

**Związki fenolowe wychmielin jako inhibitory enzymów  
glikolitycznych**

mgr inż. Iwona Majewska

Promotor : dr hab. inż. Anna Podsędek, prof. uczelni

## Streszczenie

Cukrzyca jest jednym z głównych problemów zdrowotnych na świecie, bowiem jest powszechnie występującą chorobą, a nawet została uznana za epidemię. Jedną z cech charakterystycznych tej choroby jest wysoki poziom glukozy we krwi (hiperglikemia), który powstaje wskutek zaburzeń w produkcji lub działaniu insuliny. Jedną ze strategii obniżania poziomu cukru we krwi u chorych na cukrzycę typu 2 jest zmniejszenie ilości uwalnianej z posiłku glukozy na drodze hamowania enzymów trawiennych rozkładających węglowodany, czyli  $\alpha$ -glukozydazy i  $\alpha$ -amylazy. Ze względu na występowanie działań niepożądanych wywoływanych przez obecnie stosowane leki konwencjonalne, celowe jest poszukiwanie alternatywnych inhibitorów enzymów glikolitycznych pochodzenia naturalnego. Powyższą aktywność wykazują m.in. wtórne metabolity roślinne, w tym związki fenolowe.

W niniejszej pracy jako źródło związków fenolowych wykorzystano pozostałość po ekstrakcji szyszek chmielowych nadkrytycznym CO<sub>2</sub>, czyli wychmieliny. Użycie produktu odpadowego wpisuje się w teraźniejszy trend ograniczania powstawania odpadów poprzez wykorzystywanie ich jako materiału wyjściowego do powstawania nowych produktów. Pod kątem aktywności inhibicyjnej wobec  $\alpha$ -glukozydazy i  $\alpha$ -amylazy przeanalizowano ekstrakt z wychmielin oraz frakcje wydzielone po jego rozdziale na złożu Sephadex™ LH-20.

W pracy postawiono hipotezę badawczą, że właściwości inhibicyjne związków fenolowych pochodzących z wychmielin są zależne od źródła pochodzenia enzymów glikolitycznych oraz od rodzaju użytych substratów. W celu sprawdzenia powyższego założenia zbadano aktywność antyamyloazową stosując trzy źródła enzymu: ślinę ludzką, trzustkę ludzką i wieprzową w modelu z pięcioma rodzajami skrobi. Właściwości hamowania  $\alpha$ -glukozydazy przez składniki wychmielin określono dla enzymów pochodzących z drożdży *S. cerevisiae* i szczurzych jelit oraz dla pięciu substratów, w tym dwóch syntetycznych oraz trzech naturalnych. W niniejszej pracy po raz pierwszy w badaniach nad poszukiwaniem inhibitorów enzymów glikolitycznych zastosowano taką różnorodność enzymów i substratów. Dodatkowo ważnym aspektem pracy było określenie składu ilościowego i jakościowego użytego ekstraktu oraz jego frakcji metodą UPLC-PDA-Q/TOF-MS celem wskazania związków fenolowych odpowiedzialnych za zaobserwowane właściwości biologiczne.

Pierwszy etap badań polegał na dokonaniu rozdziału związków fenolowych zawartych w ekstrakcie z wychmielinach na złożu Sephadex LH-20 z wykorzystaniem roztworów wodnych metanolu z jego wzrastającym udziałem (od 25 do 80%) oraz 70% acetonu. W oparciu o dane spektrofotometryczne uzyskane dla eluowanych próbek wydzielono 7 frakcji. Kolejnym etapem było określenie zawartości związków fenolowych w ekstrakcie z wychmielin i jego frakcjach z zastosowaniem metod spektrofotometrycznych i chromatograficznych. Otrzymane wyniki wskazują na rozdział związków fenolowych zawartych w ekstrakcie z wychmielin, na co wskazują uzyskane dane

dotyczące składu jakościowego i ilościowego związków fenolowych oraz określone wartości średniego stopnia polimeryzacji proantocyjanidyn. Ważnym aspektem pracy było określenie profilu fenolowego ekstraktu i frakcji, w których zidentyfikowano 97 związków fenolowych należących do kwasów hydroksybenzoesowych (3 związki), kwasów hydroksycynamonowych (9 związków), flawonoli (28 związków), stilbenów (1 związek), monomerów flawan-3-oli (4 związki) oraz proantocyjanidyn (51 związków), a także innych polifenoli (1 związek). Należy podkreślić, że 11 związków fenolowych zostało opisanych po raz pierwszy jako związki obecne w szyszkach chmielowych.

Zasadnicza część badań polegała na określeniu potencjału przeciwcukrzycowego badanego ekstraktu z wychmielin oraz jego frakcji. Potencjał ten określono metodami *in vitro* jako efektywność hamowania aktywności  $\alpha$ -glukozydazy i  $\alpha$ -amylazy różnego pochodzenia.  $\alpha$ -Glukozydazy były badane w układzie z następującymi substratami: glukopiranozyd *p*-nitrofenolu (*p*NPG) i  $\alpha$ -D-glukopiranozyd 4-metyloumbeliferonu (MUG), maltoza, sacharoza oraz dekstryny. Natomiast dla  $\alpha$ -amylaz zastosowano 5 rodzajów skrobi: ziemniaczaną, pszenną, kukurydzianą, ryżową i tapiokową. Oznaczono również potencjał antyoksydacyjny badanych prób jako zdolność do zmiatania wolnych kationorodników ABTS<sup>•+</sup> oraz rodniaków nadtlenkowych ze względu na nadmierne wytwarzanie reaktywnych form tlenu w stanie przewlekłej hiperglikemii. Otrzymane wyniki wskazują, że ekstrakt z wychmielin jest bogatym źródłem związków fenolowych, w szczególności glikozylowanych flawonoli oraz form monomerycznych flawanoli jak i proantocyjanidyn. Stwierdzono duże zróżnicowanie właściwości inhibicyjnych ekstraktu z wychmielin i jego frakcji w zależności od pochodzenia enzymu oraz zastosowanego substratu. Wykazano, że aktywnymi inhibitorami  $\alpha$ -glukozydazy są raczej prawdopodobnie są glikozylowane flawonole oraz monomery flawanolowe jak również proantocyjanidyny. Z kolei, za właściwości inhibicyjne ekstraktu z wychmielin wobec badanych  $\alpha$ -amylaz odpowiadają głównie proantocyjanidyny. Ponadto ekstrakt z wychmielin oraz jego frakcje charakteryzowały się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wykazały właściwości przeciwcukrzycowe wychmielin oparte na inhibicji enzymów glikolitycznych odpowiedzialnych za trawienie węglowodanów i uwalnianie glukozy. Ponadto, duże zróżnicowanie wyników w zależności od zastosowanego układu pomiarowego wskazują na potrzebę standaryzacji metod określających wyżej opisane aktywności, szczególnie w przypadku badania złożonych ekstraktów roślinnych. Wychmieliny mogłyby stanowić doskonały surowiec do wzbogacania żywności funkcjonalnej lub preparatów farmaceutycznych o charakterze suplementów diety z przeznaczeniem dla osób z cukrzycą typu 2. Jednakże, niezbędne są dalsze badania potwierdzające działanie przeciwcukrzycowe wychmielin i bezpieczeństwo ich stosowania.