



PODPIS ZAUFANY

BARTOSZ
BRZozowski
06.03.2023 09:59:14 (GMT+1)
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

**Rada Naukowa Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
Wydział Nauki o Żywności
Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn**
za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Bartosz Marek Brzozowski
(imię i nazwisko wnioskodawcy)

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Nauki o Żywności
Katedra Inżynierii, Aparatury Procesowej i Biotechnologii Żywności
(miejsce pracy/jednostka naukowa)

Wniosek

z dnia 06.03.2023

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie **nauk rolniczych** w dyscyplinie¹ **technologia żywności i żywienia**.

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Cykl 4 publikacji naukowych ujętych pod wspólnym tytułem:

„Wpływ procesów bio-technologicznych na immunoreaktywne właściwości białek pszenicy w aspekcie ich celiakotoksyczności”

Wniosuję – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym**^{*2}

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art.

232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

.....
(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

- Załącznik 1. Dane wnioskodawcy;
- Załącznik 2. Kopia dokumentu potwierdzającego posiadanie stopnia doktora;
- Załącznik 3. Autoreferat;
- Załącznik 4. Wykaz osiągnięć naukowych;
- Załącznik 5. Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z oświadczeniami współautorów;

¹ Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

² * Niepotrzebne skreślić.



PODPIS ZAUFANY

BARTOSZ
BRZOWSKI

06.03.2023 10:03:07 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

ZAŁĄCZNIK 3

Autoreferat

Dr inż. Bartosz Marek Brzozowski

Katedra Inżynierii, Aparatury Procesowej i Biotechnologii Żywności

Wydział Nauki o Żywności

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

10-718 Olsztyn, ul. Heweliusza 1

tel +89 523 36 50

e-mail: bartosz.brzozowski@uwm.edu.pl

OLSZTYN 2023

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	3
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	24
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	25
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.	26

1. Imię i nazwisko

Bartosz Marek Brzozowski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2004 Doktor nauk rolniczych, dyscyplina: Technologia żywności i żywienie, specjalność: Biotechnologia żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,

Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Studia nad wytwarzaniem egzopolisacharydów przez termofilne bakterie fermentacji mlekowej”*, promotor: Prof. dr hab. Andrzej Babuchowski, recenzenci: Prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski, Prof. dr hab. Kazimierz Kornacki

1998 Magister inżynier, dyscyplina: Technologia żywności i żywienie człowieka, specjalność: Biotechnologia żywności, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie

Tytuł pracy magisterskiej: *„Próba otrzymywania modyfikowanych ziaren kefirowych”* promotor: Prof. dr hab. Andrzej Babuchowski

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

2021 - obecnie **Adiunkt**, Katedra Inżynierii, Aparatury Procesowej i Biotechnologii Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

2005 - 2021 **Adiunkt**, Katedra Biotechnologii Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

2003 - 2005 **Technolog**, Katedra Biotechnologii Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

2002 - 2003 **Inżynier technolog**, Instytut Mleczarstwa w Warszawie, Stacja Doświadczalna w Olsztynie

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Wpływ procesów bio-technologicznych na immunoreaktywne właściwości białek pszenicy w aspekcie ich celiakotoksyczności”

4.2. Cykl powiązanych tematycznie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Omawiane osiągnięcie naukowe zostało przedstawione w postaci czterech artykułów naukowych, opublikowanych w języku angielskim:

A1. **Brzozowski B.**, Stasiewicz K. Effects of water stress on the composition and immunoreactive properties of wheat storage proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017, 97(4), 1134-1142, DOI: 10.1002/jsfa.7839

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 3(2)*	IF ₂₀₁₇ =2,379	MNiSW ₂₀₁₇ =35 pkt lista A
SCOPUS: 4(3)	IF ₂₀₂₁ =4,125	MEiN ₂₀₂₁ =100 pkt
	5-letni IF=4,096	

* w nawiasie liczba cytowań bez autocytacji

Mój wkład w przygotowanie artykułu obejmował:

(1) postawienie hipotezy badawczej, (2) opracowanie koncepcji i metodyki badań, (2) wykonanie doświadczeń, pomiarów i charakterystyki elektroforetycznej (elektroforeza dwukierunkowa 2D-NuPAGE, elektroforeza kapilarna FZCE i SDS-CE) i immunochemicznej białek (ELISA, Immunoblotting) (4) selekcję, analizę statystyczną, opracowanie i omówienie uzyskanych wyników, (5) opracowanie graficzne wyników, (6) opracowanie dyskusji wyników, (7) napisanie manuskryptu artykułu, (8) przygotowanie odpowiedzi na recenzje i finalną edycję manuskryptu.

A2. **Brzozowski B.** Immunoreactivity of wheat proteins modified by hydrolysis and polymerisation. *European Food Research and Technology*. 2016, 242(7), 1025-1040, DOI: 10.1007/s00217-015-2608-6

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 14(11)	IF ₂₀₁₆ =1,664	MNiSW ₂₀₁₆ =30 pkt lista A
SCOPUS: 13(11)	IF ₂₀₂₁ =3,498	MEiN ₂₀₂₁ =70 pkt
	5-letni IF=3,455	

Mój wkład w przygotowanie artykułu obejmował:

(1) postawienie hipotezy badawczej, (2) opracowanie koncepcji i metodyki badań, (2) wykonanie doświadczeń w zakresie biosyntezy enzymów i ich zastosowanie w hydrolizie białek pszenicy (3) wykonanie pomiarów aktywności enzymów, ocenę średniej długości polipeptydów, ocenę stopnia hydrolizy białek i ich charakterystykę elektroforetyczną (jednokierunkowa elektroforeza NuPAGE i elektroforeza kapilarna FZCE) i immunochemiczną (ELISA) (4) selekcję, analizę statystyczną, opracowanie i omówienie uzyskanych wyników, (5) opracowanie graficzne wyników, (6) opracowanie dyskusji wyników, (7) napisanie manuskryptu artykułu, (8) przygotowanie odpowiedzi na recenzje i finalną edycję manuskryptu.

A3. **Brzozowski B.**, Stasiewicz K., Ostolski M., Adamczak M. Reducing immunoreactivity of gliadins and coeliac-toxic peptides using peptidases from *L. acidophilus* 5e2 and *A. niger*. *Catalysts*. 2020, 10, 923. DOI: 10.3390/catal10080923

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 3(3)	IF ₂₀₂₀ =4,146	MNiSW ₂₀₂₀ =100 pkt
SCOPUS: 3(3)	IF ₂₀₂₁ =4,501	MEiN ₂₀₂₁ =100 pkt
	5-letni IF=4,641	

Mój wkład w przygotowanie artykułu obejmował:

(1) postawienie hipotezy badawczej, (2) opracowanie koncepcji i metodyki badań, (2) wykonanie doświadczeń w zakresie biosyntezy enzymów i ich zastosowania w hydrolizie gliadyn i peptydów (3) wykonanie pomiarów aktywności enzymów, ocenę stopnia hydrolizy gliadyn i peptydów i ich charakterystykę elektroforetyczną (dwukierunkowa elektroforeza 2D-NuPAGE i elektroforeza kapilarna FZCE) i immunochemiczną (ELISA, Immunoblotting) (4) współudział w selekcji, analizie statystycznej, opracowaniu i omówieniu uzyskanych wyników, (5) opracowanie graficzne wyników, (6) opracowanie dyskusji wyników, (7) napisanie manuskryptu artykułu, (8) przygotowanie odpowiedzi na recenzje i finalną edycję manuskryptu.

A4. Brzozowski B. Impact of food processing and simulated gastro-intestinal digestion on gliadin immunoreactivity in rolls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018, 98(9), 3363-3375, DOI: 10.1002/jsfa.8847

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNIŚW/MEiN
Web of Science: 4(3)	IF ₂₀₁₈ =2,379	MNIŚW ₂₀₁₈ =35 pkt lista A
SCOPUS: 4(3)	IF ₂₀₂₁ =4,125	MEiN ₂₀₂₁ =100 pkt
	5-letni IF=4,096	

Mój wkład w przygotowanie artykułu obejmował:

(1) postawienie hipotezy badawczej, (2) opracowanie koncepcji i metodyki badań, (2) wykonanie doświadczeń w zakresie biosyntezy enzymów i ich zastosowanie w produkcji modyfikowanych bułek pszennych (3) wykonanie pomiarów aktywności enzymów, ocenę średniej długości polipeptydów, ocenę stopnia hydrolizy białek i ich charakterystykę elektroforetyczną (jednokierunkowa elektroforeza NuPAGE i elektroforeza kapilarna FZCE) i immunochemiczną (ELISA) (4) selekcję, analizę statystyczną, opracowanie i omówienie uzyskanych wyników, (5) opracowanie graficzne wyników, (6) opracowanie dyskusji wyników, (7) napisanie manuskryptu artykułu, (8) przygotowanie odpowiedzi na recenzje i finalną edycję manuskryptu.

Liczba punktów MNIŚW/MEiN zgodnie z rokiem wydania: 200 pkt

Impact Factor zgodnie z rokiem wydania: 10,568

Liczba cytowań wg Web of Science na dzień 22 luty 2023 r.: 24 (19 bez autocytowań)

Liczba cytowań wg SCOPUS na dzień 22 luty 2023 r.: 24 (19 bez autocytowań)

4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.3.1. Wstęp

Celiakia (enteropatia jelita cienkiego, choroba trzewna) jest przewlekłą chorobą jelita cienkiego o podłożu autoimmunologicznym występującą zarówno u dzieci, jak i osób dorosłych. Badania epidemiologiczne szacują, że dotyka ona 1-3 % populacji ludzkiej. Czynnikiem wyzwalającym jej rozwój jest spożywanie białek glutenu pszenicy, jęczmienia lub żyta przez osoby predysponowane genetycznie, u których obserwuje się uszkodzenie nabłonka jelita cienkiego, zanik kosmków i hyperplazję krypt. Następstwem tych zmian są zaburzenia żołądkowo-jelitowe, zmniejszenie przyswajania składników odżywczych, chroniczne zmęczenie oraz zwiększenie ryzyka rozwoju chorób nowotworowych jelita (Di Sabatino i Corazza, 2009; Gilissen i wsp., 2014; Catassi i wsp., 2005).

W etiologii celiakii kluczową rolę odgrywają uwalniane z glutenu peptydy bogate w prolinę i glutaminę wyzwalające nieprawidłową odpowiedź układu immunologicznego. Prolina ze względu na cykliczną budowę przestrzenną wpływa na strukturę drugo- i trzeciorzędową peptydów i białek, warunkując ich właściwości biologiczne. W łańcuchu polipeptydowym odpowiada ona za tworzenie β -zwrotów tworząc bardziej upakowaną przestrzennie strukturę, niż α -helisa (Simpson, 2001).

Występowanie w sekwencji aminokwasów obok siebie reszt proliny powoduje, że wiązania peptydowe utworzone przy jej udziale są odporne na działanie enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego człowieka i mogą przenikać barierę jelita (Shan i wsp. 2005). Obecność reszt glutaminy w peptydach uwalnianych z glutenu powoduje, że są one dobrym substratem do reakcji z transglutaminazą tkankową (tTG) (Stamnaes i wsp., 2008). Deamidacja glutaminy do kwasu glutaminowego zwiększa powinowactwo peptydów do antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC II (HLA-DQ2), które eksponowane są pomocniczym limfocytom T CD4⁺. Występowanie celiakii jest silnie skorelowane z ekspresją cząsteczek HLA-DQ2 i HLA-DQ8. U od 90 do 95 % osób cierpiących na enteropatię jelita cienkiego stwierdza się haplotyp HLA-DQ2, zaś u od 5 do 10 % haplotyp HLA-DQ8. Rolą tych cząsteczek jest prezentacja obcych antygenów własnym komórkom T CD4⁺, które po ich rozpoznaniu i aktywacji produkują cytokiny. Cytokiny limfocytów Th2 mogą aktywować i stymulować komórki B do produkcji przeciwciał IgA skierowanych przeciw peptydom uwalnianym z glutenu i przeciw transglutaminazie tkankowej. Z kolei cytokiny limfocytów Th1 wywołują stan zapalny w obrębie jelita poprzez stymulację fibroblastów do wydzielania metaloproteinaz i zwiększenie cytotoksyczności śród nabłonkowych limfocytów w kierunku enterocytów prowadzącą do apoptozy nabłonka. Powoduje to zwiększenie przenikania celiakotoksycznych peptydów przez barierę nabłonkową jelita. Następuje atrofia kosmków i hiperplazja uchyłków jelitowych (Arentz-Hansen i wsp., 2002; Ciccocioppo i wsp., 2005; Deking i wsp., 2008; Vader i wsp. 2002).

U osób z celiakią, komórki T CD4⁺ stymulowane są fragmentami peptydów uwalnianymi z gliadyn np. α (93-106), γ (60-79), γ (102-113), w sekwencji których stwierdza się dużą zawartość proliny i glutaminy. Peptydy uszkodzające w warunkach *in vitro* komórki nabłonka osób z chorobą trzewną zawierają w swojej budowie molekularnej jeden z następujących motywów sekwencji aminokwasowych tj.: PSQQ, QQQP, QQPYP lub QPYP, wśród których również występuje prolina i glutamina. Homologiczne motywy strukturalne znajdują się w hordeinach jęczmienia i sekalinach żyta (Arentz-Hansen i wsp., 2002; Ciccocioppo i wsp., 2005; Deking i wsp., 2008; Shan i wsp., 2002).

Najskuteczniejszym sposobem zahamowania rozwoju celiakii jest dieta eliminująca z jadłospisu osób chorych produkty zawierające gluten. Za żywność bezglutenową uważa się produkty, w których stężenie glutenu jest mniejsze niż 20 mg kg⁻¹. W produktach o niskiej zawartości glutenu jego stężenie nie powinno przekraczać 100 mg kg⁻¹ (Codex Alimentarius, 2008).

Na jakość i stężenie białek glutenowych w ziarniakach, stanowiących surowiec do produkcji mąki, mają wpływ warunki w jakich uprawiane są zboża. Rośliny hodowane w

warunkach polowych są narażone na działanie różnych czynników środowiskowych: biotycznych np. patogenów roślinnych i abiotycznych np. deficytu wodnego, stresu cieplnego, czy stresu osmotycznego (Brzozowski i wsp., 2008; Flagella i wsp., 2010; Wang i Frei, 2011). W warunkach środowiskowych z reguły na roślinę oddziałuje równocześnie kilka czynników stresogennych np. podwyższona temperatura i niedobór wody. Niekorzystne warunki podczas hodowli pszenicy mogą pogarszać jej właściwości technologiczne wynikające ze zmian jakości i ilości zarówno skrobi, jak i białek zapasowych (Singh i wsp., 2008).

Na ilość syntezowanego białka w ziarniakach ma wpływ dostępność wody, zarówno podczas wzrostu pszenicy, jak i kształtowania się ziarniaków. Niedobór wody podczas wzrostu rośliny przyczynia się do zmniejszenia wydajności plonu ziarna, zwiększenia ilości białka ogółem w ziarniakach i zwiększenia udziału frakcji wielocząsteczkowych kosztem mało-cząsteczkowych glutenin (Flagella i wsp., 2010). Natomiast wpływ deficytu wody w środowisku na skład i jakość białek zapasowych pszenicy podczas kształtowania się ziarniaków nadal nie jest do końca wyjaśniony. W badaniach Panozzo i wsp. (2001) nie stwierdzono wpływu stresu wodnego na proporcje gliadyn i glutenin w ziarniakach. Z innych badań wynika, że niedobór wody powoduje zwiększenie ilości glutenu w ziarniakach, przy czym ilość gliadyn w warunkach stresu maleje kosztem zwiększenia udziału glutenin (Flagella i wsp., 2010). Stres wodny podczas rozwoju pszenicy powoduje zmniejszenie w ziarniakach ilości albumin i globulin, γ -gliadyn i glutenin w porównaniu do białek ziarniaków pszenicy nie poddanej działaniu czynnika stresogennego (Konopka i wsp., 2007). Zmiany składu i jakości białek zapasowych pszenicy będące wynikiem odpowiedzi rośliny na niedobór wody mogą wpływać ich właściwości immunoreaktywne.

Przetworzone ziarno pszenicy konsumowane w postaci np. makaronów i pieczywa jest głównym składnikiem codziennej diety, oraz jest jedną z najczęstszych przyczyn alergii oraz nietolerancji pokarmowych (Rizzello i wsp., 2006). Z powodu względnie dużego spożycia produktów zbożowych w naszej codziennej diecie, to właśnie białka pszenicy są uznane, jako potencjalne źródło alergii i nietolerancji pokarmowych (Battais i wsp., 2005).

Alternatywnym do diety rozwiązaniem jest usunięcie lub modyfikacja celiakotoksycznych i immunoreaktywnych fragmentów łańcuchów polipeptydowych na etapie produkcji żywności lub poprzez wspomaganie trawienia białek w przewodzie pokarmowym człowieka. Eliminacja immunogennego potencjału peptydów polega na degradacji lub modyfikacji struktury epitopów rozpoznawanych przez komórki układu immunologicznego z zastosowaniem prolino- lub glutamino-specyficznych enzymów. W tym celu stosuje się m.in. endopeptydazę prolinową (EPP), transglutaminazę (TG), peptydazy syntezowane przez bakterie fermentacji mlekowej (BFM), grzyby strzępkowe oraz rodzime peptydazy zbóż (Gass i wsp., 2007; Gobbetti i wsp., 2007).

Istotną rolę w uwalnianiu biologicznie aktywnych peptydów z białek, wchodzących w skład produktów spożywczych, pełni trawienie żywności w przewodzie pokarmowym człowieka. Alergenność i immunogenność białek zmienia się nie tylko procesach technologicznych stosowanych w przetwarzaniu surowców do produktu

spożywczego, ale również podczas ich przemian w układzie pokarmowym. Rozpatrując wpływ procesów technologicznych na właściwości białek modulujące układ immunologiczny, należy zwrócić uwagę na produkty ich przemian uwalniane w procesie hydrolizy pepsyną w środowisku kwasowym żołądka, a następnie hydrolizy w warunkach lekko zasadowych enzymami trzustkowymi tj. trypsyną, chymotrypsyną, elastazą i karboksypeptydazą uwalnianych do dwunastnicy oraz enzymami zlokalizowanymi w mikrokosmkach nabłonka jelita (Gass i wsp., 2007). Dlatego też istotna jest ocena alergenicności i immunoreaktywności nie tylko gotowej żywności, ale również produktów jej trawienia.

W prezentowanym cyklu publikacji zaprezentowano wpływ wybranych operacji technologicznych i biotechnologicznych na zmiany właściwości immunoreaktywnych białek pszenicy istotnych w etiologii celiakii od surowca do produktu gotowego z uwzględnieniem procesów jego trawienia w układzie modelowym przewodu pokarmowego.

Za główny **cel badań cyklu publikacji** tworzących osiągnięcie naukowe przyjęto:

- Określenie wpływu wybranych warunków hodowli pszenicy na zawartość immunoreaktywnych białek istotnych w etiologii celiakii.
- Określenie wpływu modyfikacji enzymatycznych białek pszenicy katalizowanych transglutaminazą i peptydazami na ich właściwości immunoreaktywne.
- Określenie możliwości zastosowania mieszaniny peptydaz syntezowanych przez *L. acidophilus* i *A. niger* w hydrolizie gliadyn i celiakotoksycznych peptydów.
- Określenie wpływu fermentacji ciasta i wypieku pieczywa pszennego na peptydy uwalniane podczas trawienia i ich właściwości immunoreaktywne.

4.3.2. Omówienie wyników badań

Określenie wpływu wybranych warunków hodowli pszenicy na zawartość immunoreaktywnych białek istotnych w etiologii celiakii.

Wstępne badania własne oraz literaturowe wykazały, że jednym z czynników abiotycznych istotnie wpływającym na stężenie i jakość białek w ziarniakach pszenicy jest dostępność wody i związany z nią stres wodny. W doświadczeniach zastosowano próbki ziarna pszenicy odmian: Nawra (allele glutenin N-7+8-5+10) i Tonacja (allele glutenin 2*-7+9-2+12) pochodzące z Zakładu Doświadczalnego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego (UWM) w Bałtynach. Doświadczenie wazonowe przeprowadzono w szklani doświadczalnej UWM w Olsztynie stosując nawodnienie gleby w zakresie optymalnym 60-70 % kapilarnej pojemności wodnej (kpw) i 30-35 % kpw odpowiadające działaniu suszy. Zmniejszoną wilgotność podłoża stosowano od momentu kwitnienia pszenicy do zbioru ziarniaków, aby symulować warunki odpowiadające suszy. Omawiane badania zrealizowano w ramach projektu PBZ-KBN 097/P06/2003 „Identyfikacja i sposoby przeciwdziałania toksyczności i alergenicności białek ważnych roślin uprawnych”.

Celem przeprowadzonych doświadczeń było zweryfikowanie hipotezy, czy hodowla pszenicy w warunkach deficytu wodnego wpływa na właściwości immunoreaktywne białek ziarniaków.

Zmniejszenie wilgotności podłoża z 60-70 do 30-35 % kapilarnej pojemności wodnej podczas rozwoju pszenicy powoduje formowanie mniejszych ziarniaków i zawierających mniej białka. Analiza składu frakcyjnego białek wykazała, że obie odmiany pszenicy syntezują mniejsze ilości gliadyn i glutenin w ziarniakach podczas suszy. W ziarniakach Nawry odnotowano zmniejszenie syntezy gliadyn i glutenin odpowiednio o 11,9 i 20,8 %. Mniejsze ilości białek zapasowych stwierdzono również w ziarniakach pszenicy Tonacja w warunkach niedoboru wody. Ilość syntezowanych gliadyn i glutenin zmniejszyła się odpowiednio o 29,1 i 13,5 %.

Elektroforeza dwukierunkowa białek wykazała zmiany proteomu w próbkach obu badanych odmian pszenicy poddanej stresowi wodnemu. Analiza porównawcza obrazów elektroforetycznych białek ziarniaków pszenicy odmiany Nawra poddanych stresowi wodnemu i kontrolnych wykazała, że 109 polipeptydów (75 %) ma takie same wartości mas cząsteczkowych i punktów izoelektrycznych. Pozostałe frakcje (25 %) to polipeptydy, których synteza została zahamowana w wyniku działania stresu wodnego. Hodowla pszenicy w warunkach stresu wodnego powoduje również indukcję syntezy 38 nowych białek. Zmiany w proteomie odnotowano również dla ziarniaków pszenicy Tonacja. Spośród białek próbki kontrolnej 159 (88 %) peptydów ma takie same wartości mas cząsteczkowych i punktów izoelektrycznych, jak peptydy próbki po stresie. Hodowla pszenicy Tonacja w warunkach suszy powoduje zahamowanie syntezy 24 polipeptydów oraz indukcję syntezy 21 nowych białek. Elektroforeza dwukierunkowa próbek białek ziarniaków pszenicy odmian Nawra i Tonacja, wykazała obecność dużej ilości polipeptydów w zakresie mas cząsteczkowych od 31 kDa do 55 kDa. Obszar ten, charakterystyczny dla białek zapasowych pszenicy uczestniczących w patogenezie alergii i celiakii, zawiera polipeptydy należące do frakcji α -, β -, γ -gliadyn i małowcząsteczkowych glutenin – LMW-GS (28-39 kDa) oraz frakcji $\omega_{1,2}$ - (39-44 kDa) i ω_5 -gliadyn (49-55 kDa) (Wieser, 2007; Vensel i wsp., 2014).

Zmiany składu białek zapasowych ziarniaków zbóż potwierdzono również z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej. Niedobór wody powoduje zmniejszenie udziału frakcji α/β i γ w gliadynach ogółem. Hodowla pszenicy w warunkach stresu powoduje zwiększenie ilości ω -gliadyn o 4,5 i 43,3 % dla odmian odpowiednio Nawra i Tonacja. Hodowla pszenicy odmian Nawra i Tonacja w warunkach ubogich w wodę powoduje zmiany jakościowe białek, w tym również białek o charakterze alergennym i celiakotoksycznym.

Stres wodny sprzyja zwiększeniu udziału proliny (P) i glutaminy (Q) /kwasu glutaminowego (E) w gliadynach. Gliadyny izolowane z ziarniaków pszenicy Nawra po stresie wodnym, zawierają więcej P ($16,2 \pm 0,6$ mol%), niż gliadyny z próbki kontrolnej ($14,6 \pm 0,7$ mol%). Podobnie więcej P ($17,4 \pm 0,6$ mol%) oznaczono w gliadynach z pszenicy Tonacja hodowanej w warunkach deficytu wodnego, niż w gliadynach z próbki kontrolnej ($14,9 \pm 0,7$ mol%). Należy zwrócić uwagę, że cechą charakterystyczną peptydów ważnych w etiologii alergii i celiakii jest duża zawartość P i Q (Tuckova i wsp., 2012, Wieser i Koehler, 2008). Większa zawartość reszt P i Q/E w próbkach ziarniaków pszenicy hodowanej w warunkach obniżonej kapilarnej pojemności wodnej podłoża do 30-35 %

powoduje większą reaktywności gliadyn z przeciwciałami IgE od osób ze stwierdzoną alergią, jak również z przeciwciałami R5.

Ziarniaki pszenicy hodowanej w warunkach stresu wodnego charakteryzują się większą zawartością gliadyn, niż ziarniaki formowane w warunkach optymalnego uwodnienia gleby. Ilość gliadyn w próbkach pszenicy Nawra i Tonacja poddanych stresowi, wyznaczona metodą sandwich R5 ELISA, wynosiła odpowiednio 52208 ± 98 i 49091 ± 62 mg kg^{-1} . Natomiast zawartość gliadyn w próbkach kontrolnych była mniejsza i wynosiła 50263 ± 56 i 47132 ± 58 mg kg^{-1} odpowiednio dla pszenicy odmiany Nawra i Tonacja. Testy kompetycyjne ELISA wykrywające sekwencje QQFP obecne w gliadynach również wykazały większą immunoreaktywność gliadyn w próbkach pszenicy hodowanej w warunkach stresu wodnego, niż w próbkach pszenicy kontrolnej.

W warunkach deficytu wodnego rośliny te akumulują w ziarniakach prolaminę reagującą z przeciwciałami od osób z alergią na gluten. Przeciwciała IgE łączyły się z białkami występującymi w obszarze mas cząsteczkowych od 36 do 55 kDa charakterystycznego dla ω -gliadyn oraz od 24 do 36 kDa odpowiadającego frakcjom α -, β - i γ -gliadynom. Western-blotting wykazał, że w obszarze mas cząsteczkowych od 24 do 29 kDa próbki białek ulegają intensywniejszemu wybarwieniu, co świadczy o obecności większej ilości białek rozpoznawanych przez przeciwciała. Stwierdzono również obecność białek w zakresie mas cząsteczkowych od 20 do 24 kDa w próbce prolamin izolowanych z pszenicy odmiany Tonacja poddanej stresowi wodnemu, a nieobecne w próbce kontrolnej.

Do głównych osiągnięć przeprowadzonych badań można zaliczyć wykazanie, że:

- deficyt wody występujący od kwitnienia do wykształcenia ziarniaków pszenicy powoduje zmiany ilości i składu białek syntezowanych i gromadzonych w ziarniakach,
- zmniejszenie dostępności wody zmienia skład frakcyjny gliadyn zwiększając w nich udział ω -gliadyn oraz zwiększa ilości reszt proliny i glutaminy/kwasu glutaminowego w gliadynach,
- stres wodny powoduje zwiększenie immunoreaktywności gliadyn z przeciwciałami R5 wykrywającymi epitopy celiakotoksyczne i reaktywność z przeciwciałami IgE od osób z alergią na gluten.

Przedstawione wyniki badań opisano w publikacji A2 (Załącznik 4 – 2.A1):

- ✓ **Brzozowski B.**, Stasiewicz K. Effects of water stress on the composition and immunoreactive properties of wheat storage proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017, 97(4), 1134-1142, DOI: 10.1002/jsfa.7839

Określenie wpływu modyfikacji enzymatycznych białek pszenicy katalizowanych transglutaminazą i peptydazami na ich właściwości immunoreaktywne.

W degradacji białek glutenu wykorzystuje się aparat enzymatyczny aktywnych fizjologicznie bakterii fermentacji mlekowej. Jednak ze względu na małą aktywność enzymów zewnątrzkomórkowych tych mikroorganizmów hydroliza białek może trwać

nawet 24-48 godzin (Gobbetti i wsp., 2007). Wstępna hydroliza prolamin zbóż jest więc prowadzona przez endogenne enzymy proteolityczne ziarniaków lub dodawane do mąki peptydazy grzybowe, a następnie uwolnione peptydy są dalej degradowane przez BFM (Rizzello i wsp., 2007).

W omawianych doświadczeniach zastosowano dodatek preparatu wewnątrzkomórkowych peptydaz, syntezowanych przez BFM, do hydrolizy mąki pszennej, co eliminuje konieczność oczekiwania na wzrost komórek mikroorganizmów. Wstępne badania realizowane w ramach projektu N312 066 31/3701 „Zastosowanie wysokowydajnego skringu mikroorganizmów i metod bioinżynierii w pozyskiwaniu peptydaz prolinowych przydatnych w degradacji peptydów immunoreaktywnych w żywności” pozwoliły na wyselekcjonowanie 2 szczepów bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus acidophilus* 5e2 i *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20663 degradujących białka zapasowe pszenicy. Z biomasy bakterii izolowano frakcję cytoplazmatyczną komórek zawierającą peptydazy wykazujące zdolność do hydrolizy wiązań peptydowych utworzonych przez reszty proliny. Ponadto w doświadczeniach zastosowano endopeptydazę prolinową (EPP) syntezowaną przez *Aspergillus niger* i transglutaminazę (TG) syntezowaną przez *Streptoverticillium mobaraense*.

Badania zrealizowano w ramach projektu N N312 170739 „Charakterystyka znaczenia aktywności inhibitorów enzymów proteolitycznych w procesie wyrobu pieczywa i jego trawienia z uwzględnieniem oddziaływań alergicznych i patogenezы celiakii”. Modyfikacje enzymatyczne (30 °C, 3 h, dawka enzymu 10 U g⁻¹ mąki) białek pszenicy obejmowały hydrolizę, sieciowanie, hydrolizę białek uprzednio sieciowanych oraz sieciowanie ich hydrolizatów.

Celem doświadczeń było zweryfikowanie hipotezy, czy enzymatyczne modyfikacje białek pszenicy, jedno- i dwuetapowe, zmniejszają ich immunoreaktywność do poziomu bezpiecznego dla osób z celiakią.

Zastosowanie preparatu peptydaz z *L. acidophilus* 5e2 (LA) i *L. sanfranciscensis* DSM20663 (LS) umożliwia głębszą hydrolizę białek, niż przy zastosowaniu endopeptydazy prolinowej z *A. niger* (EPP). Wynika to z faktu, że BFM syntezują mieszaninę peptydaz o szerokim spektrum działania i różnej specyficzności względem reszt aminokwasowych tworzących wiązania peptydowe w łańcuchu polipeptydowym. Natomiast ilość wiązań degradowanych przez endopeptydazę prolinową jest ograniczona do tych utworzonych przynajmniej przez jedną resztę proliny (Stepniak i wsp., 2006). Zróżnicowana degradacja frakcji gliadyn przez endopeptydazę prolinową wynika z różnej zawartości reszt proliny. Ilość tego aminokwasu we frakcjach $\alpha\beta$, γ i ω wynosi odpowiednio 16, 17 i 23 mol%. Ponadto obecność reszt cysteiny w C-końcowej domenie $\alpha\beta$ - i γ -gliadyny umożliwia utworzenie odpowiednio trzech i czterech wewnątrzcząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych (Wieser, 2007), które mogą zmniejszać dostępność wiązań peptydowych utworzonych przez prolinę. Natomiast ω -gliadyna prawie w ogóle nie zawiera reszt cysteiny i tym samym nie bierze udziału w tworzeniu wiązań dwusiarczkowych. Zawartość reszt proliny umożliwia uszeregowanie gliadyn od frakcji $\alpha\beta$, najmniej podatnej na hydrolizę katalizowaną przez endopeptydazę prolinową, przez frakcję γ , do frakcji ω degradowanej w największym stopniu.

Zrealizowane przeze mnie doświadczenia wykazały, że dodatek pojedynczych preparatów enzymów wewnątrzkomórkowych z *L. acidophilus* 5e2 i *L. sanfranciscensis* DSM20663 oraz endopeptydazy prolinowej z *A. niger* w dawce 10 U g⁻¹ mąki obniża jej immunoreaktywność o co najmniej 35 % w czasie 3 godzin. W doświadczeniach zastosowałem przeciwciała monoklonalne R5 wykrywające m.in. sekwencje aminokwasów QQFPF, LQLQFPF, QLPYP, PQPF i PQQFPF obecne w strukturze pierwszorzędowej gliadyn. Skuteczność degradacji celiakotoksycznych fragmentów peptydów potwierdzono stosując elektroforezę kapilarną. Zmiana zawartości gliadyn w próbkach hydrolizowanych przez LA, LS i EPP wynosiła odpowiednio ok. 35, 40 i 20 % w stosunku do próbki natywnej.

W modyfikacji białek zbóż zastosowałem również transglutaminazę należącą do grupy acylotransferaz i katalizującą reakcję przeniesienia grupy acylowej pomiędzy grupą γ -karboksamidową glutaminy, a różnymi pierwszorzędowymi grupami aminowymi różnych związków w tym białek. Enzym ten może katalizować reakcję deamidacji przenosząc grupę acylową glutaminy na cząsteczkę wody z wytworzeniem kwasu glutaminowego i amoniaku. Z kolei sieciowanie białek następuje w wyniku transamidacji, czyli wytworzenia wiązania kowalencyjnego ϵ -(γ -Q)-K między grupą ϵ -aminową lizyny jednego białka i grupą γ -karboksamidową glutaminy drugiego białka (Yokoyama i wsp., 2004). W środowisku kwaśnym TG katalizuje przede wszystkim reakcje deaminacji glutaminy do kwasu glutaminowego. Podczas, gdy w środowisku alkalicznym przeważają reakcje transamidacji i tworzą się wiązania między łańcuchami polipeptydowymi (Dekking i wsp., 2008). Moje doświadczenia wykazały również zdolność sieciowania białek przez TG w środowisku o odczynie zasadowym. Wraz ze zmniejszaniem się kwasowości środowiska wydłuża się średnia długość łańcuchów polipeptydowych, co świadczy o tworzeniu wiązań poprzecznych między polipeptydami i tworzeniu struktur zagregowanych białek. Modyfikacje białek z zastosowaniem TG prowadzone w środowisku kwaśnym wykazały niewielkie zmiany w średniej długości łańcuchów polipeptydowych, ale ich immunoreaktywność wzrosła od 6,6 do 41,4 % w porównaniu do próbki natywnej. Obserwacje te sugerują, że w środowisku kwaśnym transglutaminaza katalizuje przede wszystkim reakcje deamidacji.

Gliadyny i gluteniny ze względu na dużą zawartość reszt glutaminy, odpowiednio 35-56 i 36-38 mol%, stanowią bardzo dobry substrat do reakcji z TG (Wieser, 2007). Niestety zawartość lizyny w białkach zapasowych pszenicy jest niewielka i wynosi 0,7 i 1,2 mol% odpowiednio dla gliadyn i glutenin. Z kolei w całych ziarniakach i mące pszennej stężenie tego aminokwasu wynosi odpowiednio 2,8 i 2,2 mol% (Shewry, 2007). Przy dużej podaży reszt glutaminowych czynnikiem ograniczającym tworzenie wiązań izopeptydowych jest zawartość w białkach reszt lizyny. W gliadynach jej stężenie wynosi maksymalnie 0,6 mol%, 0,9 mol% i 0,6 mol%, odpowiednio dla frakcji α , γ i ω . Z kolei w LWM- i HMW-gluteninach zawartość lizyny wynosi odpowiednio 0,6 i 1,1 mol% (Gianibelli i wsp., 2001). W środowisku o małej zawartości lizyny lub jej braku, transglutaminaza będzie katalizować reakcje deamidacji grup karboksamidowych reszt glutaminy tworząc kwas glutaminowy, co zwiększa immunoreaktywność peptydów

poprzez wzrost ich powinowactwa do antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC II (HLA-DQ2) (Dekking i wsp., 2008).

Dostępności aminokwasów w próbkach białek pszenicy można zwiększyć prowadząc wstępną ich hydrolizę. Degradacja polipeptydów przez peptydazy LA i LS uwalnia peptydy będące później substratem do reakcji z TG. Zaproponowany proces plasteinizacji zmniejszał immunoreaktywność białek pszenicy. Plasteiny pozyskane w wyniku działania peptydaz LS i następnie TG charakteryzowały się najwyższą immunoreaktywnością ($97,6 \pm 2,9$ %). Wynika to z większych uzdolnień preparatu peptydaz LS do degradacji białek pszenicy (DH $14,45 \pm 0,11$ %), niż pozostałych preparatów EPP (DH $1,69 \pm 0,01$ %) i LA ($12,23 \pm 0,07$ %). Należy zwrócić uwagę, że modyfikacje białek mąki prowadzono w środowisku wodnym przy początkowej kwasowości pH 6,2. Moje badania wykazały, że w środowisku kwaśnym TG katalizuje głównie reakcje deamidacji. Tak więc, wstępna hydroliza białek z zastosowaniem wewnątrz-komórkowych peptydaz i endopeptydazy prolinowej uwalnia różną ilość peptydów, które później ulegają sieciowaniu i/lub deamidacji. Z kolei mniejszą immunoreaktywność hydrolizatów białek wstępnie usieciowanych, niż natywnych, można tłumaczyć wstępną polimeryzacją peptydów i wytworzeniem iso-wiązań. Zmiany konformacyjne białek utrudnią dostępność do wiązań peptydowych enzymom proteolitycznym, jak i przeciwciałom rozpoznającym sekwencję QQFPF.

Według Codex Alimentarius (2008) tylko żywność zawierająca mniej niż 20 mg kg^{-1} glutenu może być oznaczana jako produkt bezglutenowy. Żywność zawierająca od 20 do 100 mg kg^{-1} może być oznaczana jako żywność o małej zawartości glutenu. Zaproponowane w doświadczeniach modyfikacje enzymatyczne białek pszenicy umożliwiają zmniejszenie zawartości glutenu z 61400 mg kg^{-1} dla próbki mąki natywnej do 7200 mg kg^{-1} przy zastosowaniu TG w środowisku o pH 8,5. Tak więc, to wciąż za dużo, aby oznaczyć tę mąkę jako bezglutenową, czy o małej zawartości glutenu. Mąka modyfikowana nie jest produktem końcowym i należy ją traktować jako surowiec o obniżonej zawartości glutenu. Proponowana enzymatyczna metoda redukcji immunoreaktywności białek pszenicy może być stosowana jako dodatkowy etap modyfikacji mąki w produkcji pieczywa.

- Do głównych osiągnięć przeprowadzonych badań można zaliczyć wykazanie, że:
- reakcje katalizowane transglutaminazą wraz ze zwiększaniem się zasadowości środowiska powodują zmiany składu frakcyjnego gliadyn poprzez efektywniejsze sieciowanie ω -gliadyn i zmniejszenie immunoreaktywności białek,
 - hydroliza białek katalizowana endopeptydazą prolinową z *A. niger* i peptydazami z *L. acidophilus* 5e2 and *L. sanfranciscensis* DSM20663 sprzyja degradacji głównie HMW-glutenin i ω -gliadyn,
 - biała zapasowe ziarniaków pszenicy degradowane peptydazami z *L. acidophilus* 5e2 (LA) i *L. sanfranciscensis* DSM20663 (LS) charakteryzują się mniejszą immunoreaktywnością niż te degradowane endopeptydazą prolinową z *A. niger*, czy sieciowane transglutaminazą z *S. mobaraense* (TG),

- dwuetapowa enzymatyczna modyfikacja mąki pszennej zmniejsza immunoreaktywność hydrolizatów białek usieciowanych w wyniku reakcji katalizowanych transglutaminazą/peptydazą LS, jak i białek sieciowanych transglutaminazą po hydrolizie peptydazami LS w odniesieniu do mąki natywnej,
- proponowane metody enzymatycznej jedno- i dwuetapowej redukcji immunoreaktywności białek ziarniaków pszenicy mogą być wykorzystane jako dodatkowy etap modyfikacji mąki w technologii produkcji pieczywa.

Przedstawione wyniki badań opisano w publikacji A1 (*Załącznik 4 – 2.A2*):

- ✓ **Brzozowski B.** Immunoreactivity of wheat proteins modified by hydrolysis and polymerisation. *European Food Research and Technology*. 2016, 242(7), 1025-1040, DOI: 10.1007/s00217-015-2608-6

Określenie możliwości zastosowania mieszaniny peptydaz syntezowanych przez *L. acidophilus* i *A. niger* w hydrolizie gliadyn i celiakotoksycznych peptydów.

Zastosowanie bakterii fermentacji mlekowej do degradacji białek pszenicy nie zawsze jest efektywne, np. *L. sakei* TMW 1.22, *L. plantarum* TMW 1.468 i *L. sanfranciscensis* TMW 1.53 izolowane z zakwasu chlebowego, mimo iż, syntezowały enzymy proteolityczne, to w niewielkim stopniu hydrolizowały gluten (Wieser i wsp., 2008). Zwiększenie wydajności hydrolizy białek zbóż, możliwe jest po zastosowaniu mieszaniny enzymów syntezowanych przez kilka szczepów BFM albo dodatku peptydaz innego pochodzenia, np. grzybowego (Gerez i wsp., 2012; Rizzello i wsp., 2006, 2007).

Doświadczenia zaprezentowane w publikacji A2 wykazały, że enzymatyczna modyfikacja jedno i dwuetapowa białek pszenicy nie obniża ich immunoreaktywności do poziomu uznanego za bezpieczny dla osób z celiakią. Najlepsze rezultaty redukcji immunoreaktywności białek pszenicy odnotowano dla wariantu sieciowania białek z TG w środowisku o odczynie zasadowym o pH 8,5. Jednak ze względu na fakt, że ciasto pszenne prowadzone na zakwasie z udziałem BFM charakteryzuje się kwasowością w zakresie pH 4,0-6,5 to TG będzie głównie katalizowała reakcje deaminacji białek, a nie sieciowania. W kolejnych doświadczeniach zaproponowałem więc zastosowanie mieszaniny peptydaz syntezowanych przez BFM i endopeptydazy prolinowej do hydrolizy białek pszenicy. W doświadczeniach zastosowano dawkę mieszaniny peptydaz 100 U mg⁻¹ gliadyn. Czas hydrolizy wynosił 3 h i był prowadzony w środowisku o kwasowości pH 4,0 i pH 6,0, w 30 i 37 °C. Substratami w reakcjach hydrolizy były gliadyny izolowane z pszenicy odmiany Nawra oraz celiakotoksyczne peptydy o sekwencjach aminokwasowych: LGQQPFPPQQPY (P1) i PQPQLPYPQPQLP (P2).

Celem doświadczeń było zweryfikowanie hipotezy, czy hydroliza białek katalizowana przez mieszaninę peptydaz redukuje immunoreaktywność gliadyn oraz celiakotoksycznych peptydów do poziomu bezpiecznego dla osób z celiakią. Badania zrealizowano w ramach projektu N N312 170739 „Charakterystyka znaczenia aktywności inhibitorów enzymów proteolitycznych w procesie wyrobu pieczywa i jego trawienia z uwzględnieniem oddziaływań alergicznych i patogenyzy celiakii”.

Szczep *L. acidophilus* 5e2 syntezował enzymy proteolityczne wykazujące aktywność aminopeptydazową, karboksypeptydazową, endopeptydazową, w tym prolino-specyficzną istotną w degradacji immunoreaktywnych peptydów, bogatych w reszty proliny i glutaminy. Zastosowano dodatek preparatu wewnątrz-komórkowego peptydaz syntezowanych przez *L. acidophilus* 5e2 i endopeptydazy prolinowej syntezowanej przez *A. niger* w celu hydrolizy gliadyn izolowanych z pszenicy odmiany Nawra. Niezależnie od parametrów środowiska reakcji wszystkie próbki białek uległy hydrolizie, a największy stopień hydrolizy gliadyn, wynoszący $74,0 \pm 1,2$ %, uzyskano po 3 h reakcji, w 37 °C, w środowisku o odczynie pH 4,0. Pozostałe próbki gliadyn charakteryzowały się istotnie statystycznie ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test) mniejszym stopniem hydrolizy wynoszącym od $49,9 \pm 0,8$ do $66,4 \pm 0,7$ %. Zwiększenie kwasowości środowiska reakcji, z pH 6,0 do pH 4,0, powodowało zwiększenie istotnie statystycznie ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test) stopnia hydrolizy białek o 33,0 i 20,1 %, odpowiednio dla próbek inkubowanych w 30 i 37 °C. Również zwiększenie temperatury reakcji z 30 do 37 °C sprzyjało hydrolizie gliadyn i statystycznie istotnemu zwiększeniu ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test) stopnia degradacji białek o 11,4 i 23,4 % w środowisku o odczynie odpowiednio, pH 4,0 i pH 6,0.

Analizy immunochemiczne wykazały, że enzymatyczna hydroliza białek zmniejsza stężenie sekwencji aminokwasowych QQPFP w gliadynach, uznanych za celiakotoksyczne, wykrywanych przez przeciwciała R5. Stężenie peptydu QQPFP w próbce natywnej gliadyn wynosiło $47689,8 \pm 221,1$ mg kg⁻¹, a jej immunoreaktywność właściwa $269412,49 \pm 4831,01$ µg mg⁻¹. Hydrolizaty gliadyn, otrzymane w wyniku reakcji enzymatycznej w 37 °C i pH 4, charakteryzowały się istotnie statystycznie ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test) mniejszym stężeniem peptydu QQPFP wynoszącym $432,2 \pm 4,3$ mg kg⁻¹ i mniejszą immunoreaktywnością właściwą wynoszącą $0,08 \pm 0,00$ µg mg⁻¹, niż pozostałe próbki hydrolizatów. Po reakcji hydrolizy katalizowanej w 30 °C i pH 6,0 uzyskano najmniejszy stopień degradacji białek, w tym celiakotoksycznej sekwencji aminokwasowej QQPFP, której stężenie w tej próbce wynosiło $16097,5 \pm 118,1$ mg kg⁻¹. Hydrolizat ten charakteryzował się również największą immunoreaktywnością właściwą wynoszącą $4,15 \pm 0,00$ µg mg⁻¹. Zwiększenie temperatury środowiska reakcji z 30 do 37 °C zmniejszyło stężenie peptydu QQPFP w hydrolizatach zarówno w środowisku o odczynie pH 4,0 i pH 6,0, o odpowiednio 84,8 i 77,2 %. Immunoreaktywność względna wszystkich otrzymanych hydrolizatów gliadyn była istotnie statystycznie ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test) mniejsza niż w próbce natywnej. Najmniejszą immunoreaktywnością charakteryzowały się hydrolizaty gliadyn otrzymane w wyniku degradacji enzymatycznej w środowisku o odczynie pH 4,0 zarówno w 30 i 37 °C wynoszącą odpowiednio $3,97 \pm 0,08$ i $0,91 \pm 0,01$ %.

Gliadyny i ich hydrolizaty rozdzielano z zastosowaniem elektroforezy dwukierunkowej i identyfikowano ich właściwości immunoreaktywne z zastosowaniem przeciwciał R5. Natywne gliadyny charakteryzowały się obecnością 35 frakcji o masach cząsteczkowych od 28 do 65 kDa oraz punktach izoelektrycznych od pI 4,0 do pI 9,5 z czego 18 frakcji wykazywało właściwości immunoreaktywne. Porównanie obrazów elektroforetycznych białek natywnych i hydrolizowanych wykazało, że od 74,3 do 94,3 %

polipeptydów ma takie same wartości mas cząsteczkowych i punktów izoelektrycznych. Pozostałe frakcje (5,7-25,7 %) to polipeptydy uwolnione z gliadyn w wyniku degradacji enzymatycznej. W wyniku hydrolizy gliadyn ilość zidentyfikowanych peptydów zwiększyła się z 35 dla próbki natywnej do 37 i 38 dla próbek hydrolizatów. Na podstawie obrazów elektroforetycznych białek wykazano, że w zależności od warunków środowiska reakcji w wyniku hydrolizy z gliadyn uwalniane są polipeptydy w ilości od 5 do 11 o masach cząsteczkowych poniżej 28 kDa. Analiza immunochemiczna wykazała, że zarówno w przedziale mas cząsteczkowych 28-65 kDa charakterystycznym dla gliadyn nasywnych, jak i obszarze mas cząsteczkowych poniżej 28 kDa odpowiadającym uwolnionym polipeptydom występują frakcje białek wykazujące zdolność łączenia przeciwciał R5. Najmniejszą ilość frakcji (14 spotów) o właściwościach immunoreaktywnych odnotowano dla próbki gliadyn hydrolizowanych w 37 °C i środowisku o odczynie pH 4,0. Pozostałe hydrolizaty charakteryzowały się obecnością od 18 do 21 frakcji immunoreaktywnych.

Peptydazy syntezowane z *L. acidophilus* 5e2 i endopeptydazę prolinową z *A. niger* zastosowano również w hydrolizie peptydów o sekwencjach aminokwasowych LGQQQPFPPQQPY (P1) i PQQQLPYPQQQLP (P2) pełniących istotną rolę w patogenezie celiakii. Stopień hydrolizy peptydu P1 wynosił od 93,1±0,7 do 99,8±0,0 % w zależności od zastosowanych parametrów środowiska reakcji. Na podstawie rozdzielów elektroforetycznych z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej wykazano prawie całkowitą hydrolizę peptydu P1 w środowisku o odczynie pH 4,0 i 37 °C. Zarówno zmniejszenie temperatury i kwasowości środowiska zmniejszało istotnie statystycznie ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test) stopień hydrolizy peptydu o 4,3-6,9 %. Z kolei stopień hydrolizy peptydu P2 wynosił od 89,4±0,3 do 97,5±0,1 %. Podobnie jak w doświadczeniu z peptydem P1 jako substratem w największym stopniu hydrolizie peptydu P2 sprzyja środowisko o odczynie pH 4,0 i temperaturze 37 °C. Zmniejszenie temperatury środowiska reakcji z 37 do 30 °C i jego alkalizacja z pH 4,0 do pH 6,0 zmniejszało istotnie statystycznie ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test) stopień hydrolizy o 4,4-8,1 %.

Analizy immunochemiczne produktów hydrolizy peptydów P1 i P2 z zastosowaniem peptydaz z *L. acidophilus* 5e2 i endopeptydazy prolinowej wykazały zmniejszenie ich immunoreaktywności względnej. Produkty hydrolizy peptydów P1 i P2 charakteryzowały się immunoreaktywnością względną wynoszącą odpowiednio od 0,8±0,02 do 8,8±0,02 % oraz od 3,2±0,01 do 11,5±0,02 %. Najmniejsze wartości immunoreaktywności względnej odnotowano dla hydrolizatów uzyskanych w środowisku o odczynie pH 4,0 i temperaturze 37 °C. Zmiana odczynu środowiska reakcji, z pH 4,0 do pH 6,0, powodowała zwiększenie istotne statystycznie ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test) immunoreaktywności hydrolizatów peptydu P1 o 18,2 i 90,9 % odpowiednio dla próbek inkubowanych w 30 i 37 °C. Zwiększenie temperatury reakcji z 30 do 37 °C sprzyjało istotnej statystycznie ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test) redukcji immunoreaktywności peptydu P1 o 82,2 % w środowisku o odczynie pH 4,0 i jej zwiększeniu o 60,0 % w środowisku o odczynie pH 6,0. Podobne zależności odnotowano w doświadczeniu z zastosowaniem peptydu P2, tj. zwiększenie temperatury reakcji w

środowisku o wartości pH 4,0 redukuje immunoreaktywność hydrolizatu, a w środowisku o pH 6,0 zwiększa.

Możliwość powszechnego zastosowania aparatu enzymatycznego bakterii fermentacji mlekowej do redukcji immunoreaktywnych białek pszenicy ogranicza konieczność stosowania wielogodzinnej fermentacji. Rozwiązaniem wydaje się więc zastosowanie preparatu peptydaz syntezowanych przez BFM wraz z peptydazami grzybowymi do degradacji białek pszenicy. BFM syntezują mieszaninę peptydaz o szerokim spektrum działania i różnej specyficzności względem reszt aminokwasowych tworzących wiązania peptydowe w łańcuchu polipeptydowym, natomiast endopeptydaza prolinowa z *A. niger* hydrolizuje głównie wiązania peptydowe utworzone z udziałem reszt proliny (Di Cagno i wsp., 2004; Stepniak i wsp., 2006).

Oba zastosowane w doświadczeniach peptydy zawierają w swojej sekwencji aminokwasowej motyw QQFPF. Zastosowanie mieszaniny peptydaz z *L. acidophilus* 5e2 i endopeptydazy prolinowej zmniejszyło stężenie QQFPF w hydrolizatach celiakotoksycznych peptydów. Stężenie natywnego peptydu LGQQFPFPQQPY wynoszące $403,0 \pm 0,3$ mg kg⁻¹ zmniejszyło się do wartości od $3,2 \pm 0,1$ do $35,3 \pm 0,1$ mg kg⁻¹ w zależności od parametrów środowiska reakcji. Największe zmniejszenie stężenia sekwencji QQFPF o 99,2 % odnotowano po hydrolizie w środowisku reakcji o pH 4,0 i temperaturze 37 °C, najmniejsze zaś o 91,2 % w środowisku o pH 6,0 i 30 °C. Hydrolizaty peptydu P2 również charakteryzowały się mniejszym niż peptyd natywny ($401,8 \pm 0,3$ mg kg⁻¹) stężeniem sekwencji QQFPF wynoszącym od $12,8 \pm 0,2$ do $46,2 \pm 0,2$ mg kg⁻¹. Najmniejsze stężenie sekwencji QQFPF wynoszące $12,8 \pm 0,2$ mg kg⁻¹ odnotowano w hydrolizacie peptydu P2 uzyskany w środowisku o odczynie pH 4,0 i temperaturze 37 °C.

W powszechnie stosowanej technologii wyrobu pieczywa zrezygnowano z długotrwałej fermentacji z udziałem zakwasu chlebowego w skład którego wchodzi BFM odpowiedzialne za jego ukwaszenie i proteolizę, na rzecz zastosowania krótkotrwałych procesów z zastosowaniem różnego rodzaju polepszaczy pieczywa. Zastosowanie takiej technologii powoduje, że białka zbóż w czasie produkcji pieczywa są degradowane w niewielkim stopniu. Zmiana sposobu wytwarzania pieczywa i przeprowadzenie skutecznej degradacji immunoreaktywnych białek pszenicy w krótszym czasie w porównaniu do procesów tradycyjnych może być osiągnięta poprzez jednoczesne zastosowanie peptydaz syntezowanych BFM i grzyby.

Do głównych osiągnięć przeprowadzonych badań można zaliczyć wykazanie, że:

- w zależności do odczynu środowiska i temperatury hydroliza gliadyn i celiakotoksycznych peptydów zachodzi z różną wydajnością,
- degradacja gliadyn z udziałem peptydaz z *L. acidophilus* 5e2 i endopeptydazy prolinowej z *A. niger* prowadzona w środowisku o kwasowości pH 4,0 i w 37 °C zmniejsza stężenie gliadyn ponad 110 krotnie redukując immunoreaktywność względną hydrolizatu do 0,91 % wartości wyjściowej,
- hydroliza celiakotoksycznych peptydów o sekwencjach aminokwasowych LGQQFPFPQQPY i PQQPLPYPQQPLP zachodzi najwydajniej w środowisku o

kwasowości pH 4,0 i w 37 °C, dla których stopień hydrolizy wynosił 99,8±0,0 i 97,5±0,1 %,

- mieszanina peptydaz z *L. acidophilus* 5e2 i *A. niger* degraduje zarówno białka jak i peptydy odporne na hydrolizę enzymami przewodu pokarmowego człowieka, zmniejszając ich immunoreaktywność,
- mieszanina peptydaz z *L. acidophilus* 5e2 i *A. niger* zastosowana w czasie klasycznej fermentacji ciasta pszennego może skrócić czas potrzebny na degradację białek i produktów ich hydrolizy.

Przedstawione wyniki badań opisano w publikacji A4 (Załącznik 4 – 2.A3):

- ✓ **Brzozowski B.**, Stasiewicz K., Ostolski M., Adamczak M. Reducing immunoreactivity of gliadins and coeliac-toxic peptides using peptidases from *L. acidophilus* 5e2 and *A. niger*. *Catalysts*. 2020, 10, 923. DOI: 10.3390/catal10080923

Określenie wpływu fermentacji ciasta i wypieku pieczywa pszennego na peptydy uwalniane podczas trawienia i ich właściwości immunoreaktywne.

Zmianę właściwości biologicznych białek zbóż można prowadzić podczas produkcji pieczywa w czasie fermentacji i wyrobu zakwasu oraz ciasta chlebowego lub wspomagając procesy trawienia białek w przewodzie pokarmowym. Na etapie produkcji w modyfikacji białek zapasowych zbóż stosuje się enzymy, jak również mikroorganizmy m.in. BFM wchodzące w skład zakwasów chlebowych. Niestety, ze względu na małą aktywność zewnątrzkomórkową enzymów syntezowanych przez te mikroorganizmy degradacja białek może trwać nawet 24-48 godzin. Początkowo hydroliza białek zapasowych zbóż jest wynikiem działania endogennych enzymów ziarniaków lub peptydaz grzybowych dodawanych podczas formowania zakwasu, a następnie uwolnione peptydy są głębiej hydrolizowane przez peptydazy z BFM (Di Cagno i wsp., 2004; Rizzello i wsp., 2007, 2014).

Celem doświadczeń było zweryfikowanie hipotezy, czy enzymatyczne modyfikacje białek pszenicy na etapie fermentacji ciasta, a następnie podczas symulowanego trawienia pieczywa zmniejszają jego immunoreaktywność.

Dodatek preparatów peptydaz LA i EPP podczas formowania ciasta sprzyja degradacji białek zapasowych pszenicy zwiększając stopień ich hydrolizy i zmniejszając średnią długość łańcuchów polipeptydowych. Krótsze peptydy i wyższy stopień hydrolizy białek podczas fermentacji ciasta pszennego z zastosowaniem preparatów peptydaz LA izolowanych z bakterii fermentacji mlekowej, niż przy zastosowaniu EPP syntezowanej przez *A. niger* wynika z faktu, że BFM syntezują mieszaninę peptydaz o szerokim spektrum działania i różnej specyficzności względem reszt aminokwasowych tworzących wiązania peptydowe w łańcuchu polipeptydowym. Z kolei EPP hydrolizuje tylko wiązania peptydowe utworzone z udziałem reszt proliny (Di Cagno i wsp., 2004; Stepniak i wsp., 2006).

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że dodatek preparatów enzymów wewnątrzkomórkowych syntezowanych przez *L. acidophilus* 5e2, endopeptydazy

prolinowej lub transglutaminazy w ilości 10 U g⁻¹ mąki po 6 godzinach fermentacji obniża jej immunoreaktywność o odpowiednio 83,9, 51,9 i 18,5 %. W teście ELISA zastosowano przeciwciała monoklonalne R5 wykrywające m.in. sekwencje aminokwasów QQPFP, LQLQFP, QLPYP, PQPF i PQQFP obecne w strukturze pierwszorzędowej gliadyn. Skuteczność degradacji celiakotoksycznych fragmentów peptydów potwierdzono stosując elektroforezę kapilarną. Zmiana zawartości gliadyn w próbkach hydrolizowanych przez LA, EPP i TG wynosiła odpowiednio 57,0, 57,1 i 43,4 % w stosunku do próbki natywnej. Proces fermentacji ciasta pszennego z dodatkiem preparatów enzymatycznych TG, EPP lub LA zmniejszał immunoreaktywność białek glutenu, ale jego zawartość w cieście przekraczała nawet dopuszczalną wartość 100 mg kg⁻¹ przyjętą dla żywności o małej zawartości glutenu zgodnie z wytycznymi Codex Alimentarius (2008).

Możliwości modyfikacji białek przez peptydazy syntezowane przez BFM i endopeptydazę prolinową wykazano we wcześniejszych badaniach. Hydroliza białek zapasowych pszenicy z zastosowaniem EPP i peptydaz z *L. acidophilus* 5e2 sprzyja uwalnianiu peptydów o średniej długości wynoszącej odpowiednio 20,8 i 6,5 reszt aminokwasowych (AAU). Niższe wartości średniej długości peptydów i większe wartości stopnia hydrolizy białek wynikają z wydłużenia czasu reakcji do 6 godzin w porównaniu do badań wcześniejszych.

Zróznicowana degradacja gliadyn przez EPP wynika z różnej zawartości reszt proliny, która wynosi 16, 17 i 23 mol% odpowiednio dla frakcji αβ, γ i ω. Mniejsza dostępność wiązań peptydowych utworzonych przez prolinę może wynikać z obecności wewnątrzcząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych utworzonych przez reszty cysteiny w C-końcowej domenie αβ- i γ-gliadyny (Wieser, 2007). Z kolei ω-gliadyna nie bierze udziału w tworzeniu wiązań dwusiarczkowych. Zawartość reszt proliny umożliwia uszeregowanie gliadyn od frakcji αβ, najmniej podatnej na działanie EPP, przez frakcję γ, do frakcji ω degradowanej w największym stopniu przez EPP.

Mniejszy stopień hydrolizy białek pszenicy modyfikowanych z udziałem TG, niż peptydaz LA i EPP wynika z różnej dostępności substratów. Białka zapasowe pszenicy zawierają dużą ilość reszt glutaminy 35-56 i 36-38 mol% odpowiednio dla gliadyn i glutenin (Wieser, 2007). Natomiast zawartość lizyny jest niewielka i wynosi 0,7 i 1,2 mol% odpowiednio dla gliadyn i glutenin. W całych ziarniakach i mące pszennej stężenie tego aminokwasu wynosi odpowiednio 2,8 i 2,2 % (Shewry, 2007). W prezentowanych doświadczeniach zaobserwowano również zmiany stopnia hydrolizy i średniej długości łańcuchów polipeptydowych w próbce kontrolnej. Zmiany te świadczą o aktywności rodzimych enzymów proteolitycznych ziarniaków. Obecność tych enzymów w ziarniakach zbóż wykorzystuje się w autohydrolizie prolamin pszenicy, jęczmienia i żyta.

Wypiek pieczywa powoduje reorganizację struktury przestrzennej białek glutenu zmieniając głównie epitopy konformacyjne, zbudowane z aminokwasów, które nie muszą wchodzić w skład jednego łańcucha polipeptydowego, lecz tworzą odpowiedni układ przestrzenny, który jest rozpoznawany przez określone przeciwciało. Zniszczenie struktury trzecio- i czwartorzędowej glutenu, rozpad i tworzenie nowych wiązań dwusiarczkowych, agregacja może ukrywać lub eksponować epitopy liniowe istotne w

patogenezie celiakii (Wieser i Koehler, 2008). Zmiany konformacji białek wynikające z ich ogrzewania prowadzą do wyeksponowania innych grup funkcyjnych na powierzchni białka, co moduluje rozpoznawanie antygenów przez przeciwciała. W prezentowanych doświadczeniach immunoreaktywność białek zmniejsza się w wyniku obróbki termicznej w zakresie od 14,3 do 18,5 %. Temperaturowe zmiany konformacyjne białek glutenu, a przez to zmniejszenie ich rozpuszczalności w roztworach wodnych etanolu potwierdziła elektroforeza kapilarna. W próbkach pieczywa odnotowano zmniejszenie zawartości gliadyn od 77,1 do 80,2 %. Natomiast zastosowanie do ekstrakcji gliadyn roztworu detergentu, anionowego surfaktanta i etanolu zwiększa rozpuszczalność białek, chociaż i tak ich zawartość w pieczywie jest mniejsza, niż w cieście pszennym.

Prezentowane doświadczenia wykazały, że wprowadzenie dodatkowych peptydaz podczas trawienia *in vitro* białek pieczywa istotnie zmniejsza ich immunoreaktywność. Zawartość gliadyn w próbce pieczywa wstępnie modyfikowanego peptydazami syntezowanymi przez *L. acidophilus* 5e2, a następnie hydrolizowanej trypsyną i chymotrypsyną z dodatkiem endopeptydazy prolinowej zmniejszyła się do poziomu 7,9 mg kg⁻¹, czyli wartości uznanej za bezpieczną. Pozostałe warianty pieczywa były bardziej immunoreaktywne i zawierały powyżej 20 mg kg⁻¹ gliadyn, czyli więcej, niż dopuszcza Codex Alimentarius (2008). Na potencjał immunoreaktywności białek wpływa ich wstępna enzymatyczna modyfikacja na etapie fermentacji ciasta. Zmniejszenie zawartości immunoreaktywnych białek podczas produkcji pieczywa powoduje, że podczas jego trawienia uwalnia się z matrycy pieczywa mniej peptydów rozpoznawanych przez przeciwciała R5.

W terapii enzymowej istotne jest, aby wprowadzić do przewodu pokarmowego człowieka enzymy, które zdegradują celiakotoksyczne peptydy zanim dotrą one do jelita cienkiego. Enzymy te powinny być aktywne w warunkach, jakie panują w przewodzie pokarmowym i stabilne w obecności soli żółciowych (Gass i wsp., 2007). Skład pokarmu zawierającego gluten istotnie wpływa na możliwość degradacji immunoreaktywnych peptydów przez endopeptydazę prolinową podczas trawienia *in vitro*. Obecny w żywności tłuszcz nie wpływa istotnie na degradację peptydów przez EPP. Natomiast obecność innych białek żywności w pokarmie zmniejsza szybkość detoksykacji glutenu. Nieprzetworzony gluten jest w większym stopniu degradowany przez EPP, niż gluten poddany wypiekowi (Montserrat i wsp., 2015).

Oddziaływanie wysokiej temperatury podczas wypieku na białka pszenicy zmniejsza ich degradację przez peptydazy układu trawiennego i modyfikuje właściwości immunologiczne. Trawienie białek miękiszu chlebowego pepsyną w środowisku kwaśnym powoduje degradację HMW-glutenin do polipeptydów, ale nadal wykrywanych przez przeciwciała IgG. Natomiast degradacja uwolnionych pepsyną polipeptydów z zastosowaniem enzymów trzustkowych do peptydów zapobiega ich detekcji. Z kolei gliadyny i LMW-gluteniny uwalniają w wyniku hydrolizy peptydy, które są wykrywane na każdym etapie trawienia (Pasini i wsp., 2001).

Dodatek peptydaz lub transglutaminazy na etapie produkcji pieczywa, jak również wspomaganie peptydazami procesu jego trawienia w istotny sposób zmienia ilość i skład

białek pszenicy. Wstępna enzymatyczna modyfikacja białek na etapie fermentacji ciasta zmniejsza ich immunoreaktywny potencjał powodując, że podczas trawienia uwalnia się z matrycy pieczywa mniej peptydów rozpoznawanych przez przeciwciała R5. Ponadto peptydy te są skuteczniej degradowane, gdy enzymy trawienne są wspomagane dodatkiem endopeptydazy prolinowej.

Do głównych osiągnięć przeprowadzonych badań można zaliczyć wykazanie, że:

- dodatek enzymów: endopeptydazy prolinowej z *A. niger* (EPP), peptydaz z *L. acidophilus* 5e2 (LA) lub transglutaminazy z *S. mobaraense* (TG) podczas fermentacji obniża immunoreaktywność białek ciasta pszennego odpowiednio 83,9, 51,9 i 18,5 %,
- najbardziej podatnymi na modyfikacje enzymatyczne spośród gliadyn są frakcje γ i ω ,
- hydroliza białek zapasowych ziarniaków pszenicy z udziałem endopeptydazy prolinowej z *A. niger* (EPP) i peptydaz z *L. acidophilus* 5e2 (LA) zmniejsza stężenie $\alpha\beta$ - γ - i ω -gliadyn odpowiednio o 13,7, 60,2 i 41,9 % oraz o 22,1, 43,5 i 36,9 %,
- sieciowanie białek z zastosowaniem transglutaminazy (TG) lub ich hydroliza peptydazami EPP i LA na etapie fermentacji ciasta pszennego, a następnie trawienie próbek pieczywa z dodatkiem peptydaz EPP i LA zmniejsza immunoreaktywność hydrolizatów pieczywa od 2,4 do 0,02 %,
- zawartość peptydu QPFP wykrywanego w sekwencjach polipeptydowych wynosi $263,4 \pm 3,3$, $30,9 \pm 1,5$ i $7,9 \pm 0,4$ mg kg⁻¹ dla próbek hydrolizatów pieczywa trawionego z dodatkiem EPP wyprodukowanego z ciast modyfikowanych odpowiednio przez TG, EPP i LA.

Przedstawione wyniki badań opisano w publikacji A3 (Załącznik 4 – 2.A4):

- ✓ **Brzozowski B.** Impact of food processing and simulated gastro-intestinal digestion on gliadin immunoreactivity in rolls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018, 98(9), 3363-3375, DOI: 10.1002/jsfa.8847

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawionych publikacji uważam:

- Wykazanie istotnego wpływu stresu wodnego na zmiany składu jakościowego i ilościowego białek gromadzonych w ziarniakach pszenicy w tym białek istotnych w etiologii celiakii.
- Wykazanie możliwości zastosowania peptydaz syntezowanych przez bakterie fermentacji mlekowej *L. acidophilus* 5e2 i *L. sanfranciscensis* DSM20663 w redukcji immunoreaktywności białek ziarniaków pszenicy.
- Opracowanie dwuetapowej, enzymatycznej modyfikacji białek zapasowych pszenicy zmniejszającej ich immunoreaktywność z zastosowaniem peptydaz syntezowanych przez *L. sanfranciscensis* DSM20663 i transglutaminazy syntezowanej przez *S. mobaraense*.
- Opracowanie warunków hydrolizy białek ziarniaków pszenicy, jak i celiakotoksycznych peptydów z zastosowaniem mieszaniny peptydaz z *L. acidophilus* 5e2 i endopeptydazy prolinowej z *A. niger*, której wynikiem jest zmniejszenie immunoreaktywności.

- Wykazanie, że wstępna enzymatyczna modyfikacja białek na etapie fermentacji ciasta zmniejsza ich immunoreaktywny potencjał powodując, że podczas trawienia uwalnia się z matrycy pieczywa mniej peptydów rozpoznawanych przez przeciwciała R5.
- Wykazanie, że dodatek endopeptydazy prolinowej z *A. niger* podczas trawienia *in vitro* pieczywa, wspomaga działanie enzymów trawiennych degradując immunoreaktywne białka i peptydy wstępnie hydrolizowane przez peptydazy z *L. acidophilus* 5e2 na etapie fermentacji ciasta pszennego.

Uzyskane wyniki mają zarówno charakter poznawczy jak i aplikacyjny.

4.3.3. Piśmiennictwo

- Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg Ø, Fleckenstein B, Lundin KE, Jørgensen TJ, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM, (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadin rich in proline residues. *Gastroenterology* 123:803–809.
- Battais F, Courcoux P, Popineau Y, Kanny G, Moneret-Vautrin DA and Denery-Papini S, (2005). Food allergy to wheat: differences in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *J Cereal Sci* 42:109–117.
- Brzozowski B, Dawidziuk K and Bednarski W, (2008). Gliadin degradation by proteases of *Fusarium* genus fungi in different *in vivo* and *in vitro* conditions. *Pol J Nat Sci* 23:188–206.
- Catassi C, Bearzi I, Holmes GK, (2005). Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers. *Gastroenterology* 128(4):S79–86.
- Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR, (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 140:408–416.
- Codex Alimentarius Commission. Codex Standard 118–1979 (revised 2008). Foods for special dietary use for person intolerant to gluten. FAO/WHO, Rome, 2008.
- Dekking EHA, Van Veelena PA, de Ruyck A, Kooy-Winkelaara EMC, Gröneveld T, Nieuwenhuizen WF, Koning F, (2008). Microbial transglutaminases generate T cell stimulatory epitopes involved in celiac disease. *J Cereal Sci* 47(2):339–346.
- Di Cagno R, De Angelis M, Auricchio S, Greco L, Clarke C, De Vincenzi M, Giovannini C, D'Archivio M, Landolfo F, Parrilli G, Minervini F, Arendt E, Gobbetti M, (2004). Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in coeliac sprue patients. *Appl Environ Microb* 70:1088–1096.
- Di Sabatino A, Corazza GR, (2009). Coeliac disease. *Lancet* 373(9673):1480–1493.
- Flagella Z, Giuliani MM, Giuzio L, Volpi C and Masci S, (2010). Influence of water deficit on durum wheat storage protein composition and technological quality. *Eur J Agron* 33:197–207.
- Gass J, Bethune MT, Siegel M, Spencer A, Khosla C, (2007). Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology* 133(2):472–480.
- Gerez CL, Rollán GC, de Valdez GF, (2006). Gluten breakdown by lactobacilli and pediococci strains isolated from sourdough. *Lett Appl Microbiol* 42:459–464.
- Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F, Wrigley CW, (2001). Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat endosperm proteins. *Cereal Chem* 78:635–646.

-
- Gilissen LJWJ, van der Meer IM, Smulders MJM, (2014). Reducing the incidence of allergy and intolerance to cereals. *J Cereal Sci* 59:337–353.
- Gobbetti M, Rizzello CG, Di Cagno R, De Angelis M, (2007). Sourdough lactobacilli and coeliac disease. *Food Microbiol* 24:187–196.
- Montserrat V, Bruins MJ, Edens L and Koning F, (2015). Influence of dietary components on *Aspergillus niger* prolyl endoprotease mediated gluten degradation. *Food Chem.* 174:440–445.
- Panozzo JF, Eagles HA and Wootton M, (2001). Changes in protein composition during grain development in wheat. *Aust J Agric Res* 52:485–493.
- Pasini G, Simonato B, Giannattasio M, Peruffo AD and Curioni A, (2001). Modifications of wheat flour proteins during in vitro digestion of bread dough, crumb, and crust: an electrophoretic and immunological study. *J Agric Food Chem* 49:2254–2261.
- Rizzello CG, Curiel JA, Nionelli L, Vincentini O, Di Cagno R, Silano M, Gobbetti M, Coda R, (2014). Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiol* 37:59–68.
- Rizzello CG, De Angelis M, Coda R and Gobbetti M, (2006), Use of selected sourdough lactic acid bacteria to hydrolyse wheat and rye proteins responsible for cereal allergy. *Eur Food Res Technol* 223:405–411.
- Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I, De Vincenzi M, De Bari MD, Palmisano F, Maurano F, Gianfrani C, Gobbetti M, (2007). Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol* 73:4499–4507.
- Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg Ø, Gray GM, Sollid LM, Khosla C, (2005). Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res* 4(5):1732–1741.
- Shewry PR, (2007). Improving the protein content and composition of cereal grain. *J Cereal Sci* 46:239–250.
- Simpson DJ, (2001). Proteolytic degradation of cereal prolamins - the problem with proline. *Plant Sci* 161(5):825–838.
- Singh S, Singh G, Singh P and Singh N, (2008). Effect of water stress at different stages of grain development on the characteristics of starch and protein of different wheat cultivars. *Food Chem* 108:130–139.
- Stamnaes J, Fleckenstein B, Sollid LM, (2008). The propensity for deamidation and transamidation of peptides by transglutaminase 2 is dependent on substrate affinity and reaction conditions. *Biochim Biophys Acta* 1784(11):1804–1811.
- Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L, Koning F (2006) Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(4):G621–G629.
- Tuckova L, Sanchez D, Tlaskalova-Hogenova H and Panzner P, (2012). Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis: pros and cons of recombinant ω 5-gliadin and glutenins, or their epitope peptides, in diagnosis. *Clin Exp Allergy* 42:1146–1149.
- Vader W, Kooy Y, van Veelen P, De Ru A, Harris D, Benckhuijsen W, Peña S, Mearin L, Drijfhout JW, Koning F, (2002). The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* 122:1729–1737.

- Vensel WH, Tanaka CK and Altenbach SB, (2014). Protein composition of wheat gluten polymer fractions determined by quantitative two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Proteome Sci* 12:1–13.
- Wang Y, Frei M, (2011). Stressed food: the impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agric Ecosyst Environ* 141:271–286.
- Wieser H, (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* 24:115–119.
- Wieser H, Koehler P, (2008). The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chem* 85:1–13.
- Wieser H, Vermeulen N, Gaertner F, Vogel RF, (2008). Effects of different *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains and chemical acidification regarding degradation of gluten proteins during sourdough fermentation. *Eur Food Res Technol* 226:1495–1502.
- Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y, (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:447–454.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk rolniczych

Podczas realizacji badań do mojej pracy magisterskiej współpracowałem z **Panem dr Joseph'em Boudrant** z École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, w Nancy, we Francji. W ramach projektu PROJET 7021 POL/3TO/201 pt. „*Modification of physiological characteristics of kefir grains microorganisms influencing the healthy and organoleptic properties of the products*” badałem zmiany fizjologii ziaren kefirowych podczas fermentacji mleka w bioreaktorach o różnych wymiarach geometrycznych.

Część doświadczeń i analiz do pracy doktorskiej wykonałem we współpracy z **Panem prof. dr ir. Luc'iem De Vuyst** z Research Group of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, z Vrije Universiteit Brussel, w Brukseli, w Belgii. Badania realizowane w ramach projektu międzynarodowego INCO-Copernicus IC15-CT98-0905 „*Controlled production of functional exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria to obtain uniform, high-quality fermented milks*” dotyczyły charakterystyki egzopolisacharydów pod względem wielkości cząsteczek z zastosowaniem chromatografii ciekowej (LC) i składu monomerowego z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej (HPAEC-PAD).

5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych

W ramach projektu PBZ-KBN-097/P06/2003, pt. „*Identyfikacja i sposoby przeciwdziałania toksyczności i alergienności białek ważnych roślin uprawnych*” współpracowałem zespołem **Pana prof. dr hab. Gabriela Fordońskiego** z Katedry Diagnostyki i Patofizjologii Roślin, Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa,

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie w zakresie laboratoryjnej hodowli pszenicy w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego. Współpracowałem również z zespołem **Pana prof. dr hab. Lucjana Jędrzychowskiego** z Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, w zakresie oceny immunoreaktywności i alergenicności (ELISA, Northern-blotting) substratów i produktów hydrolizy białek zapasowych zbóż. Współpracę w tym zakresie kontynuowałem z zespołem **Pani prof. dr hab. Barbary Wróblewskiej** z Zakładu Immunologii i Mikrobiologii Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie w projekcie Nr N312 066 31/3701 pt. *„Zastosowanie wysokowydajnego skryningu mikroorganizmów i metod bioinżynierii w pozyskiwaniu peptydaz prolinowych przydatnych w degradacji peptydów immunoreaktywnych w żywności”*.

Współpracowałem również z zespołem **Pana prof. dr hab. Andrzeja Babuchowskiego** z Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, rodzimego wydziału w zakresie opracowania metody szybkiej identyfikacji gatunkowej bakterii fermentacji mlekowej z zastosowaniem technik spektrometrii w bliskiej podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) oraz identyfikacji ich metabolitów, w tym biosurfaktantów i egzopolisacharydów.

W ramach projektu NCBiR BIOSTRATEG3/344253/2/NCBR/2017 pt. *„Bioprodukty z biomasy lignocelulozowej pozyskanej z gruntów marginalnych w celu wypełnienia luki obecnej w narodowej biogospodarce”* współpracowałem z zespołem **Pana prof. dr hab. Mariusza Stolarskiego** z Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Inżynierii Biosurowców, Wydziału Rolnictwa i Leśnictwa, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie w zakresie upraw, otrzymywania i utrwalania biomasy wieloletnich roślin przemysłowych oraz z **Panem dr hab. Wiesławem Wiczkowskiem, prof. instytutu** z Zakładu Chemii i Biodynamiki Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie w zakresie analizy bioaktywnych ekstraktów nadkrytycznych z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC-MS).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Po uzyskaniu stopnia doktora byłem opiekunem 38 prac magisterskich (z Wydziału Nauki o Żywności i Wydziału Biologii i Biotechnologii, UWM w Olsztynie), 22 prac inżynierskich (z Wydziału Nauki o Żywności, Wydziału Biologii i Biotechnologii i Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, UWM w Olsztynie) oraz byłem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim Pana mgr Mateusza Ostolskiego (z Wydziału Biologii i Biotechnologii, UWM w Olsztynie). Byłem również opiekunem studentów studiów niestacjonarnych I i II stopnia na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka oraz na kierunku Towaroznawstwo. Byłem recenzentem 24 prac magisterskich i 12 prac inżynierskich (z Wydziału Nauki o Żywności i Wydziału Biologii i Biotechnologii, UWM w Olsztynie).

Koordynowałem realizację zajęć dydaktycznych z 23 przedmiotów dla studentów następujących kierunków: Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka, Inżynieria Chemiczna i Procesowa, Towaroznawstwo, Broker Innowacji w Przemysle Spożywczym, Biotechnologia, Biotechnologia przemysłowa, Biotechnologia farmaceutyczna, Bioinżynieria Produkcji Żywności, Inżynieria Środowiska. Opracowałem treści dydaktyczne i/lub prowadziłem wykłady i/lub ćwiczenia z 21 przedmiotów w tym 2 przedmiotów w języku angielskim.

W trakcie swojej pracy byłem trzykrotnie (w 2007, 2014 i 2015r.) nagrodzony przez J.M. Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za indywidualne i zespołowe osiągnięcia w dziedzinie dydaktycznej.

Podczas mojego zatrudniania byłem członkiem następujących komisji:

- 2008-2012 i 2016-2020 r. Wydziałowa Komisja ds. Infrastruktury,
- 2008-2020 r. Rada Katedry Biotechnologii Żywności,
- 2012-2016 r. Wydziałowa Komisja ds. Dydaktyki i Zapewnienia oraz Doskonalenia Jakości Kształcenia, zespół ds. dostosowania programów kształcenia do potrzeb rynku pracy,
- 2016-2020 r. Zespół programowy ds. kierunków realizowanych na Wydziale Nauki o Żywności (zespół programowy ds. kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka),
- 2020-2022 r. Wydziałowa Komisja ds. ewaluacji dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia.

W latach 2008-2021 byłem redaktorem strony internetowej Katedry Biotechnologii Żywności, Wydziału Nauki o Żywności, a w latach 2008-2014 opiekowałem się Pracownią biokatalizy i biopreparatów w rodzimej katedrze.

Od 2011 roku do 2021 roku koordynowałem plany zajęć dydaktycznych w Katedrze Biotechnologii Żywności, Wydziału Nauki o Żywności.

W 2018 r. otrzymałem Nagrodę Zespołową J.M. Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za osiągnięcia w dziedzinie organizacyjnej.

Do osiągnięć popularyzujących naukę mogę zaliczyć aktywny udział w Olsztyńskich Dniach Nauki i Sztuki w latach 2015-2019, 2021-2022, podczas których realizowałem warsztaty pt. „Ile biotechnologii jest w piwie?”, „Biotechnologia w piwie” i „Barwna biotechnologia”. W 2022 r. współorganizowałem warsztaty dla uczniów VI LO w Olsztynie pt. „Enzymy i drobnoustroje w produkcji żywności” w ramach programu Food Talk, na Wydziale Nauki o Żywności.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Moje pozostałe osiągnięcia naukowe są rezultatem współpracy z innymi zespołami badawczymi na Wydziale Nauki o Żywności, Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, a obecnie Wydziale Rolnictwa i Leśnictwa, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego Rolniczego, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, w Nancy, we Francji, Research Group of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Vrije Universiteit Brussel, w Brukseli, w Belgii. Współpracowałem również z firmami i przedsiębiorstwami: BIOLACTA TEXEL Spółka z o.o., później Rhodia Food Biolacta Spółka z o.o. Olsztyn, Polska; DSD Betaprocess, Wemeldinge, Królestwo Niderlandów; Quercus Sp. z o.o. Pasym, Polska; ChemProf s.c., Olsztyn, Polska. Praca w różnych zespołach badawczych pozwoliła mi na ukształtowanie i wypracowanie własnego warsztatu badawczego. Poniżej zaprezentowano w skrócie najważniejsze badania i projekty, w których uczestniczyłem.

7.1.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk rolniczych

Początek mojej pracy badawczej związany był z realizacją pracy magisterskiej w roku akademickim 1997-1998 w Katedrze Biotechnologii Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Andrzeja Babuchowskiego. Badania dotyczyły opracowania technologii otrzymywania modyfikowanych ziaren kefirowych. W pracy magisterskiej pt. „Próba otrzymywania modyfikowanych ziaren kefirowych” wykazałem, że możliwe jest otrzymanie z naturalnych ziaren kefirowych izolatów bakterii i drożdży, które po immobilizacji tworzą modyfikowane ziarno kefirowe oraz możliwa jest, przy ich udziale, produkcja kefiru o parametrach jakościowych nieodbiegających od kefiru z ziaren naturalnych. Część badań do pracy magisterskiej zrealizowałem na stażu naukowym w École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, w Nancy, we Francji w ramach projektu PROJET 7021 POL/3TO/201 pt. „*Modification of physiological characteristics of kefir grains microorganisms influencing the healthy and organoleptic properties of the products*” w zespole Pana dr Joseph'a Boudrant. W 1997 roku brałem również udział w dwóch dwutygodniowych stażach w École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, w Nancy, we Francji oraz Università degli Studi della Basilicata, w Potenzy, we Włoszech.

W roku 1998 rozpocząłem w tej samej Katedrze realizację pracy doktorskiej pod opieką Pana prof. dr hab. Andrzeja Babuchowskiego. Badania do pracy doktorskiej realizowałem w ramach projektu międzynarodowego INCO-Copernicus IC15-CT98-0905 „*Controlled production of functional exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria to obtain uniform, high-quality fermented milks*”. Celem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej pt. „*Studia nad wytwarzaniem egzopolisacharydów przez termofilne bakterie fermentacji mlekowej*” była charakterystyka egzopolisacharydów (EPS) produkowanych przez termofilne bakterie fermentacji mlekowej (BFM), maksymalizacja ich biosyntezy i produkcja mlecznych produktów fermentowanych o polepszonych właściwościach reologicznych i teksturze. Na początku badań z 81 próbek

fermentowanych produktów mlecznych pochodzących z rejonu północno-wschodniej Polski pozyskano BFM: 163 izolatów pałeczek i 152 izolatów ziarniaków. Do pozyskanych szczepów BFM dołączono 13 szczepów stanowiących część kolekcji stworzonej w ramach projektu. Wszystkie szczepy BFM były scharakteryzowane pod względem wzrostu na podłożu mlecznym, lepkości wytwarzanego skrzepu mleka, szybkości ukwaszania i zdolności biosyntezy EPS. W drugim etapie badań wyselekcjonowane BFM zastosowano do produkcji EPS, które charakteryzowano pod względem masy cząsteczkowej i składu monomerowego. Doświadczenia te realizowałem podczas stażu naukowego w Vrije Universiteit Brussel, w Brukseli, w Belgii w zespole Pana prof. dr ir. Luc'a De Vuyst z Research Group of Industrial Microbiology and Food Biotechnology. W kolejnym etapie określono czynniki fizyczne, chemiczne i technologiczne wpływające na biosyntezę EPS podczas fermentacji. Na podstawie wyników badań wykazałem, że maksymalna produkcja EPS jest zależna od fazy wzrostu bakterii. Ponadto określiłem wartości optymalne temperatury, odczynu środowiska, składu pożywki dla wzrostu bakterii i biosyntezy EPS. Przeprowadzone badania poszerzyły wiedzę o produkcji EPS *in situ*. Określiłem, że różnice: (a) w ilości wytwarzanych EPS, (b) w wielkości ich cząsteczek, (c) w składzie monomerowym wpływają na lepkość fermentowanych produktów mlecznych. W końcowym etapie badań zastosowałem szczepy BFM wytwarzające EPS do produkcji mlecznych napojów fermentowanych na skalę ułamkowo-techniczną. Doświadczenia te realizowałem we współpracy z przedsiębiorstwem BIOLACTA TEXEL Spółka z o.o., później Rhodia Food Biolacta Spółka z o.o. w Olsztynie. Przeprowadzona analiza sensoryczna wykazała, że niektóre szczepy BFM nadają się do produkcji jogurtu naturalnego o zwiększonej lepkości, zabezpieczonego przed synerezą. Pracę doktorską obroniłem w 2004 r. Realizacja pracy doktorskiej zaowocowała 6 doniesieniami (Załącznik 4 – 7.D1, 7.D2, 7.D3, 7.D4, 7.D5, 7.D6) na konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych. Po uzyskaniu stopnia doktora powstała dodatkowo 1 publikacja w czasopiśmie z listy A MNiSW₂₀₀₉ (Załącznik 4 – 4.C9).

Po uzyskaniu absolutorium w 2002 r. rozpocząłem pracę w Instytucie Mleczarstwa w Warszawie, Stacji Doświadczalnej w Olsztynie na stanowisku inżyniera technologa, a następnie w 2003 roku podjąłem pracę w Katedrze Biotechnologii Żywności, Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie na stanowisku technologa.

7.1.2. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych

Po rozpoczęciu w roku 2003 pracy w Katedrze Biotechnologii Żywności w zespole Pana prof. dr hab. Włodzimierza Bednarskiego zająłem się badaniami dotyczącymi wpływu obcych i rodzimych peptydaz ziarniaków zbóż na właściwości ich białek zapasowych. Uczestniczyłem w realizacji doświadczeń w latach 2004-2008, w ramach projektu badawczego zamawianego PBZ-KBN-097/P06/2003, pt. „*Identyfikacja i sposoby przeciwdziałania toksyczności i alergienności białek ważnych roślin uprawnych*”, dotyczących wpływu stresu biotycznego i abiotycznego na właściwości białek zapasowych pszenicy. Część wyników badań z tego zakresu stanowi moje **Osiągnięcie**

naukowe. Pozostałe badania z tego zakresu dotyczyły wpływu enzymów proteolitycznych syntezowanych przez patogenne grzyby z rodzaju *Fusarium* na białka zapasowe zbóż. Doświadczenia które przeprowadziłem wykazały, że zdolność do syntezy peptydaz degradujących gliadyny jest cechą gatunkową grzybów z rodzaju *Fusarium*. Ponadto wykazano stymulujący wpływ skażenia ziarna pszenicy grzybami na aktywność inhibitorów enzymów proteolitycznych. Stwierdzono również, że kiełkowanie ziarna pszenicy zmniejsza aktywność inhibitorów peptydaz i przez to umożliwia grzybom z rodzaju *Fusarium* hydrolizę białek zapasowych. W kolejnych badaniach wykazaliśmy przydatność rodzimych peptydaz obecnych w nasionach pszenicy ozimej (Sukces i Tonacja), pszenicy jarej (Nawra), owsa (Flamingsstern), gryki (Kora) i grochu (Ramrod) do degradacji białek. Wyniki były przedmiotem 2 publikacji z listy B MNiSW₂₀₀₅, MNiSW₂₀₀₈ (Załącznik 4 – 4.C12, 4.C14) i rozdziału w monografii pt. „Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności” pod redakcją J. Dziuby i Ł. Fornal (Załącznik 4 – 2.B1) oraz były prezentowane na konferencjach naukowych (Załącznik 4 – 7.D7, 7.D8, 7.D9).

W ramach projektu PBZ-KBN-097/P06/2003, pt. „Identyfikacja i sposoby przeciwdziałania toksyczności i alergienności białek ważnych roślin uprawnych” współpracowałem z zespołem Pana prof. dr hab. Lucjana Jędrzychowskiego, a obecnie Pani prof. dr hab. Barbary Wróblewskiej z Zakładu Immunologii i Mikrobiologii Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie oraz zespołem Pana prof. dr hab. Gabriela Fordońskiego z Katedry Diagnostyki i Patofizjologii Roślin, Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Wspólnie realizowane badania wykazały, że porażenie ziarna pszenicy grzybami *Fusarium graminearum* nie poddanego kiełkowaniu nie zmienia właściwości immunoreaktywnych uwalnianych peptydów. Charakterystyka elektroforetyczna białek (elektroforeza kapilarna CGE i elektroforeza żelowa SDS-PAGE) nie wykazała zmian w składzie ilościowym i jakościowym gliadyn. Stwierdzono natomiast istotne zmiany w składzie gliadyn, gdy były izolowane z kiełkującego ziarna pszenicy skażonego *Fusarium graminearum*. Wykazaliśmy, z zastosowaniem techniki Northern-blot, obecność frakcji białek o masie cząsteczkowej od 20 do 24 kDa, reagującej z przeciwciałami uzyskanymi z krwi osób z nietolerancją glutenu, co wskazuje, że również peptydazy fuzaryjne mogą uwalniać z białek zapasowych pszenicy potencjalnie niebezpieczne dla człowieka polipeptydy. Kolejne doświadczenia wykazały również przydatność peptydaz syntezowanych przez bakterie fermentacji mlekowej do degradacji białek zapasowych pszenicy. Wyniki były przedmiotem publikacji z listy B MNiSW₂₀₀₈ (Załącznik 4 – 4.C11) oraz były prezentowane na konferencjach naukowych (Załącznik 4 – 7.D10, 7.D11).

W latach 2004-2007 brałem udział, jako wykonawca, w realizacji projektu badawczego KBN Nr 2 P06T 013 27 pt. „Opracowanie warunków biotechnologicznej syntezy biosurfaktantów o właściwościach przeciw-drobnoustrojowych przydatnych w produkcji żywności” którego kierownikiem był Pan prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski. Efektem prac była izolacja i selekcja bakterii fermentacji mlekowej syntezujących związki powierzchniowo aktywne, które stosowane jako substancje impregnujące mają zdolność

do hamowania rozwoju bakterii patogennych na powierzchni nabłonka Caco-2 i powierzchniach abiotycznych. Wykazano, że o wydajności syntezy biosurfaktantów decydują głównie skład podłoża oraz faza wzrostu bakterii *L. casei* 8/4. Wodne roztwory preparatów biosurfaktantów wykazują aktywność antymikrobiologiczną wobec testowych szczepów patogenów *Staphylococcus aureus* 11, *Bacillus subtilis* T91 and *Micrococcus roseus* R2. Metodą FTIR wykazano, że biosurfaktanty zbudowane są z frakcji białkowych oraz frakcji polisacharydowych, struktury typowej dla glikoprotein, o której decyduje skład podłoża oraz faza wzrostu szczepu je syntetyzującego. Te same czynniki determinują strukturę białek w glikoproteinach, co potwierdzono po ich rozdziale elektroforetycznym metodą Nu-PAGE. Kolejne doświadczenia wykazały, że biosurfaktanty syntezowane przez *L. fermenti* 126 i *L. rhamnosus* CCM 1825 zbudowane są peptydów, polisacharydów i związków fosforu w różnych proporcjach zależnych od gatunku mikroorganizmu. Oba szczepy charakteryzują się krytycznym stężeniem miceli 9,0 i 6,0 g L⁻¹ oraz napięciu powierzchniowym odpowiednio 45,1±0,1 i 43,6±0,6 mN m⁻¹. Biosurfaktanty syntetyzowane przez *L. rhamnosus* CCM 1825 wykazywały wyższą aktywność emulgującą i pianotwórczą niż te otrzymywane z *L. fermenti* 126, co skutkowało lepszymi właściwościami antyadhezyjnymi. Stwierdzono pozytywny wpływ impregnacji powierzchni polistyrenu wodnym roztworem biosurfaktantów na hamowanie adhezji szczepów chorobotwórczych *Escherichia coli* 22, *Klebsiella pneumoniae* 2 i *Pseudomonas aeruginosa* W2 do impregnowanej powierzchni. W projekcie tym analizowałem budowę i właściwości biosurfaktantów z zastosowaniem technik elektroforetycznych, spektroskopii FTIR i zdolności do obniżania napięcia powierzchniowego wody. Efektem tych prac są 2 publikacje z listy A MNiSW₂₀₀₉ i MNiSW₂₀₁₁ (Załącznik 4 – 4.C8, 4.C10) oraz doniesienie na konferencję naukową (Załącznik 4 – 7.D12).

Równocześnie współpracowałem z zespołem Pana prof. dr hab. Andrzeja Babuchowskiego z Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, rodzimego wydziału w zakresie opracowania metody szybkiej identyfikacji gatunkowej bakterii fermentacji mlekowej z zastosowaniem technik spektrometrii w bliskiej podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) oraz identyfikacji ich metabolitów. Uzyskane wyniki opublikowano w 2 publikacjach z listy A MNiSW₂₀₀₆ i MNiSW₂₀₀₉ (Załącznik 4 – 4.C9, 4.C13).

Zainteresowanie biotechnologicznymi metodami zmniejszania immuno-reaktywności białek zbóż istotnych w etiologii celiakii przyczyniły się do złożenia wniosku o projekt do MNiSW. W roku 2006 r otrzymałem finasowanie badań w ramach projektu badawczego Nr N312 066 31/3701 pt. „Zastosowanie wysokowydajnego skринingu mikroorganizmów i metod bioinżynierii w pozyskiwaniu peptydaz prolinowych przydatnych w degradacji peptydów immunoreaktywnych w żywności”, w którym pełniłem rolę kierownika. Wymiernym efektem tego projektu była selekcja z puli 66 szczepów pochodzących z kolekcji kultur: Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie, Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności i Katedry Biotechnologii

Żywności, Wydziału Nauki o Żywności, UWM w Olsztynie oraz Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, w Braunschweig, w Niemczech, dwóch szczepów bakterii fermentacji mlekowej: *L. acidophilus* 5e2 i *L. sanfranciscensis* DSM20663 syntezujących proline-specyficzne peptydazy efektywnie degradujące białka zapasowe pszenicy. W ramach projektu scharakteryzowano aktywność wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych peptydaz 13 szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Wykazano, że wybrane BFM syntezują głównie metalopeptydazy i peptydazy tiolowe. Stwierdzono również obecność peptydaz aspartylowych. Wykazano znaczne różnice aktywności peptydaz w zależności od miejsca wydzielania enzymu. Peptydazy zewnątrzkomórkowe były bardziej podatne na inhibicję, niż peptydazy wewnątrzkomórkowe. W kolejnych etapach projektu wykazano stosując plany eliminacyjne Placketta-Burmana, że w syntezie peptydaz przez *L. acidophilus* 5e2 istotne jest stężenie źródła azotu w pożywce i jej wyjściowa kwasowość. Optymalizacja prowadzona metodą centralnych planów kompozycyjnych (CCD) potwierdziła zarówno liniowy jak i kwadratowy wpływ stężenia azotu i wyjściowej kwasowości pożywki na produkcję peptydaz. Metodą powierzchni odpowiedzi (RSM) wskazano jako wartości optymalne stężenie azotu w pożywce na poziomie 26,88 g L⁻¹ i kwasowość pH 4,85. Walidacja uzyskanego modelu pozwoliła zwiększyć ponad 3-krotnie ilość syntezowanego enzymu. We współpracy z Panią prof. dr hab. Barbarą Wróblewską z Zakładu Immunologii i Mikrobiologii Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie wykazaliśmy, że pozyskane peptydazy mogą być stosowane do degradacji białek zbóż podczas fermentacji ciasta pszennego, czego efektem jest obniżona jego immunoreaktywność. Podobne wyniki otrzymaliśmy stosując peptydazy z bakterii fermentacji mlekowej i grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*. Wyniki tych badań opublikowano w czasopiśmie z listy A MNiSW₂₀₁₄ (Załącznik 4 – 4.C6) oraz były one prezentowane na konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych (Załącznik 4 – 7.D13, 7.D14, 7.D15, 7.D16, 7.D17).

Badania nad efektywną hydrolizą białek zapasowych pszenicy z uwzględnieniem ich immunoreaktywności kontynuowałem w ramach kolejnego projektu badawczego KBN/NCN Nr N N312 170739, realizowanego w latach 2010-2013, pt. „*Charakterystyka znaczenia aktywności inhibitorów enzymów proteolitycznych w procesie wyrobu pieczywa i jego trawienia z uwzględnieniem oddziaływań alergicznych i patogenezы celiakii*” pełniąc rolę kierownika. Część wyników badań z tego zakresu stanowi moje **Osiągnięcie naukowe**. W projekcie zwrócono uwagę na rolę produktów hydrolizy prolamin pszenicy, owsa, jęczmienia i żyta w aspekcie ich celiako-toksyczności. Procesy technologiczne takie jak fermentacja i obróbka termiczna ciasta sprzyjają uwalnianiu peptydów mogących wykazywać właściwości biologiczne. Wśród nich są inhibitory trypsyny i peptydy celiakotoksyczne. Inhibitory dwufunkcyjne α -amylazy/trypsyny są przyczyną alergii wziewnych i/lub pokarmowych dotyczących osoby pracujące w otoczeniu zawierającym pyły mąk m.in. młynarzy i piekarzy. Z kolei białka prolaminowe są przyczyną enteropatii glutenowej dotyczącej nie tylko dzieci, ale również coraz częściej dorosłych. Uwalnianie podczas fermentacji ciasta inhibitorów trypsyny może być przyczyną trudności w degradacji toksycznych białek przez mikroorganizmy. Obecność termostabilnych

związków hamujących aktywność peptydaz może być również przyczyną problemów z trawieniem białek w układzie pokarmowym człowieka. Do opracowania wskazań ważnych w produkcji żywności o minimalnej lub obniżonej immunoreaktywności białek roślinnych zalecanej w żywieniu dzieci i osób dorosłych ważne są badania aktywności, stabilności i immunogenności inhibitorów trypsyny izolowanych z mąki pszennej podczas fermentacji ciasta pszennego, wypieku pieczywa i modelowego trawienia białek. Wymiernym efektem badań było wykazanie obecności białkowych inhibitorów peptydaz izolowanych z pszenicy odmiany Nawra i Tonacja. Związki te charakteryzowały się masami cząsteczkowymi z zakresu od 5 kDa do 35 kDa. Z pszenicy Tonacja wyizolowano inhibitory charakteryzujące się masą cząsteczkową ok. 5,3 kDa, których punkty izoelektryczne zawierał się w przedziale pI 3,0-4,6 i pI 4,6-5,4. Z kolei inhibitory izolowane z pszenicy Nawra charakteryzowały się masą cząsteczkową ok. 15,0 kDa, których punkty izoelektryczne zawierały się w przedziale pI 7,0-10,0. Wyizolowane inhibitory niezależnie od źródła pochodzenia hamowały aktywność pepsyny, trypsyny i chymotrypsyn. Wykazano, że obecne w ziarniakach pszenicy jarej Nawra związki hamujące aktywność trypsyny są termostabilne. Pozostają one aktywne po 30 min. inkubacji w temp. 100 °C i 200 °C. Natomiast pszenica ozima Tonacja charakteryzowała się obecnością inhibitorów termolabilnych. Wykazano również, że inhibitory trypsyny izolowane z pszenicy jarej i ozimej są stabilne w szerokim spektrum kwasowości środowiska od pH 2,0 do pH 8,0.

W kolejnym etapie prowadzono hydrolizę glutenu i gliadyn w warunkach odpowiadających fermentacji ciasta pszennego z i bez inhibitorów trypsyny w środowisku reakcji. W doświadczeniach zastosowano preparaty enzymów proteolitycznych syntezowanych przez *L. acidophilus* 5e2, *L. sanfranciscensis* DSM20663, *Aspergillus niger*. Stopień hydrolizy glutenu w środowisku zawierającym inhibitory był niższy niż w środowisku bez inhibitorów dla wszystkich stosowanych preparatów enzymatycznych. Określono również wpływ inhibitorów peptydaz na proces enzymatycznego trawienia glutenu w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka. Inhibitory peptydaz izolowane z pszenicy jarej odmiany Nawra oraz pszenicy ozimej odmiany Tonacja ograniczają proces trawienia białek. Wykazano, że dodatek inhibitorów izolowanych z pszenicy Nawra i Tonacja zmniejszał stopień enzymatycznej degradacji gliadyn odpowiednio o 3,6 % i 3,1 %. Wykazano również, że inhibitory trypsyny izolowane z obu odmian pszenicy wpływają hamująco na aktywność enzymów przewodu pokarmowego w zakresie od 2,0 % dla elastazy do 59,9 % dla pepsyny, jak również zmniejszają aktywność endoproteolityczną enzymów o 93,86 %, 62,62 % i 38,65 % izolowanych z hodowli odpowiednio, bakterii *L. sanfranciscensis* DSM20663, *L. acidophilus* 5e2 i *Aspergillus niger*. Oceniono również wpływ parametrów fermentacji ciasta pszennego na redukcję celiako-toksycznych białek pszenicy. Wykazano, że temperatura, wielkość inokulum bakterii i czas fermentacji istotnie wpływają na zwiększenie degradacji białek zapasowych pszenicy, w tym gliadyn. Zwiększenie dawki biomasy, temperatura z zakresu 30-37 °C i czas 26 h sprzyjają zmniejszeniu immunoreaktywności białek w cieście pszennym. Proces wypieku ciasta sprzyjał z kolei

tworzeniu nowych antygenów i zwiększeniu immunoreaktywności. Uzyskane wyniki były prezentowane na konferencjach naukowych (Załącznik 4 – 7.D18, 7.D19, 7.D20) i stał się źródłem do napisania dwóch rozdziałów w monografii pt. „Biotechnologia żywności dla dietetyków. Aspekty technologiczne i żywieniowe.” pod redakcją W. Bednarskiego i J.J. Pietkiewicza (Załącznik 4 – 2.B2, 2.B3).

Kolejnym obszarem moich zainteresowań naukowych jest produkcja biopaliw. W latach 2010-2013 uczestniczyłem jako wykonawca zadań w projekcie badawczym Nr N N312 235838 „Dobór oraz doskonalenie warunków degradacji surowców lignocelulozowych oraz intensyfikacja biokonwersji pochodnych sacharydów do etanolu” pod kierownictwem Pani dr inż. Małgorzaty Lewandowskiej. W ramach projektu określono wpływ różnych kombinacji preparatów celulazy i hemicelulazy na efektywność hydrolizy enzymatycznej polisacharydów słomy rzepakowej i miskanta olbrzymiego po wstępnej obróbce alkalicznej. Ich skuteczność oceniono na podstawie ilości sacharydów uwolnionych podczas reakcji enzymatycznej oraz wydajności obliczonej na podstawie sumy polisacharydów obecnych w substratach natywnych. Wykazaliśmy, że najbardziej skuteczny okazał się kompleks preparatów wytworzonych z grzybów *Trichoderma longibrachiatum*. W badaniu wykazano istotne działanie ksylanaz z *T. longibrachiatum*, których obecność powodowała wzrost efektywności hydrolizy polisacharydów o 27–45 % w porównaniu z kompleksami enzymatycznymi bez ich dodatku. Ponadto wyniki potwierdziły konieczność zastosowania obróbki wstępnej w konwersji substratów lignocelulozowych do bioetanolu. Część wyników uzyskanych w projekcie opublikowano w czasopiśmie z listy A MNiSW₂₀₁₄ (Załącznik 4 – 4.C7). Zagadnienia związane z przygotowaniem surowców lignocelulozowych do fermentacji etanolowej, w tym z obróbką wstępną metodami fizycznymi, fizykochemicznymi, chemicznymi i biologicznymi, jak również hydrolizę enzymatyczną, metody fermentacji i nowoczesne techniki odwadniania bioetanolu omówiliśmy w publikacji przeglądowej z listy MEiN₂₀₂₁ (Załącznik 4 – 4.C1).

Prace nad wykorzystaniem enzymów do wstępnej degradacji materiału lignocelulozowego kontynuowałem w zespole Pana dr hab. Marka Adamczaka, prof. UWM. Badania dotyczyły hydrolizy biomasy miskanta olbrzymiego i cukrowego, po hydrotermicznej obróbce alkalicznej, z użyciem preparatu celulaz (Accellerase 1500) i mieszaniny enzymów wspomagających. Obróbka alkaliczna umożliwia skuteczną hydrolizę biomasy, usunięcie lignin i/lub hemicelulozy. Uzyskano zwiększenie porowatości materiału i zmniejszenie udziału celulozy krystalicznej. Otrzymany substrat jest podatny na działanie hydrolaz, co zapewnia sorpcję enzymów w biomasie. Uzyskane wyniki potwierdzają możliwości zastosowania enzymów litycznych związanych z frakcją stałą surowca lignocelulozowego do jego hydrolizy. Wykazaliśmy możliwość katalizy dwóch reakcji z użyciem jednej dawki mieszaniny enzymów i zachowanie co najmniej 50% wydajności początkowej procesu. Omówione wyniki badań opublikowano w czasopiśmie z listy MEiN₂₀₂₁ (Załącznik 4 – 4.C3).

W obszarze moich zainteresowań jest również synteza biodiesla. Alternatywnym sposobem jego otrzymywania jest transestryfikacja olejów roślinnych katalizowana przez lipazy. Lipazy, pracując w łagodnych warunkach temperaturowych, pozwalają na łatwy odzysk glicerolu, syntezę specyficznych estrów alkilowych oraz transestryfikację acylogliceroli wysokimi stężeniami wolnych kwasów tłuszczowych. Nasiona modraka abisyńskiego (*Crambe abyssinica*) mają wysoką zawartość oleju i duży potencjał do produkcji biodiesla. Optymalizacja warunków syntezy biodiesla z oleju z nasion modraka z udziałem lipazy z *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) metodą centralnych planów kompozycyjnych z zastosowaniem powierzchni odpowiedzi wykazała istotny wpływ stosunku molowego metanolu do oleju, stężenia katalizatora i ilości wody na wydajność. Wyniki tych badań prezentowano na konferencji naukowej (Załącznik 4 – 7.D22).

W latach 2015-2017 uczestniczyłem w realizacji zadania pt. “Badania eksperymentalne nad: charakterystyką odpadów, otrzymaniem bioproduktów oraz bioplastiku ze strumienia odpadów biorafinerii” w międzynarodowym projekcie ERA-NET BIOENERGY CHEMBEET/01/2015 pt. “Biofuels and green chemicals from sugar beet through direct processing CHEMBEET”. Kierownikiem projektu był Pan prof. dr hab. Mariusz Stolarski z obecnej Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Inżynierii Biosurowców, Wydziału Rolnictwa i Leśnictwa, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. W ramach projektu opracowaliśmy wraz z zespołem pod kierownictwem Pana dr hab. Marka Adamczaka, prof. UWM, założenia do opracowania technologii produkcji rozpuszczalników organicznych metodami biotechnologicznymi. Wykazaliśmy istotne znaczenie bakterii z rodzaju *Clostridium* w fermentacji acetonowo-butanolowo-acetonowej (fermentacja ABE) i biokonwersji acetonu do izopropanolu (fermentacja IBE). Wskazaliśmy na istotną rolę dehydrogenazy alkoholowej w biokonwersji podczas fermentacji IBE. Omówione zostały również czynniki wpływające na biosyntezę izopropanolu w tym skład podłoża, metody hodowli mikroorganizmów i modyfikacje biokatalizatorów. W części doświadczalnej zastosowałem substrat otrzymany z buraka cukrowego natywnego i poddanego rozprężaniu podciśnieniowemu (beta-procesowi) w syntezie enzymów. Wyniki doświadczeń wskazują, że grzyby strzępkowe z gatunku *Aspergillus niger* wykazują zdolność do syntezy enzymów proteolitycznych i sacharolitycznych podczas hodowli prowadzonej z wykorzystaniem podłoży skomponowanych z miazgi z buraka natywnego i poddanego beta-procesowi. Nie wykazano różnic w ilości syntezowanych enzymów w zależności od obróbki wstępnej pożywki. Wyniki tych doświadczeń były prezentowane na konferencji naukowej (Załącznik 4 – 7.D21). Doświadczenia realizowano we współpracy z DSD Betaprocess, z Wemeldinge, z Królestwa Niderlandów.

W dalszej pracy naukowej rozszerzyłem zakres moich zainteresowań naukowych na tematykę związaną z otrzymywaniem związków aktywnych biologicznie z wieloletnich roślin przemysłowych i ich aplikacji w technologii żywności. W latach 2017-2021 wraz z zespołem, pod kierunkiem Pana dr hab. Marka Adamczaka, prof. UWM,

uczestniczyłem w realizacji zadania pt. „*Biotechnologia ekstraktów i rafinatów na cele spożywcze i/lub paszowe*” w ramach projektu NCBiR BIOSTRATEG3 /344253/2/NCBR/2017 pt. „*Bioprodukty z biomasy lignocelulozowej pozyskanej z gruntów marginalnych w celu wypełnienia luki obecnej w narodowej biogospodarce*” Kierownikiem projektu był Pan prof. dr hab. Mariusz Stolarski z Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Inżynierii Biosurowców, Wydziału Rolnictwa i Leśnictwa, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. W ramach projektu współpracowaliśmy z przedsiębiorstwem Quercus Sp. z o.o. Pasym, Polska, w zakresie hodowli, zbiorów i utrwalenia biomasy wieloletnich roślin przemysłowych oraz z przedsiębiorstwem ChemProf s.c., Olsztyn, Polska, w zakresie: (a) oceny formy i sposobu przygotowania substancji biologicznie aktywnych, (b) realizacji doświadczeń w skali pilotowej weryfikującej rezultaty doświadczeń laboratoryjnych, (c) wymiany doświadczeń w zakresie oceny aktywności biologicznej ekstraktów, opracowywania koncepcji biorafinerii.

Głównym celem projektu było wytworzenie bioproduktów zawierających substancje bioaktywne pozyskane z biomasy lignocelulozowej wieloletnich roślin przemysłowych (WRP) uprawianych na gruntach marginalnych. Surowiec w postaci WPR, w tym uprawianych na gruntach marginalnych w systemie krótkiej rotacji, może stanowić ważny wkład w biogospodarkę. Większość dostępnych danych na ten temat ogranicza się do produkcji bioenergii z tego rodzaju biomasy roślinnej. Zgodnie z koncepcją biogospodarki bioprodukty z biomasy mają pierwszeństwo zanim zostaną wykorzystane do produkcji energii. W projekcie scharakteryzowano skład chemiczny i aktywność przeciwutleniającą ekstraktów otrzymanych z kory, drewna oraz mieszaniny kory i drewna WPR w tym wierzby wiciowej (*Salix viminalis*), wierzby purpurowej (*Salix purpurea*) oraz topoli czarnej (*Populus nigra*). Ekstrakcja składników biologicznie aktywnych była prowadzona przy użyciu dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym (scCO₂), scCO₂ i wody (1 %, w/w) lub tylko wody. W doświadczeniach wykazaliśmy, że wysokie stężenie polifenoli uzyskano po ekstrakcji scCO₂ i wodą, natomiast najniższe stężenie stwierdzono w ekstraktach uzyskanych scCO₂. Najwyższe stężenie polifenoli ($p < 0,05$) uzyskano w ekstrakcie z *P. nigra* z kory ($502,62 \pm 9,86$ mg GAE g⁻¹ s.m.) po ekstrakcji scCO₂ i wodą, natomiast najniższe stężenie polifenoli stwierdzono w ekstrakcie scCO₂ z *S. purpurea* z kory ($6,02 \pm 0,13$ mg GAE g⁻¹ s.m.). Flawonoidy zostały skutecznie oddzielone przez ekstrakcję scCO₂ (0,88–18,37 mg QE g⁻¹ s.m.). Wykazano dodatnią liniową zależność między aktywnością przeciwutleniającą oznaczoną testami DPPH i ABTS a stężeniem polifenoli, odpowiednio $R^2 = 0,8377$ i $R^2 = 0,9568$. Najprawdopodobniej to stężenie flawonoidów, a nie polifenoli, determinuje aktywność chelatującą Fe²⁺. Aktywność chelatująca Fe²⁺ ekstraktów scCO₂ wahała się od 75,11 % (EC₅₀ = 5,41 mg cm⁻³, *S. purpurea*, kora i drewno) do 99,43 % (EC₅₀ = 0,85 mg cm⁻³, *P. nigra*, kora i drewno). Najniższą aktywność chelatującą wykazały ekstrakty otrzymane z scCO₂ i wody (maksymalnie 26,36 %, *S. purpurea*, kora i drewno). W ekstraktach otrzymanych z udziałem scCO₂ i wody dominującymi składnikami polifenoli były kwas *p*-hydroksybenzoesowy, kwas *p*-kumarowy, saligenina, i salikortyna. Wszystkie te związki

chemiczne występowały głównie w postaci wolnej. Wykazaliśmy, że biomasa *S. purpurea*, *S. viminalis* i *P. nigra* jest atrakcyjnym źródłem związków biologicznie czynnych do różnych możliwych zastosowań w żywności, lekach czy kosmetykach. Doświadczenia te realizowaliśmy we współpracy z Panem dr hab. Wiesławem Wiczkowskim, prof. instytutu z Zakładu Chemii i Biodynamiki Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

Analizowaliśmy również zmiany składników bioaktywnych w ekstraktach w zależności od terminu zbioru rośliny w różnych fazach jej wzrostu. Biomasa roślinną zbierano dwukrotnie w okresie wegetacyjnym (czerwiec i październik) oraz raz po zakończeniu okresu wegetacyjnego (luty). Ekstrakty otrzymano metodą ekstrakcji dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym (scCO) lub scCO₂ z wodą jako korozpuszczalnikiem (scCO₂/H₂O) z biomasy następujących roślin: *Helianthus salicifolius*, *Silphium perfoliatum*, *Helianthus tuberosus*, *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sacchariflorus*, *Miscanthus sinensis* i *Spartana pectinata*. W ekstraktach określono zawartość całkowitą polifenoli (TPC), flawonoidów (TFC) oraz przeprowadzono analizę spektralną z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (QATR-FTIR) oraz analizę aktywności przeciwutleniającej. Dla większości analizowanych ekstraktów uzyskanych z biomasy w fazie wzrostu przy użyciu scCO₂ lub scCO₂/H₂O odnotowano wyższą TPC niż dla próbek biomasy półdrzewnej lub słomy uzyskanych po zakończeniu okresu wegetacyjnego. Wykazaliśmy wyższą zawartość związków polifenolowych w ekstraktach otrzymanych przy użyciu scCO₂/H₂O. Dla analizowanych substratów stwierdzono dodatnią korelację między TPC a aktywnością antyoksydacyjną. Zawartość flawonoidów w analizowanych próbkach była zróżnicowana, a wyższe zawartości na ogół uzyskiwano w ekstraktach scCO₂ z biomasy zebranej na początku okresu wegetacyjnego. Duże zróżnicowanie składu ekstraktów zostało potwierdzone analizą spektralną.

W ramach zadania w projekcie oceniana była również możliwość zastosowania ekstraktów roślinnych zawierających substancje aktywne biologicznie w produkcji pieczywa, napojów fermentowanych oraz określono możliwości otrzymywania preparatów kapsułkowanych. Wprowadzenie ekstraktów roślinnych do ciasta pszennego, jego fermentacja i wypiek pozwoliło otrzymać pieczywo wzbogacone o związki polifenolowe. Dzięki zakwaszeniu ciasta z użyciem bakterii fermentacji mlekowej otrzymano pieczywo utrwalone metodą biotechnologiczną. Największe stężenie polifenoli uzyskano w próbce pieczywa z dodatkiem ekstraktu z drewna *P. nigra*, które wynosiło 94,22 µgGAE cm⁻³, a aktywność antyoksydacyjna wynosiła od 22,77 do 49,72 µg Troloksu cm⁻³.

Kolejnymi produktami wzbogaconymi związkami zawartymi w ekstraktach roślinnych były mleczne napoje fermentowane. Jogurt otrzymywany w wyniku fermentacji z udziałem *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* lub *Lactobacillus rhamnosus*, może być wzbogacony w związki polifenolowe zwiększające jego właściwości antyoksydacyjne. Źródłem związków bioaktywnych były ekstrakty nadkrytyczne scCO₂ pozyskane z kory i drewna *P. nigra* i *S. viminalis*.

Ocenialiśmy wpływ ekstraktów scCO₂ z *P. nigra* i *S. viminalis* na fermentację, jakość i właściwości bioaktywne jogurtu pitnego tradycyjnego i probiotycznego. Doświadczenia wykazały, że dodatek 0,01 % (w/v) ekstraktu scCO₂ z *S. viminalis* skracał czas fermentacji jogurtu tradycyjnego. Jogurt z ekstraktami charakteryzował się wielkością populacji bakterii nie mniejszą niż 7 log jtk g⁻¹, a mikroflora była aktywna przez cały okres przechowywania chłodniczego. Wprowadzenie ekstraktów w dawce 0,01 % (w/v) do mleka do produkcji jogurtów tradycyjnych i probiotycznych zwiększa ich właściwości funkcjonalne poprzez zwiększenie aktywności antyoksydacyjnej bez większego negatywnego wpływu na właściwości fizykochemiczne i organoleptyczne produktów. Wykazano, że aktywność antyoksydacyjna jogurtu z ekstraktem scCO₂ z *P. nigra* i *S. viminalis* była większa odpowiednio o 1,3-13,2 % i o 4,4-37,5 % od jogurtów naturalnych. Dodatek ekstraktów scCO₂ do jogurtu tradycyjnego i probiotycznego zwiększył synerżę, ale ocena organoleptyczna wyglądu i tekstury nie wykazała istotnych różnic w odniesieniu do jogurtów naturalnych.

Omawiane wyniki doświadczeń opublikowano w trzech czasopismach z listy MEiN₂₀₂₁ (Załącznik 4 – 4.C5, 4.C4, 4.C2) i prezentowano na konferencji naukowej (Załącznik 4 – 7.D23).

W trakcie swojej pracy naukowo-badawczej byłem dwukrotnie (w 2016 i 2019r.) nagrodzony przez J.M. Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za indywidualne osiągnięcia w dziedzinie naukowej, a w 2022 otrzymałem nagrodę J.M. Rektora za wyróżniającą się publikację naukową wydaną w 2021 roku.

Na prośbę redakcji wykonałem recenzje 17 publikacji naukowych dla następujących czasopism międzynarodowych: Journal of the Science of Food and Agriculture, Food Biotechnology, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, Probiotics and Antimicrobial Proteins, Journal of Food and Nutrition Research, Journal of Agricultural and Food Chemistry i Food Science and Technology International.

Uczestniczyłem w szkoleniach podnoszących kwalifikacje zawodowe:

- Szkolenie „Asertywna komunikacja, czyli jak efektywnie porozumiewać się ze studentami i współpracownikami (z uwzględnieniem szczególnych potrzeb wynikających z niepełnosprawności)”, Stowarzyszenie Twoje Nowe Możliwości, Wrocław, 5 grudzień 2022
- Szkolenie „Wsparcie osób z zaburzeniami psychicznymi w uczelni wyższej”, Stowarzyszenie Twoje Nowe Możliwości, Wrocław, 28 czerwiec 2022
- Szkolenie „Pierwsza pomoc przedmedyczna ze szczególnym uwzględnieniem procedur odnoszących się do osób z niepełnosprawnościami”, Ośrodek Szkoleń Ratowniczych Forest-Med, Olsztyn, 24 maj 2022
- Szkolenie „ABC wspierania osób w spektrum autyzmu w UWM w Olsztynie”, Ośrodek ds. Osób z Niepełnosprawnościami, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn, 27 kwiecień 2022

-
- Szkolenie „Etykieta wobec osób z niepełnosprawnościami” TECHPAL Sp. z o.o., Olsztyn, 18 marzec 2022
 - Szkolenie „Zaburzenia depresyjne”, Ośrodek ds. Osób z Niepełnosprawnościami, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn, 10 luty 2022
 - Szkolenie „Ochrona danych osobowych”, Inspektor Ochrony Danych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn, 22 sierpień 2018
 - Szkolenie „Mistrzowskie wystąpienia publiczne” - Cezary Wojtczak - Regionalny Punkt Kontaktowy Programów Badawczych UE, Olsztyn, 30 maj 2018
 - Szkolenie „IC Tour: Chromatografia jonowa – teoretycznie i praktycznie”, Metrohm Polska Sp. z o. o. Opacz-Kolonia, 22 styczeń 2014
 - Kurs „NOVABA Postgraduate Course: Agricultural Cooperatives”, Akademia Rolniczo-Techniczna, Olsztyn, 22-25 marzec 1999

Uczestniczyłem również w stażach dotyczących współpracy uczelni i przemysłu. Staże poszerzające kompetencje zawodowe dotyczące technologii fermentacyjnych odbyłem w ramach projektu Tempus Phare S-JEP-09770-95 w:

- École Nationale Supérieure d’Agronomie et des Industries Alimentaires, Nancy, Francja, 1-14 lipiec 1997, „Biochemical engineering in malting, brewing and fermentation technology”
- Università degli Studi della Basilicata, Potenza, Włochy, 1-14 wrzesień 1997, „Biotechnological processes for improvement in fermented food and beverage quality”.



.....
(podpis wnioskodawcy)



PODPIS ZAUFANY

BARTOSZ

BRZozowski

06.03.2023 10:04:28 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

ZAŁĄCZNIK 4

Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny

Dr inż. Bartosz Marek Brzozowski

Katedra Inżynierii, Aparatury Procesowej i Biotechnologii Żywności

Wydział Nauki o Żywności

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

10-718 Olsztyn, ul. Heweliusza 1

tel +89 523 36 50

e-mail: bartosz.brzozowski@uwm.edu.pl

OLSZTYN 2023

I. WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY

1. Monografia naukowa, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2a ustawy;

Nie dotyczy

2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych (zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy).

Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Wpływ procesów bio-technologicznych na immunoreaktywne właściwości białek pszenicy w aspekcie ich celiakotoksyczności”

Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- A1. **Brzozowski B., Stasiewicz K.** Effects of water stress on the composition and immunoreactive properties of wheat storage proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017, 97(4), 1134-1142, DOI: 10.1002/jsfa.7839

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 3(2)	IF ₂₀₁₇ =2,379	MNiSW ₂₀₁₇ =35 pkt lista A
SCOPUS: 4(3)	IF ₂₀₂₁ =4,125	MEiN ₂₀₂₁ =100 pkt
	5-letni IF=4,096	

Mój wkład w przygotowanie artykułu obejmował:

(1) postawienie hipotezy badawczej, (2) opracowanie koncepcji i metodyki badań, (2) wykonanie doświadczeń, pomiarów i charakterystyki elektroforetycznej (elektroforeza dwukierunkowa 2D-NuPAGE, elektroforeza kapilarna FZCE i SDS-CE) i immunochemicznej białek (ELISA, Immunoblotting) (4) selekcję, analizę statystyczną, opracowanie i omówienie uzyskanych wyników, (5) opracowanie graficzne wyników, (6) opracowanie dyskusji wyników, (7) napisanie manuskryptu artykułu, (8) przygotowanie odpowiedzi na recenzje i finalną edycję manuskryptu.

- A2. **Brzozowski B.** Immunoreactivity of wheat proteins modified by hydrolysis and polymerisation. *European Food Research and Technology*. 2016, 242(7), 1025-1040, DOI: 10.1007/s00217-015-2608-6

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 14(11)*	IF ₂₀₁₆ =1,664	MNiSW ₂₀₁₆ =30 pkt lista A
SCOPUS: 13(11)	IF ₂₀₂₁ =3,498	MEiN ₂₀₂₁ =70 pkt
	5-letni IF=3,455	

* w nawiasie liczba cytowań bez autocytacji

Mój wkład w przygotowanie artykułu obejmował:

(1) postawienie hipotezy badawczej, (2) opracowanie koncepcji i metodyki badań, (2) wykonanie doświadczeń w zakresie biosyntezy enzymów i ich zastosowanie w hydrolizie białek pszenicy (3) wykonanie pomiarów aktywności enzymów, ocenę średniej długości polipeptydów, ocenę stopnia hydrolizy białek i ich charakterystykę elektroforetyczną (jednokierunkowa elektroforeza NuPAGE i elektroforeza kapilarna FZCE) i immunochemiczną (ELISA) (4) selekcję, analizę statystyczną, opracowanie i omówienie uzyskanych wyników, (5) opracowanie graficzne wyników, (6) opracowanie dyskusji wyników, (7) napisanie manuskryptu artykułu, (8) przygotowanie odpowiedzi na recenzje i finalną edycję manuskryptu.

- A3. **Brzozowski B.**, Stasiewicz K., Ostolski M., Adamczak M. Reducing immunoreactivity of gliadins and coeliac-toxic peptides using peptidases from *L. acidophilus* 5e2 and *A. niger*. *Catalysts*. 2020, 10, 923. DOI: 10.3390/catal10080923

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MEiN
Web of Science: 3(3)	IF ₂₀₂₀ =4,146	MEiN ₂₀₂₀ =100 pkt
SCOPUS: 3(3)	IF ₂₀₂₁ =4,501	MEiN ₂₀₂₁ =100 pkt
	5-letni IF=4,641	

Mój wkład w przygotowanie artykułu obejmował:

(1) postawienie hipotezy badawczej, (2) opracowanie koncepcji i metodyki badań, (2) wykonanie doświadczeń w zakresie biosyntezy enzymów i ich zastosowania w hydrolizie gliadyn i peptydów (3) wykonanie pomiarów aktywności enzymów, ocenę stopnia hydrolizy gliadyn i peptydów i ich charakterystykę elektroforetyczną (dwukierunkowa elektroforeza 2D-NuPAGE i elektroforeza kapilarna FZCE) i immunochemiczną (ELISA, Immunoblotting) (4) współudział w selekcji, analizie statystycznej, opracowaniu i omówieniu uzyskanych wyników, (5) opracowanie graficzne wyników, (6) opracowanie dyskusji wyników, (7) napisanie manuskryptu artykułu, (8) przygotowanie odpowiedzi na recenzje i finalną edycję manuskryptu.

- A4. **Brzozowski B.** Impact of food processing and simulated gastro-intestinal digestion on gliadin immunoreactivity in rolls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018, 98(9), 3363-3375, DOI: 10.1002/jsfa.8847

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 4(3)	IF ₂₀₁₈ =2,379	MNiSW ₂₀₁₈ =35 pkt lista A
SCOPUS: 4(3)	IF ₂₀₂₁ =4,125	MEiN ₂₀₂₁ =100 pkt
	5-letni IF=4,096	

Mój wkład w przygotowanie artykułu obejmował:

(1) postawienie hipotezy badawczej, (2) opracowanie koncepcji i metodyki badań, (2) wykonanie doświadczeń w zakresie biosyntezy enzymów i ich zastosowanie w produkcji modyfikowanych bułek pszennych (3) wykonanie pomiarów aktywności enzymów, ocenę średniej długości polipeptydów, ocenę stopnia hydrolizy białek i ich charakterystykę elektroforetyczną (jednokierunkowa elektroforeza NuPAGE i elektroforeza kapilarna FZCE) i immunochemiczną (ELISA) (4) selekcję, analizę statystyczną, opracowanie i omówienie uzyskanych wyników, (5) opracowanie graficzne wyników, (6) opracowanie dyskusji wyników, (7) napisanie manuskryptu artykułu, (8) przygotowanie odpowiedzi na recenzje i finalną edycję manuskryptu.

Oświadczenia wszystkich współautorów prac, określające ich indywidualny wkład w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w Załączniku 5.

3. Wykaz zrealizowanych oryginalnych osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych lub artystycznych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2c ustawy.

Nie dotyczy

II. WYKAZ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

1. Wykaz opublikowanych monografii naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1).

Brak

2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych.

Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora.

B1. Bednarski W., **Brzozowski B.**, Fornal Ł., Jędrychowski L., Konopka I., Tańska M., Wróblewska B. „Enzymatyczne i technologiczne modyfikacje celiakotoksycznych białek roślinnych” w monografii pt.: „Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności” pod redakcją J. Dziuby i Ł. Fornal, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2009, ISBN 978-83-204-3582-5: 408-440. Punktacja MNiSW=3 pkt, lista B

B2. **Brzozowski B.** „Enzymatyczna modyfikacja białek” w monografii pt.: „Biotechnologia żywności dla dietetyków. Aspekty technologiczne i żywieniowe.” pod redakcją W. Bednarskiego i J.J. Pietkiewicza, Wydawnictwo Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej im. Witelona w Legnicy, 2018, ISBN 978-83-61389-75-0: 216-235. Punktacja MNiSW=5 pkt, lista B

B3. **Brzozowski B.** „Alergeny pochodzenia roślinnego – alergeny zbóż, ich przetworów oraz innych produktów zawierające białka zbóż” w monografii pt.: „Biotechnologia żywności dla dietetyków. Aspekty technologiczne i żywieniowe.” pod redakcją W. Bednarskiego i J.J. Pietkiewicza, Wydawnictwo Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej im. Witelona w Legnicy, 2018, ISBN 978-83-61389-75-0: 308-318. Punktacja MNiSW=5 pkt, lista B

3. Wykaz członkostwa w redakcjach naukowych monografii.

Brak

4. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.2).

Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora.

C1. Kordala N., Walter M., **Brzozowski B.**, Lewandowska M. 2G-biofuel ethanol: an overview of crucial operations, advances and limitations. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022. DOI: 10.1007/s13399-022-02861-y

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MEiN
Web of Science: 0(0)	IF ₂₀₂₁ =4,050	MEiN ₂₀₂₁ =70 pkt
SCOPUS: 0(0)	IF ₂₀₂₁ =4,050	
	5-letni IF=4,103	

C2. Walter M., **Brzozowski B.**, Adamczak M. Effect of supercritical extract from black poplar and basket willow on the quality of natural and probiotic drinkable yogurt. *Animals*. 2021, 11(10), 2997. DOI: 10.3390/ani11102997

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MEiN
Web of Science: 2(2)	IF ₂₀₂₁ =3,231	MEiN ₂₀₂₁ =100 pkt
SCOPUS: 2(2)	IF ₂₀₂₁ =3,231	
	5-letni IF=3,312	

- C3. Walter M., Adamczak M., **Brzozowski B.** Recycling of enzymes in the hydrolysis of biomass of *Miscanthus giganteus* and *Miscanthus sacchariflorus*. *Przemysł Chemiczny*. 2021, 100(6), 576-580. DOI: 10.15199/62.2021.6.7

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MEiN
Web of Science: 0(0)	IF ₂₀₂₁ =0,464	MEiN ₂₀₂₁ =70 pkt
SCOPUS: 0(0)	IF ₂₀₂₁ =0,464	
	5-letni IF=0,370	

- C4. Ostolski M., Adamczak M., **Brzozowski B.**, Stolarski M.J. Screening of functional compounds in supercritical carbon dioxide extracts from perennial herbaceous crops. *Agriculture*. 2021, 11(6), 488. DOI: 10.3390/agriculture11060488

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MEiN
Web of Science: 6(6)	IF ₂₀₂₁ =3,408	MEiN ₂₀₂₁ =100 pkt
SCOPUS: 6(5)	IF ₂₀₂₁ =3,408	
	5-letni IF=3,459	

- C5. Ostolski M., Adamczak M., **Brzozowski B.**, Wiczkowski W. Antioxidant activity and chemical characteristics of supercritical CO₂ and water extracts from willow and poplar. *Molecules*. 2021, 26(3), 545. DOI: 10.3390/molecules26030545

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MEiN
Web of Science: 8(6)	IF ₂₀₂₁ =4,927	MEiN ₂₀₂₁ =140 pkt
SCOPUS: 12(10)	IF ₂₀₂₁ =4,927	
	5-letni IF=5,110	

- C6. **Brzozowski B.**, Lewandowska M. Prolyl endopeptidase - optimization of medium and culture conditions enhanced production by *L. acidophilus*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2014, 17, 204-210. DOI: 10.1016/j.ejbt.2014.07.003

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 16(14)	IF ₂₀₁₄ =0,681	MNiSW ₂₀₁₄ =15 pkt lista A
SCOPUS: 18(16)	IF ₂₀₂₁ =2,826	MEiN ₂₀₂₁ =70 pkt
	5-letni IF=3,511	

- C7. Świątek K., Świątek M., Lewandowska M., Bednarski W., **Brzozowski B.** The improvement of enzymatic hydrolysis efficiency of rape straw and *Miscanthus giganteus* polysaccharides. *Bioresource Technology*. 2014, 151, 323-331. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.090

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 19(19)	IF ₂₀₁₄ =4,494	MNiSW ₂₀₁₄ =45 pkt lista A
SCOPUS: 23(23)	IF ₂₀₂₁ =11,889	MEiN ₂₀₂₁ =140 pkt
	5-letni IF=11,139	

- C8. **Brzozowski B.**, Bednarski W., Gołek P. The adhesive capability of two *Lactobacillus* strains and physicochemical properties of their synthesized biosurfactants. *Food Technology and Biotechnology*. 2011, 49(2), 177-186.

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 26(26)	IF ₂₀₁₁ =1,195	MNiSW ₂₀₁₁ =25 pkt lista A
SCOPUS: 25(25)	IF ₂₀₂₁ =2,330	MEiN ₂₀₂₁ =40 pkt
	5-letni IF=4,298	

- C9. **Brzozowski B.**, Bednarski W., Dziuba B. Functional properties of *Lactobacillus acidophilus* metabolites. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009, 89, 2467-2476. DOI: 10.1002/jsfa.3749

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 8(6)	IF ₂₀₀₉ =1,386	MNiSW ₂₀₀₉ =32 pkt lista A
SCOPUS: 11(9)	IF ₂₀₂₁ =4,125	MEiN ₂₀₂₁ =100 pkt
	5-letni IF=4,096	

- C10. Gołek P., Bednarski W., **Brzozowski B.**, Dziuba B., The obtaining and properties of biosurfactants synthesized by bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Annals of Microbiology*. 2009, 59(1), 119-126.

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 21(19)	IF ₂₀₀₉ =0,358	MNiSW ₂₀₀₉ =13 pkt lista A
SCOPUS: 29(27)	IF ₂₀₂₁ =3,138	MEiN ₂₀₂₁ =70 pkt
	5-letni IF=2,897	

- C11. **Brzozowski B.**, Tatarczuk K., Szymkiewicz A., Bednarski W. Immunoreactive properties of wheat cv. Tonacja storage proteins infected with *Fusarium graminearum* fungi. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2008, 58(1), 53-58.

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 0(0)	IF ₂₀₀₈ =0,0	MNiSW ₂₀₀₈ =6 pkt lista B
SCOPUS: 0(0)	IF ₂₀₂₁ =2,736	MEiN ₂₀₂₁ =100 pkt
	5-letni IF=3,039	

- C12. **Brzozowski B.**, Dawidziuk K., Bednarski W. Gliadin degradation by proteases of *Fusarium* genus fungi in different *in vivo* and *in vitro* conditions. *Polish Journal of Natural Sciences*. 2008, 23(1), 188-206,

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 0(0)	IF ₂₀₀₈ =0,0	MNiSW ₂₀₀₈ =2 pkt lista B
SCOPUS: 0(0)	IF ₂₀₂₁ =0,0	MEiN ₂₀₂₁ =20 pkt
	5-letni IF=0,0	

- C13. Dziuba B., Babuchowski A., Niklewicz M., **Brzozowski B.** FTIR spectra characteristics of lactic acid bacteria – a spectra library. *Milchwissenschaft*, 2006, 61(2), 146-149.

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 11(10)	IF ₂₀₀₆ =0,528	MNiSW ₂₀₀₆ =15 pkt lista A
SCOPUS: 12(11)	IF ₂₀₂₁ =0,0	MEiN ₂₀₂₁ =0 pkt
	5-letni IF=0,266	

- C14. **Brzozowski B.**, Bednarski W., Adamczak M. Biotechnologiczna modyfikacja biologicznych właściwości białek zbóż. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2005, 4(45), 17-26.

Liczba cytowań:	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Web of Science: 0(0)	IF ₂₀₀₅ =0,0	MNiSW ₂₀₀₅ =4 pkt lista B
SCOPUS: 0(0)	IF ₂₀₂₁ =0,0	MEiN ₂₀₂₁ =20 pkt
	5-letni IF=0,295	

5. Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3).

Nie dotyczy

6. Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3).

Nie dotyczy

7. Wykaz wystąpień na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

Wystąpienia przed uzyskaniem stopnia doktora.

D1. Dziuba B., **Brzozowski B.**, Babuchowski A., Fetliński A., Vaningelgem F., Vancanneyt M., Kołakowski P., De Vuyst L. Isolation and characterisation of exopolysaccharides produced by thermophilic lactic acid bacteria naturally existing in environments of eastern Europe. *First International Symposium on Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria*. 16-19 May, 2001, Bruksela, Belgia. Prezentacja posterowa

D2. Vaningelgem F., Zamfir M., **Brzozowski B.**, Degeest B., Laws A., De Vuyst L. Biodiversity of heteropolysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *First International Symposium on Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria*. 16-19 May, 2001, Bruksela, Belgia. Prezentacja posterowa

D3. **Brzozowski B.**, Dziuba B., Babuchowski A., Warminska-Moroz Ł., Vaningelgem F., De Vuyst L. Isolation and characterisation of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* T60. *First International Symposium on Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria*. 16-19 May, 2001, Bruksela, Belgia. Prezentacja ustna w języku angielskim

D4. Kowalska A., **Brzozowski B.**, Dziuba B., Jachnowicz A., Babuchowski A. Evaluation of commercial suitability of the EPS producing starter cultures. *First International Symposium on Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria*. 16-19 May, 2001, Bruksela, Belgia. Prezentacja posterowa

D5. **Brzozowski B.**, Babuchowski A., Dziuba B. Egzopolisacharydy produkowane przez bakterie fermentacji mlekowej, jako alternatywa stosowania substancji zagęszczających i stabilizujących w jogurtach. *VIII Sesja Sekcji Młodej Kadry Naukowej Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności* pt. „Bezpieczna Żywność”, 2003, Guzowy Piec, Polska. Prezentacja ustna

D6. **Brzozowski B.**, Dziuba B., De Vuyst L., Kołakowski P., Babuchowski A. Wpływ egzopolisacharydów produkowanych *in situ* przez szczepy *Streptococcus thermophilus* na właściwości jogurtu. *IV Konferencja organizowana przez Politechnikę Łódzką* pt. „Bakterie fermentacji mlekowej. Metabolizm, genetyka, wykorzystanie.” 2003, Spała, Polska. Prezentacja ustna

Wystąpienia po uzyskaniu stopnia doktora.

- D7. **Brzozowski B.**, Bednarski W., Pszczółkowska A., Fordoński G. Oddziaływanie warunków środowiskowych na aktywność rodzimych endoproteaz oraz ich inhibitorów w nasionach pszenicy. *I Krajowa Konferencja Naukowa* pt. „Alergeny i składniki powodujące nietolerancje pokarmowe występujące w surowcach roślinnych i żywności”, 2005, Olsztyn, Polska. Prezentacja ustna
- D8. **Brzozowski B.**, Bednarski W. Wpływ rodzimych endoproteaz na białka zapasowe nasion wybranych roślin uprawnych. *I Krajowa Konferencja Naukowa* pt. „Alergeny i składniki powodujące nietolerancje pokarmowe występujące w surowcach roślinnych i żywności”, 2005, Olsztyn, Polska. Prezentacja ustna
- D9. Tatarczuk K., **Brzozowski B.**, Bednarski W. Ocena wpływu proteaz grzybów z rodzaju *Fusarium* na skład i właściwości białek pszenicy. *XXXVII Sesja naukowa Komitetu Nauk o Żywności PAN*, 26-27 wrzesień, 2006, Gdynia, Polska. Prezentacja posterowa
- D10. **Brzozowski B.**, Tatarczuk K., Szymkiewicz A., Bednarski W. Immunoreaktywne właściwości białek zapasowych pszenicy ozimej Tonacja porażonej grzybami *Fusarium graminearum*. *II Krajowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa* pt. „Alergeny i składniki powodujące nietolerancje pokarmowe występujące w surowcach roślinnych i żywności” 19 wrzesień 2007, Olsztyn, Polska. Prezentacja posterowa
- D11. **Brzozowski B.**, Tatarczuk K., Rzewnicka E., Kłębukowska L., Bednarski W. Ocena zdolności bakterii fermentacji mlekowej do degradacji białek zapasowych pszenicy. *II Krajowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa* pt. „Alergeny i składniki powodujące nietolerancje pokarmowe występujące w surowcach roślinnych i żywności” 19 wrzesień 2007, Olsztyn, Polska. Prezentacja posterowa
- D12. Gołek P., Bednarski W., **Brzozowski B.**, Dziuba B. Charakterystyka budowy chemicznej biosurfaktantów syntetyzowanych przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. *III Krajowy Kongres Biotechnologii* pt. „Biotechnologia – człowiek i środowisko”, 9-12 wrzesień, 2007, Poznań, Polska. Prezentacja posterowa
- D13. **Brzozowski B.**, Bednarski W., Krzyżanowska W., Wróblewska B. Application of selected microorganisms and enzyme preparations in reduction of allergic proteins during wheat dough fermentation. *COST 928 Control and exploitation of enzymes for added-value products*. 3rd Annual Meeting, 23-25 wrzesień, 2009, Kraków. Prezentacja ustna w języku angielskim
- D14. **Brzozowski B.**, Bednarski W. Application of prolyl endopeptidase synthesized by *Lactobacillus acidophilus* 5e2 and *Aspergillus niger* to detoxifying wheat storage proteins. *COST 928 Control and exploitation of enzymes for added-value products*. Final Workshop, 2-4 Marzec, 2010, Neapol, Włochy. Prezentacja posterowa
- D15. **Brzozowski B.**, Bednarski W., Wróblewska B. Modification of immunoreactive properties of wheat flour with application microbial transglutaminase and lactic acid bacteria proteases. *COST 928 Control and exploitation of enzymes for added-*

- value products*. Final Workshop, Neapol, Włochy, 2-4 Marzec, 2010, Neapol, Włochy, Prezentacja posterowa
- D16. **Brzozowski B.**, Bednarski W., Wróblewska B. Degradation of gliadin peptides toxic for coeliac disease patients by prolyl endopeptidase synthesized by *Lactobacillus acidophilus* 5e2 and *Aspergillus niger*. *GF10 Second International Symposium on Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, 8-11 czerwiec, 2010, Tampere, Finlandia. Prezentacja posterowa
- D17. **Brzozowski B.**, Bednarski W. Biotechnological methods for gluten degradation and detoxification for coeliac disease patients. *Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech 2010, White Biotechnology*, 20-22 wrzesień, 2010, Kraków, Polska, Acta Biochimica Polonica, 57 Supplement 3, L2.2. Referat plenarny w języku angielskim
- D18. **Brzozowski B.**, Bednarski W., Wojnicz S. Ocena wpływu inhibitorów trypsyny na trawienie białek zapasowych pszenicy w układzie modelowym. *X Konferencja Naukowa "Żywność XXI wieku – Żywność Projektowana"*, 22-23 wrzesień, 2011 Kraków, Polska. Prezentacja posterowa
- D19. **Brzozowski B.**, Bednarski W., Zawalich M. Znaczenie pszenicznych inhibitorów trypsyny w enzymatycznej modyfikacji białek zapasowych ziarniaków zbóż. *X Konferencja Naukowa "Żywność XXI wieku – Żywność Projektowana"*, 22-23 wrzesień, 2011 Kraków, Polska. Prezentacja ustna
- D20. **Brzozowski B.**, Bednarski W., Puzio K., Enzymatyczna modyfikacja immunoreaktywnych właściwości białek pszenicy. *XLI Sesja Komitetu Nauk o Żywności PAN* pt. „Innowacyjność w nauce o żywności i żywieniu”, 2-3 lipiec, 2013, Kraków, Polska. Prezentacja posterowa
- D21. Stasiewicz K., **Brzozowski B.**, Lewandowska M., Adamczak M. A new method of sugar beet pretreatment and lactic acid fermentation of this substrate. SSCHE17 - 44th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering, 22-26 May 2017, Demänovská Dolina, Słowacja. Prezentacja posterowa
- D22. Ostolski, M., Walter M., **Brzozowski B.**, Adamczak M. Optimization of methyl esters synthesis from crambe oil (*Crambe abyssinica*) by lipozyme TL IM. SSCHE17 - 44th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering, 22-26 May 2017, Demänovská Dolina, Słowacja. Prezentacja posterowa
- D23. Kordala N., Stasiewicz K., **Brzozowski B.**, Adamczak M. Oddziaływanie wybranych ekstraktów roślinnych na drobnoustroje kultur starterowych stosowanych w przemyśle mleczarskim. *43 Międzynarodowe Seminarium Naukowo - Techniczne* pt. „Chemistry for Agriculture”, 25-28 listopad 2018, Karpacz, Polska. Prezentacja posterowa
8. Wykaz udziału w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.

Członek komisji oceniającej doniesienia posterowe, *X Konferencja Naukowa "Żywność XXI wieku – Żywność Projektowana"*, 22-23 wrzesień, 2011 Kraków, Polska

9. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

Uczestnictwo w projektach przed uzyskaniem stopnia doktora.

1997-1998 – Projekt międzynarodowy PROJET 7021 POL/3TO/201 „Modification of physiological characteristics of kefir grains microorganisms influencing the healthy and organoleptic properties of the products” (kierownik projektu Prof. dr hab. Andrzej Babuchowski) - **wykonawca**

1998-2001 – Projekt międzynarodowy INCO-COPERNICUS IC15-CT98-0905 „Controlled Production of Functional Exopolysaccharides by Thermophilic Lactic Acid Bacteria to Obtain Uniform, High Quality Fermented Milks (EPS from LAB)” (kierownik projektu Prof. dr ir. Luc De Vuyst) – **lider zespołu badawczego**

Uczestnictwo w projektach po uzyskaniu stopnia doktora.

2004-2008 – Projekt badawczy zamawiany KBN PBZ-KBN 097/P06/2003 „Identyfikacja i sposoby przeciwdziałania toksyczności i alergenicności białek ważnych roślin uprawnych” – **lider zespołu badawczego** realizującego zadanie pt. „Charakterystyka aktywności proteaz rodzimych i obcych oraz warunków ich oddziaływania na skład i właściwości białek wybranych nasion” (kierownik zadania Prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski)

2004-2007 – Projekt badawczy własny KBN Nr 2 P06T 013 27 „Opracowanie warunków biotechnologicznej syntezy biosurfaktantów o właściwościach przeciw-drobnoustrojowych przydatnych w produkcji żywności” (kierownik projektu Prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski) – **wykonawca**

2006-2009 – Projekt badawczy własny Nr N312 066 31/3701 „Zastosowanie wysokowydajnego skriningu mikroorganizmów i metod bioinżynierii w pozyskiwaniu peptydaz prolinowych przydatnych w degradacji peptydów immunoreaktywnych w żywności” – **kierownik projektu**

2010-2013 – Projekt badawczy własny KBN/NCN Nr N N312 170739 „Charakterystyka znaczenia aktywności inhibitorów enzymów proteolitycznych w procesie wyrobu pieczywa i jego trawienia z uwzględnieniem oddziaływań alergicznych i patogenezy celiakii” – **kierownik projektu**

2010-2013 – Projekt badawczy własny KBN/NCN Nr N N312 235838 „Dobór oraz doskonalenie warunków degradacji surowców lignocelulozowych oraz intensyfikacja biokonwersji pochodnych sacharydów do etanolu” (kierownik projektu Dr inż. Małgorzata Lewandowska) – **wykonawca**

2015-2017 – Projekt międzynarodowy NCBiR ERA-NET BIOENERGY CHEMBEET/01/2015 “Biofuels and green chemicals from sugar beet through direct processing CHEMBEET” (kierownik projektu Prof. dr hab. Mariusz Stolarski) – **wykonawca** zadania “Badania eksperymentalne nad: charakterystyką odpadów, otrzymaniem bioproduktów oraz bioplastiku ze strumienia odpadów biorafinerii” (kierownik zadania Dr hab., prof. UWM Marek Adamczak)

2017-2021 – Projekt NCBiR BIOSTRATEG3/344253/2/NCBR/2017 „Bioprodukty z biomasy lignocelulozowej pozyskanej z gruntów marginalnych w celu wypełnienia luki obecnej w narodowej biogospodarce” (kierownik projektu Prof. dr hab. Mariusz Stolarski) – **lider zespołu badawczego** realizującego zadanie „Biotechnologia ekstraktów i rafinatów na cele spożywcze i/lub paszowe” (kierownik zadania Dr hab., prof. UWM Marek Adamczak)

10. Wykaz członkostwa w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

Brak

11. Wykaz staży w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

Stáže odbyte przed uzyskaniem stopnia doktora.

1. École Nationale Supérieure d' Agronomie et des Industries Alimentaires, Nancy, Francja, 1-14 lipiec 1997, **staż** w ramach projektu Tempus Phare S-JEP-09770-95 „Biochemical engineering in malting, brewing and fermentation technology”
2. Università degli Studi della Basilicata, Potenza, Włochy, 1-14 wrzesień 1997, **staż** w ramach projektu Tempus Phare S-JEP-09770-95 „Biotechnological processes for improvement in fermented food and beverage quality”
3. École Nationale Supérieure d' Agronomie et des Industries Alimentaires, Nancy, Francja, 16-28 listopad 1997, **staż naukowy** fundowany przez Ambasadę Francji w ramach projektu PROJET 7021 POL/3TO/201 „Modification of physiological characteristics of kefir grains microorganisms influencing the healthy and organoleptic properties of the products”
4. Vrije Universiteit Brussel, Bruksela, Belgia, 27 wrzesień – 26 październik 2000, **staż naukowy** w ramach projektu INCO-COPERNICUS IC15-CT98-0905 „Controlled Production of Functional Exopolysaccharides by Thermophilic Lactic Acid Bacteria to Obtain Uniform, High Quality Fermented Milks (EPS from LAB)”

Stáže odbyte po uzyskaniu stopnia doktora.

Brak

12. Wykaz członkostwa w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.).

Edytor gościnny w czasopiśmie *Catalyst*, EISSN 2073-4344, Published by MDPI

13. Wykaz recenzowanych prac naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

W latach 2013-2022 przygotowałem 17 recenzji prac naukowych w następujących czasopismach: *Journal of the Science of Food and Agriculture* (5), *Food Biotechnology* (4), *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* (3), *Probiotics and Antimicrobial Proteins* (3), *Journal of Food and Nutrition Research* (1), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1), *Food Science and Technology International* (1).

14. Wykaz uczestnictwa w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.

Brak

15. Wykaz udziału w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.9.

Brak

16. Wykaz uczestnictwa w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny.

Brak

III. WSPÓŁPRA Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego.

Brak

2. Współpraca z sektorem gospodarczym.

Współpraca przed uzyskaniem stopnia doktora.

- Współpraca z przedsiębiorstwem BIOLACTA TEXEL Spółka z o.o., później Rhodia Food Biolacta Spółka z o.o. w Olsztynie, w zakresie pozyskania i przygotowania termofilnych kultur jogurtowych syntezujących egzopolisacharydy w ramach projektu INCO-COPERNICUS IC15-CT98-0905 „Controlled Production of Functional Exopolysaccharides by Thermophilic Lactic Acid Bacteria to Obtain Uniform, High Quality Fermented Milks (EPS from LAB)”.

Współpraca po uzyskaniu stopnia doktora.

- Współpraca z przedsiębiorstwem DSD Betaprocess, Wemeldinge, Królestwo Niderlandów w zakresie próżniowej implozji materiałów roślinnych w ramach projektu ERA-NET BIOENERGY CHEMBEET/01/2015 “Biofuels and green chemicals from sugar beet through direct processing CHEMBEET”.

- Współpraca z przedsiębiorstwem Quercus Sp. z o.o. Pasym, Polska, w zakresie hodowli, zbiorów i utrwalenia biomasy wieloletnich roślin przemysłowych w ramach projektu BIOSTRATEG3/344253/2/NCBR/2017 „Bioprodukty z biomasy lignocelulozowej pozyskanej z gruntów marginalnych w celu wypełnienia luki obecnej w narodowej biogospodarce”.
 - Współpraca z przedsiębiorstwem ChemProf s.c., Olsztyn, Polska, w zakresie: (a) oceny formy i sposobu przygotowania substancji biologicznie aktywnych, (b) realizacji doświadczeń w skali pilotowej weryfikującej rezultaty doświadczeń laboratoryjnych, (c) wymiany doświadczeń w zakresie oceny aktywności biologicznej ekstraktów, opracowywania koncepcji biorafinerii w ramach projektu BIOSTRATEG3/344253/2/NCBR/2017 „Bioprodukty z biomasy lignocelulozowej pozyskanej z gruntów marginalnych w celu wypełnienia luki obecnej w narodowej biogospodarce”.
3. Wykaz uzyskanych praw własności przemysłowej, w tym uzyskanych patentów krajowych lub międzynarodowych.

Brak

4. Wykaz wdrożonych technologii.

Brak

5. Wykaz wykonanych ekspertyz lub innych opracowań wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.

Brak

6. Wykaz udziału w zespołach eksperckich lub konkursowych.

Brak

7. Wykaz projektów artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi.

Nie dotyczy

IV. DANE NAUKOMETRYCZNE

1. Impact Factor (w dziedzinach i dyscyplinach, w których parametr ten jest powszechnie używany jako wskaźnik naukometryczny).

Publikacje wchodzące w cykl osiągnięcia naukowego według roku wydania: **IF=10,568**

Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora: **IF=0,0**

Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora: **IF=24,722**

Sumaryczny Impact Factor publikacji według roku wydania: **IF=35,290**

Sumaryczny Impact Factor publikacji według punktacji z 2021 roku: **IF=59,373**

5-letni Impact Factor wszystkich publikacji: **IF=62,183**

2. Liczba cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań.

Liczby cytowań podane na 22 luty 2023 roku

Liczba cytowań według Web od Science: **141**

Liczba cytowań według Web od Science bez autocytowań: **126**

Liczba cytowań według SCOPUS: **162**

Liczba cytowań według SCOPUS bez autocytowań: **148**

3. Indeks Hirscha.

Indeks Hirscha podany na 22 luty 2023 roku

H-index według Web od Science: **8**

H-index według SCOPUS: **8**

H-index według SCOPUS bez autocytowań: **8**

4. Informacja o liczbie punktów MNiSW/MEiN.

Punktacja publikacji wchodzących w cykl osiągnięcia naukowego według roku wydania: **200 pkt.**

Punktacja publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora: **0 pkt.**

Punktacja publikacji po uzyskaniu stopnia doktora: **650 pkt.**

Punktacja publikacji według roku wydania publikacji **850 pkt.**

Punktacja publikacji według danych z 2021 roku: **1410 pkt.**



.....
(podpis wnioskodawcy)