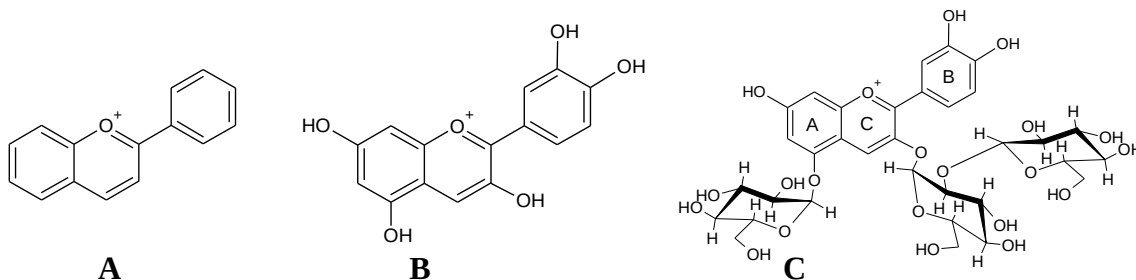
3) Omówienie celu oraz wyników prac dokumentujących osiągnięcie naukowe.

a) Wstęp

Antocyjany są powszechnie występującymi w owocach (głównie w owocach jagodowych) i niektórych warzywach naturalnymi, rozpuszczalnymi w wodzie barwnikami odpowiedzialnymi za barwę czerwoną, pomarańczową, purpurową oraz niebieską i oprócz chlorofilu, uważane są za jedno z najważniejszych barwników roślinnych (Kong i in. 2003). Bogatym źródłem antocyjanów są winogrona, jeżyny, czarna jagoda, dziki bez, czarne porzeczki, maliny, aronia, żurawina, bataty, marchew i kapusta czerwona (Wu i Prior, 2005). Podstawową strukturą antocyjanów jest kation flawyliowy (2-fenylobenzopiryliowy, Rysunek 1A). Do chwili obecnej sklasyfikowano 20 naturalnych antocyjanów ale tylko 6 z nich powszechnie występuje w roślinach wyższych, tj.: pelargonidyna, cyjanidyna, delfinidyna, peonidyna, petunidyna i malwidyna. W roślinach antocyjany występują głównie jako pochodne β -O-glikozydowe a najpowszechniej spotykanym podstawnikiem glikozydowym jest glukoza, ale również ksyloza, arabinoza, galaktoza, ramnoza, soforoza, rutynoza i sambubioza. Glikozylacja najczęściej ma miejsce w pozycji C-3, rzadziej C-5. Ponadto reszty glikozydowe antocyjanów mogą być acylowane kwasami organicznymi, przede wszystkim fenolowymi (synapinowym, ferulowym, kawowym, *p*-kumarowym, galusowym) ale również alifatycznymi (bursztynowym, octowym, jabłkowym, malonowym, szczawiowym). Zatem antocyjany są grupą naturalnych substancji charakteryzujących się złożonymi wzorami hydroksylacji, metylacji, glikozylacji i acylacji (Clifford, 2000; Wu i Prior, 2005). Czynniki te związane są z gatunkiem rośliny tworząc jej charakterystyczny i niepowtarzalny „wzór antocyjanowy”.

Antocyjany to związki stosunkowo nietrwałe. W środowisku wodnym ulegają odwracalnym jak i nie odwracalnym przemianom, powodując istotne zmiany barwy roztworu. W zależności od pH mogą przyjmować formy: kationu flawyliowego (barwa czerwona), zasady chinoidowej (barwa niebieska), pseudozasady karbinolowej (bezbarna) lub chalkonu (barwa jasnożółta). Na stabilność antocyjanów wpływa ich budowa chemiczna (grupy hydroksylowe i metoksyłowe, glikozylacja, acylowanie), środowisko (pH, cukry, kwas askorbinowy, kopigmenty, enzymy) oraz warunki zewnętrzne (temperatura, światło, tlen) (Clifford, 2000). Obecność reszt glikozydowych i acylowych w cząsteczce antocyjanów zwiększa ich stabilność poprzez oddziaływania wewnątrz- i międzycząsteczkowe. Dlatego antocyjany acylowane o wysokim stopniu glikozylacji mogą wykazywać wyższą stabilność podczas przetwarzania żywności (Bąkowska-Barczak, 2005).

Antocyjany charakteryzują się silnym działaniem przeciwutleniającym, które wynika ze struktury ich cząsteczki (układu 3',4'-O-dihydroksylowego w pierścieniu B oraz układu grupy 5-hydroksylowej w pierścieniu A z grupą 3-hydroksylową pierścienia C) a cyjanidyna (Rysunek 1B) i jej pochodne należą do najefektywniejszych antyoksydantów występujących w produktach żywnościowych (Rice-Evans i in. 1996; Aby i in. 2004). Dlatego nawet niewielkie poziomy tych substancji w organizmie ludzi i zwierząt mogą być dla ich kondycji bardzo istotne. Antocyjany jako powszechny składnik wielu produktów żywnościowych pochodzenia roślinnego są spożywane w dużych ilościach, dlatego mogą być istotne dla człowieka z fizjologicznego punktu widzenia (Wu i Prior, 2005; Wu i in. 2006).



Rysunek 1. Struktura kationu flawyliowego (A), cyjanidyny (B) i 3-diglukozydu cyjanidyny (C).

Dotychczasowe badania wskazują na ogromne znaczenie antocyjanów jako składników żywności o właściwościach prozdrowotnych. Wynika to z szeregu aktywności biologicznych tych związków, z których jednymi z najważniejszych są właściwości przeciwzapalne, antynowotworowe, kardioprotekcyjne, poprawiające widzenie, przeciwcukrzycowe i przeciwneurodegeneracyjne (Zafra-Stone i in. 2007; De Pascual-Teresa i Sanchez-Ballesta, 2008). Mechanizmy działania antocyjanów związane z tymi właściwościami nie są do końca poznane. Uważa się, że oprócz bezpośredniego udziału w reakcjach redox antocyjany mogą również indukować enzymy przeciwutleniające i detoksyfikujące jak i pobudzać syntezę endogennych związków przeciwutleniających (Young, 1999; Shimoi, 2000, 2001). Ponadto, nawet po spożyciu wysokich dawek antocyjanów obecnych w żywności nie zaobserwowano działania toksycznego, teratogenne i mutagenne tych substancji (Clifford, 2000). Stąd też diety z udziałem żywności bogatej w antocyjany są coraz bardziej doceniane przez konsumentów zainteresowanych funkcją prozdrowotną żywności. Ponadto, duże zainteresowanie antocyjanami wynika z odrzucenia przez konsumentów sztucznych barwników co powoduje wzrost zainteresowania przemysłu spożywczego naturalnymi barwnikami do których zaliczane są antocyjany (Azeredo, 2009). Tak jak wcześniej wspomniano, antocyjany są źródłem intensywnych kolorów dlatego w wielu sytuacjach podnoszą walory estetyczne spożywanej żywności.

Spożywanie żywności zasobnej w substancje bioaktywne nie jest jednoznaczne z ich dobrą biodostępnością, a tym samym potencjalnie ochronnym działaniem wewnątrz ustroju konsumenta, dlatego z żywieniowego/zdrowotnego punktu widzenia niezbędne jest określenie biodostępności tych substancji, która umożliwia określenie ilościowej ekspozycji organizmu na podaną substancję. Dotychczasowe badania wskazują, że antocyjany obecne w żywności są absorbowane przez organizmy zwierząt oraz ludzi i występują w płynach ustrojowych w postaci natywnych związków i koniugowanych pochodnych (Fernandes i in. 2014). Ponadto badania Vitaglione i in. (2007) dowodzą, że po spożyciu antocyjanów pomarańczy czerwonej oprócz natywnych związków oraz ich metylowanych, glukuronowanych i siarczanowanych pochodnych w organizmie ludzi w wyniku zachodzących procesów powstaje kwas protokatechowy (kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy).

Owoce i warzywa powinny być spożywane w ciągu całego roku, najlepiej w stanie świeżym. Niestety, w polskich warunkach większość z nich występuje sezonowo, a tylko niektóre, takie jak: jabłka, warzywa cebulowe, korzeniowe i kapustne można przechowywać, a tym samym spożywać w postaci nieprzetworzonej lub mało-przetworzonej jeszcze przez kilka miesięcy po zbiorze. Jednym z powszechnych i często spożywanych warzyw w Polsce, które jest dostępne w stanie świeżym przez cały rok jest

kapusta czerwona. Posiada ona wysoką wartość dietetyczną oraz profilaktyczną w stosunku do wielu chorób dzięki temu, że jest zasobna w związki mineralne, witaminy, oligosacharydy i szereg substancji bioaktywnych na czele z antocyjanami (Kong i in. 2003; Lila, 2004; Ghosh, 2005; Podsędek, 2007). Oprócz szeregu walorów dietetycznych kapusta czerwona jest ceniona przez konsumentów również ze względu na swoje walory smakowe. Dotychczasowe badania wskazują również, że kapusta czerwona posiada bardzo wysoką pojemność przeciwutleniającą, która wynika z zasobności tego warzywa w wiele substancji biologicznie aktywnych, między innymi antocyjanów (Wu i in. 2004; Hassimotto i in. 2005).

Biologiczny los fitozwiązków w organizmach ludzi i zwierząt jest bardzo skomplikowany i zależy od wielu czynników (McGhie i Walton, 2007). Gatunek/odmiana, procesy technologiczne i sposoby przygotowywania pożywienia są czynnikami determinującymi zawartość, dostępność, a tym samym biodostępność fitozwiązków. Ponadto, do czynników wpływających na wchłanianie i metabolizm fitozwiązków, a które można określić mianem „strukturalnych”, można zaliczyć strukturę podstawowego szkieletu fitozwiązków, obecność lub brak glikozylacji w podstawowej strukturze oraz rodzaj i liczbę acylacji przyłączonych cząsteczek cukru. Wspomniane czynniki są silnie związane z gatunkiem rośliny posiadającej swój charakterystyczny „wzór fitozwiązkowy”.

Jak dotąd, w Polsce jak i na świecie, nie prowadzono badań określających jak wybrane procesy technologiczne i obróbka kulinarna, którym poddawana jest kapusta czerwona przed spożyciem, wpływają na profil i zawartość antocyjanów oraz ich biodostępność ale również na całkowitą pojemność przeciwutleniającą osocza krwi konsumenta po spożyciu tych produktów. Brak też wyników ukazujących pełen profil antocyjanów oraz pojemności przeciwutleniającej różnych odmianach kapusty czerwonej a także aktywności przeciwutleniającej poszczególnych antocyjanów występujących w kapuście czerwonej. Badania prowadzone na świecie dotyczyły głównie profilu, zawartości, absorpcji i metabolizmu antocyjanów obecnych w owocach jagodowych i winogronach (McGhie i Walton, 2007). Jedynie jedna praca podejmuje temat obecności antocyjanów kapusty czerwonej w moczu ludzi po spożyciu tego warzywa (Charron i in. 2007).

W dotychczasowych eksperymentach rzadko badano biodostępność antocyjanów z produktów żywnościowych. Z żywieniowego punktu widzenia zastosowanie pokarmowych źródeł antocyjanów w tego typu badaniach jest wskazane. Wybór pomiędzy suplementacją a dietą bogatą w naturalne produkty wydaje się być bardzo istotny, gdyż komponenty występujące w pożywieniu mogą działać synergistycznie lub antagonistycznie w stosunku do obecnych tam antocyjanów i ich biodostępności. Użycie suplementów antocyjanów w badaniach, takich możliwości nie daje, lub je ogranicza. Jak pokazują moje porównawcze badania biodostępności kwercetyny i jej glukozydów (Wiczowski i in. 2003, 2008) zastosowanie naturalnych surowców jako źródła fitozwiązków skutkuje odmiennymi wynikami niż w przypadku gdy do diety dodawane są czyste substancje (Morand i in. 2000).

Zatem, badania dotyczące zawartości antocyjanów w roślinach, przemian tych substancji w trakcie wytwarzania produktów żywnościowych, procesów ich wchłaniania i metabolizmu przez organizmy zwierząt i ludzi po spożyciu decydujących o biodostępności tych barwników oraz spełnianej w tych organizmach roli fizjologicznej, aczkolwiek stale uzupełniane i rozwijane, są nadal niepełne.

Biorąc powyższe pod uwagę przeprowadziłem cykl badań, których celem było:

- identyfikacja antocyjanów występujących w kapustach czerwonych,
- wyizolowanie antocyjanów z kapusty czerwonej oraz określenie aktywności przeciwutleniającej poszczególnych związków,
- określenie profilu i zawartości antocyjanów w odmianach kapusty czerwonej uprawianych w Polsce oraz pojemności przeciwutleniającej ekstraktów uzyskanych z tych odmian,
- określenie jak proces fermentacji i obróbki termicznej oraz przechowywanie produktu fermentowanego wpływa na antocyjany obecne w czerwonej kapuście i pojemność przeciwutleniającą uzyskanych produktów,
- określenie profilu metabolitów antocyjanów obecnych w osoczu krwi i moczu ludzi po spożyciu produktów z kapusty czerwonej,
- porównanie biodostępności antocyjanów oraz pojemności przeciwutleniającej osocza krwi ochotników po spożyciu świeżej i fermentowanej kapusty czerwonej.

Hipotezy badawcze:

- antocyjany kapusty czerwonej różnią się strukturą chemiczną,
- struktura chemiczna i właściwości fizykochemiczne poszczególnych antocyjanów kapusty czerwonej wpływają na ich aktywność przeciwutleniającą,
- odmiany kapusty czerwonej uprawiane w Polsce różnią się istotnie profilem i zawartością antocyjanów oraz pojemnością przeciwutleniającą,
- proces fermentacji, obróbki termicznej oraz przechowywanie fermentowanej kapusty czerwonej wpływają na profil i zawartość antocyjanów oraz pojemność przeciwutleniającą uzyskanych produktów,
- po spożyciu produktów z kapusty czerwonej antocyjany występują w osoczu krwi i moczu ludzi w formie natywnych związków jak również w postaci koniugowanych pochodnych,
- proces fermentacji kapusty czerwonej wpływa na biodostępność antocyjanów i całkowitą pojemność przeciwutleniającą osocza krwi ochotników po spożyciu kapusty.

b) Materialy

Materiałem roślinnym w pierwszej pracy (*praca W1*) były główki kapusty czerwonej (*Brassica oleracea* L. f. *rubra*) odmiany Langedijker. Natomiast w drugiej pracy (*praca W2*), materiałem roślinnym były główki kapusty czerwonej pięciu odmian uprawianych w Polsce, pochodzących z dwóch sezonów wegetacyjnych. Spośród badanych odmian cztery charakteryzowały się główkami o kształcie kulistym (Langedijker Dauer 2, Kissendrup, Koda i Langedijker Polona) a jedna o kształcie stożkowym (Kalibos). Ponadto badane odmiany charakteryzowały się różną długością okresu wegetacji: odmiana Koda była odmianą wczesną, Kissendrup i Kalibos były odmianami średnio późnymi, a Langedijker Dauer 2 i Langedijker Polona były odmianami późnymi. Badane odmiany były uprawiane w 2008 i 2009 roku. Do badań określających zmiany profilu i zawartości antocyjanów w czasie procesu fermentacji i obróbki termicznej a także przechowywania produktu fermentowanego (*praca W3*) i badań porównawczych biodostępność antocyjanów z kapusty świeżej i fermentowanej (*praca W4*) została wykorzystana odmiana Langedijker Polona ponieważ charakteryzowała się najwyższą zawartością antocyjanów wykazaną w drugiej pracy dokumentującej niniejsze osiągnięcie naukowe (*praca W2*).

Do analiz jakościowych i ilościowych wykorzystano cyjanidynę, 3-glukozyd cyjanidyny, peonidynę (3'-metylocyjanidynę) i 3-glukozyd peonidyny zakupione w firmie Extrasynthese (Genay, Francja) oraz 3-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny, 3-(synapoilo)diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny, 3-(*p*-kumaroilo)diglukozyd-5-glukozyd 3-(feruloilo)(feruloilo)diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny, 3-(feruloilo)(synapoilo)diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny, 3-(synapoilo)(synapoilo)diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny, które zostały wyizolowane w ramach badań przedstawionych w pierwszej pracy dokumentującej osiągnięcie naukowe (*praca W1*).

c) **Metody**

- Ekstrakcję antocyjanów z liofilizowanych próbek kapust czerwonych przeprowadzono mieszaniną metanolu/wody/kwasu trifluorooctowego (0,58/0,38/0,04; v/v/v) w probówkach typu „eppendorf” przy pomocy dezintegratora ultradźwiękowego i wytrząsarki typu vortex (*prace W1-W4*).
- Analizy antocyjanów w ekstraktach kapust czerwonych i roztworach wyizolowanych wzorców dokonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) sprzężonej z detektorem diodowym (DAD) i spektrometrem masowym QTRAP 5500 (MS/MS) z wykorzystaniem termostатовanej kolumny C18 i elucji w gradiencie dwufazowym. Związki identyfikowano na podstawie czasu retencji, widm UV-Vis i widm MS/MS jonów dodatnich (*prace W1-W4*).
- Otrzymywanie/izolację standardów antocyjanów kapusty czerwonej z uzyskanych liofilizatów przeprowadzono poprzez ekstrakcję antocyjanów 80% metanolem z dodatkiem siarczanu (IV) sodu, oczyszczenie i wstępny rozdział antocyjanów na żywicy jonowymiennej oraz rozdział antocyjanów na termostатовanej półpreparatywnej kolumnie C18 po wbudowaniu jej w system HPLC sprzężony z detektorem UV/Vis stosując elucję w gradiencie dwufazowym (*praca W1*).
- Oznaczanie pojemności przeciwutleniającej ekstraktów kapust czerwonych i aktywności przeciwutleniającej wyizolowanych wzorców przeprowadzono: (1) na podstawie wymiatania kationorodnika ABTS^{•+} (metoda TEAC) według zmodyfikowanej metody Re i in. (1999) z wykorzystaniem spektrofotometru (*prace W1-W3*), (2) na podstawie zdolności wiązania rodników tlenowych (metoda ORAC) z użyciem fluoresceiny według metody Del Castillo i in. (2005) z wykorzystaniem spektrometru luminescencyjnego (*prace W2 i W3*), (3) na zasadzie wymiatania anionorodnika ponadtlenkowego z wykorzystaniem metody fotochemiluminescencyjnej (PCL ACL dla frakcji lipidowych, PCL ACW dla frakcji hydrofilowych) według Zielińskiej i in. (2008) przy użyciu urządzenia Photochem[®] (*prace W1-W3*) i (4) na zasadzie wymiatania rodnika DPPH[•] według metody Zielińskiej i in. (2008) z wykorzystaniem spektrofotometru (*praca W3*).
- Badanie pojemności przeciwutleniającej osocza ochotników przeprowadzono na zasadzie wymiatania anionorodnika ponadtlenkowego z wykorzystaniem metody fotochemiluminescencyjnej (PCL ACW) przy użyciu urządzenia Photochem[®] według Juśkiewicza i in. (2008) (*praca W4*).

- Proces spontanicznej 14-dniowej fermentacji kapusty czerwonej z kontrolą odczynu soku (pH) przeprowadzono w kamiennych naczyniach w temperaturze 24°C przez 3 pierwsze dni i 18°C przez kolejne 11 dni (*praca W3 i W4*).
- Proces przechowywania fermentowanej kapusty czerwonej przeprowadzono w szczelnie zamkniętych słoikach typu „Weck” w temperaturze 4°C przez 7, 30, 60, 90 i 180 dni (*praca W3*).
- Obróbkę termiczną kapusty czerwonej w 100°C (pod przykryciem) w małej ilości wody (kapusta : woda, 4:1, w/w) (określaną jako proces duszenia) prowadzono przez 30 i 60 minut (*praca W3*).
- Niekliniczne badanie medyczne biodostępności antocyjanów po spożyciu świeżej i fermentowanej kapusty czerwonej przeprowadzono w Zakładzie Chemii i Biodynamiki Żywności Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, 10-748 Olsztyn, ul. Tuwima 10 pod nadzorem lekarskim po wyrażeniu zgody (Uchwała nr 23/2010) przez Komisję Bioetyczną przy Wydziale Medycznym Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiej w Olsztynie zgodnie z zasadami zawartymi w Deklaracji Helsińskiej. Po badaniu lekarskim do eksperymentu zgodnie z metodologią badań biodostępności zakwalifikowano 13-tu zdrowych ochotników w wieku 24-38 lat, spełniających kryteria włączenia. Ochotnicy zostali poproszeni aby w trakcie trwania całego doświadczenia wykluczyli ze swojej codziennej diety produkty bogate w antocyjany, tj.: kapustę czerwoną, cebulę czerwoną, rzodkiewkę, kolorową sałatę i kalafior, czerwoną pomarańczę i grejpfrut, kolorową marchew, aronię, truskawki, czarną jagodę, maliny, jeżyny, winogrona, śliwki, wiśnie i czereśnie, granaty, brzoskwinie i nektarynki, porzeczki, żurawina, borówki, hibiskus, przetwory z ich udziałem (surówki, sałatki, napoje, soki, lody, desery, alkohol) oraz suplementy diety. Badanie przeprowadzono w dwufazowym eksperymencie, którego fazy rozdzielono 7 dniowym okresem przeznaczonym na wymycie pochodnych/metabolitów antocyjanów (wash-out period). Każdy z uczestników po wyrażeniu pisemnej i dobrowolnej woli na udział w badaniu, otrzymał na czczo, jednorazowo w każdej fazie badania, jedną porcję badanego produktu, tj.: kapustę świeżą lub kapustę fermentowaną (około 240 g/60 kg masy ciała ochotnika). Po fazie wash-out dokonano zamiany krzyżowej podanych produktów z kapusty czerwonej. Podczas każdej fazy badania wymagane było wstrzymanie się od spożywania pokarmów od 22⁰⁰ dnia poprzedzającego badanie, aż do ośmiu godzin po podaniu badanego produktu dnia następnego (z wyjątkiem wody niegazowanej). Prowadzący badanie zapewnił ochotnikom odpowiedni posiłek po czterech godzinach od spożycia każdego z produktów z kapusty czerwonej. Przed i po spożyciu każdego badanego produktu od każdego ochotnika pobrano krew na oznaczenie antocyjanów i ich metabolitów oraz określenie pojemności przeciwutleniającej, łącznie 8 pobrań krwi w każdej fazie badania. Ponadto zbierany był mocz przed i w siedmiu przedziałach czasowych po spożyciu produktów z kapusty czerwonej. Pobraną krew odwirowywano dwustopniowo (500 x g - 15 min, 1000 x g - 10 min, 4°C) a otrzymane osocze i zebrany mocz przeznaczone do oznaczania poziomu antocyjanów i ich metabolitów przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania analiz. W poszczególnych fazach badania, zaraz po otrzymaniu, część osocza mieszano zgodnie z czasem poboru i

następnie poddawano analizie pojemności przeciwutleniającej. W trakcie badania ochotnicy byli obserwowani na wystąpienie jakichkolwiek objawów niepożądanych, które odnotowywano w dokumentacji uczestnika badania (*praca W4*).

- Oznaczanie antocyjanów i ich pochodnych w osoczu krwi i moczu ochotników polegało na wyekstrahowaniu ich na złożu stałym i oznaczeniu metodą HPLC-MS/MS. Ekstrakcję antocyjanów przeprowadzono na złożu stałym w kolumnienkach z wypełnieniem C18. Próby osocza i moczu rozcieńczano wodnym roztworem kwasu mrówkowego, odwirowywano a następnie наносzono na kondycjonowaną kolumnkę C18 i przemywano wodnym roztworem kwasu mrówkowego a następnie antocyjany wymywano metanolem roztworem kwasu mrówkowego. Zebrany eluent był odparowany do sucha w atmosferze azotu. Przed analizą HPLC-MS/MS wyekstrahowane antocyjany rozpuszczono w fazie startowej HPLC i odwirowywano. Analiza antocyjanów i ich metabolitów przeprowadzona została z wykorzystaniem systemu HPLC sprzężonego z spektrometrem masowym QTRAP 5500. Rozcieńczone próbki nastrzykiwano na termostatowaną kolumnę chromatograficzną C18 a rozdział związków uzyskiwano stosując elucję w gradiencie dwufazowym. Przeprowadzona została analiza jakościowa polegająca na jednoczesnym skanowaniu matrycy biologicznej w trybie jonizacji negatywnej jak i pozytywnej w zakresie 50-1250 m/z dla kwadrupoli oraz 50-1000 m/z dla pułapki jonowej. Przeprowadzone zostało również przemiatanie jonów fragmentacyjnych powstałych z wybranego jonu macierzystego umożliwiające obserwację wszystkich jonów powstałych z rozpadu jonu macierzystego. Skanowano również jony powstałe w wyniku wyodrębnienia cząstek neutralnych. Analiza ilościowa przeprowadzona została metodą MRM (Multiple Reaction Monitoring) (*praca W4*).
- Wykorzystując oprogramowanie Biokinetica wyznaczono parametry farmakokinetyczne badanych antocyjanów na podstawie zmian stężenia antocyjanów w osoczu krwi i moczu, między innymi: stałą eliminacji (β); okres biologicznego półtrwania ($t_{1/2}$); pole powierzchni pod krzywą przedstawiającą zależność stężenia badanej substancji we krwi od czasu (AUC); czas po którym zostało osiągnięte stężenie maksymalne badanego związku we krwi (t_{max}) oraz wartość maksymalnego stężenia (C_{max}), średni czas obecności substancji w organizmie (MRT), stałą szybkości usuwania badanej substancji z moczem (K), klirens (Cl), ilość badanej substancji wydalonej z moczem (Ae), objętość dystrybucji (V_u), udział frakcji wydalonej z moczem (Fe), maksymalną szybkość wydalania badanej substancji z moczem (V_{ex}), czas po którym została osiągnięta maksymalna szybkość wydalania badanej substancji z moczem (t_{vex}) i pole powierzchni pod krzywą przedstawiającą zależność szybkości wydalania badanej substancji z moczem od czasu (AURC) (*praca W4*).
- Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Statistica (*prace W1-W4*).

d) Omówienie wyników

Aby zrozumieć funkcje jakie po spożyciu antocyjany obecne w żywności mogą odgrywać w organizmie człowieka, należy najpierw poznać strukturę chemiczną tych związków ponieważ determinuje ona ich właściwości biologiczne, między innymi ich aktywność przeciwutleniającą. Dlatego też, w pierwszej kolejności podjęte zostały badania określające pełen profil i zawartość antocyjanów w kapuście czerwonej metodą HPLC-DAD i metodą HPLC-MS/MS. W analizowanej kapuście zidentyfikowano tylko pochodne cyjanidyny co potwierdzono znalezieniem w widmach fragmentacyjnych MS/MS jedynie sygnału $[M-X]^+$ 287 m/z odpowiadającego aglikonowi cyjanidyny. Również badania Arapitsas'a i in. (2008) oraz Wu i Prior (2005) wskazują jedynie na obecność pochodnych cyjanidyny w kapuście czerwonej. Natomiast badania McDougall'a i in. (2007) oraz Charron'a i in. (2007) informują o obecności także innych antocyjanów w przebadanych kapustach czerwonych, tj. peonidyny i pelargonidyny. W moich badaniach, na podstawie analizy czasów retencji, widm UV-Vis i widm MS/MS jonów dodatnich badanego ekstraktu z czerwonej kapusty oraz analizy dostępnych wzorców i danych literaturowych (Wu i Prior, 2005; Charron i in. 2007; McDougall i in. 2007) zostało zidentyfikowanych 20 pochodnych cyjanidyny (*załącznik 4, praca W1: Fig. 1, Table 1*). W innych, wcześniejszych badaniach, w analizowanych kapustach znaleziono od 9 do 24 antocyjanów (Arapitsas i in. 2008; Pliszka i in. 2009). Wskazuje się, że czynnikami decydującymi o różnej liczbie flawonoidów do których zaliczane są antocyjany, występujących w uprawianych roślinach może być zmienność odmianowa, wpływ sezonu wegetacyjnego (światło, poziom opadów), warunki klimatyczne oraz warunki uprawy (Wiczowski i Piskula, 2004).

Podstawową strukturą antocyjanów zidentyfikowanych w mojej pracy był 3-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Rysunek 1C), którego reszty cukrowe mogą być nieacylowane, monoacylowane i diacylowane kwasami fenolowymi, tj. ferulowym, synapinowym, kawowym i *p*-kumarowym. Na podstawie czasów retencji, parametrów widm UV-Vis (λ_{vis} , λ_{acyl} , E_{acyl}/E_{vis}) i parametrów widm MS/MS (jonów pseudomolekularnych: $[M]^+$ oraz jonów fragmentacyjnych: $[M-glu]^+$ i $[M-glu-acyl]^+$) (*załącznik 4, praca W1: Table 1*) w obrębie znalezionych antocyjanów zidentyfikowano dwie nieacylowane formy cyjanidyny, tj. 3-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3diG5G) i 3-glukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3G5G). Kolejne jedenaście pochodnych opisanych zostało jako antocyjany monoacylowane, przy czym dwa związki zidentyfikowano jako 3-(synapoilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(sin)diG5G), dwa oznaczono jako 3-(synapoilo)-triglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(sin)triG5G) a kolejne dwa opisano jako 3-(feruloilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(fer)diG5G). Do monoacylowanych antocyjanów należały również 3-(feruloilo)-triglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(fer)triG5G), 3-(kawoilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(caf)diG5G), 3-(*p*-kumaroilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(*p*-cum)diG5G), 3-(feruloilo)-glukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(fer)G5G) i 3-(synapoilo)-glukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(sin)G5G). Trzecią grupę antocyjanów znalezionych w kapuście czerwonej stanowiło siedem pochodnych diacylowanych, tj. 3-(feruloilo)(feruloilo)-triglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(fer)(fer)triG5G), 3-(feruloilo)(synapoilo)-triglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(fer)(sin)triG5G), 3-(feruloilo)(feruloilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(fer)(fer)diG5G), 3-(feruloilo)(synapoilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(sin)(fer)diG5G), 3-(synapoilo)(synapoilo)-diglukozyd-5-glukozyd

cyjanidyny (Cy3(sin)(sin)diG5G) oraz dwa związki określone jako 3-(kawoilo)(p-kumaroilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(caf)(p-cum)diG5G) (*załącznik 4, praca W1: Fig. 1, Table 1*). W obrębie zidentyfikowanych antocyjanów, dla Cy3(sin)diG5G, Cy3(fer)diG5G i Cy3(sin)triG5G znaleziono po dwóch przedstawicieli posiadających bardzo zbliżone wartości parametrów widm UV-Vis i MS/MS ale różne czasy retencji. Jak wskazano we wcześniejszych badaniach (Wu i Prior, 2005; McDougall i in. 2007) różne pozycje acylacji w cząsteczce glukozydów cyjanidyny są możliwe co skutkuje różnym czasem retencji tych związków. Z drugiej strony, w roślinach występują różne typy wiązania cukier-cukier (2-O- β , 3-O- β , 6-O- β) (Wu i Prior, 2005), który mogą również wpływać na czas retencji związków. W związku z tym, biorąc pod uwagę powyższe wyjaśnienia możliwe są różne struktury di- i tri-glukozydowe z różnymi pozycjami grup acylowych. Ponieważ stosowane w moich badaniach wyposażenie analityczne nie pozwala na określenie położenia grupy acylowej i typu wiązania cukier-cukier, dlatego oba związki z każdej pary zostały oznaczone jak powyżej.

Analizowana w tych badaniach kapusta czerwona charakteryzowała się dużą zawartością antocyjanów (2,32 mg cyjanidyny/g suchej masy (sm), *załącznik 4, praca W1: Table 1*). Dominującą pochodną była nieacylowana forma 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny, która stanowiła 25% ogólnej zawartości antocyjanów znalezionych w tej kapuście. Duży udział procentowy znaleziono również w przypadku Cy3(sin)(sin)diG5G (11,2%), Cy3(p-cum)diG5G (8,2%), Cy3(sin)diG5G (7,8%), Cy3(sin)(fer)diG5G (7,8%), Cy3(fer)(fer)diG5G (7,3%), Cy3(fer)diG5G (6%) i Cy3(sin)diG5G (5,2%).

Z powodu braku oferty handlowej standardów antocyjanów występujących w kapuście czerwonej podjęto badania wyizolowania tych związków z uzyskanego liofilizatu kapusty czerwonej. W tym celu opracowano i przeprowadzono przedstawioną w części *Metody* procedurę pozyskania tych substancji. W oparciu o przedstawioną przeze mnie metodę zostało po raz pierwszy wyizolowane i oczyszczone 15 antocyjanów kapusty czerwonej.

W następnym etapie tej pracy przeprowadzono analizy pojemności przeciwutleniającej ekstraktu z kapusty czerwonej oraz po raz pierwszy 7 głównych antocyjanów wyizolowanych z kapusty czerwonej (Cy3diG5G, Cy3(sin)diG5G, Cy3(p-cum)diG5G, Cy3(fer)diG5G/Cy3(sin)diG5G, Cy3(fer)(fer)diG5G, Cy3(fer)(sin)diG5G i Cy3(sin)(sin)diG5G) (*załącznik 4, praca W1: Table 2*). Analizy pojemności przeciwutleniającej przeprowadzono z wykorzystaniem trzech metod, tj. TEAC, PCL ACL i PCL ACW. Badana kapusta czerwona charakteryzowała się wysoką pojemnością przeciwutleniającą a w obrębie wyizolowanych antocyjanów najwyższą aktywność przeciwutleniającą posiadał Cy3(sin)(sin)diG5G. Okazało się, że porównując właściwości antyoksydacyjne antocyjanów kapusty czerwonej niezbędne jest uwzględnienie obecności lub braku podstawnika acylowego w strukturze molekularnej tych naturalnych czerwonych barwników. W moich badaniach wszystkie acylowane pochodne cyjanidyny posiadały wyższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu do pochodnej nieacylowanej. Ponadto, w przypadku monoacylowanych pochodnych cyjanidyny, związki acylowane kwasem synapinowym wykazywały wyższą aktywność niż substancje z kwasem ferulowym lub p-kumarowym. Również w przypadku diacylowanych pochodnych cyjanidyny, formy z dwoma kwasami synapinowymi wykazywały najwyższą zdolność do zmiatania wolnych rodników. Ponadto, diacylowane pochodne cyjanidyny charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwutleniającą niż pochodne monoacylowane. Prezentowane wyniki

wskazują, że acylacja antocyjanów zwiększa ich zdolność do zmiatania rodników w porównaniu do form nieacylowanych. Natomiast w obrębie antocyjanów acylowanych rodzaj podstawnika acylowego determinuje wielkość aktywności przeciwutleniającej, tj. kwas synapowy > kwas ferulowy > kwas *p*-kumarowy. Moje badania znajdują potwierdzenie w eksperymentach innych autorów dotyczących aktywności przeciwutleniającej pochodnych innych antocyjanów, takich jak delfinidyny i pelargonidyny (Matsufuji i in. 2007; Azuma i in. 2008).

W pracy przebadano również względny udział pojedynczych antocyjanów w pojemności przeciwutleniającej kapusty czerwonej (*załącznik 4, praca W1: Table 3*). Najniższy udział w pojemności przeciwutleniającej badanej kapusty czerwonej prezentował Cy3(sin)diG5G a najwyższy Cy3(sin)(sin)diG5G. Generalnie, pomijając fakt, że wyizolowane z kapusty czerwonej antocyjany posiadają silne właściwości przeciwutleniające, udział tych związków w pojemności przeciwutleniającej badanej kapusty był niski. Może to wskazywać, że inne substancje obecne w kapuście czerwonej (kwasy fenolowe, flawonole, witamina C) oraz ich interakcje mogą być odpowiedzialne za właściwości przeciwutleniające tego warzywa (Wiczkowski i in. 2014).

Wyniki niniejszych badań dowodzą, że kapusta czerwona jest bogatym źródłem szeregu acylowanych antocyjanów posiadających silne właściwości antyoksydacyjne. Należy podkreślić, że acylowane antocyjany wykazują wyższą stabilność (McDougall i in. 2007) i dlatego mogą być z powodzeniem stosowane jako naturalne barwniki żywności oraz substancje przeciwutleniające, co jest ważne w aspekcie ich potencjalnej roli w zapobieganiu chorobom związanym z uszkodzeniami oksydacyjnymi.

Przedstawione powyżej badania zostały zawarte w pierwszej publikacji (*praca W1*) dokumentującej osiągnięcie naukowe, tj.: **Wiczkowski W., Szawara-Nowak D., Topolska J. Red cabbage anthocyanins: profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food Research International*, 2013, 51, 303–309.**

Jak do tej pory w dostępnej literaturze nie było systematycznych informacji o profilu antocyjanów i ich zawartości w różnych odmianach kapusty czerwonej oraz o właściwościach przeciwutleniających tych odmian. Ponadto nie istniały dane opisujące wpływ różnych okresów wegetacyjnych na profil i zawartość antocyjanów kapusty czerwonej, a także określających jak długość okresu wegetacji oddziałuje na profil i zawartość antocyjanów. Poznanie tych faktów może pomóc w określeniu nowych możliwości wykorzystania tego warzywa oraz może pozwolić na wyselekcjonowanie odmian z korzystnym profilem antocyjanów oraz wysoką ich zawartością (np. odmian bogatych w antocyjany diacylowane kwasem sinapinowym wykazujących silną aktywność przeciwutleniającą co zostało udowodnione w *pracy W1*) tak aby mogły pozytywnie oddziaływać na zdrowie konsumentów po spożyciu. Dlatego w kolejnym etapie moich badań przeanalizowano profil i zawartość antocyjanów oraz pojemność przeciwutleniającą 5 odmian kapusty czerwonej uprawianych w Polsce. Ponadto, zbadano wpływ dwóch kolejnych okresów wegetacyjnych oraz długość okresu wegetacyjnego na profil, zawartość i właściwości przeciwutleniające kapust czerwonych. Do analizy antocyjanów w kapustach czerwonych wykorzystano metodę HPLC-DAD i metodę HPLC-MS/MS. Identyfikację przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną we wcześniejszej pracy (*praca W1*) i podobnie jak tam, w badanych kapustach czerwonych znaleziono 20 antocyjanów, których

podstawową strukturą był 3-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny. Reszty glukozydowe tej molekuly były dodatkowo acylowane kwasem synapinowym, ferulowym, kawowym lub *p*-kumarowym. Wśród 20 zidentyfikowanych pochodnych cyjanidyny, dwie formy były nieacylowane. Pięć pochodnych cyjanidyny było monoacylowane kwasem synapinowym, cztery formy były monoacylowane kwasem ferulowym, jedna pochodna była monoacylowana kwasem *p*-kumarowym a jedna kwasem kawowym. Zidentyfikowano również siedem form diacylowanych, w tym dwie pochodne diacylowane kwasami *p*-kumarowym i kawowym, dwie formy diacylowane kwasami synapinowym i ferulowym, dwie pochodne podwójnie acylowane kwasem ferulowym a jedna pochodna podwójnie acylowana kwasem synapinowym.

Przeanalizowane kapusty czerwone okazały się bogatym źródłem antocyjanów (1,13 - 6,29 mg Cy/g sm, co odpowiadało 0,14-0,91 mg Cy/g wilgotnej masy (wm) (*załącznik 4, praca W2: Table 2*). Dla porównania kapusta czerwona z Norwegii zawierała 1,14 mg antocyjanów/g wm (Volden i in. 2008) a kapusta z Włoch 1,25 mg antocyjanów/g wm (Piccaglia i in. 2002). Wyższą zawartość antocyjanów znaleziono w kapuście czerwonej (1,38 mg/g wm) pochodzącej z Wielkiej Brytanii (McDougal i in. 2007) a niższą w kapuście uprawianej w północnych Włoszech (0,77 mg/g wm, Scalzo i in. 2008). Najwyższy poziom antocyjanów znaleziono w kapuście czerwonej pochodzącej ze Stanów Zjednoczonych (3,22 mg/g wm, Wu i in. 2006).

Średnia zawartość antocyjanów w odmianach uprawianych w 2009 roku ($4,15 \pm 0,16$ mg Cy/g sm) była ponad dwukrotnie wyższa niż w 2008 roku ($1,78 \pm 0,13$ mg Cy/g sm) (*załącznik 4, praca W2: Table 2*). Ponieważ w obydwu sezonach wegetacyjnych zastosowano takie same zabiegi agrotechniczne dlatego zaobserwowane różnice w zawartość antocyjanów mogły wynikać z różnych warunków panujących podczas okresu wegetacji, między innymi nasłonecznienia, ponieważ światło stymuluje syntezę tych związków (Wiczowski i Piskula, 2004).

W obu sezonach wegetacyjnych, spośród pięciu badanych odmian najwyższą zawartością antocyjanów charakteryzowała się odmiana Langedijker Polana. W odmianie tej dominującym związkiem był 3-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny, forma nieacylowana. Związek ten dominował również w odmianie Langedijker Dauer 2. Najniższą zawartość antocyjanów stwierdzono w odmianie Kalibos. W odmianie tej dominującym związkiem była forma monoacylowana kwasem *p*-kumarowym. Związek ten w największej ilości występował również w odmianie Kissendrup. Natomiast w odmianie Koda stwierdzono największe ilości formy diacylowanej kwasem synapinowym.

Z pośród trzech grup antocyjanów (nieacylowanych, monoacylowanych i diacylowanych) znalezionych w kapustach czerwonych, monoacylowane pochodne cyjanidyny charakteryzowały się najwyższą zawartością. Ich udział w całkowitej zawartości antocyjanów w kapuście czerwonej stanowił około 44% podczas gdy udział nieacylowanych i diacylowanych pochodnych wynosił odpowiednio 17% i 39%.

Ponieważ analizowane w pracy odmiany kapusty czerwonej charakteryzowały się różną długością okresu wegetacji dlatego podjęte zostały badania określenia wpływu tego parametru na profil antocyjanów. Wyniki niniejszych badań wykazały po raz pierwszy, że dłuższy okres wegetacji sprzyja wyższemu udziałowi antocyjanów nieacylowanych w ogólnej zawartości antocyjanów w uprawianych kapustach (*załącznik 4, praca W2: Table 3*). Odmiany wczesne o 80-90 dniowym okresie wegetacji charakteryzowały się 10%

udziałem nieacylowanych antocyjanów, podczas gdy odmiany średnio-późne o 110-120 dniowej wegetacji miały prawie 15% nieacylowanych pochodnych cyjanidyny. Najwyższy procentowy udział form nieacylowanych (ponad 20%) został znaleziony w odmianach późnych o 140-150 dniowym okresie wegetacji. Zupełnie odwrotny profil dystrybucji tych związków został zidentyfikowany w przypadku antocyjanów acylowanych. Największy udział acylowanych antocyjanów w ogólnej zawartości antocyjanów miały odmiany wczesne (około 45%) a najniższy odmiany późne (około 40%). Udział acylowanych antocyjanów w ogólnej zawartości tych barwników zmniejszał się wraz z wydłużeniem okresu wegetacji kapust czerwonych. Obserwacje te wskazują, że warunki pogodowe (niższa temperatura, mniejsze nasłonecznienie) i procesy dojrzewania występujące pod koniec okresu wegetacji mogły powodować degradację antocyjanów acylowanych do form nieacylowanych.

Prior i in. (2005) sugerują aby do standaryzacji pomiaru właściwości przeciwutleniających żywności używać trzech następujących metod: ORAC, TEAC i test Folin-Ciocalteu. W moich badaniach zostały wykorzystane dwie (ORAC i TEAC) z trzech proponowanych metod oraz dwie dodatkowe metody w których wykorzystywany jest anionorodnik ponadtlenkowy generowany w komórkach w warunkach fizjologicznych (metoda PCL ACW i PCL ACL). Spośród przebadanych odmian najwyższą pojemnością przeciwutleniającą mierzoną wszystkimi zastosowanymi metodami charakteryzowała się odmiana Langedijker Polona a najmniejszą odmiana Kalibos (*załącznik 4, praca W2: Table 4*). Pojemność przeciwutleniająca badanych odmian kształtowała się w następującej kolejności: Langedijker Polona > Langedijker Dauer 2 > Kissendrup > Koda > Kalibos. Ponadto, podobnie jak w przypadku zawartości antocyjanów wyższą pojemnością przeciwutleniającą, wyznaczaną wszystkimi czterema metodami, charakteryzowały się odmiany uprawiane w 2009 roku. Uzyskane wyniki wskazują po raz pierwszy, że różnice w pojemności przeciwutleniającej kapusty czerwonej mogą zależeć od odmiany. Ponadto, uzyskane wyniki pojemności przeciwutleniającej pozytywnie i istotnie korelowały z ogólną zawartością antocyjanów w tych odmianach. Niniejsze wyniki potwierdzają wcześniejsze badania w których zaobserwowano związek pomiędzy zawartością antocyjanów w słodkich ziemniakach a pojemnością przeciwutleniającą tych warzyw (Zhu i in. 2010).

Podsumowując, jak już wcześniej wspomniano, niniejsze badania są pierwszymi w których przedstawiono pełen profil antocyjanów obecnych w różnych odmianach kapusty czerwonej uprawianych w dwóch kolejnych latach i wyraźnie pokazują, że odmiany kapusty czerwonej mają swój unikatowy „odcisk antocyjanowy”. Ponadto, pochodna cyjanidyny diacylowana kwasem synapinowym charakteryzująca się wysoką pojemnością przeciwutleniającą (co wykazano w pracy W1) była jednym z dominujących antocyjanów występujących w przebadanych kapustach czerwonych. Z fizjologicznego i żywieniowego punktu widzenia, wiedza o pełnym profilu antocyjanów kapust czerwonych jest bardzo ważna, ponieważ może pomóc w przewidywaniu właściwości biologicznych tych roślin. Ponadto, informacje o unikalnym profilu antocyjanów w kapustach czerwonych mogą być bardzo dobrym "markerem taksonomicznym".

Przedstawione powyżej badania zostały zawarte w drugiej publikacji (praca W2) dokumentującej osiągnięcie naukowe, tj.: **Wiczkowski W., Topolska J., Honke J. Anthocyanins profile and antioxidant capacity of red cabbages are influenced by genotype and vegetation period. *Journal of Functional Foods*, 2014, 7, 201-211.**

Analiza zawartości antocyjanów oraz ich profilu w produktach spożywczych po obróbce technologicznej jest niezbędna do charakterystyki losu antocyjanów w czasie zastosowanych procesów, a także do opracowania odpowiednich procedur zmniejszających straty tych naturalnych barwników. Ponadto, badania nad sposobem przetwarzania i formami spożycia kapusty czerwonej powinny być prowadzone z uwzględnieniem potencjalnej prozdrowotnej roli tych biologicznie aktywnych składników. Dlatego, po badaniach profilu i zawartości antocyjanów w kapustach czerwonych uprawianych w Polsce oraz pojemności przeciwutleniającej tych warzyw (*prace W1 i W2*), kolejnym etapem podjętych badań była analiza wpływu procesu fermentacji, obróbki termicznej i przechowywania produktu fermentowanego z kapusty czerwonej na profil i zawartość antocyjanów oraz pojemność przeciwutleniającą otrzymanych produktów.

Kapustę fermentowaną uzyskano w procesie spontanicznej 14 dniowej fermentacji, o której właściwym przebiegu świadczyły zmiany odczynu soku, tj. od pH 6,21 w pierwszym dniu procesu do pH 3,79 w 14 dniu procesu. Ponadto, fermentowaną kapustę czerwoną poddano przechowywaniu w szczelnie zamkniętych słoikach typu „Weck” w temperaturze 4°C przez 7, 30, 60, 90 i 180 dni. Kapustę duszoną otrzymano po 30 i 60 minutowej obróbce termicznej w 100°C (pod przykryciem) w małej ilości wody (kapusta : woda, 4:1, w/w). Skład antocyjanów i ich zawartość w świeżej, fermentowanej, duszonej i przechowywanej kapuście czerwonej analizowano w oparciu o metodę HPLC-DAD i HPLC-MS/MS. Ponadto, w celu scharakteryzowania pojemności przeciwutleniającej uzyskanych w pracy produktów z kapusty czerwonej wykorzystano 5 metod badawczych: TEAC, ORAC, PCL ACL, PCL ACW i DPPH.

Kapusta czerwona stanowi bogate źródło niacylowanych, monoacylowanych i diacylowanych pochodnych cyjanidyny (*prace W1 i W2*), a zatem zapewnia unikalny grunt dla badań zależności pomiędzy profilem i zawartością antocyjanów a sposobem przygotowania żywności. Przeprowadzone przeze mnie analizy porównawcze profilu i zawartości antocyjanów w świeżej, fermentowanej, przechowywanej i duszonej kapuście czerwonej zostały zrealizowane po raz pierwszy i wykazały, że zastosowane procesy istotnie wpływały na los antocyjanów (*załącznik 4, praca W3: Table 3*). Generalnie, przeprowadzone procesy spowodowały spadek ogólnej zawartości antocyjanów w uzyskanych produktach końcowych. Proces fermentacji spowodował zmniejszenie ogólnej zawartości antocyjanów o 24%. Podobne obniżenie ogólnej zawartości antocyjanów (o 25%) zostało zaobserwowane po 30 minutowym procesie duszenia kapusty czerwonej. Gdy proces duszenia został wydłużony do 60 min zwiększył się również spadek ogólnej zawartości antocyjanów (do 34%). W przypadku przechowywania fermentowanej kapusty czerwonej w 4°C, intensywność procesu degradacji antocyjanów zależała od długości przechowywania. Po 7 dniach przechowywania ogólna zawartość antocyjanów zmniejszyła się jedynie o 2%, podczas gdy po 180 dniach spadła aż o 58%. Intensywność procesu degradacji antocyjanów w przechowywanej fermentowanej kapuście czerwonej kształtowała się w następującej kolejności: 7 dni (2%) < 30 dni (13%) < 60 dni (30%) < 90 dni (36%) < 180 dni (58%). W innych badaniach dotyczących wpływu procesu rozmrażania, ogrzewania mikrofalowego, gotowania, blanszowania, ekstrakcji soku, pasteryzacji i przechowywania na poziom antocyjanów w żywności zaobserwowano spadek zawartości tych związków w przedziale 3-95% w zależności od zastosowanego procesu (Giusti i Wrostad, 2003; Sadilova i in. 2007; Hartmann i in. 2008; Scalzo i in. 2008).

Wyniki uzyskane w mojej pracy umiejscawiają się w dolnym i środkowym zakresie cytowanych wartości.

Ponieważ we wcześniejszych badaniach (Davey i in. 2000) wykazano, że ługowanie jest jednym z głównych przyczyn strat polifenoli w trakcie stosowanych procesów technologicznych dlatego, w niniejszej pracy powstałe płyny (sok świeży, fermentowany i z duszonej kapusty) były gromadzone a następnie w odpowiedniej proporcji objętościowej były dodawane do uzyskanych produktów z kapusty czerwonej przed poddaniem ich procesowi liofilizacji. W związku z tym, proces ługowania jako przyczyna strat zawartości antocyjanów został wykluczony. W tej sytuacji, inne czynniki takie jak temperatura, długotrwałość procesu, obecność tlenu, światła, aktywność enzymów roślinnych i mikroorganizmów oraz wartość pH decydowały o losie antocyjanów (Castaneda-Ovando i in. 2009; Clifford, 2009; Truong i in. 2010). Przy czym, siła oddziaływania wymienionych czynników zależała od typu zastosowanej obróbki. Dodatkowo, pojawienie się jednego lub kilku czynników w tym samym czasie mogło mieć istotny wpływ na los badanych antocyjanów. Ponieważ działanie jednego głównego czynnika bardzo często było niemożliwe do zaobserwowania a mogły występować efekty interakcji dlatego synergistyczne i antagonistyczne oddziaływania wymienionych czynników były brane pod uwagę (Castaneda-Ovando i in. 2009).

W przypadku fermentacji, spadek zawartości antocyjanów mógł być wywołany panującą temperaturą, 24°C w pierwszych 3 dniach procesu fermentacji i 18°C w kolejnych 11 dniach. Również we wcześniejszych badaniach wykazano negatywny wpływ temperatury pokojowej (20-22°C) na zawartość związków biologicznie czynnych w czasie obróbki technologicznej (Aaby i in. 2007). Kolejnym czynnikiem, który mógł wpływać na profil i zawartość antocyjanów była mikroflora procesu fermentacji, na co wskazały już wcześniejsze badania Bisakowskiego i in. (2007), w których udowodniono oddziaływanie procesu fermentacji mlekowej na flawonoidy obecne w cebuli. Ponadto, główki kapusty czerwonej były cięte na cienkie paski w czasie przygotowywania do fermentacji co skutkowało uszkodzeniem komórek tkanek kapusty czerwonej i powodowało, że antocyjany były ekspozowane na procesy enzymatycznego i nieenzymatycznego utleniania (Pourcel i in. 2007). Biorąc powyższe pod uwagę, można stwierdzić, że enzymy roślinne mogły wpływać na zawartość i skład antocyjanów, dopóki nie zostały dezaktywowane przez czynniki środowiska procesu fermentacji.

Wpływ wymienionych powyżej czynników na stabilność antocyjanów w czasie fermentacji mógł zależeć od pH środowiska procesu (Castaneda-Ovando i in. 2009). Wartość pH w pierwszych 7 dniach procesu fermentacji mogła negatywnie oddziaływać na poziom antocyjanów (*załącznik 4, praca W3: Table 1*). Na początku pH soku kapusty czerwonej kształtowało się na poziomie powyżej 6. Następnie w ciągu kolejnych dni odczyn soku obniżał się, by w 8 dniu procesu fermentacji uzyskać wartość 3,8. W pozostałych 7 dniach pH soku kształtowało się na poziomie poniżej 4. Wysoka wartość odczynu soku z kapusty w pierwszych dniach fermentacji oraz jego tempo zmian mogło prowadzić do degradacji części antocyjanów. Wcześniejsze badania sugerują, że pH poniżej 4 jest korzystne dla stabilności antocyjanów, podczas gdy bliskie neutralnych wartości może wpływać negatywnie na te barwniki (Markakis, 1982). Ponadto, badania Giusti i Wrolstad'a (2003) oraz McDougall'a i in. (2007) informują, że antocyjany acylowane są stabilniejsze w środowisku o pH bliskim neutralnego w porównaniu do antocyjanów nieacylowanych.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, można stwierdzić, że bardzo wysoki odsetek acylowanych antocyjanów (około 80%) w badanej kapuście czerwonej ograniczał tempo degradacji antocyjanów (tylko 24% spadek) w okresie 14-dniowej fermentacji.

Moje badania wykazały również, że długość okresu przechowywania istotnie wpływała na poziom antocyjanów. Podobnie wykazały badania Giusti'ego & Wrolstad'a (2003). Cytowani autorzy stwierdzili również, że temperatura przechowywania wywiera wpływ na kinetykę degradacji antocyjanów, w 25°C tempo rozkładu tych substancji było wyższe niż 2°C. W mojej pracy, w czasie przechowywania fermentowanej kapusty czerwonej w temperaturze 4°C przez 180 dni, średni jednodniowy spadek ogólnej zawartości antocyjanów wynosił 0,32%. Najwyższą redukcję zawartości antocyjanów (o 34,5%) zaobserwowano w okresie pomiędzy 90 a 180 dniem, podczas gdy najwyższe tempo degradacji antocyjanów wystąpiło pomiędzy 7 a 30 dniem przechowywania (0,59% ogólnej zawartości antocyjanów/dzień). Podobne obserwacje poczyniono we wcześniejszych badaniach dotyczących przechowywania produktów uzyskanych z truskawki (Aaby i in. 2007; Hartmann i in. 2008). Jeśli chodzi o wartości pH w czasie przechowywania fermentowanej kapusty czerwonej to wzrosły one nieznacznie w ciągu tego procesu, ale nadal były korzystne dla stabilności antocyjanów (Markakis, 1982) ponieważ kształtowały się w pobliżu 4,0. Dlatego, oprócz długości okresu przechowywania i panującej w czasie tego procesu temperatury, inne czynniki, takie jak niekontrolowany wzrost drobnoustrojów, mogły wpływać na poziom antocyjanów w czasie przechowywania fermentowanej kapusty czerwonej.

Proces duszenia kapusty czerwonej przez 30 i 60 minut spowodował znaczny spadek zawartości antocyjanów, przy czym w przypadku krótszej ekspozycji na wysoką temperaturę obniżenie poziomu antocyjanów było niższe. Należy zaznaczyć, że spośród wszystkich procesów wykorzystanych w niniejszej pracy duszenie w wysokiej temperaturze (około 100°C) przez 60 minut było zabiegiem powodującym największe straty antocyjanów. Wskazuje to na wysoką temperaturę jako jeden z najsilniejszych czynników powodujących degradację tych naturalnych barwników. Również inne badania donoszą, że obróbka cieplna różnych produktów spożywczych prowadzi do znacznych spadków całkowitej zawartości antocyjanów (Hartmann i in. 2008; Scalzo i in. 2008; Volden i in. 2008). Z drugiej strony wykazano, że gotowanie z zastosowaniem mikrofal nie powoduje znacznych zmian w zawartości antocyjanów w żywności (Scalzo i in. 2008).

W niniejszych badaniach określano również wpływ procesu fermentacji i przechowywania produktu fermentowanego oraz duszenia na poszczególne antocyjany obecne w kapuście czerwonej. Jak wcześniej podano w świeżej kapuście czerwonej dominującym związkiem była nieacylowana forma 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny a kolejnymi były pochodna 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny diacylowana kwasem sinapinowym i pochodna 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny acylowana kwasem *p*-kumarowym. Również po fermentacji i duszeniu kapusty czerwonej ale także w trakcie jej przechowywania wspomniana powyżej nieacylowana pochodna 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny charakteryzowała się najwyższą zawartością. Zarówno fermentacja jak i obróbka termiczna powodowały zmniejszenie się zawartości wszystkich analizowanych antocyjanów występujących w kapuście czerwonej. Przy czym, intensywność procesu degradacji poszczególnych pochodnych cyjanidyny zależała od ich struktury chemicznej. Z pośród głównych antocyjanów obecnych w badanej kapuście czerwonej najmniejsze spadki

zawartości znaleziono dla nieacylowanej pochodnej 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny. Natomiast w obrębie monoacylowanych form cyjanidyny pochodne z kwasem synapinowym wykazywały największe obniżenie zawartości. Wyniki te znajdują potwierdzenie w innych badaniach (McDougall i in. 2007; Sadilova i in. 2007) w których wykazano, że acylowane kwasem synapinowym pochodne antocyjanów są mniej stabilne niż pochodne acylowane kwasem ferulowym i *p*-kumarowym.

W niniejszych badaniach analizowano również procentowy udział nieacylowanych, monoacylowanych i diacylowanych antocyjanów w ogólnej ilości antocyjanów znalezionych w poszczególnych produktach uzyskanych z kapusty czerwonej. Po procesie fermentacji udział antocyjanów nieacylowanych wzrósł a antocyjanów acylowanych zmniejszył się w porównaniu do kapusty nieprzetworzonej. W przypadku pierwszych 7 dni przechowywania produktu fermentowanego zaobserwowano wzrost udziału antocyjanów nieacylowanych. W kolejnych dniach przechowywania (30, 60 i 90 dniu) znaleziono zbliżony do zaobserwowanego w 7 dniu procesu udział procentowy form nieacylowanych. Natomiast po 180 dniach przechowywania poziom antocyjanów nieacylowanych w fermentowanej kapuście czerwonej obniżył się. W przypadku antocyjanów monoacylowanych w początkowym okresie przechowywania zaobserwowano wzrost udziału tych pochodnych w ogólnej zawartości antocyjanów w porównaniu do produktu analizowanego bezpośrednio po fermentacji. Następnie poziom antocyjanów monoacylowanych systematycznie spadał. Odmienny profil antocyjanów znaleziono w przypadku antocyjanów diacylowanych. W początkowej fazie ich procentowy udział zmniejszył się a następnie w kolejnych dniach przechowywania stopniowo wzrastał. Po obróbce termicznej procentowy udział antocyjanów nieacylowanych wzrósł w porównaniu do surowca wyjściowego. Dodatkowo, zaobserwowano również wzrost udziału antocyjanów monoacylowanych w kapuście po procesie duszenia. Odmienny proces wystąpił w przypadku antocyjanów diacylowanych. Po 30 minutowej obróbce termicznej udział antocyjanów diacylowanych zmniejszył się z 34,4% do 30,6%. Wdłużenie procesu duszenia o kolejne 30 minut spowodowało dalszy spadek ogólnej zawartości tych antocyjanów, do poziomu 29,2%. Tak jak już wcześniej zauważyłem antocyjany występujące w kapuście czerwonej mają identyczną podstawową strukturę i dlatego zmiany w udziale antocyjanów nieacylowanych, monoacylowanych i diacylowanych w ogólnej zawartości antocyjanów mogą wynikać z degradacji jednych pochodnych cyjanidyny w drugie.

Zastosowanie pięciu różnych metod badania pojemności przeciwutleniającej (PCL ACW, PCL ACL, ORAC, ABTS, DPPH) do charakterystyki dziewięciu różnych produktów otrzymanych z kapusty czerwonej (świeża, fermentowana, przechowywana przez 7, 30, 60, 90 i 180 dni oraz duszona przez 30 i 60 min) pozwoliło na uzyskanie pełnego profilu właściwości przeciwutleniających tego warzywa podczas procesów technologicznych (załącznik 4, praca W3: Table 4). Wartości pojemności przeciwutleniającej produktów otrzymanych z kapusty czerwonej wyznaczonej metodą ABTS kształtowały się w przedziale od 133,1 do 166,5 $\mu\text{moli Troloxu/g sm}$. W przypadku metody ORAC wynosiły od 318,3 do 411,3 $\mu\text{moli Troloxu/g sm}$. Gdy pojemność przeciwutleniająca wyznaczana była metodą PCL ACW to uzyskiwano wartości od 71,6 do 103,5 $\mu\text{moli Troloxu/g sm}$ a gdy wykorzystywano metodę PCL ACL to wartość tego parametru wynosiła od 413,7 do 632,8 $\mu\text{moli Troloxu/g sm}$. Natomiast po analizie testem DPPH pojemność przeciwutleniająca produktów z kapusty czerwonej wynosiła od 38,1 do 47,0 $\mu\text{moli Troloxu/g sm}$. Szereg

wartości pojemności przeciwutleniającej produktów z kapusty czerwonej dla zastosowanych metod kształtował się następująco: PCL ACL > ORAC > ABTS > PCL ACW > DPPH.

Pojemność przeciwutleniająca badanych produktów z kapusty czerwonej różniła się istotnie ($P < 0,05$). Świeża kapusta czerwona charakteryzowała się większymi zdolnościami do zmiatania wolnych rodników niż kapusta fermentowana, przechowywana i duszona. Największą redukcję pojemności przeciwutleniającej w porównaniu do kapusty świeżej znaleziono w kapuscie przechowywanej przez 180 dni. Natomiast, najmniejszą stratę właściwości przeciwutleniających zaobserwowano dla produktu poddanego 30 min obróbce termicznej. Szereg wartości pojemności przeciwutleniającej dla produktów otrzymanych z kapusty czerwonej kształtował się następująco: kapusta świeża > duszona 30 min > fermentowana > przechowywana 7 dni > duszona 60 min > przechowywana 30 dni > przechowywana 60 dni > przechowywana 90 dni > przechowywana 180 dni. Uzyskane wyniki wskazują, że różnice w pojemności przeciwutleniającej produktów z kapusty czerwonej zależą od rodzaju zastosowanego procesu technologicznego. Również inne badania dowodzą, że właściwości przeciwutleniające produktów żywnościowych są kształtowane przez procesy jakim zostały poddane (Aaby i in. 2007). Ponadto, spadek pojemności przeciwutleniającej wnoszonej przez antocyjany nie jest kompensowany przez aktywność nowo utworzonych związków fenolowych powstałych w wyniku obróbki termicznej (Sadilova i in. 2007).

W przeprowadzonych badaniach pojemność przeciwutleniająca produktów z kapusty czerwonej jest istotnie i dodatnio skorelowana ($P < 0,05$) z całkowitą zawartością antocyjanów w tych produktach ($r = 0,949$ dla ORAC; $r = 0,938$ dla PCL ACL; $r = 0,926$ dla DPPH; $r = 0,861$ dla PCL ACW). Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że antocyjany występujące w fermentowanej, przechowywanej i duszonej kapuscie czerwonej były odpowiedzialne za pojemność przeciwutleniającą tych produktów. Ponadto, w pracy analizowano zależności pomiędzy zawartością głównych antocyjanów kapusty czerwonej a potencjałem przeciwutleniającym uzyskanych produktów. W przypadku Cy3(fer)(sin)diG5G i Cy3(sin)(sin)diG5G analiza korelacji Pearsona wykazała, że zawartość tych związków w badanych produktach była istotnie i dodatnio skorelowana z pojemnością przeciwutleniającą tych produktów wyznaczoną za pomocą czterech metod: PCL ACL, DPPH, PCL ACW i ORAC. Jeżeli chodzi o zawartość Cy3(fer)(fer)diG5G to była ona istotnie i dodatnio skorelowana z pojemnością przeciwutleniającą określoną za pomocą trzech metod (PCL ACW; PCL ACL; DPPH) a Cy3diG5G za pomocą dwóch metod (ORAC; PCL ACL). Natomiast, zawartość Cy3(p-cum)diG5G i Cy3(fer)diG5G korelowała istotnie jedynie z pojemnością przeciwutleniającą wyznaczoną testem ORAC. Moje obserwacje znajdują potwierdzenie we wcześniejszych badaniach, które wykazały istotny udział antocyjanów w kształtowaniu pojemności przeciwutleniającej produktów żywnościowych (Sadilova i in. 2007).

W niniejszych badaniach właściwości przeciwutleniające fermentowanej, przechowywanej i duszonej kapusty czerwonej był niższe w porównaniu do świeżej kapusty. Prawdopodobnie, wynikało to z faktu, że antocyjany - silne przeciwutleniacze w warunkach *in vitro* - degradowały w trakcie zastosowanych procesów co powodowało spadek pojemności przeciwutleniającej uzyskanych produktów. Ponadto, biorąc pod uwagę moje wcześniejsze wyniki (*praca W1*) wskazujące, że antocyjany acylowane kwasem synapinowym mają najwyższą aktywność przeciwutleniającą spośród antocyjanów

sprzężonych z różnymi kwasami hydroksycynamonowymi a także obserwację pochodzącą z niniejszych badań dowodzące, że acylowane kwasem synapinowym pochodne 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny wykazują najwyższy wskaźnik degradacji podczas zastosowanych procesów technologicznych, wydaje się być uzasadniony wynik wskazujący obniżoną pojemność przeciwutleniająca produktów z kapusty czerwonej w porównaniu do kapusty świeżej.

Podsumowując, uzyskane wyniki dowodzą, że wszystkie zastosowane procesy zmniejszyły zawartość antocyjanów w otrzymanych produktach z kapusty czerwonej. Przy czym zakres strat zależał od rodzaju przeprowadzonego procesu. Wśród barwników występujących w kapuście czerwonej, formy acylowane kwasem synapinowym charakteryzowały się największymi stratami. Natomiast, najniższe tempo degradacji odnotowano dla nieacylowanych pochodnych cyjanidyny, przy czym wyniki te mogą wynikać z rozkładu części antocyjanów acylowanych do nieacylowanych. W przypadku pojemności przeciwutleniającej, świeża kapusta czerwona charakteryzowała się silniejszymi zdolnościami do zmiatania wolnych rodników niż kapusta fermentowana, przechowywana i duszona, co związane było ze zmniejszeniem zawartości antocyjanów w powstałych produktach.

W trakcie wytwarzania żywności określanej mianem „prozdrowotnej” bardzo ważna jest minimalizacja strat substancji biologicznie aktywnych podczas zastosowanej obróbki, ponieważ korzystne właściwości tej żywności w znacznym stopniu wynikają z obecności tych składników. Wszystkie przedstawione powyżej wyniki wskazują, że produkty z kapusty czerwonej takie jak kapusta świeża, fermentowana i poddana krótkotrwałej obróbce termicznej mogą stanowić cenny składnik codziennej diety ponieważ pozostają bogatym źródłem antocyjanów będących silnymi przeciwutleniaczami. Przy czym należy zauważyć, że fermentowana kapusta czerwona przechowywana do 30 dni jest również zasobnym źródłem antocyjanów. Podsumowując, przeprowadzone badania zawartości i profilu antocyjanów w produktach z kapusty czerwonej mogą być przyczynkiem do optymalizacji procesów przetwórczych oraz sposobu przechowywania surowca i produktów w celu zmniejszenia strat i niekorzystnych zmian profilu antocyjanów, jak również do poprawy prozdrowotnego potencjału produktów wytworzonych z tego warzywa.

Przedstawione powyżej badania zostały zawarte w trzeciej publikacji (praca W3) dokumentującej osiągnięcie naukowe, tj.: **Wiczkowski W., Szawara-Nowak D., Topolska J.** Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing. *Food Chemistry*, **2015**, 167, 115-123.

Ponieważ pozytywny wpływ spożywanych warzyw, w tym kapusty czerwonej, na organizmy ludzi i zwierząt może być związany z fitozwiązkami obecnymi w tych roślinach, dlatego niezbędne jest pełne poznanie ilości spożywanych fitozwiązków (w tym antocyjanów), procesów ich wchłaniania, metabolizmu i akumulacji w organizmach ludzi i zwierząt oraz potencjalnych biologicznych funkcji tych substancji.

Jeżeli chodzi o kwestie ilości spożywanych fitozwiązków to czynnikami decydującymi o zawartości fitozwiązków w spożywanym produkcie, a tym samym determinującymi spożycie fitozwiązków, są zmienność gatunkowa i odmianowa, sezon wegetacyjny, światło, klimat, procesy technologiczne i sposób przygotowania posiłku. W moich, powyższych badaniach zostało wykazane, że kapusta czerwona i produkty z niej uzyskane są bardzo

bogatym źródłem antocyjanów, które wykazują silne właściwości przeciwutleniające (*prace W1-W3*). W przypadku kwestii dotyczących losu fitozwiązków po ich spożyciu, dotychczasowe badania wskazują, że biodostępność fitozwiązków takich jak związki kwercetyny i izoflawony zależy od rozpuszczalności tych substancji w środowisku przewodu pokarmowego, stanu odżywiania organizmu, struktury chemicznej badanej substancji (glikozydy, aglikony) oraz matrycy pokarmowej (Piskula, 2000). Brak jest jednak badań biodostępności fitozwiązków z produktów żywnościowych w których badano aktualną koncentrację fitozwiązków i ich metabolitów z jednoczesnym uwzględnieniem wpływu różnych procesów technologicznych oraz zmienności osobniczej (Cermak i in. 2009). W przypadku antocyjanów wcześniejsze badania dowodzą jedynie, że antocyjany kapusty czerwonej są wchłaniane i część z nich podlega procesom metabolicznym w ramach szlaków detoksyfikacyjnych, co skutkuje obecnością zarówno natywnych jak i koniugowanych form tych związków w płynach fizjologicznych ludzi (Charron i in. 2007).

Ponieważ, jak do tej pory nie było prac dokumentujących jak kształtuje się biodostępność i metabolizm antocyjanów spożywanych w postaci różnych matryc pokarmowych i jaki jest ich wpływ na status przeciwutleniający osocza krwi ludzi, dlatego kolejnym etapem moich badań było porównanie biodostępności antocyjanów z świeżej i fermentowanej kapusty czerwonej z jednoczesnym wyznaczeniem profilu metabolitów antocyjanów kapusty czerwonej w płynach fizjologicznych ochotników oraz określeniem pojemności przeciwutleniającej osocza krwi ochotników.

Badanie biodostępności antocyjanów ze świeżej i fermentowanej kapusty czerwonej przeprowadzono zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 3c (*Metody*) niniejszego opracowania. Profil i zawartość antocyjanów w świeżej i fermentowanej kapuście czerwonej analizowano w oparciu o metodę HPLC-DAD i HPLC-MS/MS. Obydwa produkty zawierały 20 pochodnych cyjanidyny, których podstawową strukturą był 3-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (*załącznik 4, praca W4: Table 1*). Reszty cukrowe tych związków były nieacylowane lub mono- i diacylowane kwasem synapinowym, ferulowym, kawowym i *p*-kumarowym. W obu produktach, 7 głównych antocyjanów (Cy3diG5G, Cy3(*p*-cum)diG5G, Cy3(fer)diG5G, Cy3(sin)diG5G, Cy3(fer)(fer)diG5G, Cy3(fer)(sin)diG5G, Cy3(sin)(sin)diG5G) stanowiło prawie 82% ogólnej zawartości antocyjanów, podczas gdy 13 pozostałych pochodnych cyjanidyny stanowiło zaledwie 18% ogólnej zawartości antocyjanów. Zastosowany proces fermentacji kapusty czerwonej spowodował obniżenie ogólnej zawartości antocyjanów. Zawartość antocyjanów w świeżej kapuście czerwonej wyznaczona w oparciu o metodę HPLC-DAD kształtowała się na poziomie $1,80 \pm 0,02$ mg cyjanidyny/g w.m. Spadek ogólnej zawartości antocyjanów w czasie procesu fermentacji wynosił 15%. W obrębie 7 głównych antocyjanów znalezionych w świeżej i fermentowanej kapuście czerwonej jedynie nieacylowana pochodna cyjanidyny nie wykazywała istotnych zmian zawartości. Tak jak już wcześniej wspomniałem to zjawisko może wynikać z faktu, że antocyjany znalezione w kapuście czerwonej miały identyczną podstawową strukturę chemiczną i podczas procesu fermentacji mogły degradować z form acylowanych do formy nieacylowanej. W przypadku głównych acylowanych antocyjanów najwyższym spadkiem zawartości charakteryzowały się pochodne cyjanidyny acylowane kwasem synapinowym. Niniejsze wyniki znajdują potwierdzenie w innych pracach (McDougall i in. 2007; Sadilova i in. 2007), które donoszą,

że antocyjany acylowane kwasem synapinowym są mniej stabilne niż pochodne antocyjanów acylowane kwasem ferulowy i *p*-kumarowym.

W pierwszym kroku analizy jakościowej próbek osocza krwi i moczu metodą HPLC-MS/MS (jonizacja pozytywna) przeprowadzono badanie w trybie skanowania jonu prekursora 287 m/z dla cyjanidyny oraz 301 m/z dla metylowanej formy cyjanidyny. W kolejnym kroku przeprowadzono skanowanie jonów fragmentacyjnych powstałych z rozpadu jonów pseudomolekularnych wyselekcjonowanych na podstawie pierwszego kroku. Przeprowadzono również skanowanie jonów powstałych w wyniku wyodrębnienia cząstek neutralnych. Ostatecznie metabolity cyjanidyny zostały zidentyfikowane na podstawie uzyskanych widm MS/MS oraz porównania z wcześniej publikowanymi danymi (Wu i Prior, 2005). W osoczu krwi i moczu ochotników zebranych po spożyciu świeżej i fermentowanej kapusty czerwonej zidentyfikowano 30 pochodnych cyjanidyny (*załącznik 4, praca W4: Table 1*). Oprócz 18 natywnych antocyjanów znaleziono 12 metabolitów cyjanidyny, w tym formy metylowane, glukuronowane i sulfonowane, tj.: 3-glukozyd cyjanidyny (Cy3G), monoglukuronid cyjanidyny (CyGlc), peonidyna (Po), 3-glukozyd peonidyny (Po3G), diglukozyd metylowanej cyjanidyny (mCydiG), triglukozyd metylowanej cyjanidyny (mCytriG), monoglukuronid metylowanej cyjanidyny (mCyGlc), siarczano-glukuronido-glukozyd metylowanej cyjanidyny (mCyGGlcSulf), (*p*-kumaroilo)triglukozyd metylowanej cyjanidyny (mCy(*p*-cum)triG), (kawoilo)triglukozyd metylowanej cyjanidyny (mCy(*caf*)triG), (feruloilo)triglukozyd metylowanej cyjanidyny (mCy(*fer*)triG) i (synapoilo)triglukozyd metylowanej cyjanidyny (mCy(*sin*)triG). Spośród 12 zidentyfikowanych metabolitów cyjanidyny aż 10 (Cy3G, CyGlc, Po, Po3G, mCydiG, mCyGGlcSulf, mCy(*p*-cum)triG, mCy(*caf*)triG, mCy(*fer*)triG, mCy(*sin*)triG) zostało znalezionych w osoczu krwi i moczu ludzi po raz pierwszy po spożyciu kapusty czerwonej. Wcześniejsze badania wskazują, że po spożyciu żywności bogatej w antocyjany w płynach fizjologicznych występują różne metylowane, glukuronowane, sulfonowane i kombinowane pochodne antocyjanów (Fernandes i in. 2014). W jedynym wcześniejszym badaniu dotyczącym biodostępności antocyjanów z kapusty czerwonej, w którym badano wpływ wielkości dawki antocyjanów na biodostępność tych związków, w moczu ochotników znaleziono jedynie 14 antocyjanów z których tylko 4 zostały zidentyfikowane jako pochodne metylowane i glukuronowane (Charron i in. 2007). W innym badaniu, w którym określano biodostępność acylowanych i nieacylowanych antocyjanów z marchwi znaleziono zaledwie 5 natywnych związków (Kurilich i in. 2005). Również w pracach dotyczących wchłaniania acylowanych antocyjanów z bakłazana i słodkiego ziemniaka w materiale biologicznym znaleziono jedynie natywne formy antocyjanów (Ichiyanagi i in. 2006; Oki i in. 2006).

Pochodne cyjanidyny obecne w osoczu krwi i moczu ochotników po spożyciu produktów z kapusty czerwonej należały głównie do związków natywnych (*załącznik 4, praca W4: Table 2 i 3*). Średnia procentowa zawartość natywnych antocyjanów w osoczu krwi wynosiła 75,2%, podczas gdy w moczu stanowiła 76,0%. W przypadku osocza krwi, głównym związkiem był 3-(synapoilo)diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny, który stanowił więcej niż 20% ogólnej zawartości antocyjanów znalezionych w osoczu ochotników. W przypadku moczu, podstawowym związkiem z grupy antocyjanów, który pokrywał więcej niż 25% ogólnej zawartości antocyjanów wydalonych z moczem w ciągu 24 godzin po spożyciu kapusty czerwonej był 3-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny. W tym samym

czasie, suma metabolitów cyjanidyny zidentyfikowanych w osoczu krwi i moczu ochotników po spożyciu obu produktów wynosiła odpowiednio 24,8% i 24,0% ogólnej zawartości antocyjanów. W badaniach przedstawionych przez Charrona i in. (2007) udokumentowano niższy udział metabolitów antocyjanów (średnio 14,3%) w ogólnej zawartości tych związków znalezionych w moczu ludzi po spożyciu kapusty czerwonej. W innych badaniach określających los acylowanych antocyjanów po spożyciu żywności bogatej w te barwniki nie zidentyfikowano metabolitów antocyjanów (Kurilich i in. 2005; Ichianagi i in. 2006; Oki i in. 2006; Charron i in. 2009; Novotny i in. 2012). W moich badaniach, spośród zidentyfikowanych 12 metabolitów cyjanidyny, (synapoilo)triglukozyd metylowanej cyjanidyny (7,8% ogólnej zawartości antocyjanów) był głównym związkiem znalezionym w osoczu krwi, natomiast monoglukuronid cyjanidyny (9,8% ogólnej zawartości antocyjanów) był głównym metabolitem w moczu. Podsumowując, po wchłonięciu, w płynach fizjologicznych większość antocyjanów występowała w niezmetabolizowanej formie. Natomiast, w obrębie szlaków metabolicznych, głównym szlakiem była metylacja (13,6%) a glukuronowanie i sulfonowanie odgrywały mniejszą rolę w metabolizmie antocyjanów kapusty czerwonej u ludzi.

Analiza osocza krwi ochotników, które zostało zebrane przed spożyciem obu produktów uzyskanych z kapusty czerwonej, nie wykazała obecności związków z grupy antocyjanów co dowodzi, że zastosowanie 72-godzinnej diety wolnej od antocyjanów przed rozpoczęciem doświadczenia było wystarczające na wymycie tych substancji z organizmów ochotników (*załącznik 4, praca W4: Table 2*). Natomiast analiza osocza krwi po spożyciu kapusty czerwonej wykazała, że antocyjany były wchłaniane w postaci natywnej ale podlegały również metabolizmowi (metylacji, glukuronowaniu, sulfonowaniu). Generalnie, profil wchłaniania poszczególnych antocyjanów z obu produktów był podobny. Antocyjany występowały w osoczu krwi już po 30 min od spożycia świeżej ($50,98 \pm 4,12$ nmol/L) i fermentowanej ($63,66 \pm 3,31$ nmol/L) kapusty czerwonej co wskazuje, że związki te, nie zależnie od ich źródła, są wchłaniane w górnych odcinkach przewodu pokarmowego. Wcześniejsze badania również dowodzą, że antocyjany są wchłaniane zarówno w żołądku jak i jelicie cienkim (Passamonti i in. 2003; Talavera i in. 2004). Ponadto, uważa się, że we wchłanianiu antocyjanów uczestniczy transporter jonów organicznych, bilitranslokaza (TC 2.A.65.1.1) (Passamonti i in. 2002). Natomiast inne badania wskazują, że w przekraczaniu antocyjanów przez błony jelitowe może uczestniczyć transporter cukrów (Mulleder i in. 2002).

Wzrost stężenia antocyjanów w osoczu krwi ochotników w ciągu pierwszych 30 min był istotnie szybszy po spożyciu fermentowanej kapusty czerwonej niż po spożyciu kapusty świeżej (*załącznik 4, praca W4: Fig. 1A*). Przynajmniej po części, zjawisko to może wynikać z lepszego wchłaniania antocyjanów z „rozluźnionej” matrycy fermentowanej kapusty czerwonej w porównaniu do „nienaruszonej” matrycy świeżej kapusty czerwonej. W tym czasie, po spożyciu świeżej kapusty czerwonej prawie 14% ogólnej ilości antocyjanów znalezionych w osoczu krwi występowało w postaci natywnych antocyjanów, podczas gdy po spożyciu kapusty fermentowanej ponad 20% ogólnej zawartości antocyjanów występowało w postaci natywnej. Wyższy udział procentowy natywnych antocyjanów w osoczu krwi ochotników w 30 min po spożyciu fermentowanej kapusty niż po spożyciu kapusty świeżej również wskazuje na łatwiejsze wchłanianie pochodnych cyjanidyny z „rozmiękczonej” matrycy kapusty fermentowanej. W pozostałych punktach

pomiarowych stężenie antocyjanów w osoczu krwi po spożyciu kapusty świeżej było wyższe niż po spożyciu kapusty fermentowanej. Ponadto, po jednej godzinie od spożycia kapusty fermentowanej stężenie antocyjanów w osoczu ($34,48 \pm 5,32$ nmol/L) spadło poniżej poziomu znalezionej w 30 min by następnie wzrosnąć do maksymalnej wartości ($64,02 \pm 4,87$ nmol/L) w drugiej godzinie od spożycia tej kapusty. Zjawisko to mogło powstać ponieważ w pierwszej fazie po spożyciu fermentowanej kapusty czerwonej nastąpiło szybkie wchłonięcie puli antocyjanów luźno związanych z „rozmiękczoną” matrycą kapusty fermentowanej co skutkowało wyższym stężeniem antocyjanów w osoczu krwi ochotników zebranych w 30 min po spożyciu kapusty fermentowanej w porównaniu do kapusty świeżej. Natomiast, gdy w górnym odcinku przewodu pokarmowego wyczerpała się pula łatwo dostępnych antocyjanów nastąpił znaczący spadek stężenia antocyjanów w pierwszej godzinie od spożycia kapusty fermentowanej. W przypadku obu produktów maksymalne stężenie antocyjanów zostało znalezione po 2 godzinach od ich spożycia. Podobny czas maksymalnego stężenia antocyjanów w osoczu ochotników stwierdzono również po spożyciu fioletowej marchwi zawierającej antocyjany acylowane (Kurilich i in. 2005; Novotny i in. 2012). W moich badaniach maksymalne stężenie antocyjanów w osoczu krwi po spożyciu świeżej kapusty czerwonej było prawie o 26% wyższe niż po spożyciu kapusty fermentowanej. Od drugiej godziny po spożyciu obu produktów z kapusty czerwonej stężenie antocyjanów w osoczu krwi zmniejszało się stopniowo wyniku intensywnego metabolizmu. Ostatecznie w 24 godzinie po spożyciu świeżej i fermentowanej kapusty czerwonej stężenie antocyjanów w osoczu wynosiło odpowiednio $3,55 \pm 1,38$ nmol/L i $1,99 \pm 0,53$ nmol/L.

Pole powierzchni pod krzywą, przedstawiającą zależność stężenia antocyjanów w osoczu ochotników od czasu (AUC), będące markerem biodostępności, po spożyciu świeżej kapusty czerwonej było ponad 25,5% większe niż po spożyciu kapusty fermentowanej. Ponieważ dawka antocyjanów spożyta przez ochotników wraz z kapustą świeżą była o 15% wyższa w porównaniu do ilości antocyjanów przyjętych po spożyciu kapusty fermentowanej, dlatego ostatecznie biodostępność antocyjanów po spożyciu świeżej kapusty została wyliczona na wyższą o 10,5% w porównaniu do kapusty fermentowanej.

Ponieważ antocyjany mają tendencję do gromadzenia się w wakuolach roślin, dlatego mogą być łatwo uwalniane z tkanek w wyniku różnych procesów powodujących uszkodzenie tkanek, między innymi podczas procesu fermentacji. Zatem podczas procesu fermentacji mogła zostać utworzona ogromna pula antocyjanów niezwiązanych trwale z matrycą fermentowanej kapusty czerwonej i ostatecznie mogła zostać łatwo zaabsorbowana. Niestety, w organizmach ludzi może dochodzić do zjawiska wysycenia mechanizmu absorpcji antocyjanów co istotnie wpływa na stężenie tych związków w osoczu (Kurilich i in. 2005). W moim doświadczeniu wysycenie procesu absorpcji antocyjanów mogło mieć miejsce na początku procesu wchłaniania antocyjanów z fermentowanej kapusty czerwonej (w ciągu pierwszych 30 minut po spożyciu kapust), gdy duża ilość antocyjanów niezwiązanych trwale z matrycą znalazła się w środowisku górnego odcinka przewodu pokarmowego. Konsekwencją tego zjawiska było wyższe stężenie antocyjanów w osoczu krwi ochotników w ciągu 24 godzin po spożyciu świeżej kapusty czerwonej niż po spożyciu kapusty fermentowanej. Jednak, z drugiej strony, gdy badano wpływ różnej dawki antocyjanów podawanej w postaci kapusty czerwonej na biodostępność tych związków nie zaobserwowano wystąpienia mechanizmu wysycenia procesu wchłaniania (Charron i in.

2007). Jednak w cytowanej pracy dla wszystkich zastosowanych dawek antocyjanów zastosowano tą samą matrycę żywieniową (świeżą kapustę czerwoną). Natomiast, w moim eksperymencie i doświadczeniach Kurilicha i in. (2005) wykorzystano dwie różne matryce, poddaną obróbce (odpowiednio, fermentowaną kapustę czerwoną i gotowaną marchew fioletową) i bez obróbki (odpowiednio, świeżą kapustę czerwoną i surową marchew fioletową). Dlatego wydaje się, że gdy podobna doustna dawka antocyjanów jest stosowana, główny wpływ na procesy absorpcji, a zatem na poziom biodostępności barwników, ma matryca żywności i wysycenie mechanizmu absorpcji antocyjanów.

Podobnie jak w przypadku analizy osocza, w moczu ochotników zebranych przed spożyciem produktów z kapusty czerwonej nie stwierdzono obecności pochodnych cyjanidyny. Profil wydalania poszczególnych antocyjanów z moczem po spożyciu obu produktów był podobny (*załącznik 4, praca W4: Fig. 1B, Table 3*). Zarówno po spożyciu kapusty fermentowanej jak i świeżej najwyższe tempo wydalania antocyjanów z moczem stwierdzono w przedziale czasowym pomiędzy 1 a 2 godziną. Jednak po spożyciu świeżej kapusty czerwonej ($289,35 \pm 23,23$ nmol/h) tempo wydalania tych związków z moczem było o ponad 30% wyższe niż po spożyciu kapusty fermentowanej ($193,18 \pm 33,11$ nmol/h). Następnie, tempo wydalania antocyjanów z moczem stopniowo spadało by w okresie 12-24 godzina od spożycia uzyskało poziom $2,36 \pm 1,91$ nmol/h w przypadku świeżej kapusty czerwonej i poziom $2,46 \pm 1,54$ nmol/h w przypadku kapusty fermentowanej. Sumarycznie, po spożyciu świeżej kapusty czerwonej w ciągu 24 godzin z moczem zostało wydanych $0,09 \pm 0,004\%$ ($A_e = 1283,31 \pm 36,90$ nmol) spożytych antocyjanów, podczas gdy po spożyciu kapusty fermentowanej $0,07 \pm 0,002\%$ ($A_e = 928,68 \pm 28,13$ nmol). Odzysk antocyjanów w moczu po spożyciu kapusty świeżej był ponad 22% wyższy niż po spożyciu kapusty fermentowanej. Pole powierzchni pod krzywą, przedstawiającą zależność tempa wydalania antocyjanów z moczem od czasu (AURC) będące kolejnym markerem biodostępności, po spożyciu kapusty świeżej było o 29% wyższe niż po spożyciu kapusty fermentowanej. Jak widać wyniki dotyczące wydalania antocyjanów z moczem również wskazują na wyższą biodostępność antocyjanów po spożyciu kapusty świeżej niż po spożyciu kapusty fermentowanej. Przy czym, profil gromadzenia się antocyjanów w moczu po spożyciu obu produktów był podobny. Najwyższe tempo gromadzenia antocyjanów w oczu wystąpiło w przedziale czasowym 0-6 h. W tym czasie, w moczu znaleziono aż 83% zidentyfikowanych w ciągu 24 h antocyjanów.

W niniejszych badaniach zaobserwowano różnicę w odzysku z moczem antocyjanów nieacylowanych i acylowanych. Odzysk antocyjanów nieacylowanych, monoacylowanych i diacylowanych po spożyciu świeżej kapusty czerwonej wynosił odpowiednio 0,28%, 0,07% i 0,03% podczas gdy po spożyciu fermentowanej kapusty czerwonej kształtował się odpowiednio na poziomie 0,20%, 0,05% i 0,03%. Odzysk antocyjanów monoacylowanych był 4 razy mniejszy niż odzysk antocyjanów nieacylowanych. Natomiast odzysk antocyjanów diacylowanych w stosunku do antocyjanów monoacylowanych oraz diacylowanych w stosunku do nieacylowanych był odpowiednio mniejszy o 2 i 8 razy. Również inni badacze (Kurilich i in. 2005; Charron i in. 2007) zaobserwowali różnice w odzysku antocyjanów nieacylowanych i acylowanych po spożyciu produktów bogatych w antocyjany. Obserwacje te wskazują, że wielkość cząsteczki (antocyjany nieacylowane mają mniejszą cząsteczkę niż antocyjany acylowane) i powinowactwo do wody (antocyjany nieacylowane są mniej hydrofobowe niż antocyjany acylowane) (Charron i in. 2007) mogą

wpływać na biodostępność nieacylowanych i acylowanych antocyjanów. Przy czym, nie można wykluczyć wpływu odłączenia reszty acylowej z cząsteczki antocyjanów acylowanych jako czynnika ograniczającego odzysk antocyjanów acylowanych (Kurilich i in. 2005).

Przed analizą pojemności przeciwutleniającej osocza krwi ochotników, w celu wyeliminowania zmienności międzyosobniczej, próbki osocza zostały połączone zgodnie z czasem pobrania krwi i rodzajem spożytego produktu. Tak jak zostało przedstawione powyżej, antocyjany pojawiły się w osoczu krwi ochotników w 30 min po spożyciu świeżej i fermentowanej kapusty czerwonej. Następnie stężenie tych związków wzrosło do poziomu 86,39 i 64,02 nmol/L w 2 godzinie od spożycia. W kolejnych godzinach stężenie antocyjanów sukcesywnie spadało do poziomu 2,55 i 1,99 nmol/L w 24 godzinie. Takim zmianom stężenia antocyjanów w osoczu towarzyszył podobny schemat zmian pojemności przeciwutleniającej osocza mierzonej w stosunku do substancji wykazujących powinowactwo do wody (metoda PCL ACW) (*załącznik 4, praca W4: Fig. 2*). Maksymalną wartość pojemności przeciwutleniającej osocza ochotników określoną metodą PCL ACW znaleziono w 2 godzinie po spożyciu obu produktów uzyskanych z kapusty czerwonej, przy czym po spożyciu kapusty świeżej była ona wyższa o 27% niż po spożyciu kapusty fermentowanej. Również, pole powierzchni pod krzywą przedstawiającą zależność zmian pojemności przeciwutleniającej osocza od czasu, po spożyciu kapusty świeżej było prawie o 30% wyższe niż po spożyciu kapusty fermentowanej. Podobnie jak w przypadku stężenia antocyjanów w osoczu, tak pojemność przeciwutleniająca osocza ochotników tylko w 30 min po spożyciu kapusty fermentowanej była wyższa w porównaniu do kapusty świeżej. W moich badaniach po raz pierwszy wykazano, że proces fermentacji kapusty czerwonej poprzez obniżenie biodostępności antocyjanów z tego produktu wpływa istotnie na pojemność przeciwutleniającą osocza osób spożywających fermentowaną kapustę czerwoną. Wyjaśnienia tego zjawiska można doszukiwać się w następujących aspektach. Po pierwsze, stężenie pochodnych cyjanidyny, silnych hydrofilowych przeciwutleniaczy *in vitro* (Kahkonen i Heinonen, 2003; Galvano i in. 2004) po spożyciu świeżej kapusty czerwonej było wyższe niż po spożyciu kapusty fermentowanej. Wyjątek od tej reguły występował w 30 minut, gdy stężenie antocyjanów było wyższe po spożyciu kapusty fermentowanej. Przy czym to tylko potwierdza powyższe założenia, ponieważ w tym czasie pojemność przeciwutleniająca osocza ochotników była również wyższa w porównaniu do tej uzyskanej po spożyciu kapusty świeżej. Po drugie, metoda PCL ACW jest kierowana do pomiaru pojemności przeciwutleniającej substancji wykazującej powinowactwo do wody a antocyjany stanowią właśnie taką grupę związków biologicznie aktywnych.

W innych badaniach wykazano zarówno pozytywny wpływ (Mertens-Talcott i in. 2008; Avila-Nava i in. 2014;) jak i brak wpływu (Da Silva i in. 2014; McAnulty i in. 2014) spożycia owoców i warzyw na pojemność przeciwutleniającą osocza krwi ludzi. Ta rozbieżność może w pewnym stopniu wynikać z różnych: fenotypów ochotników/zwierząt uczestniczących w eksperymentach, rodzajów używanych testów do pomiaru właściwości przeciwutleniających, grup analizowanych fitozwiązków oraz rodzajów matrycy spożywanych produktów.

Podsumowując, niniejsze badania są pierwszymi demonstrującymi wpływ procesu fermentacji kapusty czerwonej na biodostępność antocyjanów oraz opisującymi jak spożywanie świeżej i fermentowanej kapusty czerwonej zmienia pojemność

przeciwutleniającą osocza krwi ochotników. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że biodostępność antocyjanów z świeżej kapusty czerwonej jest wyższa niż z fermentowanej kapusty czerwonej, a głównymi czynnikami decydującymi o tym stanie są matryca żywnościowa i wysycenie mechanizmu wchłaniania tych barwników. Ponadto, przeprowadzone badania dowodzą, że po spożyciu produktów z kapusty czerwonej antocyjany występują w płynach fizjologicznych ochotników w postaci 18 natywnych glukozydów cyjanidyny oraz 12 metabolitów (metylowanych, glukuronowanych, sulfonowanych i kombinowanych pochodnych cyjanidyny), przy czym 10 związków w ramach metabolitów została zidentyfikowana po raz pierwszy po spożyciu kapusty czerwonej.

Kolejnym osiągnięciem tych badań jest wykazanie, że pojemność przeciwutleniająca osocza krwi ochotników po spożyciu świeżej kapusty czerwonej jest wyższa niż po spożyciu fermentowanej kapusty czerwonej, co jest prawdopodobnie związane z wyższym stężeniem pochodnych cyjanidyny - silnych hydrofilowych przeciwutleniaczy *in vitro* - w osoczu krwi ochotników. Wskazuje to, że metabolity cyjanidyny obecne w krążeniu ogólnym po spożyciu produktów z czerwonej kapusty mogą działać jako antyoksydanty. Zatem, produkty z kapusty czerwonej są bogatym źródłem biodostępnych pochodnych cyjanidyny i mogą być stosowane jako naturalne składniki produktów spożywczych i/lub dietetyczne przeciwutleniacze, w szczególności gdy brana jest pod uwagę profilaktyka chorób związanych z uszkodzeniem oksydacyjnym.

Przedstawione powyżej badania zostały zawarte w czwartej publikacji (*praca W4*) dokumentującej osiągnięcie naukowe, tj.: **Wiczowski W., Szawara-Nowak D., Romaszko J.** The impact of red cabbage fermentation on bioavailability of anthocyanins and antioxidant capacity of human plasma. *Food Chemistry*, 2016, 190, 730-740.

e) Literatura

1. Aaby, K., Wrolstad, R.E., Ekeberg, D., Kkrede, G. (2007). Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry puree; impact of achene level and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5156-5166.
2. Arapitsas, P., Sjoberg, P.J.R., Turner, Ch. (2008). Characterization of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 109, 219-226.
3. Avila-Nava, A., Calderon-Oliver, M., Medina-Campos, O.N., Zou, T., Gu, L., Torres, N., Tovar, A.R., Pedraza-Chaverri, J. (2014). Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes scavenges reactive oxygen species in vitro and enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Functional Foods*, 10, 13-24.
4. Azeredo, H.M.C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2365-2376.
5. Azuma, K., Ohyama, A., Ippoushi, K., Ichiyanagi, T., Takeuchi, A., Saito, T., Fukuoka, H. (2008). Structures and antioxidant activity of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10154-10159.
6. Bąkowska-Barczak, A. (2005). Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 14/55, 107-116.

7. Bisakowski, B., Atwal, A.S., Gardner, N., Champagne, C.P. (2007). Effect of lactic acid fermentation of onions (*Allium cepa*) on the composition of flavonol glucosides. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 783–789.
8. Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, Ma. L., Paez-Hernandez, Ma. Rodriguez, J. A., Galan-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.
9. Cermak, R., Durazzo, A., Maiani, G., Böhm, V., Kammerer, D. R., Carle, R., Wiczowski, W., Piskula, M. K., Galensa, R. (2009). The influence of postharvest processing and storage of foodstuffs on the bioavailability of flavonoids and phenolic acids. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, S184-S193.
10. Charron, C.S., Clevidence, B.A., Britz, S.J., Novotny, J.A. (2007). Effects of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5354-5362.
11. Charron, C.S., Kurilich, A.C., Clevidence, B.A., Simon, P.W., Harrison, D.J., Britz, S.J., Baer, D.J., Novotny, J.A. (2009). Bioavailability of anthocyanins from purple carrot juice: effects of acylation and plant matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1226-1230.
12. Clifford, M.N. (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1063-1072.
13. Da Silva, J.K., Cazarin, C.B.B., Batista, A.G., Marostica, M.Jr. (2014). Effects of passion fruit (*Passiflora edulis*) byproduct intake in antioxidant status of Wistar rats tissues. *LWT – Food Science and Technology*, 59, 1213-1219.
14. Davey, M.W., Van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Iris, J., Benzie, I. J.J., Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 80, 825-860.
15. Del Castillo M.D., Gordon, M.H., Ames, J.M. (2005). Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, 221, 471-477.
16. De Pascual-Teresa, S., Sanchez-Ballesta, M.T. (2008). Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*, 7, 281-299.
17. Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7, 54-66.
18. Galvano, F., La Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Cappellano, S., Battistini, N.C., Gavazzi, B., Galvano, G. (2004). Cyanidins: metabolism and biological properties. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 2-11.
19. Ghosh D.K. (2005). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts in biology and medicine: biochemical, cellular and medicinal properties. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 3, 113-124.
20. Giusti, M.M, Wrolstad, R.E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217-225.
21. Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2005). Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935.

22. Hartmann, A., Patz, C-D., Andlauer, W., Dietrich, H., Ludwig, M. (2008). Influence of processing on quality parameters of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9484-9489.
23. Ichiyanagi, T., Terahara, N., Rahman, M., Konishi, T. (2006). Gastrointestinal uptake of nasunin, acylated anthocyanin in eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5306-5312.
24. Juśkiewicz, J., Zduńczyk, Z., Jurgoński, A., Brzuzan, Ł., Godycka-Kłos, I., Żary-Sikorska, E. (2008). Extract of green tea leaves partially attenuates streptozotocin-induced changes in antioxidant status and gastrointestinal functioning in rats. *Nutrition Research*, 28, 343-349.
25. Kahkonen, M.P., Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 628-633.
26. Kanner, J., Harel, S., Granit, R. (2001). Betalains – a new class of dietary cationized antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5178-5185.
27. Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N. K., Chia, T.F., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.
28. Kurilich, A.C., Clevidence, B.A., Britz, S.J., Simon, P.W., Novotny, J.A. (2005). Plasma and urine responses are lower for acylated anthocyanins vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6537-6542.
29. Lila M.A. (2004). Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306-313.
30. Markakis, P. (1982). Stability of anthocyanins in foods. In P. Markakis, Anthocyanins as food colors (pp. 163-180). New York: Academic Press.
31. Matsufuji, H., Kido, H., Misawa, H., Yaguchi, J., Otsuki, T., Chino, M., Takeda, M., Yamagata, K. (2007). Stability to light, and hydrogen peroxide at different pH values and DPPH radical scavenging activity of acylated anthocyanins from red radish extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3692-3701.
32. McAnulty, L.S., Collier, S.R., Landram, M.J., Whittaker, D.S., Isaacs, S.E., Klemka, J.M., Cheek, S.L., Arms, J.C., McAnulty, S.R. (2014). Six weeks daily ingestion of whole blueberry powder increases natural killer cell counts and reduces arterial stiffness in sedentary males and females. *Nutrition Research*, 34, 577-584.
33. McDougall, G.J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage – stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68, 1285-1294.
34. McGhie, T.K., Walton, M.C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 702-713.
35. Mertens-Talcott, S.U., Rios, J., Jilma-Stohlawetz, P., Pacheco-Palencia, L.A., Meibohm, B., Talcott, S.T., Derendorf, H. (2008). Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7796-7802.
36. Morand, Ch., Manach, C., Crespy, V., Remesy, Ch. (2000). Quercetin 3-O-β-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radical Research*, 33, 667-676.

37. Moreno, D. A., Garcia-Viguera, C., Gil, J. I., Gil-Izquierdo, A. (2008). Betalains in the era of global agric-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Reviews*, 7, 261-280.
38. Murase H., Moon J-H., Yamauchi R., Kato K., Kunieda T., Yoshikawa T., Terao J. (1998). Antioxidant activity of a novel vitamin E derivative, 2-(α -D-glucopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-ol. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 217-225.
39. Mulleder, U., Murkovic, M., Pfannhauser, W. (2002). Urinary excretion of cyanidin glycosides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53, 61-66.
40. Novotny, J.A., Clevidence, B.A., Kurilich, A.C. (2012). Anthocyanin kinetics are dependent on anthocyanin structure. *British Journal of Nutrition*, 107, 504-509.
41. Oki, T., Suda, I., Terahara, N., Sato, M., Hatakeyama, M. (2006). Determination of acylated anthocyanin in human urine after ingesting a purple-fleshed sweet potato beverage with various contents of anthocyanin by LC-ESI-MS/MS. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 2540-2543.
42. Passamonti, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F. (2002). The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296, 631-636.
43. Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, 544, 210-213.
44. Piccaglia, R., Marotti, M., Baldoni, G. (2002). Factors influencing anthocyanin content in red cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata* L f *rubra* (L) Thell). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1504-1509.
45. Piskula, M. (2000). Factors affecting flavonoids absorption. *BioFactors*, 12, 175–177.
46. Piskula M.K., Terao J. (1998). Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4313-4317.
47. Pliszka, B., Huszcza-Ciolkowska, G., Mielezsko, E., Czaplicki, S. (2009). Stability and antioxidative properties of acylated anthocyanins in three cultivars of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *rubra*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1154-1158.
48. Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 1-11.
49. Pourcel, L., Routaboul, J-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12, 29-36.
50. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
51. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
52. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.

53. Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F.C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 1461-1471.
54. Scalzo, R.L., Genna, A., Branca, F., Chedin, M., Chassaing, H. (2008). Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) and cabbage (*B. oleracea* L. var. *capitata*) and its stability in relation to thermal treatments. *Food Chemistry*, 107, 136-144.
55. Shimoi, K., Saka, N., Kaji, K., Nozawa, R., Kinae, N. (2000). Metabolic fate of luteolin and its functional activity at focal site. *BioFactors*, 12, 181-186.
56. Shimoi, K., Saka, N., Nozawa, R., Sato, M., Amano, I., Nakayama, T., Kinae, N. (2001). Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 1512-1524.
57. Strack, D., Vogt, T., Schliemann, W. (2003). Recent advance in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247-269.
58. Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J.L., Remesy, C. (2004). Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *Journal of Nutrition*, 134, 2275-2279.
59. Truong, V-D., Deighton, N., Thompson, R.T., McFeeters, R.F., Dean, L.O.D., Pecota, K.V., Yencho, G.C. (2010). Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweetpotatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 404-410.
60. Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., Fogiliano, V. (2007). Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyaniding-glucosides. *Journal of Nutrition*, 137, 2043-2048.
61. Volden, J., Borge, G.I.A., Bengtsson, G.B., Hansen, M., Thygesen, I.E., Wicklund, T. (2008). Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* f. *rubra*). *Food Chemistry*, 109, 595-605.
62. Wiczowski, W., Nemeth, K., Buciński, A., Piskula, M.K. (2003). Bioavailability quercetin from fresh scales and dry skin of onion in rats. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 12/53, 95-99.
63. Wiczowski, W., Piskula, M.K. (2004). Food flavonoids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 13/54, 101-114.
64. Wiczowski, W., Romaszko, J., Buciński, A., Szawara-Nowak, D., Honke, J., Zieliński, H., Piskula, M.K. (2008). Quercetin from shallot (*Allium cepa* var. *Aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *Journal of Nutrition*, 138, 885-889.
65. Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., Topolska, J., Olejarz, K., Zieliński, H., Piskula, M. K. (2014). Metabolites of dietary quercetin: profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 11, 121-129.
66. Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.
67. Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.F., Prior, R.L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4069-4075.

68. Wu, X., Prior, R.L. (2005). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3101-3113.
69. Young J.F., Nielsen S.E., Haraldsdottir J., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Knuthsen P., Crozier A., Sandstrom B., Dragsted L.O. (1999). Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 87-94.
70. Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A., Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 675-683.
71. Zhu, F., Cai, Y-Z., Yang, X., Ke, J., Corke, H. (2010). Anthocyanins, hydroxycinnamic acid derivatives, and antioxidant activity in roots of different Chinese purple-fleshed sweetpotato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7588-7596.
72. Zielińska, D., Wiczowski, W., Piskula, M.K. (2008). Determination of the relative contribution of quercetin and its glucosides to the antioxidant capacity of onion by cyclic voltammetry and spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3524-3531.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych, dydaktycznych i organizacyjnych.

- a) Aktywność naukowo-badawcza, dydaktyczna i organizacyjna przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

W roku 2000 (11.05.2000) ukończyłem studia z wyróżnieniem obroną pracy magisterskiej pt. „Produktywność rzepaku jarego, wartość technologiczna nasion i ich produktów w aspekcie stosowanych środków ochrony roślin”, którą zrealizowałem w Katedrze Ochrony Roślin Wydziału Rolnictwa i Kształtowania Środowiska Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (UWM Olsztyn) pod kierunkiem Prof. dr hab. Danuty Murawy.

Badania realizowane w ramach pracy magisterskiej dotyczyły reakcji dwóch odmian rzepaku jarego na zastosowanie kombinacji czterech wybranych chemicznych środków ochrony roślin. W trakcie przeprowadzonych eksperymentów polowych i badań laboratoryjnych analizowałem wpływ zastosowanych preparatów chemicznych na plonowanie i skład chemiczny nasion rzepaku jarego. Uzyskane wyniki badań wykazały, że rzepak jary dodatnio reagował na stosowane zabiegi ochronne poprzez zwiększenie plonu, przy czym najwyższe plony uzyskano w obiektach z pełną ochroną. Jednocześnie zastosowane preparaty nie wpłynęły istotnie na poziom tłuszczu i profil analizowanych kwasów tłuszczowych oraz zawartość białka w nasionach rzepaku jarego.

W tym samym roku (04.12.2000) rozpocząłem studia doktoranckie w Zakładzie Podstaw Technologii Żywności Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie (IRZiBŻ PAN). W styczniu 2005 roku (14.01.2005) rozpocząłem pracę na etacie technologa w w/w Zakładzie IRZiBŻ PAN. Tytuł doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, chemii żywności i żywienia człowieka nadany uchwałą Rady Wydział Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w

Olsztynie uzyskałem w roku 2005 (11.05.2005) po obronie pracy doktorskiej pt. „Porównanie biodostępności kwercetyny i jej glukozydów z cebuli oraz określenie wpływu ich spożycia na stabilność oksydacyjną estrów cholesterolu osocza krwi konsumenta”, którą wykonałem pod kierunkiem Prof. dr hab. Mariusza Piskuley. Rozprawa doktorska została wyróżniona decyzją Rady Wydziału Nauki o Żywności UWM Olsztyn.

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej dotyczyły analizy profilu i zawartości związków kwercetyny w cebulach uprawianych w Polsce, biodostępności tych związków oraz ich wpływu na procesy utleniania estrów cholesterolu osocza krwi ludzi. W badaniach profilu i zawartości związków kwercetyny w materiale roślinnym oraz w osoczu krwi zwierząt i ludzi wykorzystałem opracowaną przeze mnie metodę wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) sprzężonej z detektorem diodowym (DAD) i spektrometrem masowym wyposażonym w pojedynczy kwadrupol (MS) oraz metodę HPLC sprzężoną z detektorem elektrochemicznym (ECD) opracowaną przez Piskulę i Terao (1998). Badania biodostępności związków kwercetyny przeprowadzono w ramach opracowanej przeze mnie procedury nieklinicznych badań medycznych biodostępności fitozwiązków żywności z udziałem ochotników oraz z udziałem szczurów. Analizę procesu utleniania estrów cholesterolu osocza krwi ludzi przeprowadzono w warunkach *ex vivo* wg zmodyfikowanej metody Murase i in. (1998).

Przebadane w pracy cebule charakteryzowały się bardzo dużą zawartością związków kwercetyny, przy czym badane rody hodowlane szalotki posiadały wyższą jej zawartość niż odmian cebuli zwyczajnej. Najwyższą zawartość kwercetyny znaleziono w suchych łuskach okrywowych, a wśród mięsistych łusek spichrzowych w pierwszej łusce zewnętrznej. W mięsistych łuskach spichrzowych kwercetyna występowała niemal wyłącznie w formie glukozydowej (średnio ponad 99% ogólnej zawartości kwercetyny), a w suchych łuskach okrywowych dominującą formą tego związku był jej aglikon (średnio ponad 62% ogólnej zawartości kwercetyny). W przeprowadzonych badaniach biodostępności z udziałem szczurów a następnie ochotników, w których porównywano wchłanianie kwercetyny i jej glukozydów, a jako źródło tych substancji wykorzystano suche łuski okrywające i mięsiste łuski spichrzowe cebuli wykazano, że biodostępność aglikonu kwercetyny była lepsza od biodostępności jej glukozydów. W trzecim etapie badań wykazano, że spożycie pojedynczej dawki suchych łusek cebuli powodowało wzrost stężenia kwercetyny - silnego przeciwutleniacza *in vitro* - w osoczu krwi konsumenta do poziomu $\mu\text{molowego}$, ale nie wpłynęło istotnie na stabilność oksydacyjną estrów cholesterolu osocza krwi w przeprowadzonych testach *ex vivo*.

W trakcie studiów doktoranckich, oprócz badań związanych z pracą dokorską uczestniczyłem w realizacji badań związanych z analizą izoflawonów i katechin w materiale roślinnym oraz występowaniem tych substancji oraz ich metabolitów w płynach fizjologicznych zwierząt po spożyciu produktów bogatych w badane fitozwiązki przy wykorzystaniu metody HPLC-DAD-MS. Na tym etapie rozwoju naukowego mój dorobek obejmował współautorstwo 7 publikacji naukowych (*lista w załączniku 6, punkt IIA*), o sumarycznym współczynniku $IF = 4,281$, sumie punktów MNiSW 62 (zgodnie z rokiem opublikowania) i liczbie cytowań 50 oraz 14 komunikatów naukowych zaprezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. W tym okresie byłem również wykonawcą dwóch projektów badawczych finansowanych ze środków KBN (projektu pt. „Opracowanie metody *in vitro* oznaczania dostępności związków biologicznie

aktywnych żywności na przykładzie flawonoidów”, nr PBZ-KBN/020/P06/1999/09; projektu pt. „Biodostępność antyoksydantów z produktów otrzymanych z jabłek i brokułów”, nr PBZ-KBN/094/P06/2003/17) oraz uczestniczyłem w organizowaniu dwóch międzynarodowych konferencji naukowych (EUROFOODTOX V, “Food Safety – a challenge for processing of food of plant origin”, sierpień, 2002; CENEXFOOD Workshop “Ethical and methodological aspects of phytochemicals biological activity estimation”, czerwiec 2003). Ponadto przez sześć semestrów byłem współprowadzącym ćwiczenia z zakresu przetwórstwa i chemii surowców roślinnych na Wydziale Nauki o Żywności UWM Olsztyn.

- b) Aktywność naukowo-badawcza, dydaktyczna i organizacyjna po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.

Od grudnia 2005 roku pracuję w IRZiBŻ PAN w Olsztynie na stanowisku adiunkta. Moja aktywność naukowo-badawcza w IRZiBŻ PAN w Olsztynie w trakcie studiów doktoranckich oraz po uzyskaniu stopnia naukowego doktora pozwoliła mi na wypracowanie własnego warsztatu badawczego oraz ukształtowanie oryginalnych zainteresowań badawczych, które dotyczą relacji pomiędzy odżywianiem, wchłanianiem i metabolizmem związków biologicznie aktywnych, stresem oksydacyjnym a zdrowiem. Zgodnie z tym szeregiem, w pierwszej kolejności moje badania związane są z jakościową i ilościową analizą substancji bioaktywnych w surowcach i produktach żywnościowych oraz paszach dla zwierząt. W prowadzonych badaniach analizuję wpływ czynników genetycznych, stresu biotycznego i abiotycznego, procesów technologicznych oraz przechowywania na profil i zawartość fitozwiązków w żywności i paszach (1). Następnie, jeżeli jest to konieczne, moje badania obejmują procedury izolacji/otrzymywania z roślin związków biologicznie aktywnych, które nie są dostępne w handlu aby mogły być wykorzystane w badaniach właściwości biologicznych (2). W kolejnym kroku moje badania dotyczą analizy biodostępności substancji bioaktywnych z różnych matryc pokarmowych w eksperymentach z udziałem zwierząt i ludzi z jednoczesnym profilowaniem metabolitów spożytych substancji bioaktywnych w płynach fizjologicznych i tkankach. Jest to istotne ponieważ w ciągu złożonych procesów biotransformacji spożytych fitozwiązków w organizmach ludzi i zwierząt w czasie wchłaniania, metabolizmu i dystrybucji powstaje szereg metabolitów z których wiele pozostaje niezidentyfikowanych. Ostatecznie tysiące metabolitów o nieokreślonej aktywności biologicznej występuje w płynach biologicznych organizmów ludzi i zwierząt i wpływa na ich homeostazę. W celu poznania i śledzenia relacji pomiędzy dietą a zdrowiem niezbędne jest zatem analizowanie całej gamy związków obecnych w surowcu oraz produkcie, a po spożyciu również ich metabolitów w płynach biologicznych konsumenta. Dzięki temu staje się możliwe przewidywanie i śledzenie szlaków metabolicznych, co w konsekwencji może pozwolić na wnioskowanie dotyczące żywieniowych przyczyn ewentualnych zaburzeń (3). W końcowym etapie moje badania obejmują analizy właściwości biologicznych próbek roślinnych oraz pojedynczych substancji w modelach *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. Umożliwiając tym samym określenie czy czynnikiem decydującym o przebiegu danego procesu biologicznego jest konkretna substancja, określony kompleks związków czy może cały zespół związków obecnych w badanej roślinie (4).

W czasie mojej dotychczasowej kariery naukowej, poza badaniami stanowiącymi osiągnięcie naukowe prezentowane w niniejszym opracowaniu (*punkt IV, „Charakterystyka struktury chemicznej, profilu, aktywności przeciwutleniającej oraz biodostępności i przemian metabolicznych antocyjanów kapusty czerwonej”*) podejmowałem również badania dotyczące innych fitozwiązków (flawonoli, flawonów, izoflawonów, flawononów, kwasów fenolowych, katechin, betalain, kumestanów, tokoferoli, poliamin, związków perfluorowanych) według przedstawionego powyżej zakresu. Ponieważ zaprezentowane zagadnienia badawcze wymagają zastosowania odpowiednich narzędzi analitycznych, dlatego moja aktywność naukowo-badawcza związana jest również z opracowaniem a następnie wykorzystaniem właściwych technik analitycznych, w szczególności metod wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrami masowymi (QTRAP, QTOF) oraz detektorami UV-Vis, przemiatania widma, elektrochemicznymi i fluorescencyjnymi.

Badania dotyczące charakterystyki struktury chemicznej, profilu, aktywności przeciwutleniającej oraz biodostępności i przemian metabolicznych antocyjanów kapusty czerwonej stanowiące moje osiągnięcie naukowe będące podstawą do wszczęcia postępowania habilitacyjnego, poza opublikowaniem w formie cyklu czterech publikacji naukowych powiązanych tematycznie (*prace W1-W4*) były również prezentowane na konferencjach naukowych w postaci referatów i plakatów (*załącznik 6: U2, U6, U9, K13, K23*).

Oprócz badań nad biodostępnością antocyjanów kapusty czerwonej prowadziłem również prace związane z biodostępnością antocyjanów aronii. W większości wcześniejszych badań biodostępności antocyjanów z owoców, jako źródło antocyjanów wykorzystywano ekstrakty i/lub koncentraty tych związków a ich dawki były nienaturalnie wysokie, nawet kilkadziesiąt mg na kg masy ciała ochotnika. Ponadto, w tego typu badaniach naturalne matryce żywnościowe antocyjanów były bardzo rzadko wykorzystywane. Ponieważ moje wcześniejsze doświadczenia wskazały, że na biodostępność kwercetyny, jednego z głównych flawonoidów, ma wpływ matryca żywnościowa dlatego można było założyć, że biodostępność antocyjanów, również należących do flawonoidów, po spożyciu żywności, której antocyjany są immanentnym składnikiem, może być różna od biodostępności antocyjanów spożywanych w postaci koncentratów. Co więcej, biodostępność i metabolizm antocyjanów podawany w niskich dawkach, mogą być różne od biodostępności antocyjanów podanych w wysokich, skoncentrowanych dawkach. Również z żywieniowego punktu widzenia wydaje się być bardziej odpowiednie stosowanie w badaniach biodostępności dietetycznych źródeł tych substancji wraz z ich naturalnym stężeniem. Dlatego celem moich badań było określenia biodostępności antocyjanów z naturalnego soku z aronii wnoszącego odpowiadającą warunkom żywieniowym dawkę antocyjanów. Analiza HPLC-DAD-MS wykazała, że wykorzystany w badaniach sok z aronii był bardzo bogatym źródłem pochodnych cyjanidyny: 3-galaktozydu cyjanidyny, 3-arabinozydu cyjanidyny, 3-glukozydu cyjanidyny i 3-ksylozydu cyjanidyny. W obrębie znalezionych antocyjanów dominującym był 3-galaktozydu cyjanidyny, który stanowił 66% ogólnej zawartości antocyjanów występujących w soku z aronii. Po uzyskaniu pozytywnej opinii Komisji Bioetycznej przeprowadziłem niekliniczne badanie medyczne biodostępności antocyjanów z soku z aronii na grupie 13 ochotników, którzy po wyrażeniu pisemnej, dobrowolnej woli na udział

w doświadczeniu, przed i w określonych przedziałach czasowych po spożyciu soku z aronii (w dawce 0,8 mg/kg masy ciała ochotnika) oddali krew i mocz. Oznaczanie antocyjanów i ich metabolitów w próbach płynów fizjologicznych polegało na wyekstrahowaniu ich na złożu stałym i oznaczeniu metodą HPLC-DAD-MS. Po spożyciu soku z aronii w osoczu i moczu ochotników oprócz natywnych form badanych antocyjanów (3-galaktozydu cyjanidyny, 3-arabinozydu cyjanidyny, 3-glukozydu cyjanidyny) stwierdzono obecność pięciu metabolitów cyjanidyny, jej metyloowanych i glukuronowanych pochodnych. Analiza widm pseudomolekularnych jonów dodatnich pozwoliła na stwierdzenie obecności monoglukuronidu cyjanidyny, 3-galaktozydu peonidyny (3'-metylocyjanidyny), 3-arabinozydu peonidyny oraz dwóch monoglukuronidów peonidyny. Na podstawie analizy farmakokinetycznej, najwyższą sumaryczną zawartość antocyjanów w osoczu krwi ochotników ($32,7 \pm 2,9$ nmol/L) stwierdzono po $1,3 \pm 0,1$ h od spożycia soku z aronii. W miarę upływu czasu stężenie antocyjanów w osoczu malało by w 12 h osiągnąć wartość 0,6 nmol/L. Analizując stężenia antocyjanów i ich metabolitów w zbieranym moczu wykazano najwyższą szybkość wydalania antocyjanów (62,9 nmol/h) w ciągu pierwszych dwóch godzin. W miarę upływu czasu szybkość ta spadała by w przedziale 12-24h osiągnąć wartość 0,2 nmoli/h. Sumarycznie, w wydalonym w ciągu 24h moczu znaleziono jedynie 0,25% podanej dawki antocyjanów. Rozpatrując poszczególne związki antocyjanów znalezione w osoczu i moczu ochotników po spożyciu soku z aronii stwierdzono, że dominującymi były metabolity cyjanidyny stanowiące 70% wszystkich antocyjanów występujących w badanych płynach fizjologicznych. Moje badania biodostępności były pierwszymi w których jako źródło antocyjanów wykorzystano naturalny sok z aronii z rzeczywistym stężeniem antocyjanów. Ponadto wykazały, że pomimo zastosowania niskiej dawki antocyjanów te naturalne substancje są wchłaniane i występują w osoczu krwi i moczu ochotników w formie natywnej i metabolitów nawet po 24 godzinach od spożycia soku. Uzyskane rezultaty badań prezentowano na konferencjach naukowych oraz opublikowano (*załącznik 6: U5, K9, K10, P10*).

Kolejnym prowadzonym przeze mnie, tematem badawczym dotyczącym naturalnych barwników roślinnych są badania nad betalainami buraka ćwikłowego. Betalainy są żółtymi (betaksantyny) i czerwono-fioletowymi (betacyjaniny) barwnikami występującymi w roślinach należących do rzędu goździkowców oraz w niektórych gatunkach grzybów wyższych. Podstawową strukturą betalain jest kwas betalamowy do którego w przypadku betacyjanin przyłączona jest cząsteczka cyklo-3,4-dihydroksyfenyloalaniny a w przypadku betaksantyn cząsteczka aminokwasu (Strack i in. 2003). W roślinach betalainy występują głównie jako pochodne β -O-glikozydowe. Do chwili obecnej sklasyfikowano kilkadziesiąt związków z tej grupy, z których najpowszechniejszym jest betanina (Moreno i in. 2008, Azeredo 2009). W Polsce betalainy są znane głównie jako barwniki buraka ćwikłowego, warzywa które jest bardzo często spożywane w postaci ugotowanej jako sałatka, w postaci świeżego soku i zupy oraz w formie produktów fermentowanych. Zawartość betalain w burakach ćwikłowych i ich produktach może być bardzo wysoka i zależy od typu i odmiany buraków oraz warunków uprawy jak i zastosowanej obróbki technologicznej. Betalainy charakteryzują się silnym działaniem przeciwutleniającym, które wynikają ze struktury ich cząsteczki (Kanner i in. 2001). Dlatego w dużej mierze dzięki związkom betalainowym burak ćwikłowy jest umieszczany wśród dziesięciu warzyw charakteryzujących się najsilniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi (Azeredo 2009). W dostępnej

literaturze nie było systematycznych informacji na temat profilu związków betalainowych i ich zawartości w różnych odmianach buraka ćwikłowego oraz jak procesy technologiczne wpływają na profil betalain a także jak kształtują właściwości przeciwutleniające odmian i produktów z buraka ćwikłowego. Brak było również informacji o biodostępności tych naturalnych czerwonych barwników. Dlatego w ramach prowadzonych badań analizowaliśmy profil związków betalainowych w 13 odmianach buraka ćwikłowego uprawianych w Polsce. W oparciu o system HPLC sprzężony ze spektrometrem masowym wyposażonym w detektor czasu przelotu (QTOF) w badanych burakach ćwikłowych zidentyfikowaliśmy 30 związków betalainowych, przy czym 18 związków należało do grupy betacyjanin, a 12 do betaksantyn. Dominującą formą betacyjanin w burakach ćwikłowych była betanina (m/z 551,1463 $[M+H]^+$, m/z 389,0962 $[M-162]^+$) stanowiąca od 42,7 do 52,1% ogólnej zawartości tych związków. Na niższych poziomach występowały izobetanina (m/z 551,1517 $[M+H]^+$, m/z 389,0955 $[M-162]^+$, 15,0-20,4%) i 17,2-didekarboksyneobetanina (m/z 462,1608 $[M+H]^+$, m/z 300,1113 $[M-162]^+$, 1,6-17,9%). Dominującym związkiem z grupy betaksantyn była wulgaksantyna I (m/z 340,1125 $[M+H]^+$, m/z 323,0847 $[M-17]^+$) stanowiące od 13,3 do 32,1% ogólnej zawartości tych barwników. Badane buraki ćwikłowe charakteryzowały się dużym potencjałem przeciwutleniającym, który był zależny od odmiany i korelował z zawartością związków betalainowych. W przypadku zastosowanych procesów technologicznych, gotowanie buraka ćwikłowego w wodzie spowodowało spadek zawartości betaniny a wzrost zawartości izobetaniny, didekarboksybetaniny/izobetaniny i monodekarboksybetaniny/izobetaniny. Proces fermentacji nie spowodował znaczących zmian w profilu betacyjanin mięszu buraka ćwikłowego. Natomiast w uzyskanym w czasie procesu fermentacji soku zaobserwowano spadek zawartości betaniny a wzrost izobetaniny w porównaniu do świeżego soku z buraka ćwikłowego. Generalnie, zastosowane procesy spowodowały zmniejszenie pojemności przeciwutleniającej uzyskanych produktów. W ramach badań nad burakami ćwikłowymi przeprowadzono również porównanie biodostępności betacyjanin po spożyciu soku i chipsów z buraka ćwikłowego. Po uzyskaniu pozytywnej opinii Komisji Bioetycznej przeprowadziłem niekliniczne badanie medyczne biodostępności z udziałem 12 ochotników, którzy po wyrażeniu pisemnej, dobrowolnej woli na udział w doświadczeniu, przed i w określonych przedziałach czasowych po spożyciu soku i chipsów z buraka ćwikłowego (w dawce 1,5 mg betacyjanin/kg masy ciała ochotnicka) zbierali mocz do analiz profilu betacyjanin i ich metabolitów. Po spożyciu soku z buraka ćwikłowego najwyższą szybkość wydalania betacyjanin z moczem (64,21 nmol/h) stwierdzono w ciągu pierwszych dwóch godzin. Podobną szybkość wydalania odnotowano po spożyciu chipsów (66,29 nmol/h) z tym, że miało to miejsce w przedziale 2-4h po ich spożyciu. Najprawdopodobniej, opóźnienie to wynikało z konieczności wymycia betacyjanin z matrycy chipsów przed ich wchłonięciem. W miarę upływu czasu szybkość wydalania tych związków sukcesywnie spadała by w przedziale 12-24h osiągnąć wartość 8,46 nmoli/h po spożyciu soku i 8,24 nmoli/h po spożyciu chipsów. Rozpatrując poszczególne związki wchodzące w skład betacyjanin stwierdzono, iż w początkowym okresie w moczu dominowały glukozydy betaniny i izobetaniny (95%) a w okresie końcowym ich aglikony (98%). Zarówno w przypadku soku jak i chipsów buraczanych, w wydalonym w ciągu 24h moczu znaleziono jedynie 0,3% podanej dawki betacyjanin. W ramach badań nad betalainami buraka ćwikłowego realizowanych w IRZiBŻ PAN w Olsztynie uczestniczyłem

również w eksperymentach dotyczących analiz właściwości biologicznych tych substancji. Celem pracy było określenie wpływu spożycia chipsów z buraka ćwikłowego na czynności przewodu pokarmowego, pojemność przeciwutleniającą osocza oraz profil lipidowy krwi i wątroby szczurów przebywających na diecie standardowej i „dyslipidemicznej”. Przeprowadzone eksperymenty z udziałem szczurów wykazały, że spożywanie diety dyslipidemicznej zwiększało poziom cholesterolu całkowitego oraz niekorzystną proporcję cholesterolu całkowitego do HDL w surowicy badanych zwierząt, indeks aterogeny, stężenie cholesterolu całkowitego i triacylogliceroli w wątrobie zwierząt, tłumilo produkcję krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i zmniejszyło całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza oraz aktywności peroksydazy glutationowej we krwi. Wzbogacenie diety szczurów w chipsy z buraków ćwikłowych ograniczało wzrost stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy oraz poziom triacylogliceroli. Ponadto, zastosowanie najwyższej dawki chipsów (3%) zmniejszyło również poziom cholesterolu całkowitego w wątrobie i aktywność aminotransferazy asparaginianowej w surowicy. Dodanie chipsów do diety szczurów spowodowało również zwiększenie puli krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i aktywność peroksydazy glutationowej oraz powodowało obniżenie poziom glukozy w surowicy. Podsumowując, nasze badania wskazały, że wzbogacenie diety szczurów w chipsy z buraka ćwikłowego może złagodzić zmiany metaboliczne u szczurów będących na diecie zaburzającej metabolizm lipidów. Uzyskane rezultaty badań prezentowano na konferencjach naukowych oraz opublikowano (*załącznik 6: P12, M7, K2, K8, K11, K26, K27, K28, K29*).

Ważnym zagadnieniem badawczym w mojej działalności naukowej była kontynuacja badań stanowiących mój doktorat a dotyczących związków kwercetyny cebuli. Jak już wcześniej wspomniałem opisując badania stanowiące mój doktorat, cebula jest bardzo bogatym źródłem kwercetyny, przy czym mięsiste łuski spichrzowe zawierają głównie glukozydy kwercetyny a suche łuski okrywowe aglikon kwercetyny. Ponadto, na podstawie eksperymentów z udziałem szczurów i ochotników wykazałem, że kwercetyna była lepiej wchłaniana z suchych łusek okrywowych cebuli. Moje badania dowiodły również, że kwercetyna występuje we krwi ochotników nawet do 72 godzin po spożyciu cebuli. Bez odpowiedzi pozostawało jednak pytanie czy po wchłonięciu kwercetyna dociera do ważnych organów/tkanek organizmu, np. mózgu. Ponieważ kwercetyna jest związkiem o uznanych silnych właściwościach antyoksydacyjnych, czyli z potencjałem ochronnego oddziaływania na organizm konsumenta w związku z czym po dotarciu np. do środowiska układu nerwowego mogłaby działać zapobiegawczo w stosunku do chorób centralnego układu nerwowego, takie jak: demencja i choroba Alzheimera, których rozwój związany jest między innymi z występowaniem stresu oksydacyjnego w komórkach nerwowych. Kluczową kwestią w powyższym rozważaniu było pytanie czy związki kwercetyny mają zdolność przenikania barier mózgowia (bariera krew-mózg, bariera krew-płyn mózgowo-rdzeniowy) by móc oddziaływać na procesy zachodzące w komórkach nerwowych. W ramach projektu pt. „Badanie przenikania flawonoidów i ich metabolitów przez bariery mózgowia w kontekście prewencji zmian neurodegeneracyjnych” (projekt nr: 798/N-COST/2010/0) w którym byłem głównym wykonawcą próbowaliśmy wyjaśnić powyższe wątpliwości. W pierwszym etapie projektu przeprowadziłem badanie profilu i zawartości związków kwercetyny w ponad 100 rodzajach szalotki. Analizę zawartości związków kwercetyny przeprowadziłem metodą HPLC-DAD z identyfikacją na podstawie czasu

retencji i widm UV-Vis. W badanym materiale znalazłem pięć pochodnych kwercetyny. Analiza ilościowa związków kwercetyny wykazała, że w mięsistych łuskach spichrzowych glukozydowe pochodne kwercetyny stanowiły ponad 99% całkowitej zawartości kwercetyny. Zupełnie odmienny układ pochodnych kwercetyny zaobserwowano w suchych łuskach okrywowych, w których dominował aglikon kwercetyny stanowiący ponad 81% jej całkowitej zawartości. Co więcej, średnia zawartość kwercetyny w suchych łuskach okrywowych szalotki była około 8 razy wyższa niż w mięsistych łuskach spichrzowych. W kolejnym etapie projektu prowadziłem badania izolacji metabolitów kwercetyny z moczu świń po wcześniejszym podaniu im suchych łusek okrywowych cebuli zwyczajnej. Proces izolacji z wykorzystaniem kolumnowej chromatografii preparatywnej i półpreparatywnej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem DAD i spektrometrem mas pozwolił na uzyskanie preparatu zawierającego 12 metabolitów kwercetyny: metylowanych, glukuronowanych, siarczanowanych i mieszanych koniugatów kwercetyny. Następnie, przeprowadziłem analizę właściwości przeciwutleniających wyizolowanej mieszaniny metabolitów. Wykonane czterema metodami (TEAC, DPPH, PCL ACL, PCL ACW) analizy wykazały wyższą aktywność przeciwutleniającą mieszaniny metabolitów wyizolowanych z moczu świń w porównaniu do natywnych związków kwercetyny z cebuli. Co wskazuje, że metabolity kwercetyny obecne w krążeniu ogólnym, które powstały w procesach detoksyfikacji po spożyciu kwercetyny mogą wciąż działać jako przeciwutleniacze i korzystnie oddziaływać na organizm konsumenta. W ostatnim, głównym etapie projektu, w badaniach *in vivo* jako model wykorzystano owce, którym do III komory mózgu zaimplantowano metalowe kaniule umożliwiające wielokrotne pobieranie płynu mózgowo-rdzeniowego. Taki model wykorzystany został do analizy jakościowej i ilościowej metabolitów kwercetyny w osoczu krwi, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym po dożwaczowym podaniu bogatych w kwercetynę suchych łusek okrywowych cebuli i po donaczyniowym podaniu wyizolowanego wcześniej preparatu metabolitów kwercetyny. Identyfikacja metabolitów kwercetyny w płynach fizjologicznych owiec została przeprowadzona metodą HPLC-MS/MS w trybie skanowania jonu prekursora, 301,1 m/z dla kwercetyny i 315,1 m/z dla izoramnetyny (3'-metylokwerceyny) a analiza ilościowa w trybie MRM. Widma fragmentacyjne jonów ujemnych wskazały na obecność kilkunastu pochodnych kwercetyny w badanych płynach fizjologicznych. Po dożwaczowym podaniu preparatu suchych łusek okrywowych cebuli w osoczu i moczu owiec stwierdzono obecność 16 metabolitów kwercetyny, natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym tylko aglikony kwercetyny i izoramnetyny. Co interesujące, po donaczyniowym podaniu preparatu metabolitów kwercetyny w osoczu i moczu owiec znaleziono 6 metabolitów kwercetyny a w płynie mózgowo-rdzeniowym jedynie aglikon kwercetyny. Przeprowadzone badania pokazały, że u owiec które spożyły suchą łuskę cebuli bogatą w aglikon kwercetyny, po wchłonięciu z przewodu pokarmowego kwercetyna obecna jest w krwioobiegu w postaci metylowanych, glukuronowych, sulfonowych i kombinowanych pochodnych, natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym tych zwierząt pojawia się w formie dekoniugowanej jako aglikon kwercetyny i izoramnetyny na poziomie < 0,5 nmola/L. Wyniki powyższych badań przedstawiano w formie doniesień konferencyjnych oraz opublikowano (załącznik 6: P3, P23, P25, U4, U7, U8, K1, K14, K15, K16, K17, K18).

W innym badaniu związanym z kwercetyną analizowaliśmy czy związek ten ma możliwość gromadzenia się w mleku kobiet po spożyciu posiłku bogatego w ten flawonoid.

Po uzyskaniu pozytywnej opinii Komisji Bioetycznej przeprowadziliśmy badania z udziałem 11 karmiących kobiet, które po kilkudniowej diecie wolnej od związków kwercetyny spożyły zupę cebulową dostarczającą 1 mg kwercetyny na kg masy ciała. Przed i po spożyciu zupy cebulowej od ochotniczek zbierane były próby moczu i mleka, które następnie poddane zostały hydrolizie enzymatycznej i analizie HPLC-DAD-MS na obecność kwercetyny i izoramnetyny. Analiza moczu zebranego przed spożyciem zupy cebulowej wykazała obecność związków kwercetyny na poziomie 100 nM. Po spożyciu zupy stężenie związków kwercetyny w moczu ochotniczek stopniowo wzrastało by uzyskać maksymalną wartość około 11 μ M po 3 godzinach. W przypadku mleka, po spożyciu zupy cebulowej maksymalne stężenie związków kwercetyny w mleku ochotniczek wynosiło około 70 nM i wystąpiło 12 godzin od spożycia tej zupy. Co najważniejsze nasze badania wykazały, że związki kwercetyny gromadzą się w mleku kobiet po spożyciu diety bogatej w ten związek i tym samym karmiąc piersią kobiety ekspozują dzieci na potencjalnie korzystne działanie kwercetyny. Wyniki z powyższych badań opublikowano w czasopiśmie *Molecular Nutrition & Food Research* (załącznik 6: P20).

W kolejnych badaniach nad kwercetyną, współpracując z Katedrą Chemii Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie analizowałem profil związków kwercetyny w dwóch odmianach cebuli oraz właściwości przeciwutleniające tych związków i cebul mierzone 5 różnymi metodami (CV, TEAC, PRTC, DPPH, FCR). Dominującą formą kwercetyny w analizowanych odmianach cebuli był 4'-glukozyd kwercetyny (57%) oraz 3,4'-diglukozyd kwercetyny (41%). W znacznie mniejszej ilości występował 3-glukozyd kwercetyny (1,2%) i aglikon kwercetyny (0,8%). W obrębie analizowanych związków aglikon kwercetyny charakteryzował się największą aktywnością przeciwutleniającą i redukującą. W badaniach analizowaliśmy również względny udział poszczególnych związków kwercetyny w pojemności przeciwutleniającej badanych cebul. Najniższy udział w pojemności przeciwutleniającej cebul prezentował 3,4'-diglukozyd kwercetyny a najwyższy 4'-glukozyd kwercetyny. W ramach współpracy prowadziliśmy również badania mechanizmu utleniania glukozydów kwercetyny. Uzyskane rezultaty badań zostały opublikowane (załącznik 6: P4, P8).

Część mojego dorobku naukowego związana jest z badaniami nad związkami gryki. Pierwsze prace badawcze z tego obszaru realizowane w IRZiBŻ PAN w Olsztynie z moim udziałem dotyczyły opracowania metod jakościowej i ilościowej analizy flawonoli i flawonów w orzeszkach i kielkach gryki oraz obejmowały prześledzenie zmian profilu i zawartość tych związków w czasie 10 dniowego procesu kiełkowania gryki w warunkach bez i z dostępem światła. Rezultatem prowadzonych badań było wyznaczenie optymalnych warunków analizy tych związków z wykorzystaniem metody HPLC-DAD-MS. Ponadto, w oparciu o opracowaną metodę wykazano, że w orzeszkach gryki występuje głównie rutyna podczas gdy w kielkach gryki znaleziono 4 związki z grupy flawonów (orientynę, izorientynę, witeksynę i izowiteksynę) oraz trzy pochodne kwercetyny (rutynę i dwa glukozydy kwercetyny). Zaobserwowano również, że 10 dniowe kielki były najzasobniejsze w badane związki, przy czym zawartość analizowanych flawonoidów w kielkach wyprodukowanych z dostępem światła była wyższa niż bez dostępu światła. Uzyskane kielki gryczane charakteryzowano również pod względem pojemności przeciwutleniającej i wykazano, że 10 dniowe kielki wyprodukowane w warunkach z dostępem światła charakteryzowały się największą zdolnością do wymiatania wolnych rodników.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazały, że kielki gryki ze względu na zasobność w flawonoidy i duży potencjał przeciwutleniający mogą być przydatne w żywieniu człowieka. Wyniki z powyższych badań prezentowano na konferencjach naukowych oraz opublikowano (załącznik 6: P2, M3, K3, K5, K7, K13).

Kolejnym obszarem badawczym dotyczącym gryki realizowanym z moim udziałem w IRZiBŻ PAN w Olsztynie były badania składu flawonoidowego i właściwości biologicznych chlebów z dodatkiem mąki gryczanej. W badaniach *in vitro* analizowano właściwości przeciwutleniające ekstraktów z chleba pszenno-gryczanego oraz wpływ tych produktów na tworzenie końcowych produktów zaawansowanej glikacji, hamowanie aktywności enzymu konwertującego angiotensynę i procesy zapalne jelita, a zatem wpływ na procesy którym przypisuje się istotny, negatywny udział w procesach degeneracyjnych organizmu człowieka. W przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że chleb pszenno-gryczany jest bogatym źródłem związków flawonoidowych (głównie rutyny i kwercetyny) i może ograniczać procesy zapalne jelita, aktywność enzymu konwertującego angiotensynę odpowiedzialną za regulację ciśnienia krwi oraz tworzenia końcowych produktów glikacji białek, które po części odpowiedzialne są za procesy starzenia się i cukrzycę. Wyniki z powyższych badań prezentowano na konferencjach naukowych oraz opublikowano (załącznik 6: P22, P29, K22, K24, K25, K31).

Współpracując z ośrodkami naukowo-badawczymi w Siedlcach i Skierniewicach (Katedra Fizjologii Roślin i Genetyki Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach oraz Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach) uczestniczyłem w badaniach dotyczących określenia wpływu jasmonianu metylu na gromadzenie się amin biogennych oraz ich metabolitów a także związków polifenolowych w roślinach gryki. Nasze badania wykazały, że jasmonian metylu stymuluje przemianę L-fenylalaniny do 2-fenyletyloaminy oraz zwiększa poziom endogennej putrescyny w hipokotylu i liścieniach siewek gryki. Ponadto, wykazaliśmy, że 2-fenyletyloamina jest substratem w biosyntezie kwasu fenilooctowego i 2-fenyletanolu, jak również cynamonowej pochodnej 2-fenyletyloamidu. W przypadku związków polifenolowych ekspozycja siewek gryki na jasmonian metylu powodowała zmniejszenie zawartości antocyjanów w hipokotylu oraz brak istotnego wpływu na poziom tych związków w liścieniach. Zastosowanie jasmonianu metylu nie spowodowało również zmian w poziomie pochodnych kwercetyny, apigeniny i luteoliny w analizowanych częściach siewek gryki. Z drugiej strony, hormon ten stymulował biosyntezę proantocyjanidyn w hipokotylu. Na podstawie uzyskanych wyników zasugerowaliśmy, że jasmonian metylu może pobudzać enzymy uczestniczące w syntezie proantocyjanidyny i/lub hamować enzymy uczestniczące w powstawaniu antocyjanów. W ramach współpracy prowadziliśmy również badania wpływu Pb i Cd na wzrost siewek gryki oraz ich profil flawonoidowy. Porównywaliśmy również, profil i zawartość antocyjanów, flawonoli i flawonów w 5 odmianach gryki zwyczajnej i dzikiej gryce tatarce. Uzyskane wyniki wykazały, że kompozycja i zawartość związków flawonoidowych w gryce zależy od odmiany. Wykazaliśmy również, że zawartość flawonoli i flawonów była wyższa w liścieniach niż w hipokotylu podczas gdy poziom antocyjanów był wyższy w hipokotylu w porównaniu do liścieni. Uzyskane rezultaty badań zaprezentowano na konferencjach naukowych oraz opublikowano (załącznik 6: P13, P14, P17, P21, P24, P28, K20).

W ramach współpracy IRZiBŻ PAN w Olsztynie i Technical University of Lisbon opracowałem metodę analizy kumestrolu i jego głównego metabolitu (pochodnej

metylowanej) w paszy i płynach fizjologicznych kłaczy oraz analizowałem zmiany profilu tych związków w paszy oraz osoczu kłaczy przebywających na różnych dietach bogatych w fitoestrogeny. Przeprowadzone analizy wykazały między innymi, że kumestrol i jego metylowana pochodna występują w osoczu krwi kłaczy po spożyciu paszy bogatej w fitoestrogeny. Ponadto, wyższe spożycie roślinnych estrogenów powoduje wzrost poziomu kumestrolu i jego metabolitu w osoczu krwi co w konsekwencji może wpływać na możliwości reprodukcyjne kłaczy. Uzyskane rezultaty badań prezentowano na konferencjach naukowych oraz opublikowano (*załącznik 6: P18, M5*).

W obszarze badań dotyczących izoflawonów uczestniczyłem w doświadczeniach wpływu termicznej sterylizacji paszy dla zwierząt laboratoryjnych na zawartość i profil substancji odżywczych i nieodżywczych. W badaniach tych byłem odpowiedzialny za opracowanie metody HPLC analizy daidzeiny i genisteiny oraz ich pochodnych oraz prześledzenie zmian profilu tych związków w czasie zastosowania dwóch różnych procesów sterylizacyjnych. W analizowanych paszach sojowych znaleziono 10 pochodnych daidzeiny i genisteiny, przy czym glukozydowe pochodne tych związków (7-glukozyd daidzeiny i 7-glukozyd genisteiny) były formami dominującymi w obrębie analizowanych izoflawonów. Procesy sterylizacji spowodowały zwiększenie zawartości dominujących izoflawonów a spadek zawartości modyfikowanych pochodnych daidzeiny i genisteiny. W innych badaniach związanych z izoflawonami w których weryfikowano czy fitoestrogeny mogą wpływać na dostęp hormonów tarczycy (np. tyroksyny) do mózgu byłem odpowiedzialny za analizę daidzeiny i genisteiny oraz ich metabolitów (*p*-etylfenolu i ekwolu) w osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym owiec. Nasze badania wykazały, że po spożyciu przez owce bogatej w fitoestrogeny kiszonki z koniczyny czerwonej w osoczu tych zwierząt występowała daidzeina, genisteina, *p*-etylfenol i ekwol, natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym znaleziono 3 związki, tj. daidzeinę, *p*-etylfenol i ekwol. Uzyskane wyniki wskazują, że daidzeina i genisteina oraz ich metabolity gromadzą się w płynie mózgowo-rdzeniowym i mogą wpływać na dostęp tyroksyny do mózgu. Uzyskane rezultaty badań prezentowano na konferencjach naukowych oraz opublikowano (*załącznik 6: P16, P19, K21*).

Współpracując z Zakładem Cyto biologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie brałem udział w badaniach których celem było określenie czy epikatechina może wywoływać uszkodzenie DNA i apoptozę komórek nowotworowych w śledzionie szczurów z ostrą białaczką szpikową. W doświadczeniach odpowiedzialny byłem za zaadaptowanie metody analizy epikatechiny i jej metylowanej pochodnej w osoczu szczurów oraz prześledzenie zmian profilu tych związków w osoczu szczurów w zależności od zastosowanego modelu doświadczalnego. Uzyskane wyniki wskazały, że epikatechina może być stosowana jako skuteczny dodatek do standardowej terapii przeciw ostrej białaczce szpikowej. Rezultaty tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Food and Chemical Toxicology* (*załącznik 6: P9*).

Uczestniczyłem również w badaniach dotyczących profilu związków polifenolowych i aktywności biologicznych roślin z rodzaju *Mallotus*, *Cicer*, *Linum*, *Phaseolus* oraz miódów pochodzących z krajów UE, profilu tokoferoli i tokotrienoli w ziarniakach żyta i produktach z nich otrzymanych oraz profilu związków perfluorowanych w produktach żywnościowych i opakowaniach do żywności. Rezultaty tych badań prezentowano na konferencjach

naukowych oraz opublikowano w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*załącznik 6: P1, P5, P6, P15, P26, P27, P30, M2, K4, K19, K30*).

Jestem również autorem i współautorem kilku publikacji i referatów naukowych o charakterze przeglądowym, których tematyka dotyczy biodostępności i metabolizmu fitozwiązków żywności oraz wpływu czynników technologicznych na biologiczny los tych związków po spożyciu, charakterystyki składników bioaktywnych cebuli i czosnku a także aspektów praktycznych wykorzystania chromatografii gazowej w analityce środowiskowej (*załącznik 6: P7, P11, M1, M4, M6, U1, U3, K6*).

Efekty prezentowanych powyżej własnych oraz powstałych we współpracy badań były prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych w formie 31 doniesień plakatowych i 9 referatów ustnych oraz zostały opublikowane w formie 37 artykułów w renomowanych czasopismach o zasięgu krajowym i światowym. Spośród publikacji naukowych 30 zostało opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC) (poza pracami dokumentującymi osiągnięcie naukowe wymienione w punkcie IV) a 7 manuskryptów zostało opublikowanych w postaci monografii oraz publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych nieindeksowanych przez listę JCR.

Ważnym elementem mojej aktywności naukowo-badawczej była współpraca z naukowcami z jednostki macierzystej oraz z jednostek naukowych w Polsce i zagranicą w ramach przedstawionej powyżej problematyki oraz obszarów odległych tematycznie od mojego podstawowego nurtu (*załącznik 6, punkt IIIQ1*).

Moja aktywność naukowo-badawcza zaowocowała również zaproszeniem do zespołów redakcyjnych 4 międzynarodowych czasopism naukowych (Journal of Chemistry, Food Science and Technology, Frontiers in Nutrition, Advances in Agriculture and Food Systems) oraz do zespołów recenzujących 22 czasopism naukowych. Od początku tej działalności zrecenzowałem 102 manuskrypty. Jestem współautorem pięciu krajowych zgłoszeń patentowych dotyczących mieszanek wypiekowych. Jestem autorem i współautorem 13 ekspertyz dla jednostek zewnętrznych (naukowych i przemysłu) dotyczących analizy profilu substancji biologicznie aktywnych metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z różnymi detektorami, między innymi spektrometrami masowymi. Po doktoracie odbyłem pięć staży z zakresu szeroko pojętej metabolomiki w jednostkach naukowych we Francji i Hiszpanii: trzy razy w Instituto de Fermentaciones Industriales, Madryt, Hiszpania, (po jeden lub dwa tygodnie w 2007, 2008, 2009 roku) oraz dwa razy w INRA, French Institute of Agriculture Research, UMR 1019 Human Nutrition Unit, Clermont-Ferrand/Theix, Francja (po dwanaście tygodni w 2011 i 2012 roku). Kierowałem międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczo-naukowymi i badawczo-rozwojowymi oraz brałem udział realizacji takich projektów. Jestem laureatem siedmiu krajowych i międzynarodowych nagród za działalność naukową. Uczestniczyłem aktywnie w programach europejskich jako zastępca przedstawiciela narodowego w Management Committee of COST Action FA 926 "Impact of new technologies on the health benefits and safety of bioactive plant compounds" (2004-2008) i COST Action FA 0802 "Feed for Health" (2008-2012). Byłem przedstawiciel narodowy w Management Committee of COST Action FA 1005 „Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process“ (INFOGEST), (2010-2014). Obecnie jestem koordynator sekcji "Anthocyanins" w WP1 COST ACTION FA 1403 "Interindividual

variation in response to consumption of plant food bioactives and determinants involved” (POSITIVE) (2014-2017). Po doktoracie, w trakcie pracy w IRZiBŻ PAN Olsztyn byłem członkiem dwóch komitetów organizacyjnych międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych (EuroFoodChem XVI „Translating food chemistry into health benefits”, 6-8.07.2011, Gdańsk; Konferencja „ŻYWNOŚĆ dla ZDROWIA”, 15.05.2013, Olsztyn) oraz przewodniczyłem obradom na dwóch krajowych konferencjach naukowych (XVI Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności "Ewolucja Żywności", 12-13.05.2011, Olsztyn; VII Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej Technologów Przetwórstwa Owoców i Warzyw „Przetwórstwo owoców, warzyw i grzybów - Nauka i Przemysł”, 9-10.06.2014, Olsztyn). Od stycznia 2010 roku jestem odpowiedzialny za organizację Pracowni Metabolomiki w IRZiBŻ PAN w Olsztynie. Moja aktywność w tym zakresie umożliwiła wyposażenie Pracowni Metabolomiki w 5 nowych systemów chromatografii cieczowej (HPLC) sprzężonej z różnymi detektorami (QTRAP-MS/MS, QTOF-MS/MS, DAD, UV-Vis, ED). Najnowsze systemy wykorzystywane w badaniach metabolomicznych, HPLC-QTRAP 5500 MS/MS i HPLC-QTOF 5600+ MS/MS, został zakupiony w ramach środków 7 Programu Ramowego, projektu REFRESH, w którym koordynowałem zadanie dotyczące zakupu aparatury naukowej oraz ze środków Regionalnego Programu Operacyjnego Warmia i Mazury, projekt pt.: Regionalne Centrum Badań i Transferu Wiedzy - ŻYWNOŚĆ dla ZDROWIA, którego byłem współautorem i koordynowałem jego realizację. W ramach tych projektów oprócz systemów analitycznych zostało zakupione szereg urządzeń niezbędnych do przygotowania materiału biologicznego do analiz co znacznie poszerzyło możliwości badawcze Pracowni Metabolomiki oraz jej możliwości współpracy z przemysłem i obszarem badawczym UE. Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności. Mój dorobek dydaktyczny obejmuje wykłady i ćwiczenia na stacjonarnych studiach doktoranckich oraz na studiach magisterskich na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie z zakresu wchłaniania, metabolizmu i biodostępności fitozwiązków żywności oraz wykorzystania wysokosprawnej chromatografii cieczowej i spektrometrii mas w analizie fitozwiązków. Ponadto byłem promotorem dwóch prac magisterskich z zakresu analizy metabolitów antocyjanów i flawonoli oraz byłem opiekunem staży naukowych i praktyk studenckich realizowanych w Zakładzie Chemii i Biodynamiki Żywności IRZiBŻ PAN w Olsztynie. Mój dorobek popularyzatorski obejmuje wykłady i artykuły popularno-naukowe oraz audycje radiowe na temat żywności funkcjonalnej, metabolomiki, biodostępności składników bioaktywnych, piczywa o właściwościach prozdrowotnych oraz analizy fitozwiązków żywności.

Szczegółowy wykaz przedstawionych powyżej działalności został zamieszczony w Załączniku 6 „Wykaz dorobku naukowo-badawczego, dydaktycznego, organizacyjnego i popularyzacyjnego”.

VI. Podsumowanie działalności naukowo-badawczej, dydaktycznej i organizacyjnej.

1	Publikacje naukowe:	
	Całkowity dorobek naukowy	48
	Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	4
	Publikacje po doktoracie niestanowiące osiągnięcia naukowego (z listy JCR)	30
	Publikacje po doktoracie niestanowiące osiągnięcia naukowego (pozostałe)	7
	Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora	7
2	Punktacja wg MNiSW:	
	Całkowity dorobek naukowy	1045
	Suma punktów cyklu 4 publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	165
	Suma punktów publikacji po doktoracie niestanowiących osiągnięcia naukowego	818
	Suma punktów publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora	62
3	Impact Factor (IF) wg listy JCR (zgodnie z rokiem opublikowania):	
	Sumaryczny	79,654
	Cyklu 4 publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	13,406
	Publikacji po doktoracie niestanowiących osiągnięcia naukowego	61,967
	Publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora	4,281
4	Indeks Hirscha (według bazy Web of Science z dnia 20.01.2016)	10
5	Liczba cytowań wg Web of Science (z dnia 20.01.2016):	
	Sumaryczna	334
	Cyklu 4 publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	25
	Publikacji po doktoracie niestanowiących osiągnięcia naukowego	259
	Publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora	50
6	Liczba doniesień naukowych przedstawionych w formie referatów ustnych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych po doktoracie	9
7	Liczba doniesień naukowych przedstawionych w formie plakatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych po doktoracie	31
8	Liczba zgłoszeń patentowych	5
9	Uczestnictwo w zespołach redakcyjnych	4
10	Uczestnictwo w zespołach recenzujących	22
11	Recenzje manuskryptów	102
12	Uczestnictwo w programach europejskich	4
13	Współpraca z jednostkami naukowymi w Polsce i zagranicą	8
14	Organizacja konferencji naukowych oraz przewodniczenie obradom	4
15	Nagrody za działalność naukową	7
16	Kierowanie oraz udział w projektach badawczo-naukowych i badawczo-rozwojowych	10
17	Zagraniczne staże naukowe	5
18	Ekspertyzy dla jednostek zewnętrznych (naukowych i przemysłu)	13
19	Dorobek dydaktyczny i w zakresie popularyzacji nauki	20
20	Opieka naukowa nad magistrantami i studentami	7

21.01.2016

Wierzbowski