

# **AUTOREFERAT**

**Dr Marcin Taciak**

**Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt  
im. Jana Kielanowskiego  
Polskiej Akademii Nauk**

**Jabłonna, 2017**

### **1. Imię i nazwisko.**

Marcin Taciak

### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

25.05.2001 Magister inżynier, kierunek technologia żywności i żywienie człowieka w zakresie żywienia człowieka. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji.

Praca magisterska pt.: "Wpływ zróżnicowania jakości białka w diecie na utlenianie glicyny u nerek".

Promotor: Prof. dr hab. Janusz Stanisław Keller

20.06.2006 Doktor nauk rolniczych w zakresie zootechniki. Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk.

Rozprawa doktorska pt.: "Wpływ skarmiania białek pochodzenia roślinnego i zwierzęcego na przebieg procesów trawiennych, wybrane funkcje i morfologię przewodu pokarmowego szczura".

Promotor: Prof. dr hab. Barbara Pastuszewska

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.**

X.2000 - V.2001; stanowisko starszego specjalisty - Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Podstaw Żywienia Zwierząt Monogastrycznych

VI.2001 - VII.2006; stanowisko asystenta - Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Podstaw Żywienia Zwierząt Monogastrycznych

VIII.2006 - I.2016; stanowisko adiunkta - Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Podstaw Żywienia Zwierząt Monogastrycznych

II.2016 do chwili obecnej; stanowisko starszego specjalisty - Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Żywienia Zwierząt

### **4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.).**

#### **a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:**

Węglowodany złożone i białko jako czynniki modyfikujące aktywność flory bakteryjnej jelita grubego zwierząt monogastrycznych.

**b) wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:**

1. Taciak M., Pastuszewska B., Tuśnio A., Święch E. (2010) Effects of two protein and fibre sources on SCFA concentration in pig large intestine. *Livestock Science*, 133, 1, 138-140. (special issue – po pełnej procedurze peer review)

IF(2010)=1.41; MNiSW - 27 pkt.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w zaplanowaniu doświadczenia, pobraniu i utrwaleniu prób do analiz, analizie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, analizie statystycznej i interpretacji wyników oraz na przygotowaniu manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 55%.*

2. Taciak M., Barszcz M., Święch E., Tuśnio A., Bachanek I. (2017) Interactive effects of protein and carbohydrates on production of microbial metabolites in the large intestine of growing pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 71, 3, 192–209.

IF(2017)\*=1.319; MNiSW\*\* - 30 pkt.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu i organizacji doświadczenia, pobraniu i utrwaleniu części prób do analiz, współudziale w wykonaniu analiz, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników oraz na przygotowaniu manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

3. Taciak M., Barszcz M., Tuśnio A., Pastuszewska B. (2015) Interactive effects of indigestible carbohydrates, protein type, and protein level on biomarkers of large intestine health in rats. *PLoS ONE* 10(11): e0142176.

IF(2015)=3.057; MNiSW - 40 pkt.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu i organizacji doświadczenia, pobraniu i utrwaleniu prób, współudziale w wykonaniu analiz, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników oraz na przygotowaniu manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

4. Taciak M., Barszcz M., Tuśnio A., Bachanek I., Pastuszewska B., Skomiał J. (2015) The effects of type of protein and fibre fermented in vitro with different pig inocula on short-chain fatty acids and amines concentrations. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 24, 235-243.

IF=0.511; MNiSW – 20 pkt.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczenia, współudziale w wykonaniu analiz, analizie statystycznej i interpretacji wyników oraz na przygotowaniu manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

\* w dniu przygotowania tego autoreferatu nie ukazał się jeszcze wskaźnik impact factor aktualny dla roku publikacji. Została przedstawiona jego wartość dla 2015 roku.

\*\* ilość punktów zgodna z rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 2016r.

Oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowią załącznik 6.

**c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Jedną z najważniejszych funkcji jelita grubego zwierząt monogastrycznych jest wykorzystywanie energii i składników pokarmowych, niestrawionych w jelicie cienkim, dzięki aktywności symbiotycznej mikroflory. Fermentacji bakteryjnej ulegają wielocukry nieskrobiowe, skrobia oporna oraz białko. Proces fermentacji węglowodanów jest dobrze poznany. Jego głównymi produktami są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe: octowy, propionowy i masłowy. Wzajemne proporcje między produktami fermentacji zależą jednak w znacznym stopniu od składu gatunkowego mikroorganizmów, fermentowanego węglowodanu i pH środowiska. Do polisacharydów łatwo ulegających fermentacji, rozkładanych intensywnie już na początku jelita grubego, należą pektyny. Nieco mniejszą podatnością na fermentację charakteryzuje się skrobia oporna, powodująca zwiększenie produkcji kwasu masłowego, a węglowodanem uznawanym za niepodatny na rozkład bakteryjny i obojętny z punktu widzenia aktywności mikroflory jest celuloza (Lavrencik 2007; Bindelle i wsp., 2008). Węglowodany o mniejszej podatności na fermentację stanowią źródło energii dla bakterii zasiedlających końcowy odcinek jelita grubego.

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe wykorzystywane są bezpośrednio przez komórki nabłonka jelitowego lub wraz z krwią transportowane są do wątroby i innych tkanek, gdzie ulegają metabolizmowi do związków dostarczających energii (den Besten i wsp. 2013). Utlenianie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych dostarcza 70% energii izolowanym komórkom nabłonka jelita grubego. Na podstawie powinowactwa kolonocytów do kwasu masłowego, uważa się, że jest on najważniejszym źródłem energii dla tych komórek, ale równie ważnym, przy dużym stężeniu, może być kwas octowy (Clausen i wsp., 1995; Jørgensen i wsp., 1997). Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe wpływają ponadto na masę tkanek przewodu pokarmowego, a szczególnie na błonę śluzową, proliferację komórek nabłonka, ukrwienie oraz aktywność motoryczną mięśni gładkich a przez to na stan zdrowotny jelita grubego i całego organizmu (Sakata i Inagaki, 2001; Topping i Clifton, 2001). Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe odgrywają również bardzo ważną rolę w metabolizmie węglowodanów i tłuszczu, regulując homeostazę energetyczną w organizmie (den Besten i wsp., 2013).

Źródłem azotu dla bakterii jelita grubego jest białko paszy niestrawione w jelicie cienkim, białko pochodzenia endogenne (enzymy, mukoproteiny, złuszczone komórki nabłonka), peptydy oraz mocznik pochodzący z sekrecji i dyfuzji. Białko jest hydrolizowane przez proteazy i peptydazy bakteryjne oraz endopeptydazy pochodzenia trzustkowego obecne w treści pokarmowej (Smith i Macfarlane, 1998). Znaczna część flory bakteryjnej jelita grubego ma zdolność rozkładu aminokwasów, które podlegają reakcjom deaminacji, dekarboksylacji oraz alfa- i beta-eliminacji. Deaminazy są bardziej aktywne w neutralnym lub nawet lekko zasadowym środowisku, podczas gdy aktywność dekarboksylaz jest wyższa w lekko kwaśnym pH (Blachier i wsp., 2007). Deaminacja aminokwasów prowadzi do powstania amoniaku oraz szkieletu węglowego, który przekształcany jest następnie w krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe o prostym i rozgałęzionym łańcuchu. Z tego powodu, metabolizm aminokwasów w znaczący sposób wpływa na produkcję kwasu octowego (z alaniny, asparaginy, glicyny, treoniny i lizyny), propionowego (z alaniny i treoniny) oraz masłowego (z lizyny i glutaminy). Deaminacja aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu, to jest waliny, izoleucyny i leucyny, prowadzi do powstania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu, czyli kwasu izomasłowego, 2-metylomasłowego i izowalerianowego. Reakcje dekarboksylacji, prowadzące do powstania amin, zachodzą najintensywniej przy pH w zakresie od 4 do 6.

Przykładami amin są kadaweryna (powstająca z lizyny), histamina (z histydy), tyramina (z tyrozyny), tryptamina (z tryptofanu). Do poliamin, które w największej ilości występują w treści przewodu pokarmowego, należą putrescyna, spermina i spermidyna. Katabolizm aminokwasów aromatycznych prowadzi także do powstawania związków potencjalnie toksycznych. Z tyrozyny i fenyloalaniny powstają związki fenolowe, które ulegają absorpcji i detoksyfikacji w śluzówce jelita i w wątrobie, a następnie są wydalane z moczem. Produkty bakteryjnego metabolizmu aminokwasów w jelicie grubym mają negatywny wpływ na zdrowie ludzi (Smith i Macfarlane, 1997; Hughes i wsp., 2000). U świń istotne znaczenie ma przemiana tryptofanu do indolu i 3-metylindolu, które są przyczyną odoru knurzego, pogarszającego smak mięsa (Mackie i wsp., 1998). Aminokwasy siarkowe mogą być metabolizowane do siarczków i merkaptanów. Badania Mority i wsp. (1999) wykazały, że metionina podana w formie niedostępnej dla trawienia enzymatycznego i wchłaniania w jelicie cienkim, powoduje zwiększenie produkcji kwasu masłowego w jelicie ślepych szczura, co może sugerować, że w pewnych sytuacjach bakterie zużywają ten aminokwas bezpośrednio do syntezy własnego białka, a jego niedobór może ograniczać aktywność mikroflory jelita grubego.

Końcowym związkiem azotowym, powstającym podczas bakteryjnej deaminacji aminokwasów oraz rozkładu mocznika przez ureazę bakteryjną, jest amoniak. Jest on także najprostszym związkiem stanowiącym źródło azotu w syntezie białka bakteryjnego. Amoniak może działać niekorzystnie na śluzówkę jelita i powodować skrócenie kosmków. W wyższych stężeniach jest toksyczny i wpływa ujemnie na produktywność zwierząt. Zawartość amoniaku w treści jelita grubego i w kale zwiększa się pod wpływem wzrostu spożycia białka (Geypens i wsp., 1997). Produkcja i akumulacja amoniaku *in vitro* zmniejsza się w wyniku zwiększenia ilości węglowodanów jako substratu energetycznego dla bakterii i obniżenia pH (Smith i Macfarlane, 1998). Juśkiewicz i wsp. (2003) wykazali natomiast wzrost stężenia amoniaku pod wpływem diety wzbogaconej oligocukrami grochu i łubinu, czego przyczyną mogło być obniżenie strawności białka w jelicie cienkim i intensywniejsza fermentacja w jelicie grubym. Metabolizm białka w świetle jelita grubego uważany jest na ogół za proces niekorzystny dla organizmu (Hughes i wsp., 2000). Badania autorów japońskich (Morita i wsp., 2004) wskazują jednak, że białko odporne ma znaczenie jako czynnik korygujący proporcję węglowodanów i azotu dostępnych dla bakterii w jelicie grubym i stymulujący procesy fermentacyjne, a szczególnie produkcję kwasu masłowego. Autorzy ci wskazują na potrzebę opracowania strategii sterowania fermentacją oraz wskazują na potencjalną rolę skrobi odpornej jako węglowodanu o korzystnym wpływie na procesy zachodzące w jelicie grubym.

Mikroorganizmy jelitowe mogą również aktywować związki prokarcynogenne, dostające się do organizmu wraz z pokarmem, ale także te, które są wydzielane wraz z żółcią do jelita. Tworzenie szkodliwych metabolitów przez mikroorganizmy jelitowe może nastąpić przez: enzymatyczne usunięcie z karcynogenu grupy detoksykacyjnej przyłączonej w wątrobie, aktywację prokarcynogenów dostających się do organizmu wraz z dietą oraz metabolizm substancji endogennych do karcynogenów lub promotorów (związków o aktywności promującej powstawanie i rozwój guzów) (Nowak i Libudzisz 2008). Wydaje się więc uzasadnionym monitorowanie aktywności enzymów bakteryjnych (m.in.  $\beta$ -glukuronidazy,  $\beta$ -glukozydazy,  $\beta$ -galaktozydazy i ureazy) w celu określenia ryzyka wystąpienia zmian nowotworowych.

Aktywność flory bakteryjnej w poszczególnych odcinkach jelita grubego zwierząt monogastrycznych różni się w zależności od gatunku. Szczur ma bardzo dobrze rozwinięte jelito ślepe, które jest miejscem najintensywniejszych procesów fermentacyjnych. Mięśniówka jelita ślepego umożliwia selektywną retencję płynnej treści pokarmowej i usuwanie frakcji stałej, która może być ponownie zjedzona przez zwierzę (zjawisko koprofagii). Objętość jelita

grubego stanowi 61% objętości całego przewodu pokarmowego u szczura, 48% u świni, a 17% u człowieka (Topping i Clifton, 2001). U świni jelito ślepe jest słabo rozwinięte, a głównym miejscem procesów fermentacyjnych jest okrężnica. Mimo tych różnic, aktywność mikrobiologiczna, wyrażona w jednostkach ATP pochodzenia bakteryjnego w przeliczeniu na metaboliczną masę ciała zwierząt, jest podobna u obu gatunków i zwiększa się w podobnym zakresie pod wpływem wzrostu zawartości włókna w paszy. W badaniach nad procesami fermentacji stosowane są także metody *in vitro*, polegające na inkubacji treści w warunkach beztlenowych, zintegrowane metody *in vivo* – *in vitro* z udziałem przetokowanych świń, a także metody oparte na pomiarze absorpcji metabolitów bakteryjnych we krwi żyły wrotnej (Jensen, 2001). Badania prowadzone tymi metodami dotyczyły przede wszystkim wpływu różnych węglowodanów i pasz węglowodanowych na ilość i proporcje wchłoniętych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Nie badano jednak zależności między rodzajem węglowodanów a produktami katabolizmu białka. Można sądzić, że rodzaj węglowodanów, a także ilość i skład aminokwasowy białka przechodzących do jelita grubego i ulegających fermentacji mogą wpływać na stopień i kierunek rozkładu białka, a także ilość powstających krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, co może mieć ważne znaczenie dla zdrowia ludzi i zwierząt.

Głównym celem badań było określenie wpływu węglowodanów ulegających fermentacji na stopień i kierunek procesów bakteryjnego rozkładu białka i katabolizmu aminokwasów w jelicie grubym zwierząt monogastrycznych. Celem dodatkowym było porównanie procesów fermentacyjnych w jelicie grubym u dwóch gatunków modelowych zwierząt monogastrycznych tj. świń i szczurów oraz ocena przydatności metody *in vitro* w tych badaniach. Badania te były w większości realizowane w ramach projektu własnego pt. „Modyfikujący wpływ węglowodanów na procesy fermentacji i katabolizmu białka w jelicie grubym – badania na prosiętach, szczurach i *in vitro*”.

#### *Ocena wpływu źródła białka i węglowodanów w diecie na procesy fermentacyjne w jelicie grubym świń*

Doświadczenie I (publikacja 1) miało na celu określenie wpływu białka o różnej strawności jelitowej na procesy fermentacyjne w jelicie grubym oraz możliwości ich modyfikowania węglowodanami złożonymi o różnym potencjale fermentacyjnym. Doświadczenie przeprowadzono na prosiętach linii syntetycznej 990, o początkowej masie ciała 15 kg. Zwierzęta żywiono przez 21 dni paszami zawierającymi taką samą ilość białka strawnego jelitowo, którego 50% stanowiło białko kazeiny lub koncentratu białka ziemniaczanego, a pozostałe 50% białko zbóż. Jako dodatkowe źródło węglowodanów złożonych w diecie, zastosowano celulozę lub włókno ziemniaczane (60 g/kg paszy). Dzielne spożycie paszy ustalono na ok 5% masy ciała zwierząt.

Żywienie prosiąt paszą z udziałem koncentratu białka ziemniaczanego, mimo gorszej strawności jelitowej (Tuśnio i wsp., 2011), nie spowodowało znaczącego wzrostu stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu. Koncentrat białka ziemniaczanego spowodował natomiast zwiększenie stężenia kwasu masłowego w treści jelita ślepego oraz początkowej i środkowej części okrężnicy, co było efektem korzystnym, z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania kolonocytów.

Użyte w tym doświadczeniu węglowodany złożone, mimo różnego potencjału fermentacyjnego, nie miały wpływu na stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w początkowych odcinkach jelita grubego. Włókno ziemniaczane, podobnie jak koncentrat białka

ziemniaczanego, zwiększyło jedynie koncentrację kwasu masłowego w środkowej oraz końcowej części okrężnicy.

W środkowej części okrężnicy zaobserwowano również wpływ interakcji pomiędzy badanymi czynnikami doświadczalnymi. Stężenie kwasu masłowego było równe u zwierząt żywionych z paszami z kazeiną bez względu na rodzaj węglowodanów, natomiast u świń otrzymujących paszę z koncentratem białka ziemniaczanego i włóknem ziemniaczanym było znacznie wyższe w porównaniu z celulozą. Większy wpływ paszy z włóknem ziemniaczanym i koncentratem białka ziemniaczanego, niż z kazeiną, potwierdził hipotezę o roli białka opornego na trawienie w jelicie cienkim w regulacji aktywności flory bakteryjnej jelita grubego.

Doświadczenie II (publikacja 2) przeprowadzono również w układzie dwuczynnikowym, z zastosowaniem tych samych źródeł białka, ale innych węglowodanów złożonych, różniących się podatnością na fermentację. W doświadczeniu tym celuloza została porównana z pektyną jabłeczną i surową skrobią ziemniaczaną (70 g/kg). Doświadczenie zostało przeprowadzone na wieprzkach (wielka biała polska x Duroc) o początkowej masie ciała 15 kg. Zwierzęta otrzymywały paszę doświadczalną przez 14 dni, w ilości odpowiadającej 6% masy ciała. W treści jelita biodrowego oznaczono zawartość białka i jego skład aminokwasowy, a w treści jelita ślepego oraz początkowej, środkowej i końcowej części okrężnicy wskaźniki aktywności flory bakteryjnej: pH treści, koncentrację krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz związków fenolowych, amoniaku i amin.

Żywienie prosiąt paszami z udziałem koncentratu białka ziemniaczanego wpłynęło na zwiększenie zawartości białka i poszczególnych aminokwasów w treści przechodzącej z jelita biodrowego do jelita grubego, które stały się substratem dla flory bakteryjnej zasiedlającej tą część przewodu pokarmowego. W wyniku tego zwiększyła się intensywność proteolizy, której efektem było zwiększenie stężenia amoniaku, *p*-krezolu, indolu, kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu i większości amin w jelicie ślepym oraz w początkowej i środkowej części okrężnicy. Koncentracja amoniaku, który może być produkowany przez florę bakteryjną w wyniku deaminacji aminokwasów bądź rozkładu mocznika z krwi (Windey i wsp., 2012), uzależniona może być także od intensywności procesu absorpcji (Lupton i Marchant 1989; Windey i wsp., 2012). Większe stężenie *p*-krezolu oraz indolu u zwierząt otrzymujących paszę z udziałem koncentratu białka ziemniaczanego spowodowane było zwiększoną ilością tyrozyny i tryptofanu w treści przechodzącej z jelita biodrowego do jelita grubego (Blachier i wsp., 2007). Nie stwierdzono jednak wpływu na stężenie fenolu, mimo że jego prekursorem, tak jak i *p*-krezolu, jest tyrozyna. U prosiąt otrzymujących koncentrat białka ziemniaczanego zaobserwowano zwiększone stężenie amin, powstających bezpośrednio w wyniku dekarboksylacji aminokwasów. Jedynie w przypadku spermidyny, która jest syntetyzowana z putrescyny (Moinard i wsp., 2005), zaobserwowano odwrotny efekt. Wpływ koncentratu białka ziemniaczanego na stężenie spermidyny może mieć związek z jego wpływem na nabłonek jelitowy, gdyż złuszczone komórki stanowią źródło spermidyny w treści jelita grubego (Blachier i wsp., 2007). W omawianym doświadczeniu prosięta otrzymujące kazeinę miały mniejsze stężenie kwasu masłowego, stanowiącego źródło energii dla kolonocytów, przez co większa ilość tych komórek mogła złuszczać się do światła okrężnicy, w konsekwencji zwiększając stężenie spermidyny. Większa ilość białka przechodząca z treścią do jelita ślepego u prosiąt otrzymujących białko ziemniaczane zaburzyła proporcję węglowodanów do azotu w tej części jelita grubego, zmniejszając stężenie kwasu octowego i propionowego, i zwiększając stężenie kwasów o rozgałęzionym łańcuchu. Takiego wpływu nie stwierdzono w okrężnicy, ale podobnie jak w doświadczeniu I, zwiększyło się stężenie kwasu masłowego u zwierząt otrzymujących koncentrat białka ziemniaczanego. Jest to zgodne z obserwacją Mority

i wsp., (2004), którzy wykazali zwiększoną produkcję tego kwasu u szczurów otrzymujących białko ziemniaczane w porównaniu do grupy otrzymującej kazeinę.

Jak wspomniano wcześniej, użyte w tym doświadczeniu węglowodany różniły się podatnością na fermentację, a w konsekwencji wpływem na aktywność flory bakteryjnej jelita grubego. Pektyna obniżyła pH treści oraz zmniejszyła koncentrację *p*-krezolu, indolu, fenyloetyloaminy, tyraminy oraz kwasu izowalerianowego. Wpływ surowej skrobi ziemniaczanej na procesy kataboliczne białka różnił się od pektyny. Skrobia spowodowała głównie zwiększenie produkcji amin, co mogło wynikać ze stymulacji rozwoju bakterii w początkowej części okrężnicy, które następnie mogły stać się źródłem białka w dalszej części jelita grubego (Jha i Berrocso 2016). Wyniki tego doświadczenia wykazały również, że stężenie kwasu masłowego zwiększa się w treści jelita ślepego oraz początkowej i środkowej części okrężnicy u prosiąt otrzymujących skrobię ziemniaczaną oraz w całym jelicie grubym u zwierząt otrzymujących pasze z dodatkiem pektyny. Może mieć to szczególne znaczenie w końcowej części okrężnicy, która jest najbardziej podatna na procesy chorobotwórcze, którym przeciwdziała wysokie stężenie kwasu masłowego (Hamer i wsp., 2008).

W omawianym doświadczeniu określono również wpływ odcinka jelita grubego na koncentrację metabolitów bakteryjnych. Wykazano zmniejszenie koncentracji kwasu octowego, propionowego i masłowego oraz zwiększenie koncentracji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu, *p*-krezolu, indolu i amoniaku w treści wzdłuż jelita grubego. Przedstawione zależności znajdują potwierdzenie w literaturze (Topping i Clifton 2001; Hughes i wsp., 2000), a ich przyczyną są: zmniejszenie dostępności węglowodanów dla flory bakteryjnej w dalszej części okrężnicy, wzrost pH treści i w konsekwencji, zwiększona aktywność enzymów proteolitycznych. W przypadku amin, z wyjątkiem fenyloetyloaminy oraz spermidyny, nie stwierdzono takiego wpływu odcinka jelita grubego.

Interakcja pomiędzy źródłem białka a węglowodanami wpłynęła w największym stopniu na wskaźniki aktywności flory bakteryjnej w początkowym odcinku okrężnicy. Wskaźnikami tymi były: pH treści, stężenie amoniaku, indolu, putrescyny, kadaweryny oraz tyraminy. W końcowej części okrężnicy interakcja wpłynęła tylko na stężenie trzech amin. Interakcja ta wynikała prawdopodobnie ze zmiany proporcji węglowodanów do azotu (Williams i wsp., 2001; Morita i wsp., 2004). Proporcja ta zależy, jak wspomniano wcześniej, od ilości białka, które przeszło z treścią do jelita grubego oraz użytych w doświadczeniu węglowodanów, które z różną intensywnością są metabolizowane przez bakterie. Stężenie amoniaku w jelicie ślepym i początkowej okrężnicy obniżyło się u zwierząt otrzymujących koncentrat białka ziemniaczanego z pektyną w porównaniu do celulozy i skrobi, natomiast u prosiąt otrzymujących dietę z kazeiną, bez względu na źródło węglowodanów stężenie tego metabolitu nie zmieniło się. Wbrew oczekiwaniom, pektyna wpłynęła na procesy fermentacyjne na całej długości jelita grubego, prowadząc do zwiększonej produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i zmniejszonego stężenia potencjalnie toksycznych metabolitów, ale tylko w połączeniu z koncentratem białka ziemniaczanego. Warto również zauważyć, że kierunek wpływu interakcji czynników doświadczalnych na stężenie putrescyny i kadaweryny był podobny we wszystkich odcinkach jelita grubego. Koncentracja tych dwóch związków zwiększała się u prosiąt otrzymujących skrobię ziemniaczaną z białkiem ziemniaczanym, podczas gdy u zwierząt żywionych skrobią ziemniaczaną z kazeiną stężenie było mniejsze niż u zwierząt otrzymujących pektynę. Specyficzna interakcja dla putrescyny i kadaweryny, amin mających właściwości buforujące, mogła wynikać z reakcji flory bakteryjnej na zakwaszenie treści jelita grubego, które zaobserwowano u prosiąt otrzymujących skrobię ziemniaczaną z koncentratem białka ziemniaczanego. Przyczyną mogło być również zwiększone namnażanie



bakterii odpowiedzialnych za produkcję amin biogennych pod wpływem diety z udziałem koncentratu białka ziemniaczanego i skrobi.

Podsumowując, można stwierdzić, że koncentrat białka ziemniaczanego, o mniejszej strawności jelitowej w porównaniu z kazeiną, zwiększa ilość białka i poszczególnych aminokwasów docierających z treścią pokarmową do jelita grubego. Powoduje to zwiększenie intensywności procesów proteolitycznych, w wyniku których zwiększa się produkcja związków potencjalnie toksycznych, takich jak: amoniak, *p*-krezol, indol oraz większość amin. Z drugiej strony, koncentrat białka ziemniaczanego powoduje zwiększenie produkcji kwasu masłowego, który pozytywnie wpływa na funkcjonowanie nabłonka jelitowego. Wpływ węglowodanów na aktywność flory bakteryjnej jest bardziej złożony i zależy od ich właściwości fizykochemicznych. Zarówno pektyna, jak i surowa skrobia ziemniaczana zwiększają stężenie kwasu masłowego, lecz pektyna w większym stopniu wpływa na zmniejszenie produkcji potencjalnie szkodliwych produktów niż skrobia.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że modyfikacja fermentacji proteolitycznej za pomocą węglowodanów złożonych jest możliwa, ale kierunek zmian zależy od rodzaju węglowodanów. Surowa skrobia ziemniaczana pogłębia negatywny wpływ białka opornego na trawienie w jelicie cienkim, natomiast pektyna i celuloza mogą zmniejszać intensywność bakteryjnej proteolizy. Efekt ten uzależniony jest jednak od odcinka jelita grubego, dlatego też uzasadnione wydaje się być podjęcie dalszych badań nad mieszaniną węglowodanów, które stanowiłyby stabilne źródło energii dla flory bakteryjnej na całej długości jelita grubego, w przypadku zwiększonego dopływu niestrawionego białka z jelita biodrowego.

#### *Ocena wpływu źródła i poziomu białka oraz rodzaju węglowodanów w diecie na aktywność flory bakteryjnej i stan zdrowotny jelita grubego szczurów*

Doświadczenie na szczurach (publikacja 3) przeprowadzono w układzie trzyczynnikowym, a jego celem było określenie wpływu źródła i poziomu białka w diecie zawierającej różne rodzaje węglowodanów, na aktywność flory bakteryjnej i wskaźniki stanu zdrowotnego jelita grubego. Doświadczenie wykonano na szczurach szczepu Wistar, samcach, o początkowej masie ciała ok. 330 g. Zwierzęta żywione były przez trzy tygodnie dietami półsyntetycznymi zawierającymi, jako jedyne źródło białka, kazeinę lub koncentrat białka ziemniaczanego w ilości 14 lub 20% białka w diecie oraz uzupełnionymi pektyną jabłeczną, surową skrobią ziemniaczaną lub celulozą (10% w diecie). Jako kryterium aktywności flory bakteryjnej w treści jelita ślepego oznaczono pH, koncentrację i pulę lotnych kwasów tłuszczowych, koncentrację i pulę fenolu i *p*-krezolu oraz aktywność  $\beta$ -glukuronidazy. Dodatkowo w treści okrężnicy oznaczono stężenie amoniaku, a jako kryteria stanu zdrowotnego jelita oznaczono stopień uszkodzenia DNA kolonocytów okrężnicy oraz parametry morfologiczne.

Żywienie szczurów dietą wysokobiałkową z koncentratem białka ziemniaczanego zwiększyło masę treści jelita ślepego, ale wyniki przedstawione w dalszej części opisu wskazują, że tego efektu nie można przypisać zwiększonej fermentacji, a raczej zwiększonej ilości treści pokarmowej, która przechodziła z jelita biodrowego do ślepego. Typ węglowodanów także wpłynęło na masę treści jelita ślepego, która była największa u szczurów żywionych dietami z pektyną.

Wbrew oczekiwaniom nie stwierdzono wpływu źródła białka i rodzaju węglowodanów na koncentrację poszczególnych kwasów tłuszczowych w treści jelita ślepego. Jedynie zwiększenie ilości białka w diecie spowodowało zmniejszenie stężenia kwasu octowego i propionowego, a w konsekwencji sumy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Reakcja

flory bakteryjnej była więc podobna do tej zaobserwowanej w doświadczeniu II na prosiętach, z tą różnicą, że w przypadku prosiąt zwiększona ilość białka, jako substratu dla bakterii, wynikała z jego gorszej strawności, natomiast u szczurów z większej ilości w diecie. Uwzględniając wpływ czynników doświadczalnych na masę treści jelita ślepego, stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych przedstawiono jako ich pulę. Pozwoliło to stwierdzić, że zarówno większa ilość białka w diecie, jak i białko gorzej trawione w jelicie cienkim, zwiększają pulę kwasu octowego oraz kwasów o rozgałęzionym łańcuchu – wskaźników fermentacji białkowej.

Zaskakujący był również brak znaczącego wpływu rodzaju i poziomu białka w diecie na stężenie fenolu i *p*-krezolu. Wbrew oczekiwaniom nastąpiło zmniejszenie stężenia fenolu u zwierząt żywionych białkiem ziemniaczanym w porównaniu z kazeiną. Jedynie pula *p*-krezolu w jelicie ślepym była większa u szczurów otrzymujących białko o gorszej strawności. Zróżnicowanie ilości białka w diecie nie wpłynęło także na stężenie amoniaku w treści okrężnicy. Jedynie żywienie szczurów dietą z udziałem koncentratu białka ziemniaczanego zwiększyło stężenie tego związku. Spośród węglowodanów skrobia ziemniaczana i pektyna przyczyniły się do zwiększenia produkcji amoniaku. Poza tym skrobia ziemniaczana zmniejszyła aktywność bakteryjnej  $\beta$ -glukuronidazy, będącej wskaźnikiem ryzyka rozwoju nowotworu. Żywienie szczurów paszą z wyższym udziałem białka zmniejszyło stopień uszkodzenia DNA kolonocytów, natomiast surowa skrobia ziemniaczana nie wykazała ochronnego wpływu na DNA. Czynniki doświadczalne wpłynęły także na parametry morfologiczne jelita grubego. Głębokość krypt w jelicie ślepym była większa u szczurów żywionych dietami z koncentratem białka ziemniaczanego oraz u zwierząt otrzymujących paszę o wyższym poziomie białka, natomiast głębokość krypt i grubość błony mięśniowej w okrężnicy była większa u szczurów otrzymujących diety z celulozą.

Wyniki dotyczące aktywności flory bakteryjnej u szczurów różniły się od tych uzyskanych na świniami. Dotyczyło to przede wszystkim kierunku i intensywności przemian proteolitycznych, na co mogło złożyć się wiele czynników. Szczury, na których przeprowadzono doświadczenie, były dorosłe w przeciwieństwie do świń. Profil bakterii zasiedlających przewody pokarmowe tych dwóch gatunków zwierząt również mógł być odmienny. Poza tym sama budowa przewodu pokarmowego jest różna, gdyż u szczurów głównym miejscem fermentacji jest jelito ślepe, a u świń okrężnica. Duże znaczenie dla uzyskanych wyników mógł mieć również fakt, że świnię żywione były dietami naturalnymi, a szczury półsyntetycznymi. Uzyskane wyniki wskazują również, że należy z dużą ostrożnością podchodzić do porównywania wyników otrzymanych na różnych gatunkach zwierząt.

#### *Ocena wpływu źródła białka i węglowodanów na produkcję krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i amin w warunkach in vitro*

Doświadczenie w warunkach *in vitro* (publikacja 4) przeprowadzono z wykorzystaniem treści okrężnicy i kału świń jako źródła flory bakteryjnej. Fermentację prowadzono przez 24 lub 48 godzin. Wykorzystano te same źródła węglowodanów i białka, co we wcześniejszych doświadczeniach *in vivo*, czyli celulozę, surową skrobię ziemniaczaną i pektynę jabłeczną oraz koncentrat białka ziemniaczanego i kazeinę. W medium pofermentacyjnym oznaczono stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz amin.

Niezależnie od źródła flory bakteryjnej, wykazano wpływ węglowodanów na stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w obu wariantach czasowych. Rodzaj białka nie wpłynął na przebieg 24-godzinnej fermentacji, prowadzonej z florą bakteryjną pozyskaną z kału. W przeciwieństwie do wyżej omówionych wyników, największą aktywność

fermentacyjną, wyrażoną przez wyższe stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, wykazała skrobia ziemniaczana, a najniższą pektyna. Wpływ węglowodanów był bardziej widoczny, gdy do fermentacji użyto flory bakteryjnej pozyskanej z treści okrężnicy świń niż kału oraz po 48-godzinnej niż 24-godzinnej fermentacji. Zwiększenie stężenia kwasu masłowego w wyniku fermentacji skrobi ziemniaczanej miało miejsce jedynie w przypadku użycia flory bakteryjnej z okrężnicy. Znajduje to swoje potwierdzenie w wyższym stężeniu tego kwasu w treści okrężnicy niż w kale świń żywionych paszą z udziałem surowej skrobi ziemniaczanej (Martinez-Puig i wsp., 2003). Większe stężenie kwasów tłuszczowych po fermentacji kazeiny sugeruje, że to źródło białka, niepoddane wcześniej procesowi trawienia, jest intensywniej wykorzystywane przez bakterie niż koncentrat białka ziemniaczanego. Bardziej intensywna fermentacja kazeiny znalazła swoje potwierdzenie również w zwiększonym stężeniu amin, ale tylko, gdy źródłem węglowodanów była celuloza, a w mniejszym stopniu skrobia ziemniaczana. Źródło flory bakteryjnej nie miało wpływu na fermentację kazeiny w warunkach *in vitro*. W przypadku krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu zaobserwowano podobny wpływ rodzaju białka, ale tylko przy użyciu treści okrężnicy jako źródła bakterii.

Zaproponowany w tym doświadczeniu 48-godzinny model fermentacji miał w większym stopniu odzwierciedlać procesy zachodzące w przewodzie pokarmowym świni (Jha i wsp., 2011). Był wydłużony, w stosunku do często spotykanego w literaturze, 24-godzinnego okresu, przybliżonego do czasu przebywania treści w jelicie grubym człowieka (Coles i wsp., 2005). Wpływ czasu na wskaźniki aktywności flory bakteryjnej nie był jednoznaczny. Stężenie metabolitów białka i węglowodanów było nieco wyższe po 48 godzinach fermentacji przy użyciu flory bakteryjnej pozyskanej z okrężnicy świń, natomiast dłuższa fermentacja, przy użyciu bakterii kałowych, prowadziła do zmniejszenia stężeń oznaczanych związków.

Podsumowując, należy podkreślić, że badania *in vitro* nad oceną wpływu węglowodanów i białka na aktywność flory bakteryjnej stanowią ciekawą alternatywę dla badań na prosiętach i jednoznacznie wskazują na treść okrężnicy, jako właściwe źródło bakterii do fermentacji. W celu określenia kierunku wpływu tych czynników na metabolizm bakterii powinno się jednak zwiększyć częstotliwość pobierania prób do analiz, co umożliwiłoby określenie dynamiki zachodzących procesów.

Wyniki badań, stanowiących powyższe osiągnięcie, mogą zostać zastosowane przy opracowywaniu składu nowych mieszanek paszowych mających korzystny wpływ na dobrostan świń. Uzyskane wyniki pogłębiają wiedzę o fizjologicznym działaniu i interakcjach między składnikami pokarmowymi, która może przyczynić się również do rozwoju żywności funkcjonalnej, zmniejszającej ryzyko rozwoju chorób jelita grubego. Modyfikacja aktywności flory bakteryjnej w jelicie grubym przez różne rodzaje i ilość białka, jak również węglowodany złożone, może stanowić obiecujący sposób oddziaływania na status zdrowotny jelita grubego przez dietę. W celu lepszego poznania istniejących zależności konieczne są dalsze badania, szerzej uwzględniające aktywność mikrobiologiczną w przewodzie pokarmowym i jej wpływ na organizm gospodarza.

## Piśmiennictwo

Bindelle J., Leterme P., Buldgen A. 2008. Nutritional and environmental consequences of dietary fibre in pig nutrition: a review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12, 69–80.

- Blachier F., Mariotti F., Huneau J.F., Tomé D. 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids*, 33, 547–562.
- Clausen M.R., Mortensen P.B. 1995. Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. *Gut*, 37(5), 684-689.
- Coles L.T., Moughan P.J., Darragh A.J., 2005. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124, 421–444.
- den Besten G., van Eunen K., Groen A.K., Venema K., Reijngoud D.J., Bakker B.M. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325-2340.
- Geypens B., Claus D., Evenepoel P., Hiele M., Maes B., Peeters M., Rutgeerts P., Ghooos Y. 1997. Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut*, 41, 70-76.
- Hamer H.M., Jonkers D.M.A.E., Venema K., Vanhoutvin S.A.L.W., Troost F.J., Brummer R.J. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 27, 104–119.
- Hughes R., Magee E. A. M., Bingham S. 2000. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1(2), 51-58.
- Jensen B.B. 2001. Possible ways of modifying type and amount of products from microbial fermentation in the gut. Piva A., Bach Knudsen K.E., Lindberg J.E. (Eds.), *The Gut Environment of Pigs*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 181-200.
- Jha R., Berrococo JF. 2016. Dietary fiber and protein fermentation in the intestine of swine and their interactive effects on gut health and on the environment: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 212, 18–26.
- Jørgensen J.R., Clausen M.R., Mortensen P.B. 1997. Oxidation of short and medium chain C2-C8 fatty acids in Sprague-Dawley rat colonocytes. *Gut*, 40(3), 400-405.
- Juśkiewicz J., Zduńczyk Z., Wróblewska M., Gulewicz K. 2003. Influence of oligosaccharide extracts from pea and lupin seeds on caecal fermentation in rats. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 12, 289-298.
- Lavrencik A. 2007. The effect of rabbit age on in vitro caecal fermentation of starch, pectin, xylan, cellulose, compound feed and its fibre. *Animal*, 1:241–248.
- Lupton J.R., Marchant L.J. 1989. Independent effects of fiber and protein on colonic luminal ammonia concentration. *Journal of Nutrition*, 119, 235–241.
- Mackie R.I., Stroot P.G., Varel V.H. 1998, Biochemical identification and biological origin of key odor components in livestock waste. *Journal of Animal Science*, 76, 1331-1342.
- Martinez-Puig D., Pérez J.F., Castillo M., Andaluz A., Anguita M., Morales J., Gasa J. 2003. Consumption of raw potato starch increases colon length and fecal excretion of purine bases in growing pigs. *Journal of Nutrition*, 133, 134–139.
- Moinard C., Cynober L., de Bandt J.P. 2005. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24, 184–197.

- Morita T., Kasaoka S., Hase K., Kiriya S. 1999. Oligo-L-methionine and resistant protein promote cecal butyrate production in rats fed resistant starch and fructooligosaccharide. *Journal of Nutrition*, 129, 1333-1339.
- Morita T., Kasaoka S., Kiriya S. 2004. Physiological functions of resistant proteins: proteins and peptides regulating large bowel fermentation of indigestible polysaccharides. *Journal of AOAC International*, 87, 792-796.
- Nowak A., Libudzisz Z. 2008. Karcynogenna aktywność mikroorganizmów jelitowych. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 15, 6, 25-39.
- Sakata T., Inagaki A. 2001. Organic acid production in the large intestine: implication for epithelial cell proliferation and cell death. Piva A., Bach Knudsen K.E., Lindberg J.E. (Eds.), *The Gut Environment of Pigs*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 85–94.
- Smith E.A., Macfarlane G.T. 1997. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*, 3(5), 327-337.
- Smith E.A., Macfarlane G.T. 1998. Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids. *FEMS Microbiology Ecology*, 25, 355-368.
- Topping D.L., Clifton P.M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Review*, 81, 3, 1031-1063.
- Tuśnio A., Pastuszewska B., Święch E., Taciak M. 2011. Response of young pigs to feeding potato protein and potato fibre – nutritional, physiological and biochemical parameters. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20, 361–378.
- Williams B.A., Verstegen M.W., Tamminga S. 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutritional Research Reviews*, 14, 207-228.
- Windey K., De Preter V., Verbeke K. 2012. Relevance of protein fermentation to gut health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 184–196.

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

Od początku pracy w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk uczestniczyłem w realizacji kilku tematów badawczych. Dotyczyły one przede wszystkim: wartości odżywczej białka, znaczenia poszczególnych aminokwasów, oddziaływania bioaktywnych składników paszy na procesy trawienia, aktywność flory bakteryjnej przewodu pokarmowego zwierząt, jego morfologię i fizjologię. Poza tym zajmowałem się doskonaleniem żywienia zwierząt laboratoryjnych.

Określenie wartości odżywczej białka pochodzenia zwierzęcego i roślinnego (II D 2, 4, 6, 10) stanowiło temat mojej rozprawy doktorskiej. Badania te prowadzone były m.in. w ramach projektu pt. „Wpływ skarmiania białek pochodzenia roślinnego i zwierzęcego na przebieg procesów trawiennych, wybrane funkcje i morfologię przewodu pokarmowego szczura”. Wyniki badań wskazały, że kazeina oraz koncentrat białek serwatkowe są najbardziej odpowiednie w żywieniu zwierząt laboratoryjnych. Znalazło to zastosowanie w badaniach nad optymalizacją składu pasz dla tych zwierząt, omówionych w dalszej części mojego autoreferatu.

Uczestniczyłem także w badaniach nad oceną możliwości wykorzystania koncentratu białka ziemniaczanego i włókna ziemniaczanego w żywieniu zwierząt. Większość

doświadczeń została wykonana w ramach projektu badawczego pt. „Ocena wartości pokarmowej i właściwości prozdrowotnych białka i włókna ziemniaczanego na podstawie przebiegu trawienia i stanu funkcjonalnego przewodu pokarmowego oraz metabolizmu białka, tłuszczu i włókna u zwierząt monogastrycznych”. Pracę nad tym tematem rozpoczęto od określenia zawartości podstawowych składników odżywczych i czynników antyżywniowych w koncentratach białka ziemniaczanego z różnych zakładów przetwórczych (II A 12). Badania te wykazały, że wartość odżywcza białka koncentratu, oceniana na podstawie jego zawartości i składu aminokwasowego, jest wysoka i wyrównana, natomiast zawartość związków antyodżywczych, a zwłaszcza glikoalkaloidów soladyninowych, waha się w szerokich granicach. Zebrany materiał, o zróżnicowanej zawartości glikoalkaloidów i aktywności inhibitora trypsyny, został następnie wykorzystany do przeprowadzenia badań nad wpływem tych związków na wskaźniki odchowu oraz stan funkcjonalny przewodu pokarmowego kurcząt (II A 27, II D 15). Wyniki tych badań wykazały m.in., że poziom koncentratu białka ziemniaczanego w diecie ma większy wpływ na parametry odchowu kurcząt niż sama zawartość czynników antyżywniowych. W doświadczeniu na szczurach wykazano natomiast, że większe znaczenie antyżywniowe może mieć inhibitor trypsyny, zawarty w koncentracie białka ziemniaczanego, niż glikoalkaloidy (II A 25). W doświadczeniu tym użyto również suszonych kiełków ziemniaczanych, które zostały zaproponowane, aby oddzielić wpływ glikoalkaloidów od samego koncentratu białka ziemniaczanego (II A 26). Kolejne doświadczenia na szczurach pozwoliły stwierdzić, że zastąpienie połowy białka poekstrakcyjnej śrutą sojowej w diecie, koncentratem białka ziemniaczanego o wysokiej zawartości glikoalkaloidów, nie wywołuje zmian świadczących o teratogennym działaniu glikoalkaloidów i nie powoduje zmniejszenia płodności i plenności. Żywienie tą dietą powodowało jednak zmniejszenie masy ciała noworodków i szczurów odsadzanych, nie miało natomiast ujemnego wpływu na wzrost i rozwój zwierząt po odsadzeniu (II A 21). W badaniach na prosiętach, których celem było określenie wartości odżywczej białka koncentratu ziemniaczanego, wykazano, że mimo niższej strawności jelitowej białka i większości aminokwasów, nie obniżają się wskaźniki jego wykorzystania. Włókno ziemniaczane, użyte w tych doświadczeniach, nie powodowało obniżenia strawności składników odżywczych, ale również nie wykazywało prozdrowotnych efektów (II A 16, 19). Długotrwałe żywienie szczurów paszą z włóknem ziemniaczanym wpływało natomiast pozytywnie na aktywność flory bakteryjnej, absorpcję i retencję związków mineralnych oraz poziom testosteronu we krwi (II A 13). Wyniki badań nad koncentratem białka ziemniaczanego i włókna ziemniaczanego zostały podsumowane w cyklu prac przeglądowych (II D 8, 11, 12, 16, 17).

Kolejny cykl badań, w których uczestniczyłem, dotyczył możliwości wykorzystania pasz białkowych w żywieniu zwierząt gospodarskich oraz zastosowania procesów technologicznych, mających poprawić ich właściwości odżywcze. W badaniach nad wartością odżywczą nasion różnych odmian grochu, stwierdzono, że groch kolorowo-kwitnący może być alternatywą dla grochu biało-kwitnącego, pod warunkiem zastosowania procesu gotowania, obniżającego zawartość związków antyżywniowych (II A 2). Badania dotyczyły także określenia wpływu toastowania śruty rzepakowej i ogrzewania wytloku rzepakowego na wartość odżywczą białka (II A 1; II D 1) oraz określenia możliwości wykorzystania nasion tej rośliny w żywieniu prosiąt (II A 37). Badanie te prowadzono w ramach projektu pt. „Rzepak żółtonasienny jako źródło białka paszowego”. Poza tym uczestniczyłem w badaniach dotyczących możliwości wykorzystania nasion mutantów lędźwianu odmiany Krab w żywieniu kurcząt brojlerów (II A 10). Brałem również udział w projekcie pt. „Ulepszanie rodzimych źródeł białka roślinnego, ich produkcji, systemu obrotu i wykorzystania w paszach”, w ramach którego prowadzono badania nad możliwością zastąpienia poekstrakcyjnej śrutą sojowej z roślin GMO

innymi źródłami białka. Badania te dotyczyły prosiąt o dużym potencjale wzrostu, we wczesnym okresie poodsadzeniowym (II A 42, 44; II D 23, 25). Wyniki tych badań pokazały, że żywienie prosiąt paszami zawierającymi do 30% surowych lub ekstrudowanych nasion grochu, jak również drobno zmielonych lub ekspandowanych nasion łubinu wąskolistnego nie wywiera negatywnego wpływu na fizjologię przewodu pokarmowego, strawność składników pokarmowych i parametry wzrostu.

Poza białkiem, przedmiotem moich zainteresowań były również aminokwasy, a zwłaszcza treonina oraz tryptofan. Badania nad tymi związkami realizowane były w ramach trzech projektów badawczych: „Wpływ białka, glutaminianu i węglowodanów nieskrobiowych na wykorzystanie treoniny przez młode świnię: wpływ na odłożenie białka i stan funkcjonalny przewodu pokarmowego”, „Wpływ poziomu treoniny w paszy o zróżnicowanej zawartości aminokwasów endogennych na odłożenie białka, budowę morfologiczną jelit oraz sekrecję mucyn przez śluzówkę jelita u prosiąt” oraz „Wykorzystanie krystalicznego tryptofanu z pasz zawierających preparaty zakwaszające - pokrycie potrzeb związanych z syntezą białka i serotoniny u prosiąt, kurcząt i szczurów”. W badaniach tych najwięcej uwagi poświęcono zapotrzebowaniu prosiąt na treoninę i jej wpływowi na funkcjonowanie przewodu pokarmowego (II A 14, 15, 20, 38; II D 14). Określono m.in. zapotrzebowanie prosiąt na ten aminokwas we wczesnym okresie wzrostu. Wykazano także, że zwiększona ilość aminokwasów endogennych, dodanych w formie glutenu pszennego, powoduje efektywniejsze wykorzystanie treoniny do retencji azotu u młodych świń oraz pozytywnie wpływa na parametry morfologiczne jelita. Wyniki tych badań przyczyniły się do korekty zaleceń żywienia świń, wydanych w naszym Instytucie.

Spośród innych czynników, mogących wpływać na trawienie białka i wchłanianie aminokwasów w jelicie cienkim, badane były polisacharydy nieskrobiowe oraz preparaty zakwaszające. Stwierdzono m.in., że żywienie prosiąt paszami z udziałem pektyn lub żyta pogarsza strawność białka i wchłanianie aminokwasów oraz to, że zwiększenie lepkości treści nie jest głównym czynnikiem za to odpowiedzialnym (II A 5, 8, 22; II D 9). W badaniach na prosiątach wykazano również, że dodatek preparatu zakwaszającego do diety niedoborowej i uzupełnionej krystalicznym tryptofanem powoduje zmniejszenie stężenia serotoniny w tkance mózgowej zwierząt, co może mieć negatywny wpływ na dobrostan. Jednocześnie nie potwierdziła się hipoteza zakładająca, że preparat zakwaszający negatywnie wpływa na krystaliczną formę tryptofanu (II A 6). Poza wcześniej wymienionymi czynnikami, mogącymi negatywnie wpływać na trawienie białka, przedmiotem moich badań był również kwas taninowy. Na podstawie doświadczenia przeprowadzonego na szczurach wykazano, że umiarkowana ilość tego kwasu, w diecie zawierającej odpowiednią ilość białka, może mieć pozytywny wpływ na aktywność flory bakteryjnej jelita grubego i zmniejszać ryzyko rozwoju nowotworu jelita grubego przez zmniejszenie aktywności bakteryjnej  $\beta$ -glukuronidazy (II A 17; II D 13).

W ostatnich latach byłem również zaangażowany w badania nad wpływem fruktanów typu inulinowego na fizjologię zwierząt prowadzone w ramach dwóch projektów naukowych, realizowane w IFŹZ PAN (projekt pt. „Ekstrakty inuliny jako prebiotyczne dodatki paszowe dla zwierząt monogastrycznych”) oraz we współpracy z Zachodniopomorskim Uniwersytetem Technologicznym w Szczecinie (projekt pt. „Wykorzystanie technik proteomicznych do oceny wpływu diety z różnym udziałem fruktanów typu inulinowego”). Wyniki doświadczenia przeprowadzonego na kurczętach brojlerach wykazały, że inulina nie wpływa na skład i aktywność mikrobiomu jelita grubego we wczesnym okresie odchowu ptaków, bez względu na jej poziom w paszy oraz stopień polimeryzacji (II A 41; II D 19). Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na prosiątach wykazały natomiast, że inulina modyfikuje aktywność flory

bakteryjnej w zależności od stopnia polimeryzacji, udziału w paszy i segmentu jelita grubego, lecz nie stymuluje rozwoju korzystnych bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, i nie wpływa na lokalny układ odpornościowy jelita (II A 47). Populację *Bifidobacterium* zwiększa natomiast żywienie prosiąt paszą z dodatkiem suszu z bulw topinamburu, stanowiącego bogate źródło fruktanów typu inulinowego, który ponadto wpływa pozytywnie na procesy fermentacyjne przez ograniczenie bakteryjnego rozkładu białka (II A 36; II D 18). Wyniki badań realizowanych we współpracy z Zachodniopomorskim Uniwersytetem Technologicznym w Szczecinie wykazały, że inulina wpływa na proteom osocza krwi prosiąt, zmieniając ekspresję białek związanych z krzepnięciem krwi i odpornością wrodzoną oraz proteom wątroby, modyfikując ekspresję białek związanych z metabolizmem cholesterolu i triacylogliceroli oraz ochroną hepatocytów przed stresem oksydacyjnym (II A 31, 32, 45). Fruktany typu inulinowego nie wpływają jednak na aktywność enzymów wątrobowych we krwi, ale zwiększają stężenie żelaza oraz mogą korzystnie wpływać na mineralizację kości (II A 40). Ponadto wykazano, że w nerkach prosiąt inulina może zwiększać ekspresję białka TRPM6 związanego z wchłanianiem zwrotnym magnezu (II A 39).

Umiejętności analityczne, związane z oceną aktywności flory bakteryjnej, pozwoliły mi podjąć współpracę z pracownikami naukowymi zajmującymi się żywieniem zwierząt przeżuwających. W ramach tej współpracy uczestniczyłem w badaniach nad wpływem pasz z udziałem drożdży na wskaźniki fermentacyjne i aktywność pierwotniaków w żwaczu krów i kóz (II A 9, 18, 24) oraz nad charakterystyką zdolności fruktanolitycznych bakterii *Butyrivibrio* (II A 35). Poza tym brałem udział w badaniach mających na celu określenie zasięgu i konsekwencji kwasicy żwacza w stadach krów mlecznych w Polsce (II A 46).

Odrębny temat moich badań stanowiła, wspomniana wcześniej, optymalizacja składu pasz stosowanych w żywieniu zwierząt laboratoryjnych. W ramach projektu EUREKA „Development of the standardized diets for laboratory animals” realizowanego wspólnie z Uniwersytetem w Lund (Szwecja), wykazano potrzebę wyeliminowania produktów sojowych z diet stosowanych w żywieniu zwierząt hodowlanych, w związku ze zmianami hormonalnymi wywoływanymi przez fitoestrogeny w organizmie szczurów (II A 11; II D 7). Zaproponowano skład diet bez soi, o niskiej zawartości fitoestrogenów, dla zwierząt laboratoryjnych, na których przeprowadza się badania nad gospodarką hormonalną. Kontynuacją tego zagadnienia były badania mające na celu opracowanie składu diet dla zwierząt laboratoryjnych utrzymywanych w warunkach specific-pathogen-free (SPF), realizowane w ramach projektu pt. „Opracowanie żywieniowych i technologicznych warunków produkcji pasz sterylizowanych dla zwierząt laboratoryjnych o podwyższonym statusie zdrowotnym i mikrobiologicznym”. Pasza dla takich zwierząt jest najczęściej autoklawowana, w związku z czym konieczne było określenia wpływu procesu sterylizacji m.in. na wartość odżywczą i energetyczną pasz, zawartości składników mineralnych i witamin oraz na właściwości mechaniczne granul (II A 28, 30, 33, 34). Bardzo ważnym aspektem było opracowanie pasz o niskiej zawartości fitoestrogenów. Podczas realizacji tego projektu opracowane zostały metody analizy witamin rozpuszczalnych w wodzie i witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, za pomocą odpowiednio micelarnej chromatografii kinetycznej i jej odmiany, mikroemulsyjnej chromatografii elektrokinetycznej (II A 23, 29). Receptury wszystkich pozytywnie przetestowanych pasz zostały przekazane Wytwórni Pasz „Morawski”, która była partnerem przy realizacji ww. projektów. Wyniki badań nad paszami przeznaczonymi dla zwierząt SPF zostały częściowo podsumowane w artykule popularnonaukowym przygotowanym na zaproszenie redaktora ALN Magazin (II D 21).

Zainteresowanie prowadzonymi przeze mnie badaniami, które stanowią główne osiągnięcie niniejszego przewodu habilitacyjnego, pozwoliło mi na udział w pracy



przeładowej dotyczącej konsekwencji fermentacji białka w przewodzie pokarmowym prosiąt (II A 43).

