

**Charakterystyka i ocena funkcjonalności
suplementu diety PENTAPEPTYDU
(mikropeletki)**

Data wykonania raportu: 05 STYCZNIA 2023 roku

Treść ekspertyzy

1. Charakterystyka fizyko-chemiczna produktu

Cel: Ocena właściwości fizyko-chemicznych produktu PENTAPEPTYD

Metodyka badawcza: Zawartość suchej masy oznaczono zgodnie z Polską Normą (PN-A-88027:1984). Oznaczanie zawartości białka (AOAC, 1990). Do oznaczania zawartości białka wykorzystano metodę Kjeldahla. Metoda polega na określeniu zawartości azotu ogólnego w produkcie. Oznaczenie przeprowadzono w aparacie Kjeltec. Do kolb odważono próbę, następnie dodano stężony kwas siarkowy i tabletki Kjeltabs (katalizator). Mineralizację prowadzono temperaturze 420°C przez ok. godzinę, do momentu zmiany koloru na zielony. Po tym etapie kolby podłączono do jednostki destylacyjnej umieszczając odbieralnik zawierający kwas borowy oraz wskaźnik Tashiro. Destylat miareczkowano mianowanym roztworem 0,1 N kwasu siarkowego do zmiany barwy.

Oznaczenie zawartości tłuszczu przeprowadzono w aparacie Soxtec metodą Soxhleta. Do gilz naważono próbę, wymieszano dokładnie z piaskiem, a następnie wysuszono w 130°C przez 1,5 godziny. Następnie ekstrahowano próby eterem naftowym, we wcześniej wysuszonych do stałej masy kubkach ekstrakcyjnych. Po zakończeniu procesu kubki z wyekstrahowanym tłuszczem przeniesiono do suszarki i wysuszono w temperaturze 105°C przez godzinę, a następnie zważono. Zawartość węglowodanów została obliczona poprzez odjęcie od zawartości suchej masy sumy ilości białka i tłuszczu.

Zawartość jonów metali ciężkich oznaczono metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej przy użyciu spektrometru AAS-3 (Zeiss) zgodnie z metodą podaną przez Olejnik i in. (1999). Próbki zostały zmineralizowane w tyglach kwarcowych, w piecu muflowym w temp. 500°C. Uzyskany biały popiół, wolny od węgla, rozpuszczono na gorąco w 1N HNO₃. Roztwory przesączono, przenosząc ilościowo do kolb miarowych o pojemności 50 ml i uzupełniono kwasem azotowym. Wyniki przedstawiono w mg/100g próby.

Wyniki:

1. Nazwa produktu

Preparat typu suplement diety – PENTAPEPTYD

- 480 mg średnia masa produktu
- 130 mg masa kapsułki

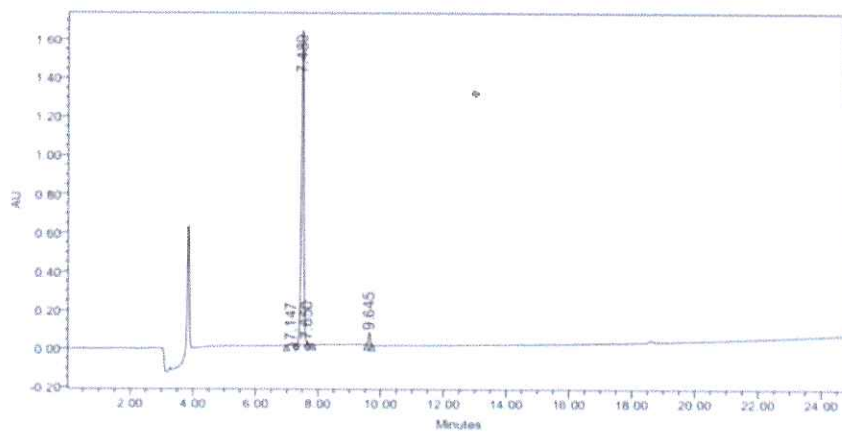
2. Charakterystyka produktu

2.1 Składniki produktu i ich procentowy udział

| Nazwa składnika | Udział [%] |
|--|------------|
| Pentapeptyd | 300 µg |
| Kwas askorbinowy (forma mikropeletek) | 150 mg |
| Acyl - karnityna (forma mikropeletek) | 50 mg |
| Celuloza mikrokrystaliczna | 100mg |
| Kapsułka żelatynowa oraz kapsułka dojelitowa | |

4. Analiza jakościowa peptydu z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej

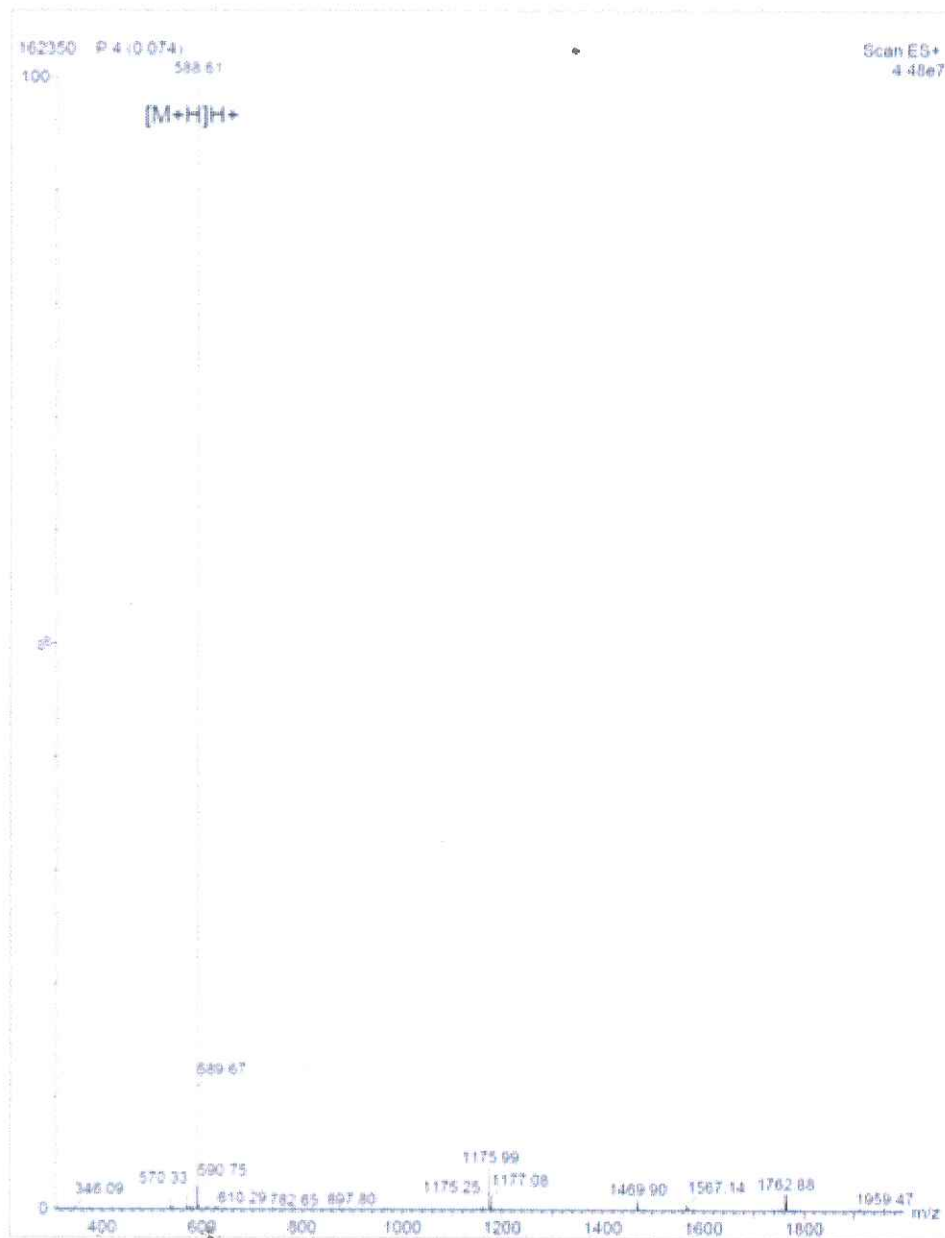
1. HPLC



| | Czas | Powierzchnia | Powierzchnia [%] | Wysokość |
|---|-------|--------------|------------------|----------|
| 1 | 7.147 | 95698 | 0.99 | 9474 |
| 2 | 7.489 | 9185677 | 95.48 | 1628497 |
| 3 | 7.650 | 44644 | 0.46 | 11418 |
| 4 | 9.645 | 294974 | 3.07 | 62331 |

5. Analiza jakościowa peptydu z wykorzystaniem spektrometrii mas

2. MS



6. Opis wyrobu

Proszek biały, niejednorodny, sypki, z grudkami, smak i zapach obojętny, mało intensywny, bez obcych zapachów i obcego smaku.

7. Przeznaczenie produktu

Przeznaczenie produktu do stosowania przez szeroką grupę konsumentów, z wyłączeniem dzieci do lat trzech.

Zakłada się użycie produktu w ilości pozwalającej na uzyskanie produktu stanowiącego źródło bioaktywnych peptydów.

8. Cechy organoleptyczne

| | |
|--------------------------|--|
| Barwa | Biała |
| Wygląd i konsystencja | Mikropeletki, brak zlepek, postać mikrogranulatu |
| Zapach | Bez zapachu i bez zapachów obcych |
| Smak | Bez smaku |
| Wielkość cząstek | 0.8mm-1.2mm |
| Rozpuszczalność w wodzie | Średnio rozpuszczalny w wodzie |

9. Cechy fizyko-chemiczne

9.1 Wartość odżywcza produktu w 100 g

| Wartość odżywcza | W 100 g | W 1 kapsułce |
|-------------------------------------|---------|--------------|
| Wartość energetyczna [kJ] | 958 | 8,65 |
| Wartość energetyczna [kcal] | 230 | 2,08 |
| Tłuszcz [g] | <0,10 g | 0,0 g |
| w tym kwasy tłuszczowe nasycone [g] | <0,10 g | 0,0 g |
| Węglowodany [g] | 19,00 g | 0,17 g |
| w tym cukry [g] | 6,18 g | 0,05 g |
| Błonnik | 43,90 g | 0,39 g |
| Białko [g] | 24,80 g | 0,22 g |
| Sól [g] | 0,11 g | 0,0 g |

9.2 Cechy fizyko-chemiczne

| Cecha | Wartość |
|----------------------------------|------------------------|
| Wilgotność [%] | 0% |
| Zawartość suchej masy [%] | 100% |
| Zawartość popiołu [%] | 0% |
| Zanieczyszczenia mechaniczne | niedopuszczalne |
| Zawartość metali ciężkich | |
| Ołów | nie więcej niż 3 mg/kg |
| Kadm | nie więcej niż 2 mg/kg |
| Rtęć | nie więcej niż 1 mg/kg |
| Zawartość składników mineralnych | nieobecne |

10. Cechy mikrobiologiczne

| | |
|---|-------------------------|
| Ogólna liczba drobnoustrojów w 1g | mniej niż 10 - 1000 jtk |
| Ogólna liczba drożdży i pleśni w 1 g | nie więcej niż 50 jtk |
| Liczba <i>Bacillus cereus</i> w 1 g | nie więcej niż 10 jtk |
| Bakterie z grupy coli w 1 g | nie więcej niż 10 jtk |
| Obecność <i>Escherichia coli</i> w 1g | nieobecne |
| Gronkowce chorobotwórcze koagulazododatnie w 1 g | nieobecne |
| Salmonella w 25 g | nieobecne |
| Obecność beztlenowych bakterii przetrwalnikujących redukujących siarczyny w 1 g | nieobecne |
| Obecność beztlenowych bakterii przetrwalnikujących Clostridium w 1 g | nieobecne |
| Liczba bakterii z rodziny Enterobacteriaceae w 1 g | nie więcej niż 10 jtk |

11. Alergeny

Brak

12. Okres przydatności do spożycia

Przykład: Okres przechowywania wynosi 12 miesięcy od daty produkcji

13. Warunki przechowywania

Warunki, których należy unikać: chronić przed wilgocią (produkt higroskopijny).

W suchym, przewiewnym pomieszczeniu wg PN - 88/A-74705.

Zalecana wilgotność względnej powietrza do 75%, temperatura do 20°C

14. Opakowanie

Przykłady:

- worki aseptyczne o poj. 1 kg i 2 kg w opakowaniach kartonowych lub skrzynkach z tzw. sztucznego
- pojemniki z tworzywa sztucznego o wybranej objętości

Wszystkie opakowania muszą być dopuszczone do kontaktu z żywnością

15. Warunki transportu i dystrybucji

Przewozić suchymi i czystymi środkami transportu, które jednocześnie powinny zabezpieczać opakowania przed uszkodzeniem

16. Oznakowanie

Zgodnie z preferencjami Producenta jak i zgodnie z obowiązującym Rozporządzeniem.

2. Określenie wartości odżywczej produktu

Cel badania: Określenie wartości odżywczej produktu PENTAPEPTYD.

Metodyka badawcza: jak w punkcie 1

Wyniki:

| Wartość odżywcza | W 100 g | W 1 kapsułce |
|-------------------------------------|---------|--------------|
| Wartość energetyczna [kJ] | 958 | 8,65 |
| Wartość energetyczna [kcal] | 230 | 2,08 |
| Tłuszcz [g] | <0,10 g | 0,0 g |
| w tym kwasy tłuszczowe nasycone [g] | <0,10 g | 0,0 g |
| Węglowodany [g] | 19,00 g | 0,17 g |
| w tym cukry [g] | 6,18 g | 0,05 g |
| Błonnik | 43,90 g | 0,39 g |

| | | |
|------------|---------|--------|
| Białko [g] | 24,80 g | 0,22 g |
| Sól [g] | 0,11 g | 0,0 g |

3. Ocena czystości mikrobiologicznej

Cel badania: Oznaczenie czystości mikrobiologicznej produktu PENTAPEPTYD

Metodyka badawcza: Produkt poddano analizie mikrobiologicznej w kierunku obecności i liczby drobnoustrojów, które stanowią wskaźnik jego jakości mikrobiologicznej:

Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych (PN-EN ISO 4833:2004/Ap1:2005)

- 10 g próby wprowadzono do 90 ml roztworu soli fizjologicznej
- wytrząsano przez 10 minut
- wykonano posiew metodą zalewową z rozcieńczeń dziesiętnych w zależności od spodziewanej liczby drobnoustrojów
- płytki zalano podłożem stałym agar odżywczy z glukozą
- po zestaleniu płytki inkubowano w temp. 37°C przez 24-48h
- policzono liczbę kolonii, które wyrosły na płytkach, jednostka jtk/ml lub gram produktu.

Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów psychrofilnych (PN-EN ISO 4833:2004/Ap1:2005)

- 10 g próby wprowadzono do 90 ml roztworu soli fizjologicznej
- wytrząsano przez 10 minut
- wykonano posiew metodą zalewową z rozcieńczeń dziesiętnych w zależności od spodziewanej liczby drobnoustrojów
- płytki zalano podłożem stałym agar odżywczy z glukozą
- po zestaleniu płytki inkubowano w temp. 15°C przez 72h
- policzono liczbę kolonii, które wyrosły na płytkach, jednostka jtk/ml lub gram produktu.

Oznaczanie liczby pleśni i drożdży (PN-A-75052-08:1990)

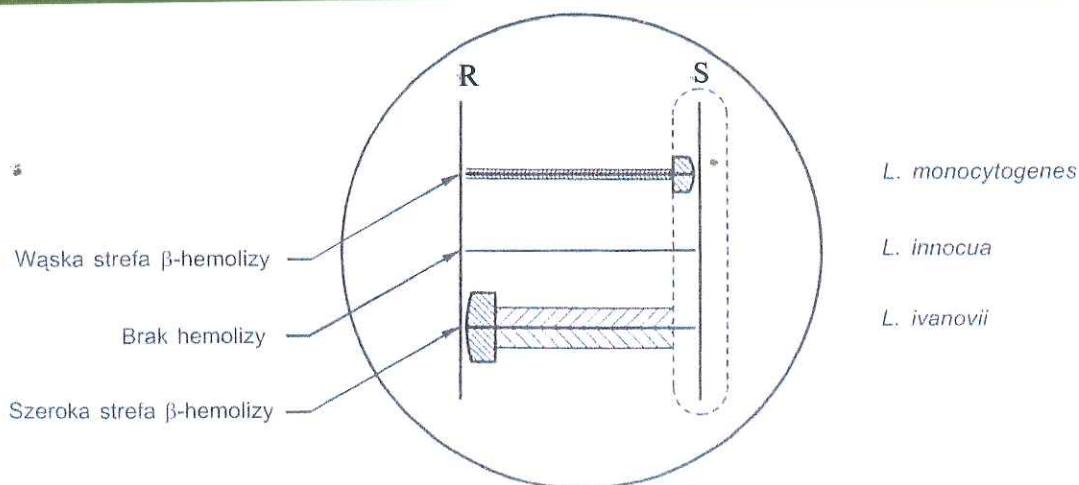
- 10 g próby wprowadzono do 90 ml roztworu soli fizjologicznej
- wytrząsano przez 10 minut

- wykonano posiew metodą zalewową z rozcieńczeń dziesiętnych w zależności od spodziewanej liczby drobnoustrojów
- płytki zalano podłożem stałym z ekstraktem drożdżowym, glukozą i chloramfenikolem
- po zestaleniu płytki inkubowano w temp. 30°C przez 3 dni
- policzono liczbę kolonii, które wyrosły na płytkach, jednostka jtk/ml lub gram produktu.

Wykrywanie obecności Listeria monocytogenes (PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005)

- 25 g (lub 10 g) próby wprowadzono do 225 ml (lub 90 ml) bulionu pół-Fraser
- wytrząsano przez 10 minut
- próby inkubowano w temp. 30°C przez 24 h
- wykonano przesiew 0,1 ml hodowli do 10 ml bulionu namnażającego Fraser
- inkubowano próby w temp. 35°C przez 48 h
- wykonano przesiew na dwa selektywne podłoża stałe (posiew powierzchniowy):
 - agar ALOA
 - agar Oxford
- inkubowano próby w temp. 37°C przez 24-48 h
- dokonano interpretacji wyników:
 - o kolonie *L. monocytogenes* na agarze ALOA: turkusowe z białą sferą
 - o kolonie *L. monocytogenes* na agarze Oxford: szaro-białe otoczone brązową czarna sfera.
- wykonano przesiew charakterystycznych kolonii na podłoże TSYEA
- inkubowano próby w temp. 37°C przez 18-24 h
- wykonano przesiew na podłoże agar z krwią (test CAMP)
- inkubowano próby w temp. 37°C przez 24 h

Schemat testu CAMP - test potwierdzający *L. monocytogenes*
 (http://zmo.biol.uw.edu.pl/pliki/2013-DK-IV_WYKRYWANIE.pdf)



S - *Staphylococcus aureus*

R - *Rhodococcus equi*

Wykrywanie obecności *Salmonella* sp. (PN-EN ISO 6579:2003/A1:2007)

- 25 g (lub 10 g) próby wprowadzono do 225 ml (lub 90 ml) zbuforowanej wody peptonowej
- wytrząsano przez 10 minut
- próby inkubowano w temp. 30°C przez 20 h
- wykonano przesiew 1 ml hodowli do 10 ml selektywnych pożywek płynnych: pożywka wg Rappaport Vassiliadis z soją (pożywka RVS) i pożywka wg Muller-Kauffman z czterotianem i nowobiocyną (pożywka MKTTn)
- próby inkubowano w pożywce RVS w temp. 41°C przez 24 h
- próby inkubowano w pożywce MKTTn w temp. 37°C przez 24 h
- wykonano przesiew na dwa selektywne podłoża stałe (posiew powierzchniowy):
 - agar z ksylozą i lizyną (XLD agar)
 - agar Rambacha
- próby inkubowano w temp. 37°C przez 24-48 h
- dokonano interpretacji wyników:

- kolonie *Salmonella* sp. na agarze XLD: regularne, czarne, błyszczące i wypukłe z białą otoczką
- kolonie *Salmonella* sp. na agarze Rambacha: kolonie czerwone – *Salmonella* sp.
- kolonie niebieskie – grupa coli.

Wykrywanie obecności i oznaczanie liczby Enterobacteriaceae (PN-ISO 21528-2:2005)

- 10 g próby wprowadzono do 90 ml roztworu soli fizjologicznej
- wytrząsano przez 10 minut
- wykonano posiew metodą zalewową z rozcieńczeń dziesiętnych w zależności od spodziewanego zakażenia.
- płytki zalano podłożem stałym z fioletem, czerwiecią, solami żółci i glukozą (VRBG)
- po zestaleniu pożywki, w celu wytworzenia drugiej warstwy zabezpieczającej przed rozprzestrzenianiem się wzrostu na powierzchni oraz w celu stworzenia warunków względnie beztlenowych, wiano do płytki ok. 15 ml pożywki agarowej VRBG
- odwrócono płytki do góry dnem i inkubowano w temp. 37° przez 24 h
- dokonano interpretacji wyników:
 - charakterystyczne kolonie są barwy różowej do czerwonej lub purpurowej (ze sferą lub bez sfery precypitacji).

Oznaczanie liczby bakterii fermentacji mlekowej (PN-ISO 15214:2002)

- 10 g próby wprowadzono do 90 ml roztworu soli fizjologicznej
- wytrząsano przez 10 minut
- wykonano posiew metodą zalewową z rozcieńczeń dziesiętnych w zależności od spodziewanej liczby bakterii
- płytki zalano podłożem stałym MRS
- po zestaleniu płytki inkubowano w temp. 32°C przez 24-48 h
- policzono liczbę kolonii, które wyrosły na płytkach, jednostka jtk/ml lub gram produktu.

Oznaczanie liczby bakterii typu kwaszącego (ISO 15214:1998)

- 10 g próby wprowadzono do 90 ml roztworu soli fizjologicznej
- wytrząsano przez 10 minut
- wykonano posiew metodą zalewową z rozcieńczeń dziesiętnych w zależności od spodziewanej liczby bakterii
- płytki zalano podłożem stałym Smith-Lorentza
- po zestaleniu płytki inkubowano w temp. 32°C przez 24-48 h
- policzono liczbę kolonii, które wyrosły na płytkach, jednostka jtk/ml lub gram produktu.

Oznaczanie miana drobnoustrojów wskaźnikowych

- 10 g próby wprowadzono do 90 ml roztworu soli fizjologicznej
- wytrząsano przez 10 minut
- wykonano rozcieńczenia dziesiętne w zależności od spodziewanego zakażenia
- pobrano 1 ml z wybranego rozcieńczenia i przeniesiono do 9 ml danego podłoża różnicującego:

podłoże Wrzoska – wykrywanie bakterii beztlenowych (interpretacja wyników: zmętnienie pożywki, powstanie osadu = wynik dodatni)

podłoże z żółcią i z zielenią brylantową – wykrywanie bakterii z grupy coli (interpretacja wyników: zmętnienie pożywki, zmiana barwy na żółtą, gaz w rurce Durhama = wynik dodatni)

podłoże z azydkiem sodu i purpurą bromokrezolową – wykrywanie enterokoków (interpretacja wyników: zmętnienie podłoża, zmiana barwy na żółtą = wynik dodatni)

podłoże Giollitti-Cantoni – wykrywanie gronkowców koagulazododatnich (interpretacja wyników: zaciemnienie pożywki = wynik dodatni).

Wyniki:

Tabela: Czystość mikrobiologiczna produktu PENTAPEPTYD

| Oznaczany wskaźnik | Wynik |
|---|-------------------------|
| Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych | $3,4 \times 10^2$ jtk/g |
| Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych | $3,5 \times 10^2$ jtk/g |
| Liczba pleśni i drożdży mezofilnych | $< 10^2$ jtk/g |

| | |
|---|-------------------------|
| Liczba pleśni i drożdży psychrofilnych | < 10 ² jtk/g |
| Obecność i liczba <i>Listeria monocytogenes</i> | Nieobecne w 25 g |
| Obecność <i>Salmonella</i> sp. | Nieobecne w 25 g |
| Liczba bakterii Enterobacteriaceae | < 10 ² jtk/g |
| Liczba bakterii fermentacji mlekowej | < 10 ² jtk/g |
| Miano beztlenowców | Nieobecne w 0,01 g |
| Miano bakterii z grupy coli | Nieobecne w 0,01 g |
| Miano enterokoków | Nieobecne w 0,01 g |
| Miano gronkowców koagulazododatnich | Nieobecne w 0,01 g |

Wnioski: Produkt spełnia wymagania mikrobiologiczne zgodnie Ustawą z dnia 25 sierpnia 2008 roku o bezpieczeństwie żywności i żywienia.

4. Testy stabilności produktu PENTAPEPTYD w różnych warunkach przechowania

Cel: Celem badań była ocena stabilności fizyko-chemicznej, organoleptycznej i mikrobiologicznej podczas przechowywania w różnych warunkach temperaturowych.

Metodyka: Produkt PENTAPEPTYD przechowywano przez 2 miesiące w temperaturze pokojowej (20°C), chłodniczej (4°C), w temperaturze -18°C i w temperaturze 40°C. Produkty analizowano zaraz po produkcji (wyniki w pkt 4 sprawozdania) jak i po 2, 4 i 6 tygodniach przechowywania. Procedura analizy fizykochemicznej jak w pkt. 1. Procedura analizy mikrobiologicznej jak w pkt 3.

Wyniki:

Tabela: Stabilność produktu PENTAPEPTYD w czasie przechowywania

| Oznaczany wskaźnik | Punkt czasowy wykonania analizy | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | T2 | | | | T4 | | | | T6 | | | |
| | Badany zakres temperatur | | | | | | | | | | | |
| | 20°C | 40°C | 4°C | -18°C | 20°C | 40°C | 4°C | -18°C | 20°C | 40°C | 4°C | -18°C |
| Cechy fizyko-chemiczne * | | | | | | | | | | | | |
| Wigotność % | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Zawartość suchej masy % | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Zawartość popiołu % | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Masa zawartości kapsułki mg | ± 5 | ± 5 | ± 10 | ± 5 | ± 10 | ± 5 | ± 5 | ± 10 | ± 10 | ± 5 | ± 10 | ± 5 |
| Cechy organoleptyczne | | | | | | | | | | | | |
| Barwa | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ |
| Smak | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ |
| Wygląd | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ |
| Konsystencja | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ |
| Wielkość cząstek | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ | BZ |
| Czystość mikrobiologiczna | | | | | | | | | | | | |
| Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych (jtk/g) | 1,5 x 10 ² | 1,9 x 10 ² | 3,8 x 10 ² | 4,4 x 10 ² | 1,9 x 10 ² | 3,5 x 10 ² | 1,5 x 10 ² | 2,2 x 10 ² | 1,8 x 10 ² | 3,6 x 10 ² | 3,4 x 10 ² | 3,0 x 10 ² |
| Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych (jtk/g) | 2,8 x 10 ² | 1,2 x 10 ² | 3,4 x 10 ² | 1,8 x 10 ² | 2,4 x 10 ² | 1,2 x 10 ² | 3,4 x 10 ² | 1,9 x 10 ² | 2,4 x 10 ² | 1,2 x 10 ² | 3,4 x 10 ² | 1,8 x 10 ² |
| Liczba pleśni i drożdży mezofilnych (jtk/g) | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² |
| Liczba pleśni i drożdży psychrofilnych (jtk/g) | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² |
| Obecność i liczba <i>Listeria monocytogenes</i> | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g |
| Obecność <i>Salmonella</i> sp. | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g |
| Liczba bakterii Enterobacteriaceae (jtk/g) | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² |
| Liczba bakterii fermentacji mlekowej (jtk/g) | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² | < 10 ² |
| Miano beztlencowców | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25g | NB w 25g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g |
| Miano bakterii z grupy coli | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25g | NB w 25g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g |
| Miano enterokoków | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25g | NB w 25g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g |
| Miano gronkowców koagulazododatnich | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25g | NB w 25g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g | NB w 25 g |

Legenda:

T2 – analiza wykonana 2 tygodnie po produkcji produktu

T2 – analiza wykonana 4 tygodnie po produkcji produktu

T6 – analiza wykonana 6 tygodni po produkcji produktu

NB – nieobecne

BZ – bez zmian w porównywaniu do momentu wyprodukowania produktu

Wnioski: Produkt jest stabilny w aspekcie analizowanych parametrów przez cały okres przechowalniczy.

5. Ocena organoleptyczna/konsumencka

Cel: Ocena organoleptyczna kapsułek zawierających PENTAPEPTYD

Metodyka: Ocenianymi cechami produktu był wygląd zewnętrzny, barwa, smak oraz zapach. Panel respondentów liczył 12 osób w wieku 35-40 lat, płci męskiej.

Ocenę konsumencką wykonano przy zastosowaniu metody dziesięciopunktowej skali hedonicznej i przeprowadzono w grupie 12 osób, w laboratorium sensorycznym spełniającym wymagania podane w normie PN-ISO 8589:1998. Karta oceny została przygotowana na podstawie opracowania J. Gawęcka T. Jędryka „Analiza sensoryczna. Wybrane metody i przykłady zastosowań”, z własnymi modyfikacjami. Wyróżnikami jakie oceniający brali pod uwagę były barwa, smak, zapach oraz ogólna pożądalność danej próbki.

Wyniki:

Tabela: Wyniki oceny organoleptycznej kapsułek zawierających PENTAPEPTYD

| Cecha | Średnia ocena respondentów | Sugestie respondentów |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Wygląd | 9 | Kapsułka powinna być nieprzeźroczysta |
| Barwa | 9 | Produkt nie powinien być widoczny |
| Zapach | 10 | Brak uwag |
| Smak | 10 | Brak uwag |
| Łatwość w przetykaniu | 10 | Brak uwag |
| Ocena ogólna | | 9,5 |

II Ocena funkcjonalności (charakteru prozdrowotnego) produktu

1. Oznaczenie potencjału antyoksydacyjnego

Wolne rodniki są jednym z czynników etiologicznych wielu tzw. chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów, chorób układu krwionośnego, cukrzycy czy chorób reumatycznych. Uważane są za jedną z przyczyn chorób neurodegeneracyjnych. Literatura przedmiotu wskazuje, że niektóre peptydy, a dokładniej ich składniki jak wchodzące w skład peptydów aminokwasy takie jak histydyna, tyrozyna, metionina, lizyna, arginina, fenyloalanina i tryptofan mogą wykazywać właściwości przeciwutleniające. Obecność tych aminokwasów wspomaga syntezę glutationu – wewnątrzkomórkowego przeciwutleniacza. Z uwagi na obecność w badanym peptydzie argininy zweryfikowano potencjał antyoksydacyjny PENTAPEPTYDU.

Cel: Ocena potencjału przeciwrodnikowego, zdolność wygaszania rodnika DPPH[•] dla produktu PENTAPEPTYD.

Metodyka: Ogólną zawartość polifenoli w produkcie oznaczano przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu'a. Metoda polegała na pomiarze zmiany barwy żółtego odczynnika Folina-Ciocalteu'a zredukowanego grupami hydroksylowymi związków fenolowych w środowisku węglanu sodu na barwę niebieską. Absorbancję próbki mierzono przy użyciu spektrofotometru firmy Metertek SP-830 (Tajwan), przy długości fali $\lambda = 765$ nm). Do wykreślenia krzywej kalibracyjnej użyto roztworów alkoholowych kwasu galusowego jako wzorca ($r = 0,99$). Wyniki wyrażano jako równoważnik kwasu galusowego (GAE) w mg/g suchej masy ekstraktu.

Ocenę potencjału antyoksydacyjnego, w tym:

Zdolność dezaktywacji rodników DPPH

Oznaczenie aktywności przeciwrodnikowej badanej próby wykonywano metodą spektrofotometryczną z użyciem stabilnego rodnika 2,2'-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH). Polegało ono na określeniu stopnia wygaszania rodników DPPH przez zawarte w ekstraktach przeciwutleniacze, czemu towarzyszyło zmniejszenie intensywności barwy purpurowej i przejście w barwę żółtą. Absorbancję próbki, po upływie 30-minutowej inkubacji w temp. $20 \pm 2^\circ\text{C}$ bez dostępu światła, mierzono przy długości $\lambda = 517$ nm (Metertek SP-830, Tajwan). Zdolność wygaszania wolnych rodników DPPH obliczano z równania:

$$(E_w - E_0)$$

$$AA = 100 - \frac{(E_w - E_0)}{E_k} \cdot 100 \%$$

gdzie:

AA – zdolność wygaszania wolnych rodników DPPH [%],

E_w – absorbancja próbki właściwej z roztworem DPPH,

E_0 – absorbancja próbki właściwej bez dodatku roztworu DPPH,

E_k – absorbancja próbki kontrolnej (alkoholowy roztwór DPPH).

Zdolność dezaktywacji rodnika ABTS

Metoda ta polega na redukcji barwnego kationorodnika ABTS [2,2'-azynobis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)] przez obecne przeciwutleniacze w badanej próbce i spektrofotometrycznym (Metertek SP-830, Tajwan) pomiarze zmian stężenia kationorodnika ABTS [2,2'-azynobis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)], po 6 minutach w temperaturze 30°C, przy długości fali 734 nm.

Aktywność chelatująca jonów żelaza II

Badanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II) przez składniki badanej próbki przeprowadzono w wodnych roztworach preparatów polifenoli dodając chlorek żelaza (II) i ferrozyn. Absorbancję barwnego kompleksu mierzono po 10 min od dodania ferrozyny przy długości fali 562 nm, w spektrofotetrze Shimadzu UV- 160A .

Wyniki:

Tabela: Potencjał przeciwutleniający produktu PENTAPEPTYD

| Nazwa produktu | DPPH mmol Tx/g s.m | ABTS mmol Tx/g s.m | Aktywność chelatuja 1500 ppm (%) |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--|
| PENTAPEPTYD | 11,81 | 9,87 | 91,02 |

Wnioski: Produkt PENTAPEPTYD posiada właściwości antyoksydacyjne, co oznacza, że może mieć potencjalny, ochronny wpływ przed reaktywnymi formami tlenu. Może chronić organizm przed negatywnymi skutkami oddziaływania wolnych

rodników. Produkty bogate w przeciwutleniacze stanowią ważny element w profilaktyce powstawiania wielu chorób. Pozwalają obniżyć ryzyko choroby wieńcowej, udaru mózgu, chorób naczyń obwodowych. Chronią przed czynnikami powodującymi raka. Podnoszą ogólną odporność organizmu na zakażenia i infekcje. Łagodzą przebieg wielu chorób.

2. Oznaczanie zawartości związków prozdrowotnych w produktach (polifenole, kwasy organiczne, cukry, witaminy, inne)

Cel: Oznaczanie związków chemicznych o charakterze prozdrowotnym w produkcie PENTAPEPTYD.

Metodyka: Cukry, kwasy organiczne, witaminy oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na chromatografie Hitachi - L-2000 Series LaChrom Elite (zestaw: automatyczny podajnik próbek L-2200, pompa podwójna L-2130, z detektorem refraktometrycznym RID L-2490 oraz detektorem UV L-2400). Do oznaczeń użyto kolumnę Rezex ROA Organic Acid H+ (8%) – 300 x 7,80 mm (Phenomenex). Jako eluent stosowano 0,0225N H₂SO₄, przy przepływie 0,6 ml/min, izokratycznie. Oznaczenia prowadzono w temperaturze 30°C. Próby nanoszono na kolumnę w ilości 10 µl. Czas rozdziału wynosił 30 minut. Identyfikacji jakościowej i ilościowej dokonano metodą standardu zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni oraz wysokości pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem programu EZChrom Elite). Analizy chromatograficzne przeprowadzono na chromatografie cieczowym Agilent 1260 Infinity II wyposażonym w automatyczny podajnik próbek (G7129A), pompę (G7111A) oraz detektor diodowy (G7115A) z przeglądem widma (190-400 nm). Oznaczenia kwasów fenolowych w tym kwasu galusowego, waniliny, p-hydroksybenzoesowego, α-tokoferolu oraz katechiny wykonano przy długości fali równej 280 nm; retinolu, kwasów kawowego, p-kumarowego, synapowego, oraz ferulowego przy 320 nm; witeksyny przy 340 nm, rutyny, kemferolu i kwercetyny przy 360 nm, niacyny, ryboflawiny przy 260 nm, natomiast kw. chlorogenowego przy 255 nm. Związki fenolowe rozdzielano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w kolumnie SB-C18 (50 mm x 4,6 mm o średnicy cząstek równej 1,8 µm, Agilent) w temperaturze 30°C. Jako eluent stosowano: A: woda : kw. octowy (98:2), B: metanol: kw. octowy (98:2) przy przepływie 0,75 ml/min, w gradiencie: 0 min 1%B, 22 min 40%B,

26 min 40%B, 28 min 100%B, 35 min 100% B, 36 min 1% B. Próby nanoszono na kolumnę w ilości 10 µl. Obliczenia ilościowe wykonano wykorzystując powierzchnie pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem programu OpenLab CDS).

Wyniki:

Tabela: Zawartość polifenoli ogółem w potencjalnych składnikach formułacji

| Nazwa produktu | Stężenie polifenoli ogółem mg/g s.m. |
|----------------|--------------------------------------|
| PENTAPEPTYD | 7,0 |

Tabela: Zawartość wybranych fitokwasów w produkcie PENTAPEPTYD

| Związek polifenolowy | | | | | | | | |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GAL | WAN | BEN | TOK | KAT | RET | KAW | KUM | SYN |
| mg/100 g próby | | | | | | | | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Związek polifenolowy | | | | | | | |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| RUT | KEM | KWE | NIA | RYB | CHL | FER | WIT |
| mg/ 100 g próby | | | | | | | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Legenda: GAL - kwas galusowy, WAN - wanilina, BEN - kwas p-hydroksybenzoesowy, TOK- α-tokoferol, KAT- katechiny, RET - retinol, KAW - kwas kawowy, KUM - kwas p-kumarowy, SYN-kwas synapowy, FER - kwas ferulowy, WIN - witeksyna, RUT - rutyna, KEM - kemferol, KWE - kwercetyna, NIA- niacyna, RYB - ryboflawina, CHL - kw. chlorogenowy; ND – nie oznaczono

Wnioski: Produkt nie zawiera cukrów, jest również pozbawiony kwasów fenolowych. Za właściwości przeciwutleniające odpowiadają prawdopodobnie zawarte w produkcie peptydy.

3. Ocena wpływ produktu na mikrobiom jelitowy prawidłowy (sportowcy) i patologicznie zmieniony (osoby po antybiotykoterapii, osoby po infekcji wirusowej, osoby otyłe, osoby w wieku >75 roku życia)

Układ pokarmowy człowieka jest miejscem kolonizacji ponad 500 różnych gatunków bakterii. Przewód pokarmowy jest drugim co do wielkości (po drogach oddechowych) układem organizmu – jego powierzchnia wynosi 250-400 m². Liczba i różnorodność bakterii jest względnie mała w żołądku, co jest spowodowane panującymi w nim warunkami, takimi jak: niskie pH treści żołądkowej, obecność soli kwasów żołądkowych, czy szybki przepływ trawionych substancji. W przewodzie pokarmowym człowieka liczebność populacji bakterii wzrasta w miarę przesuwania się pokarmu w kierunku jelita cienkiego (10³ komórek/ml treści jelitowej w dwunastnicy), krętnicy (10⁸ komórek/ml) i okrężnicy (10¹¹–10¹² komórek/ml) (Tabela poniżej).

Tabela: Skład mikrobiomu dorosłego, zdrowego człowieka

| Drobnoustroje | Liczba drobnoustrojów w 1 ml (g) treści przewodu pokarmowego | | | |
|---|--|-------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| | Żołądek | Jelito cienkie | Jelito grube | Kał |
| Tlenowe (lub fakultatywne beztlenowce): | | | | |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 0-10 ³ | 0-10 ⁵ | 10 ³ -10 ⁷ | 10 ⁷ -10 ¹² |
| <i>Streptococcus</i> sp. | 0-10 ² | 0-10 ³ | 10 ² -10 ⁶ | 10 ⁴ -10 ¹⁰ |
| <i>Staphylococcus</i> sp. | 0-10 ² | 0-10 ⁴ | 10 ² -10 ⁶ | 10 ⁵ -10 ¹⁰ |
| <i>Lactobacillus</i> sp. | 0-10 ³ | 0-10 ⁴ | 10 ² -10 ³ | 10 ⁶ -10 ¹⁰ |
| Grzyby | 0-10 ² | 0-10 ² | 10 ² -10 ³ | 10 ² -10 ⁶ |
| Bebtlenowce: | | | | |
| <i>Bacteroides</i> sp. | rzadko | 0-10 ² | 10 ³ -10 ⁷ | 10 ¹⁰ -10 ¹² |
| <i>Bifidobacterium</i> sp. | rzadko | 0-10 ³ | 10 ³ -10 ⁶ | 10 ⁸ -10 ¹² |
| <i>Streptococcus</i> sp. | rzadko | 0-10 ³ | 10 ² -10 ⁴ | 10 ⁸ -10 ¹¹ |
| <i>Clostridium</i> sp. | rzadko | rzadko | 10 ² -10 ⁴ | 10 ⁶ -10 ¹¹ |
| <i>Eubacterium</i> sp. | rzadko | rzadko | 10 ² -10 ⁴ | 10 ³ -10 ¹² |

Stan i funkcjonowanie układu pokarmowego są bardzo istotne dla ogólnego stanu zdrowia człowieka. W przewodzie pokarmowym, w przewodzie, znajdują się mikroorganizmy, które są dla nas bardzo ważne i pożyteczne, ale zamieszkują tam również organizmy szkodliwe, często niebezpieczne dla naszego zdrowia. Mikrobiom jelitowy zmienia się w trakcie życia człowieka zależnie od wieku, stanu fizjologicznego, sposobu odżywiania, mechanizmów odpornościowych gospodarza, stosowanych leków i innych czynników środowiskowych. Zaburzenia w składzie mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka są ściśle powiązane ze stylem życia, dietą i narażeniem na stres. W związku z czym można wysunąć hipotezę, że znaczącą

większość społeczeństwa charakteryzują zaburzenia w składzie jakościowo-ilościowym mikrobiomu. Stąd też konieczna jest suplementacja diety produktami wspierającymi namnażanie drobnoustrojów prozdrowotnych.

Cel: Ocena wpływu produktu PENTAPEPTYD na zmiany ilościowo-jakościowe składników mikrobiomu jelitowego.

Metodyka:

a. Model trawienia *in vitro*

Pierwszy etap trawienia *in vitro* ma na celu symulację warunków panujących w żołądku. W tym celu do mieszaniny imitującej płyn żołądkowy (pusty żołądek)* dodawana była pepsyna w ilości 300 U/ml i obniżane pH do wartości 2.0 za pomocą 1 M HCl. Ten etap trawienia był prowadzony przez 4 h w temperaturze 37°C. Ruchy perystaltyczne były imitowane przez mieszanie płynu przy użyciu mieszadła magnetycznego. Kolejny etap miał na celu odwzorowanie warunków panujących w jelicie cienkim. W tym celu pH płynu było podnoszone do wartości 6.0, z zastosowaniem 1 M NaHCO₃ i dodaniu 10 ml ekstraktu trzustkowo-jelitowego. Kolejny etap polegał na podniesieniu pH do wartości 7.4 przez dodanie 1 M NaHCO₃ i wprowadzenie wystandaryzowanego mikrobiomu jelitowego (koncentracja komórek 10¹² jtk/ml) wyizolowanego z kału ludzkiego. Ten etap prowadzono przez 2 h w temp. 37°C. W celu symulacji pasażu produktu przez jelito grube, pH podnoszono do wartości 8,0 za pomocą 2 M NaHCO₃ i dalsze trawienie prowadzone było w warunkach beztlenowych przez 18 h. Układ eksperymentalny stanowił fermentor o pojemności 250 ml. Temperatura całego układu utrzymywana była na poziomie 37°C.

*Badano trzy dawki produktu PENTAPEPTYD – 480 mg, 960 mg i 1440 mg.

b. Charakterystyka dawców próbek kału i procedura pozyskania wystandaryzowanej zaszczepki.

Materiał do badań stanowiły próbki kału pobrane od osób należących do następujących grup:

1. osoby po antybiotykoterapii,
2. osoby po infekcji wirusowej,
3. osoby otyłe,
4. osoby w wieku >75 roku życia

5. osoby zdrowe, deklarujące prowadzenie higienicznego trybu życia, bez zdiagnozowanych chorób przewlekłych, nieprzyjmujące antybiotyków min. przez okres 1 roku

* Każda grupa liczyła 20 osób.

Z każdej próby kału wykonano rozcieńczenia dziesiętne i posiano na odpowiednie podłoża selekcyjne w celu oznaczenia liczby drobnoustrojów. Po wykonaniu analizy mikrobiologicznej przygotowano wystandaryzowaną zaszczepkę, której skład odpowiadał liczbie drobnoustrojów z każdej grupy.

c. Analiza mikrobiomu jelitowego

Izolację drobnoustrojów prowadzono wykonując rozcieńczenia dziesiętne pobranych próbek kału. Z wybranych rozcieńczeń pobierano 1 ml próby i przenoszono na odpowiednie podłoże selekcyjne. Naniesiony materiał rozprowadzano po powierzchni za pomocą jednorazowej głaszczki. Płytki wraz z pożywką i naniesionym materiałem inkubowano w odpowiednich dla danej grupy warunkach gazowych i temperaturowych. Bakterie z rodzaju *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* hodowano w warunkach beztlenowych. Pozostałe drobnoustroje w warunkach tlenowych. Wszystkie oznaczane drobnoustroje inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 h. Po zakończonej inkubacji zliczano wyrosłe kolonie, określając ich liczbę. Identyfikację prowadzono z wykorzystaniem klucza zamieszczonego w specyfikacji danego podłoża. W przypadkach wyników wątpliwych przeprowadzono test biochemiczny z wykorzystaniem zestawów firmy bioMerieux (Francja).

Do izolacji i oznaczenia liczby drobnoustrojów wykorzystano odpowiednie dla danego rodzaju pożywki mikrobiologiczne:

Grupy drobnoustrojów o potencjale chorobotwórczym:

- Bakterie proteolityczne (URI)
- Bakterie laktozo-ujemne *E.coli* (MacConkey no.3)
- Bakterie z rodzaju *Clostridium* sp. (Reinforced Clostridial)
- Grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* sp. (Brilliance™ *Candida* Agar)

Grupy drobnoustrojów o potencjale prozdrowotnym:

1. Bakterie probiotyczne

- bakterie fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* sp. (MRS)

- bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* (Brucella Oxoid CM0169 + Brucella supplement)

2. Bakterie stymulujące odporność

- Niepatogenne bakterie z grupy coli (Endo Agar)
- Bakterie z rodzaju *Enterococcus* sp. (Azide blood agar base)

Wyniki:

W pierwszym etapie badań poddano analizie próby kału pochodzące od pięciu grup dawców:

1. osoby po antybiotykoterapii,
2. osoby po infekcji wirusowej,
3. osoby otyłe,
4. osoby w wieku >75 roku życia
5. osoby zdrowe, deklarujące prowadzenie higienicznego trybu życia, bez zdiagnozowanych chorób przewlekłych, nieprzyjmujące antybiotyków min. przez okres 1 roku – grupa kontrolna

Różnice, pomiędzy jakością i liczebnością drobnoustrojów reprezentujących mikrobiom jelitowy od różnych dawców przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela: Profil jakościowo-ilościowy drobnoustrojów reprezentujących mikrobiom jelitowy wytypowanych dawców

| Oznaczana grupa drobnoustrojów | Grupa 1 | Grupa 2 | Grupa 3 | Grupa 4 | Grupa 5 |
|--|-----------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| | Liczebność drobnoustrojów (jtk/g) | | | | |
| Ogólna liczba drobnoustrojów | $3,8 \times 10^7$ | $1,2 \times 10^{10}$ | $5,8 \times 10^{10}$ | $3,7 \times 10^7$ | $5,2 \times 10^{11}$ |
| <i>Bifidobacterium</i> | $3,1 \times 10^5$ | $2,5 \times 10^8$ | $2,1 \times 10^7$ | $4,3 \times 10^5$ | $7,1 \times 10^9$ |
| <i>Lactobacillus</i> sp. | $4,7 \times 10^3$ | $3,6 \times 10^4$ | $3,4 \times 10^9$ | $2,2 \times 10^2$ | $4,2 \times 10^5$ |
| Niepatogenne <i>E. coli</i> | $5,3 \times 10^4$ | $4,7 \times 10^6$ | $4,3 \times 10^6$ | $4,2 \times 10^4$ | $3,1 \times 10^6$ |
| <i>Enterococcus</i> sp. | $3,2 \times 10^4$ | $3,2 \times 10^5$ | $4,8 \times 10^5$ | $3,2 \times 10^2$ | $5,7 \times 10^6$ |
| <i>Clostridium</i> sp. | $2,3 \times 10^5$ | $4,7 \times 10^5$ | $4,3 \times 10^7$ | $3,2 \times 10^2$ | $1,1 \times 10^2$ |
| <i>E. coli</i> o potencjalnie patogennym | $4,1 \times 10^2$ | $2,8 \times 10^4$ | $8,7 \times 10^4$ | $3,1 \times 10^3$ | $4,9 \times 10^3$ |
| Bakterie proteolityczne | $4,2 \times 10^3$ | $3,1 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^2$ | $3,2 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^3$ |
| Grzyby drożdżopodobne | $1,2 \times 10^5$ | $2,2 \times 10^3$ | NB | $5,5 \times 10^6$ | NB |

Legenda: kolor czarny – drobnoustroje pożądane; Kolor czerwony – drobnoustroje niepożądane; NB – nieobecne

Mikrobiom jelitowy to integralny element organizmu człowieka. Prawidłowy skład mikrobiomu jelitowego zawiera ogólną liczbę drobnoustrojów na poziomie $>10^{11-12}$ jtk/g treści jelitowej. Prozdrowotną rolę pełnią głównie drobnoustroje należące do *Bifidobacterium* $> 10^9$ jtk/g treści jelitowej i bakterie z rodzaju *Lactobacillus* sp., których liczba powinna być na poziomie $>10^5$ jtk/g, natomiast niepatogenna grupa bakterii coli i z rodzaju *Enterococcus* sp. powinna wynosić 10^6 jtk/g. Niepatogenna grupa bakterii coli i z rodzaju *Enterococcus* sp. powinna wynosić 10^6 jtk/g. Liczebność bakterii z rodzaju *Clostridium* sp. nie powinna być wyższa niż 10^5 jtk/g, *E. coli* $< 2 \times 10^4$ jtk/g, bakterii proteolitycznych $< 10^4$ jtk/g a grzybów drożdżopodobnych $< 10^2$ jtk/g. Grupą drobnoustrojów, które nie powinny stanowić składnika mikrobiomu jelitowego są drożdże z rodzaju *Candida* sp. i bakterie proteolityczne.

Zaburzenia w składzie mikrobiomu jelitowego to częsty stan, który w konsekwencji może negatywnie wpływać na funkcjonowanie organizmu, zarówno w aspekcie fizjologicznym jak i psychologicznym.

Grupa osób z zaburzonym składem ilościowo-jakościowym mikrobiomu jelitowego to osoby po terapii antybiotykowej. Substancje o silnym charakterze antibakteryjnym nie działają na drobnoustroje wybiórczo, dlatego też powodują eliminację zarówno bakterii chorobotwórczych jak i tych pożądaných, spełniających w organizmie korzystne funkcje. Stąd też konieczna jest suplementacja diety takich osób albo preparatami probiotycznymi, albo produktami stymulującymi odbudowę prawidłowego mikrobiomu jelitowego.

Inną grupą osób, u których mikrobiom jelitowy jest daleki od prawidłowego stanu jest mikrobiom osób starszych. Tutaj przyczyną nieprawidłowości jest uboga, mało zróżnicowana dieta, osłabiona perystaltyka jelit, zmniejszona aktywność białek enzymatycznych, w tym m.in. laktazy, jak i zmianie ulega zdolność wchłaniania substancji pokarmowych oraz leków przez jelito grube. Konsekwencją tych ww. zmian i dysfunkcji jest obniżona liczba bakterii probiotycznych a zwiększona liczba drożdży grzybopodobnych i bakterii gnilnych. Szczególne niebezpieczne są procesy gnilne, które prowadzą do podwyższenia stężenia substancji toksycznych w świetle jelita, skąd część z nich może przedostać się do krwioobiegu. U osób z takim problemem, masy kałowe powodują dodatkowe obciążenie, a pętle jelitowe obsuwają się pod wpływem ciśnienia, znacznie zmieniając swoje naturalne położenie, wywierając

negatywny wpływ na inne narządy. Na skutek tworzenia się gazów dochodzić może do powiększania się objętości całej zawartości jamy brzusznej, powłoki wzdymają się, a przepona przemieszcza ku górze. To właśnie przesunięcie upośledza funkcjonowanie płuc i sprzyja powstawaniu zapalenia oskrzeli i astmy. Kolejnym problemem zarówno osób starszych jak i tych po przebytej antybiotykoterapii jest zbyt intensywna kolonizacja jelit grzybem drożdżopodobnym z rodzaju *Candida* sp. Grzyb kolonizując jelita, wydziela szereg substancji z własnych procesów metabolicznych, zatrzuwa organizm przez produkty przemiany materii oraz zaburza prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Stan taki prowadzi do rozchwiania prawidłowych czynności narządów i tkanek, co w konsekwencji przynosi rozmaite dolegliwości czy choroby.

Kolejną grupą osób z zaburzeniami w składzie ilościowo-jakościowym mikrobiomu jelitowego są osoby otyłe. W tym przypadku zaburzenia dotyczą głównie ogólnej liczby drobnoustrojów, bakterii z rodzaju *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* i *Clostridium* sp. Udowodniono, że drobnoustroje zasiedlające przewód pokarmowy ludzi otyłych to mniejsza liczba bakterii typu Bacteroidetes i odpowiednio więcej Firmicutes (bakterie z rodzaju *Lactobacillus* sp. i *Clostridium* sp.), niż w przypadku osobników szczupłych. Bakterie typu Firmicutes łatwiej niż Bacteroidetes metabolizują składniki żywności dzięki czemu bardziej skutecznie jest pozyskiwana dodatkowa energia, co może być jedną z przyczyn otyłości.

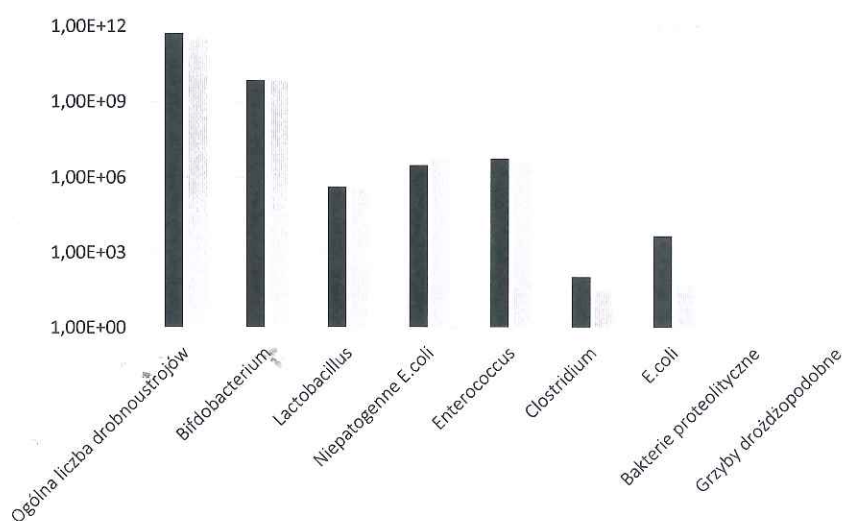
Liczne prace naukowe potwierdzają również niekorzystne zmiany w mikrobiocie pacjentów po przebytej infekcji wirusowej. Wyniki badań pacjentów potwierdziły, że skład mikrobiomu osób w trakcie i krótko po ustąpieniu infekcji wirusowej zawierał znacznie mniej bakterii odpowiadających za odporność, takich jak *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii* czy *Eubacterium rectale*. Z kolei liczebność drobnoustrojów znanych jako *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus torques* i *Bacteroides dorei*, był podwyższony.

Po scharakteryzowaniu składu jakościowego i ilościowego mikrobiomu jelitowego pochodzącego od różnych dawców przeprowadzono badania mające na celu ocenę wpływu produktu PENTAPEPTYD na skład mikrobiomu jelitowego, zwłaszcza zmienionego patologicznie. Znane są prace naukowe, które wskazują na pozytywny wpływ peptydów na drobnoustroje patogenne przez działanie takich

mechanizmów jak zmiana przepuszczalności błony komórkowej, destabilizacja jej struktury lipidowej, tworzenie micel lub kanałów w błonie, wiązanie z lipopolisacharydem, zatrzymywanie replikacji DNA, hamowanie ekspresji białek oraz uwalnianie ATP, a w kolejnym etapie – liza komórek. Aktywność antymikrobiologiczna peptydów w stosunku do drobnoustrojów przypisywana jest także ich zdolności do przyjmowania amfipatycznej struktury α -helikalnej.

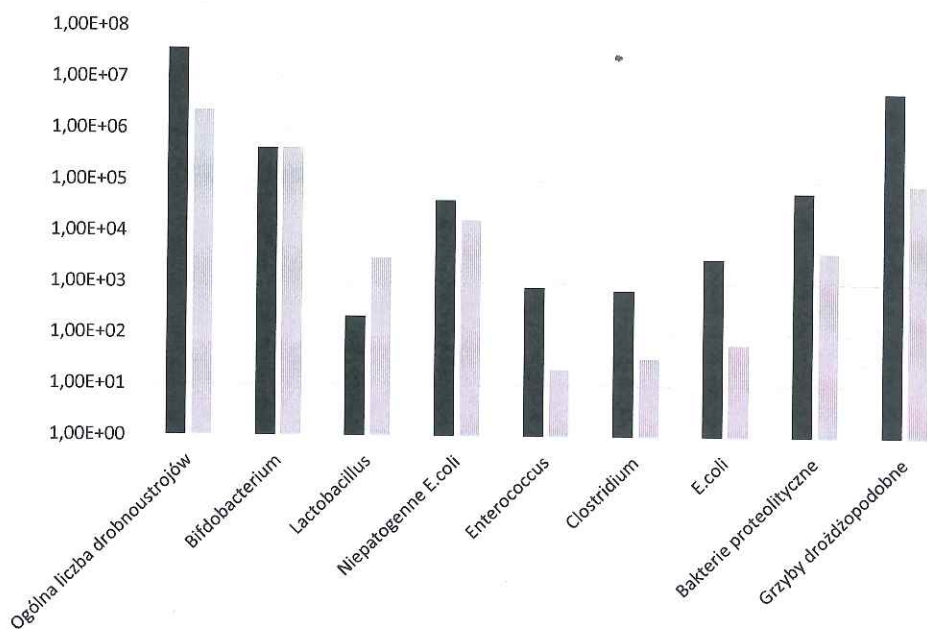
Badania wpływu PENTAPEPTYDU wykonano dla trzech dawek produktu: a. 480 mg, 960 mg i 1440 mg. Analizując bardzo dużą ilość wyników wysunięto wnioski, że najbardziej korzystne zmiany wykazano dla wariantów w których zastosowano stężenie produktu w dawce 1440 mg (3 kapsułki) (w odróżnieniu do wyników dla HEKSADEKAPEPTYDU, dla którego stężenie 960 mg wpływało najkorzystniej na mikrobiom jelitowy i TETRAPEPTYDU, dla którego najbardziej korzystne było stężenie 480 mg), i wyniki tych badań przedstawiono graficznie na wykresach poniżej (słupki szare – liczba drobnoustrojów przed procesem trawienia *in vitro*, słupki czarne – liczba drobnoustrojów po procesie trawienia *in vitro*, oś Y – liczba drobnoustrojów jtk/ml).

Wykres: Zmienność jakościowa i ilościowa składu mikrobiomu jelitowego osób zdrowych po wprowadzeniu do układu *in vitro* PENTAPEPTYDU w stężeniu 1440 mg



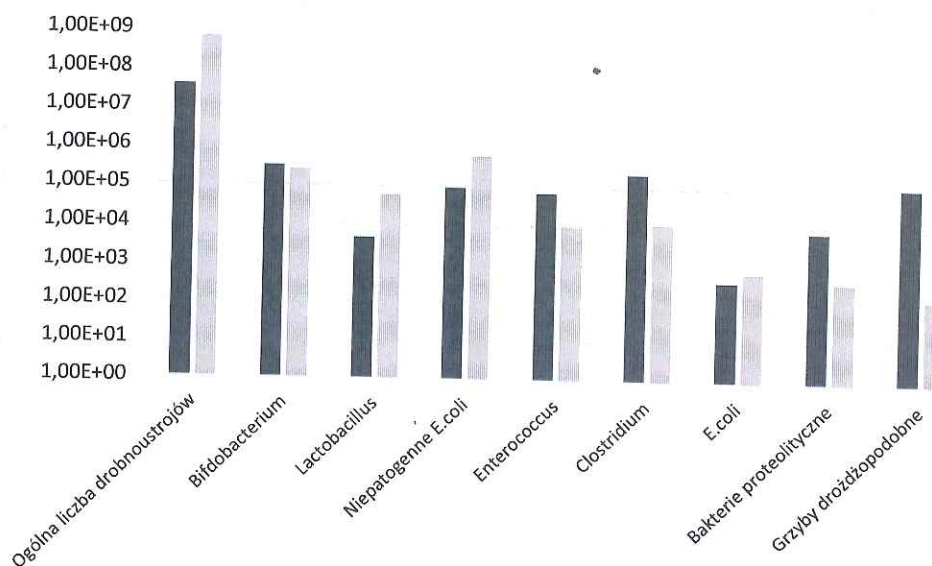
Produkt PENTAPEPTYD stabilizuje stan jakościowo-ilościowy mikrobiomu jelitowego osób zdrowych. Nie ma negatywnego wpływu na drobnoustroje prozdrowotne.

Wykres: Zmienność jakościowa i ilościowa składu mikrobiomu jelitowego osób po antybiotykoterapii po wprowadzeniu do układu *in vitro* PENTAPEPTYDU w stężeniu 1440 mg



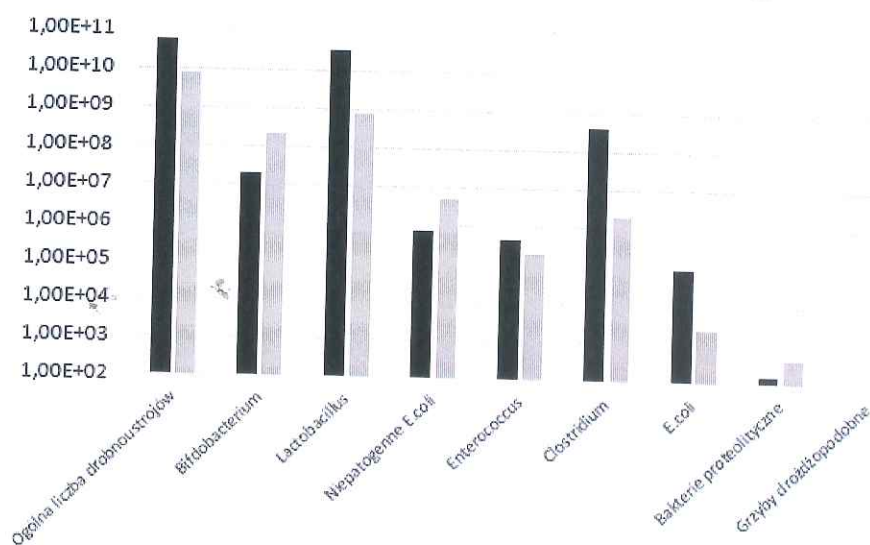
Produkt PENTAPEPTYD wykazuje działanie stymulujące namnażanie bakterii należących do rodzaju *Lactobacillus* sp., co jest korzystne z prozdrowotnego punktu widzenia. Przyczynia się również do redukcji niepożądanych bakterii z grupy *E. coli*, bakterii proteolitycznych i grzybów drożdżopodobnych, co jest zdecydowanie korzystne z punktu widzenia zaburzeń jakościowo-ilościowych mikrobiomu osób po antybiotykoterapii.

Wykres: Zmienność jakościowa i ilościowa składu mikrobiomu jelitowego osób po infekcji wirusowej po wprowadzeniu do układu *in vitro* PENTAPEPTYDU w stężeniu 1440 mg



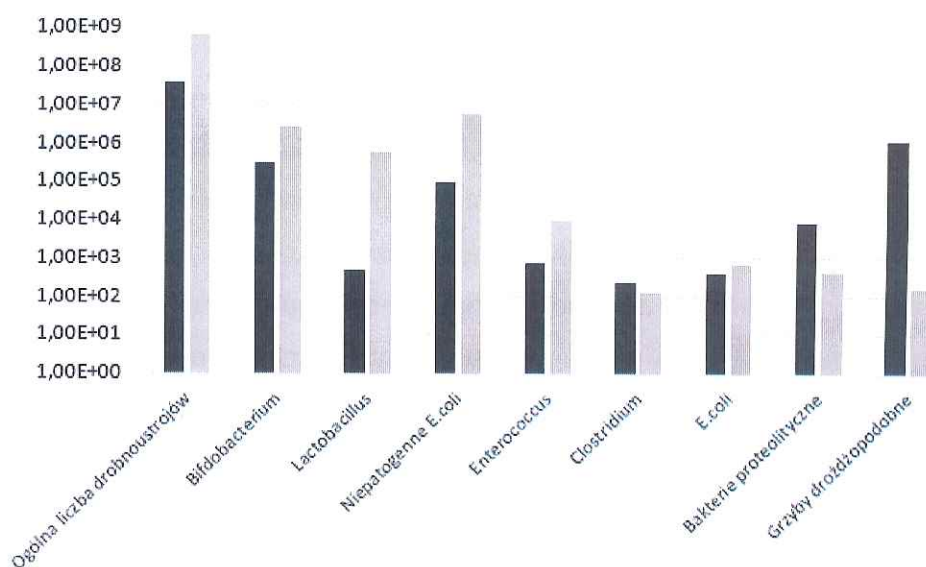
Produkt PENTAPEPTYD w odniesieniu do niekorzystnie zmienionego mikrobiomu osób po infekcji wirusowej wykazuje działanie stymulujące namnażanie bakterii należących do rodzaju *Lactobacillus* sp., ograniczenie liczby drobnoustrojów proteolitycznych, bakterii z grupy *E. coli* i grzybów drożdżopodobnych, co jest korzystne z prozdrowotnego punktu widzenia.

Wykres: Zmienność jakościowa i ilościowa składu mikrobiomu jelitowego osób otyłych po wprowadzeniu do układu *in vitro* PENTAPEPTYDU w stężeniu 1440 mg



Produkt PENTAPEPTYD wykazuje działanie stymulujące namnażanie bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* i niepatogennych *E. coli*, co jest korzystne z prozdrowotnego punktu widzenia jak i redukcję bakterii z rodzaju *Clostridium* sp i patogennych *E.coli*.

Wykres: Zmienność jakościowa i ilościowa składu mikrobiomu jelitowego osób po 75 roku życia po wprowadzeniu do układu *in vitro* PENTAPEPTYDU w stężeniu 1440 mg



Produkt PENTAPEPTYD w przypadku osób po 75 roku życia może wpływać pozytywnie na redukując liczby grzybów drożdżopodobnych i bakterii proteolitycznych, co jest korzystne z prozdrowotnego punktu widzenia. A co najbardziej kluczowe stymulować namnażanie drobnoustrojów prozdrowotnych (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* sp. niepatogenne *E.coli*, *Enterococcus* sp.)

Wnioski: Najbardziej korzystne zmiany w składzie jakościowo-ilościowym mikrobiomu jelitowego wykazano dla dawki PENTAPEPTYDU w stężeniu 1440 mg (3 kapsułki). Takie stężenie powoduje istotną redukcję drobnoustrojów niepożądanych, z zachowaniem liczby, bądź stymulacją namnażania drobnoustrojów wpływających korzystnie na organizm człowieka.

5. Ocena właściwości immunomodulacyjnych i immunostymulacyjnych PENTAPEPTYDU.

Z uwagi na właściwości przeciwdrobnoustrojowe PENTAPEPTYDU poddano weryfikacji jego właściwości immunomodulacyjne i immunostymulacyjne. Hipoteza

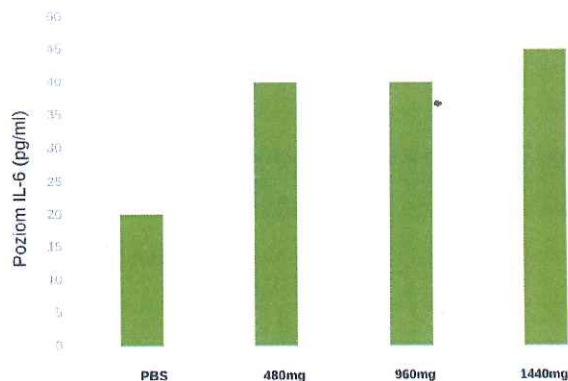
badawcza zakładała, że PENTAPEPTYD ma właściwości, które sprzyjają pobudzeniu układu immunologicznego, co może świadczyć o prozdrowotnych właściwościach produktu w ochronie organizmu przeciwko infekcji SARS-Covid.

Cel: Określenie indukcji cytokin IL-6 i TNF- α pod wpływem preparatu PENTAPEPTYDU. Przeprowadzenie *in vitro* indukcji stanu zapalnego wywołanego przez cytokiny prozapalne w celu określenie czy preparat ma właściwości ochronne (podanie preparatu przed indukcją stanu zapalnego) oraz potencjalne lecznicze (podanie preparatu po indukcji stanu zapalnego) poprzez pomiar poziomu IL-8.

Metodyka: Określenie indukcji cytokin IL-6 i TNF- α pod wpływem PENTAPEPTYDU. W tym celu linia komórkowa nabłonka ludzkiego Caco-2 hodowana były w butelkach hodowlanych T-150, w inkubatorze w temperaturze 37°C i 5% zawartości dwutlenku węgla w powietrzu, w medium hodowlanym Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose (DMEM) firmy Sigma-Aldrich uzupełnionym o 2 mM L-glutaminy firmy Sigma-Aldrich, 100 U/ml penicyliny firmy Sigma-Aldrich, 100 μ g/ml streptomycyna firmy Sigma-Aldrich, 10% Fetal Bovine Serum firmy Gibco, 1% buforem HEPES firmy Gibco, 1% Non-essential amino acids firmy Sigma-Aldrich. Linie komórkową utrzymywano w hodowli na butelkach do pasażu 20 i na tym pasażu wykonywano doświadczenie polegające na podaniu komórkom Caco-2 próbki PENTAPEPTYDU, w dawce 480 mg, 960 mg i 1440 mg. Stymulację komórek Caco-2 przeprowadzano na 12-dołkowych płytkach. Na każdy dołek nakładano $5,0 \times 10^5$ komórek Caco-2 w medium hodowlanym DMEM uzupełnionym o w/w składniki /peptydy/ i pozostawiano na 72 godziny. Następnie do dołków dodawane były badane próbki oraz PBS jako kontrola. Stymulację prowadzono 18 godzin. Po tym czasie zebrano supernatanty i oznaczono w nich poziom IL-6 oraz TNF- α (test ELISA firma Becton Dickinson, procedura testu ELISA była przeprowadzona zgodnie z załączonym przez BD protokołem). Eksperyment powtarzany był 3 krotnie (3 powtórzenia biologiczne), każda z próbek nakładana była w dwóch powtórzeniach technicznych.

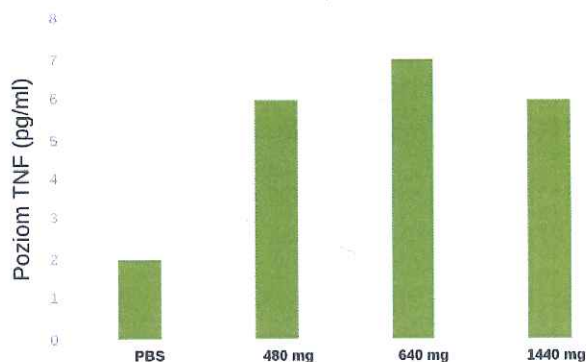
Wyniki: Zaobserwowano indukcję produkcji IL-6. Poziom IL-6 po stymulacji badanymi próbkami był wyższy jak dla samego PBS (kontrola negatywna).

Rysunek: Poziom IL-6 po 18-godzinnej stymulacji komórek Caco-2 badanymi próbkami PENTAPEPTYDU



Kolejnym wskaźnikiem był czynnik TNF- α , który był produkowany przez komórki Caco-2, w każdym z badanych stężeń PENTAPEPTYDU (wyniki na wykresie poniżej). Z uzyskanych wyników można wysunąć wniosek, że produkt stymuluje odpowiedź immunologiczną na poziomie czynnika TNF- α , jednak jest ona niezależna od dawki, tj. zwiększenie dawki produktu nie powoduje lepszej odpowiedzi na poziomie komórkowej /w zrozumieniu lepszego efektu terapeutycznego/.

Rysunek: Poziom TNF- α po 18-godzinnej stymulacji komórek Caco-2 badanymi próbkami



Kolejnym etapem prac była ocena czy PENTAPEPTYD ma zdolność obniżania poziomu IL-8 wytwarzanej w wyniku podania komórkom Caco-2 prozapalnej IL-1 β obejmujące dwa modele: podanie PENTAPEPTYD przed indukcją stanu zapalnego (przed podaniem komórkom Caco-2 cytokiny IL-1 β) oraz podanie PENTAPEPTYD po indukcji stanu zapalnego (podanie po potraktowaniu komórek Caco-2 cytokiną IL-1 β). W tym celu linię komórkową Caco-2 utrzymywano w hodowli do pasażu 20 (warunki

hodowli i stymulacji jak w/w) i na tym pasażu wykonywano doświadczenie polegające na podaniu komórkom Caco-2 próbek PENTAPEPTYDU w stężeniach a. 480 mg, b.960 mg i c. 1440 mg.

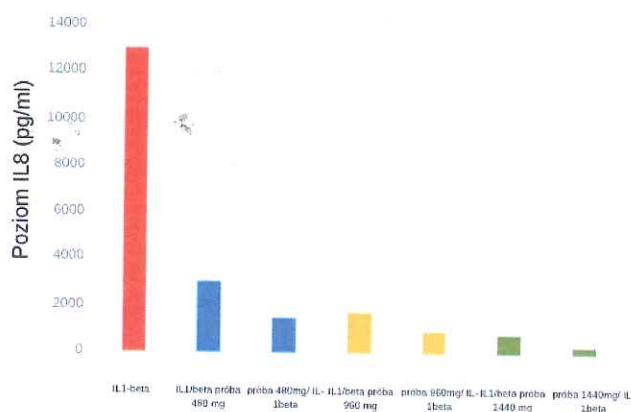
Model indukcji stanu zapalnego uzyskano przez podanie 10 ng/ul cytokiny IL-1 β do komórek Caco-2. Efektywność wywołania stanu zapalnego była mierzona poziomem wytwarzania przez komórki Caco-2 prozapalnej IL-8 (test ELISA, B&D). Eksperyment prowadzono w dwóch układach:

- stymulacja komórek Caco-2 badanymi próbkami przez 18 godzin a następnie podanie IL-1 β na kolejne 18 godzin
- stymulacja komórek Caco-2 IL-1 β przez 18 godzin a następnie podanie badanych próbek na kolejne 18 godzin.

Dodatkowo komórki Caco-2 były stymulowane samymi badanymi próbkami PENTAPEPTYDU celem sprawdzenia czy badane próbki nie indukują wytwarzania IL-8. Eksperyment powtarzany był 3 krotnie (3 powtórzenia biologiczne), każda z próbek nakładana była w dwóch powtórzeniach technicznych.

Wyniki: Preparat PENTAPEPTYD w każdym z badanych stężeń nie indukuje produkcji IL-8. Test działa prawidłowo ponieważ, po podaniu samej IL-1 β poziom IL-8 jest wysoki około 15 000 pg/ml. Badane próbki w stężeniu 480 mg, 960 mg i 1440 mg wykazują w modelu *in vitro* zarówno działanie protekcyjne jak i lecznicze. Poziom IL-8 jest znacząco obniżony w stosunku do poziomemu IL-8 po podaniu samej IL-1 β . Działanie protekcyjne jest silniejsze.

Rysunek: Poziom IL-8 po stymulacji komórek Caco-2 badanymi próbkami PENTAPEPTYDU w stężeniach a. 480 mg, b.960 mg i c. 1440 mg



Wnioski: PENTAPETYD wykazuje działanie immunomodulacyjne i immunostymulacyjne w stężeniu od 480 mg, co wskazuje że minimalna dzienna dawka produktu PENTAPETYDU to jedna kapsułka.

6. Ocena właściwości właściwości inhibujących angiotensyny, acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy przez PENTAPEPTYD.

Inhibitory acetylocholinesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BChE) są szeroko stosowane jako leki w objawowym leczeniu choroby Alzheimera (AD) – postępującej, neurodegeneracyjnej choroby związanej ze spadkiem zdolności poznawczych. W leczeniu chorób neurodegeneracyjnych stosuje się wyłącznie następujące inhibitory AChE: donepezyl, rywastygminę i galantaminę. Ponieważ te związki mogą wywoływać reakcje niepożądane/skutki uboczne, intensywnie poszukiwane są substancje o właściwościach inhibitorów tychże enzymów. Peptydy, w tym PENTAPEPTYD rokuje jako potencjalny inhibitor acetylocholinoesterazy AChE i butyrylocholinesterazy (BuChE).

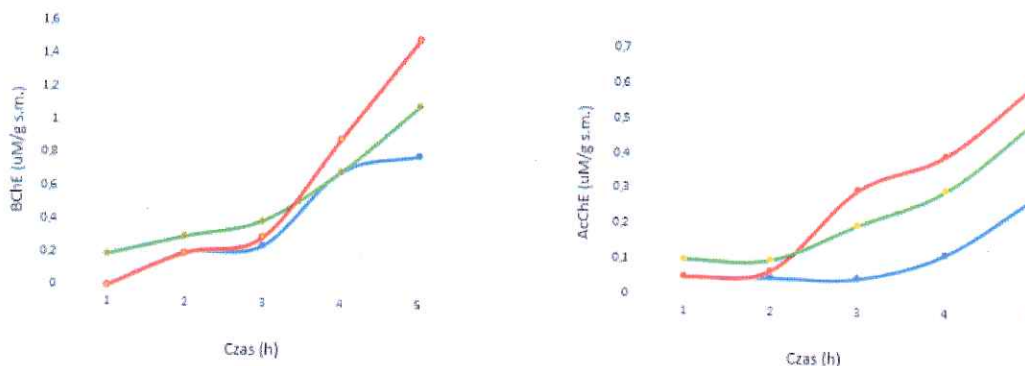
Cel: Ocena inhibicyjnego wpływu PENTAPEPTYDU na aktywność acetylocholinoesterazy AChE i butyrylocholinesterazy (BuChE).

Metodyka: W badaniach zastosowano metodę spektrometryczną. Do pomiarów wykorzystano płytki 96-dółkowe o maksymalnej objętości 300 μ l i czytnik płytek POLARstar Omega (BMG LABTECH, Niemcy). Metodyka jest oparta o hydrolizę acetylotiocholiny/butyrylotiocholiny, co powoduje zmianę koloru prób. Absorbancję mierzono przy długości fali 412 nm, dziesięć minut po przepipetowaniu na mikropłytkę. Mieszanina reakcyjna zawierała 0,1 ml 0,3 mM kwasu 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoesowego) (DTNB, Sigma Aldrich, Niemcy), 10 mM NaCl i 2 mM roztworu $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,575 ml 50 mM Tris-HCl buforu (pH=8,0), 25 μ l 0,28 jednostek/ml AChE/BChE (Sigma Aldrich, Niemcy) oraz 0,2 ml testowanego peptydu przy długości fali 405 nm i w temperaturze 22°C. Pomiar prowadzono po 20 min (BChE) lub 60 min (AChE) po dodaniu wszystkich składników do mikropłytki. Ślepa próbka zawierała bufor Tris-HCl zamiast badanego peptydu. Zastosowano kontrolę dodatnią ujemną, która składała się z 90,7 μ M seryny zamiast badanego peptydu. Wszystkie próbki analizowano w ośmiu niezależnych powtórzeniach. Aktywność hamującą każdego enzymu obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej. Krzywe kalibracyjne

przygotowano stosując serynę jako standard w zakresie stężeń od 0,09-6,10 μM dla AChE i 0,09-8,57 μM dla BChE.

Wyniki: Źródłem nowych substancji hamujących hydrolizę acetylocholiny mogą być bioaktywne peptydy. W medycynie ludowej wymienianych jest szereg przykładów wskazujących na prozdrowotne właściwości produktów hydrolizy białek pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, które tradycyjnie stosowano w celu wspomagania pamięci lub funkcji poznawczych, bądź też w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego. Związki o charakterze peptydów, którym udowodniono działanie hamujące aktywność acetylocholinoesterazy oraz butyrylocholinoesterazy, odznaczają się różnorodną budową chemiczną i należą do różnych grup związków. Dlatego też podjęto próbę zweryfikowania aktywności hamowania AChE i BChE przez produkt PENTAPEPTYD w dawce 480 mg (1 kapsułka), 960 mg (2 kapsułki) i 1440 mg (3 kapsułki). Wyniki przedstawiono na wykresach poniżej.

Rysunek: Hamowanie aktywności butyrylocholinesterazy (BChE) i acetylocholinoesterazy (AChE) próbkami PENTAPETYDU w stężeniach a. 480 mg, b.960 mg i c. 1440 mg



We wszystkich badanych wariantach wykazano aktywność hamowania zarówno AChE jak i BChE w sposób zależny od stężenia. Wyniki wykazały, że im wyższa dawka suplementu tym wyższa aktywność produktu jako inhibitora AChE i BChE. Najwyższą aktywność hamowania zarówno AChE jak i BChE wykazano dla dawki suplementu w stężeniu 1440 mg (3 kapsułki). Natomiast najniższą dla dawki 480 mg.

Zbyt wysokie ciśnienie krwi jest jednym z głównych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Trwałe zwiększenie ciśnienia tętniczego krwi może być samoistne lub wtórne, zależne od różnych przyczyn chorobowych. Obniżenie się

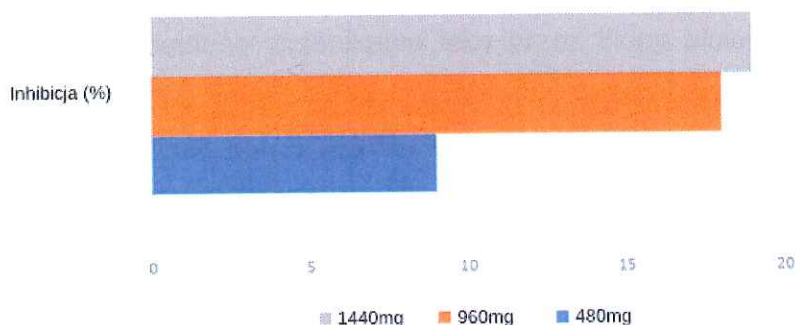
ciśnienia tętniczego w tętnicach nerkowych powoduje wydzielanie do krwi enzymu proteolitycznego – reniny, która uwalnia z angiotensynogenu dekapeptyd angiotensynę I. Angiotensyna I jest dalej hydrolizowana do oktapeptydu angiotensyny II, działającej jako hormon oraz neuroprzekaźnik. Angiotensyna II działa przez receptory błonowe w nerkach, pniu mózgu, przysadce, korze nadnerczy, ścianach naczyń i sercu. Powoduje ona zwężenie naczyń krwionośnych, co podnosi ciśnienie tętnicze krwi. W regulacji ciśnienia krwi stosowane są farmakologiczne inhibitory modulujące ten ważny układ hormonalny. Należą do nich analogi angiotensynogenu, które inhibicją działanie reniny, analogi angiotensyny I, które współzawodniczo inhibują ACE (enzym konwertujący angiotensynę), antagoniści angiotensyny II, blokujący jej wiązanie się z receptorami. Podobne funkcje pełnią niektóre peptydy uwalniane z białek żywności.

Cel: Ocena inhibicyjnego wpływu PENTAPEPTYDU na aktywność angiotensyny.

Metodyka: Aktywność angiotensyny mierzono testem fluorymetrycznym według metody Sentandreu i Toldra z modyfikacjami. Objętość 160 μ l 0,45 mM buforowanego roztworu substratu w 150 mM buforze Tris-HCl zawierającym 1,125 M NaCl (pH 8,3) zmieszano z 40 mg próbki peptydu (z 0,4% DMSO dla ślepych próbek) i 40 μ l roztworem angiotensyny (0,1 U/ml) i mieszaninę inkubowano w 37°C. Fluorescencję mierzono po 30 min w 96-studzienkowych mikroplótkach (Thermo Scientific, Rochester, NY) przy użyciu multiskanowego fluorymetru do mikroplótek (Biotek, FLx800). W tym teście zastosowano mikroplótki (Thermo Scientific, Rochester, NY). Długości fali wzbudzenia i emisji wynosiły odpowiednio 360 i 430 nm. Aktywność każdej próbki badano w trzech powtórzeniach technicznych i biologicznych.

Wyniki: Związki o charakterze peptydów, którym udowodniono działanie hamujące aktywność angiotensyny, odznaczają się różnorodną budową chemiczną i należą do różnych grup związków. Dlatego też podjęto próbę zweryfikowania aktywności hamowania angiotensyny przez produkt PENTAPEPTYD w dawce 480 mg (1 kapsułka), 960 mg (2 kapsułki) i 1440 mg (3 kapsułki). Wyniki przedstawiono na wykresie poniżej.

Rysunek: Hamowanie aktywności angiotensyny próbkami PENTAPETYDU w stężeniach
a. 480 mg, b.960 mg i c. 1440 mg



We wszystkich badanych wariantach wykazano aktywność hamowania angiotensyny w sposób zależny od stężenia. Wyniki wykazały, że im wyższa dawka suplementu tym wyższa aktywność produktu jako inhibitora angiotensyny. Najwyższą aktywność hamowania angiotensyny wykazano dla dawki suplementu w stężeniu 1440 mg (3 kapsułki). Natomiast najniższą dla dawki 480 mg. Jednakże z uwagi na nieistotną różnicę w hamowaniu angiotensyny pomiędzy dawką 960 mg a 1440 mg jako dawkę odpowiednią dla prozdrowotnego produktu wytypowano 960 mg (dwie kapsułki).

6. Ocena wpływu procesu trawienia *in vitro* na substancje aktywne wchodzące w skład produktów wraz z oceną biodostępności składników aktywnych przez barierę jelitową

Właściwości chemiczne peptydów są wynikiem obecności w nich aminokwasów. Najistotniejszą cechą aminokwasów jest amfoteryczność, która nadaje im przeciwstawną dwufunkcyjność chemiczną. Wszystkie aminokwasy z wyjątkiem proliny, zawierają dwie grupy funkcyjne aminową i karboksylową. W zależności od pH środowiska grupy te mogą pełnić rolę donora lub akceptora protonów. W punkcie izoelektrycznym grupa aminowa jest kationem a grupa karboksylowa anionem, i dzięki temu mogą oddziaływać z naładowanymi dodatnio lub ujemnie cząsteczkami organicznymi oraz kationami lub anionami nieorganicznymi. Ich interaktywność chemiczna, a w konsekwencji biologiczna, jest związana głównie z możliwością oddziaływań elektrostatycznych, tworzenia wiązań wodorowych oraz oddziaływań van

der Waalsa. Peptydy bioaktywne można traktować jako ligandy receptorowych białek komórek organizmu człowieka, których przyłączenie do nich wywołuje różnorodny efekt fizjologiczny.

Cel: Ocena wpływu procesu trawienia *in vitro* na substancje aktywne wchodzące w skład produktu PENTAPEPTYD wraz z oceną biodostępności składników aktywnych.

Metodyka: Ocena zdolności przenikania leku przez błony biologiczne wykonano z zastosowaniem techniki PAMPA GIT (ang. parallel artificial membrane permeability assay, gastro intestinal tract), która stanowi alternatywną metodę do modeli biologicznych bazujących na kulturach komórkowych (np. Caco-2). Większość dostępnych metod charakteryzuje duży nakład pracy i środków finansowych, ponad to duża zmienność komórek i w konsekwencji słaba odtwarzalność. Technologia PAMPA jest przydatnym narzędziem, zwłaszcza na wczesnych etapach rozwoju produktu, w tym badaniach skринingowych, ponieważ jest to łatwy w użyciu, ekonomiczny i wystandaryzowany model o znacznie mniejszej zmienności w porównaniu do pozostałych metod, a ponadto charakteryzuje się wysoką korelacją z przenikaniem w ludzkim przewodzie żołądkowo-jelitowym.

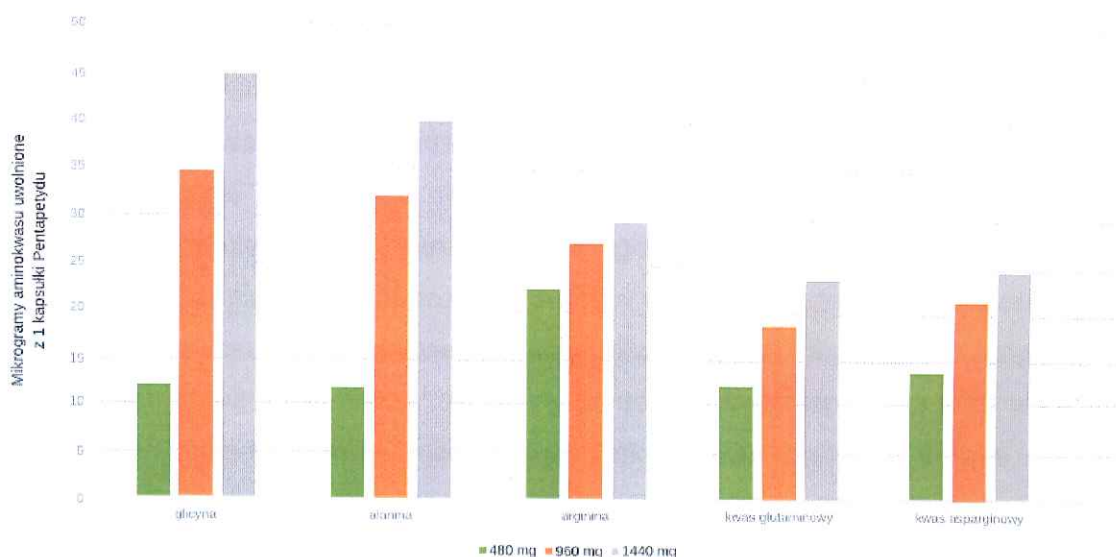
Test PAMPA składa się z 96-dółkowych mikroplitek filtracyjnych, podzielonych na dwie komory, donorową i akceptorową, oddzielonych przez mikrofiltr o grubości 120 μm , powlekany 20% roztworem lecytyny. Płytki inkubuje się w temperaturze 37°C przez kilka 1-6 godzin. Po inkubacji, płytki rozdziela się, a w części donorowej i akceptorowej oznacza się stężenie leku przy użyciu metod UV lub HPLC. Układy, których $P_{app} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ klasyfikuje się jako te z niską przenikalnością, natomiast układy których $P_{app} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ – z wysoką [Yee 1997].

Analiza aminokwasów została przeprowadzona zgodnie z metodą Agilent (Long, 2015). Przed procesem trawienia *in vitro* i po procesie trawienia *in vitro* próbki rozpuszczono przez dodanie 10 mM buforu boranu sodu (pH 8,2 zawierającego 0,1% (w/v) HCl), a następnie przefiltrowano przez filtry 0,22 μm PVDF (Sigma-Aldrich, USA). Analizę prowadzono stosując kolumnę Agilent Poroshell HPH-C18 z odwróconą fazą monitorowaną za pomocą systemu HPLC serii Agilent 1200 (Agilent Technologies Canada Inc., Mississauga, ON, Kanada), wykorzystując automatyczną pokolumnową OPA i grupę 9-fluorenylometoksykarbonylową (FMOc). Derywatywacja i detekcja była prowadzona przy długości fali $\alpha=338 \text{ nm}$. Rozdzielanie prowadzono przy szybkości

przepływu 1,5 ml/min, stosując fazę ruchomą A: 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM Na₃B₄O₇, 5 mM NaN₃, doprowadzone do pH 8,2 za pomocą HCl i B: ACN:MeOH: woda (45:45:10, v/v/v). Program elucji wyglądał następująco: 0 min, 2% B, 1,0 min, 2% B, 20 min, 59% B, 25 min, 2% B.

Wyniki: Po etapie trawienia *in vitro* PENTAPEPTYDU próbę badawczą poddano analizie pod kątem składu jakościowego. Z przeprowadzonych badań wynika, że proces trawienia pozwala na uwolnienie peptydu o określonym aminogramie: arginina, glicyna, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, alanina.

Rysunek: Profil aminokwasów (aminogram peptydu) po trawieniu PENTAPEPTYDU w warunkach *in vitro* w stężeniach a. 480 mg (słupki zielone), b. 960 mg (słupki pomarańczowe) i c. 1440 mg (słupki szare)



Biorąc pod uwagę profil jakościowy aminokwasów po procesie trawienia *in vitro* można wskazać kilka kluczowych aminokwasów, które mogą być związane z funkcjonalnością produktu. Do najważniejszych należy zaliczyć:

Kwas glutaminowy - przeciwdziała chorobom neurodegeneracyjnym, aktywuje receptory jonotropowe, związane z przepływem jonów sodu, wapnia i potasu, pobudza receptory metabotropowe (mGluR), związane są z fosfolipazą C i adenylocyklazą przez białka G, sprzężone z kaskadą wewnątrzkomórkowego metabolizmu fosfolipidów, główny neuroprzebieżnik pobudzający ośrodkowy układ nerwowy (OUN).

Szacuje się, że około połowa neuronów OUN wykorzystuje glutaminian do roli neuroprzekaźnika.

Glicyna - przyspiesza regenerację mięśni i hamuje rozpad białek, które są odpowiedzialne za budowanie tkanki mięśniowej, zwiększa skuteczność neuroleptyków, wzmacnia działanie glutaminianu w mózgu, wspomaga układ pokarmowy podczas przyjmowania silnie działających leków, może wspomagać organizm w regulacji poziomu cukru we krwi, jednocześnie niwelując uczucie głodu i zmęczenia, poprawia jakość snu, wspomaga pamięć i koncentrację niwelując trudności w uczeniu się, zmniejsza uczucie niepokoju i lęku.

Suplementacja glicyny może być ponadto pomocna w leczeniu schorzeń, takich jak depresja i padaczka.

Alanina - wspiera wytrzymałości mięśniową, beta-alanina odpowiada za nasilenie produkcji karnozyny – związku pozwalającego na znaczną poprawę pracy mięśniowej poprzez oddziaływanie na tempo kurczliwości poszczególnych włókien, stanowi jeden ze składników kwasu pantotenowego (witaminy B5), łagodzi objawy delikatnego przerostu gruczołu krokowego, bierze udział w syntezie przeciwciał stanowiących pierwszą linię obrony systemu immunologicznego.

Arginina – znaczenie zależy od poziomu argininy a zależy od stężenia jej prekursorów – proliny i kwasu glutaminowego, obecność argininy warunkuje prawidłowe funkcjonowanie wątroby, bierze udział w syntezie i uwalnianiu hormonu wzrostu, wpływa również na ciśnienie rozkurczowe i skurczowe, poszerza światło naczyń krwionośnych, regulując ciśnienie krwi, przyczynia się do zmniejszenia lepkości krwi, zmniejsza ryzyko powstawania zakrzepów, co ma największy wpływ na ograniczenie ryzyka zawałów serca. Arginina wpływa również pozytywnie na funkcjonowanie systemu odpornościowego.

Wskaźnik przenikalności pozornej

Z założenia zakapsułkowane peptydy charakteryzują się wysoką rozpuszczalnością i przepuszczalnością. Obliczono współczynniki przepuszczalności pozornej kapsułek przy pH 1,2 i pH 6,8. Przeprowadzone badania przepuszczalności prowadzono przez 3 godziny. Uzyskane wyniki potwierdzają, że badany PENTAPEPTYD jest klasyfikowany jako związek o wysokiej przepuszczalności ($P_{app} > 1 \times 10^{-6}$ cm/s).

Wnioski: Uwolnione podczas trawienia *in vitro* aminokwasy odpowiadają w szczególności za budowanie tkanki mięśniowej, regenerację organizmu po wysiłku fizycznym, zwiększoną wydolność, regulację ciśnienia krwi jak i działanie immunostymulujące i immunomodulujące.

7. Ocena tempa uwalniania substancji czynnych (peptydu) z produktu PENTAPEPTYD w przewodzie pokarmowym.

Jednym z kluczowych elementów decydujących o efektywności działania substancji bioaktywnych jest postać produktu, szybkość i miejsce uwalniania substancji aktywnych jak i wpływ substancji aktywnej na takie czynniki środowiska przewodu pokarmowego jak enzymy trawienne, pH (zróżnicowane na różnych etapach przewodu pokarmowego od 1-7), motoryka przewodu pokarmowego, stosowane inne suplementy diety, leki, dieta, obciążenie przewodu pokarmowego jednorazową dawką pożywienia, przenikalność śluzu pokrywającego przewód pokarmowy, białka efflux systemu. Ponadto fizjologiczne warunki panujące w przewodzie pokarmowym: zmienna szybkość pasażu (motorka przewodu pokarmowego ulega spowolnieniu po posiłkach), ilość płynów (w fazie na czczo – fasted dostępna ilość płynu waha się od 20 do 350 ml, podczas gdy po posiłku – fed, może wynosić w żołądku nawet do 1600 ml) w istotny sposób wpływają na biodostępność związków bioaktywnych. Podobnie jak w przypadku leków zdarza się, że suplementy diety charakteryzują się: przedłużonym uwalnianiem, opóźnionym uwalnianiem, pulsacyjnym uwalnianiem czy przyspieszonym uwalnianiem. Wiedza na temat momentu i miejsca uwalniania substancji aktywnych ma kluczowe znaczenie w ocenie wartości prozdrowotnej produktu. W przypadku peptydów miejsce uwolnienia substancji aktywnej i hydroliza do jednostek aktywnych w postaci aminokwasów jest szczególnie istotna. Kluczowym momentem jest etap trawienia w żołądku. W środowisku niskiego pH soku żołądkowego może dojść do degradacji peptydów i produktów jego hydrolizy. Około 99% suplementów diety sprzedawanych na świecie przeznaczonych jest do podawania przez przewód pokarmowy. Doustna droga podania suplementów jest najbardziej akceptowalną przez konsumentów drogą podania. Jest to związane z łatwością aplikacji, a także z faktem, że jest to jedna z najbardziej fizjologicznych dróg wnikania substancji do organizmu człowieka. Dzięki zastosowaniu modyfikacji postaci substancji aktywnej możliwe jest ograniczenie wpływu czynników fizjologicznych

przewodu pokarmowego na biodostępność substancji aktywnej oraz ograniczenie znacznych wahań stężeń we krwi podawanej substancji. Z tego powodu największą grupą preparatów o modyfikowanym uwalnianiu są stałe, doustne postacie leku o modyfikowanym uwalnianiu. Istnieje wiele możliwości klasyfikacji suplementów o modyfikowanym uwalnianiu, mogą być to systemy proste lub złożone (jednomodułowe lub wielokompartimentowe), ulegające dezintegracji lub nie. Najczęściej stosowanym, opartym na ocenie zastosowanej do wytwarzania technologii oraz mechanizmu uwalniania substancji aktywnej z suplementu, jest podział na nośniki powlekane, w tym membranowe, matrycowe oraz hybrydowe, będące połączeniem dwóch wcześniej wymienionych rodzajów.

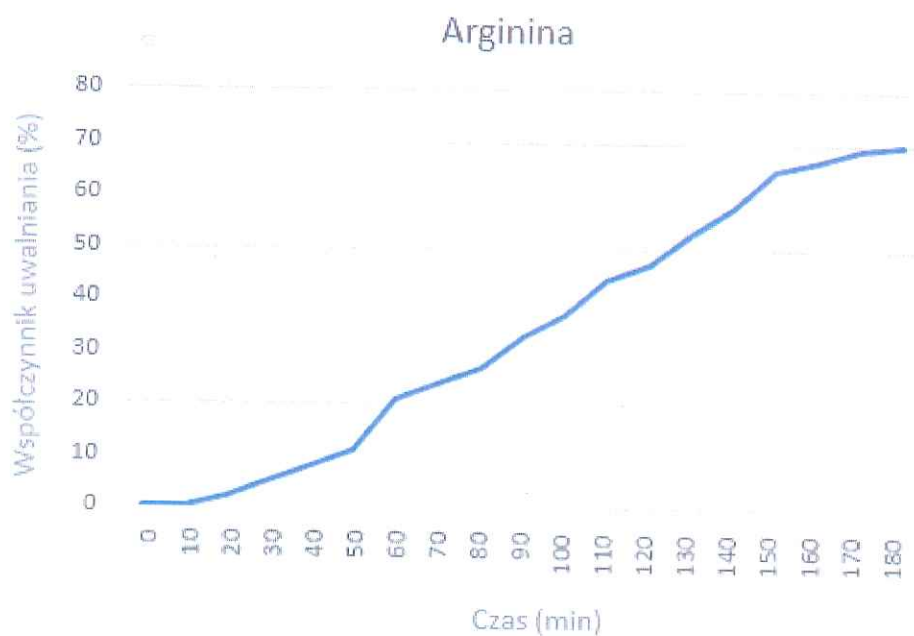
Rozpuszczalność jest to maksymalna ilość substancji stałej, ciekłej lub gazowej określona w jednostkach masowych lub w molach, którą można w danych warunkach temperatury i ciśnienia rozpuścić w określonej objętości rozpuszczalnika tworząc mieszaninę homogeniczną – roztwór. Rozpuszczalnik w układzie odgrywa rolę fazy dyspergującej, a materiał rozpuszczany jest fazą dyspergowaną. Rozpuszczalność zależy od rodzaju mieszanych substancji, ciśnienia, temperatury, pH czy siły jonowej roztworu. Rozpuszczalność jest równa stężeniu roztworu nasyconego, to ważny element warunkujący biodostępność leku podanego drogą doustną, a tym samym wpływający na skuteczność terapii. Szybkość rozpuszczania natomiast jest pojęciem termodynamicznym, które opisuje szybkość zachodzącego procesu. Jest ona zależna od temperatury, stopnia rozdrobnienia substancji czy od szybkości mieszania. W przypadku podania doustnego na dynamikę rozpuszczania substancji aktywnych będzie miał też wpływ obecności pokarmu zalegającego w układzie żołądkowo-jelitowym oraz skład mikrobiomu.

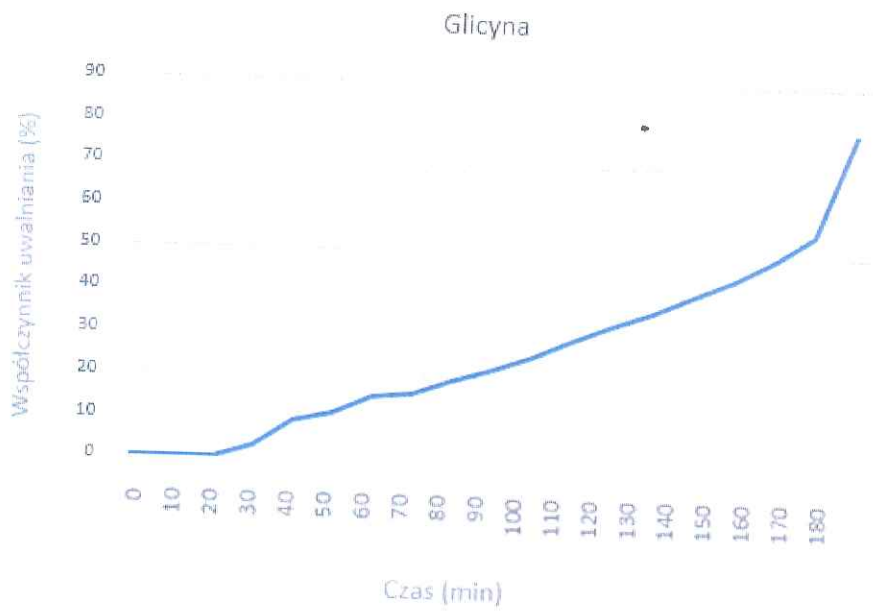
Metodyka: Zmianę szybkości rozpuszczania PENTAPEPTYDU zbadano określając profile szybkości rozpuszczania zgodnie z wymaganiami Farmakopei Europejskiej w temperaturze $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, przy użyciu aparatu łopatkowego (Agilent, Santa Clara, CA, USA) przy prędkości obrotowej łopatki 50 obr./min. Jako akceptorowe medium rozpuszczające zastosowano 500 ml 0,1 mol/L kwasu solnego (pH ~ 1,2) i bufor fosforanowy (pH ~ 6,8) w zakresie pH odpowiadającym środowisku przewodu pokarmowego. Kapsułki żelatynowe umieszczono w nurniku, aby zapobiec flotacji kapsułki na powierzchni cieczy. Próbkę do rozpuszczania pobrano w odpowiednich

punktach czasowych i zastąpiono równą objętością pożywki zrównoważonej temperaturowo. Próbki przefiltrowano przez nylonowe filtry membranowe 0,45 μm . Profile rozpuszczania porównano za pomocą modelu zaproponowanego przez Moore'a i Flannera.

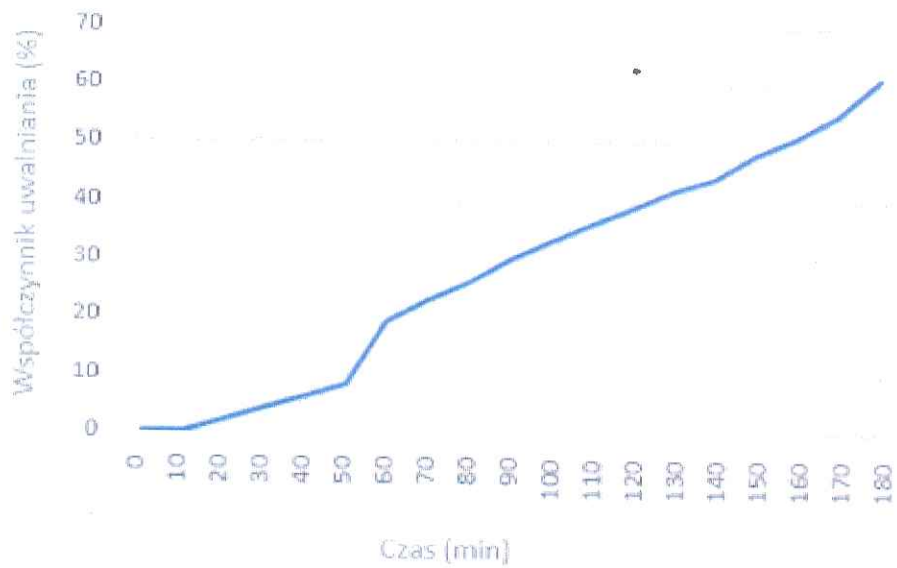
Wyniki:

Wykres: Aminogram peptydu uwalnianego z kapsulek żelatynowych.

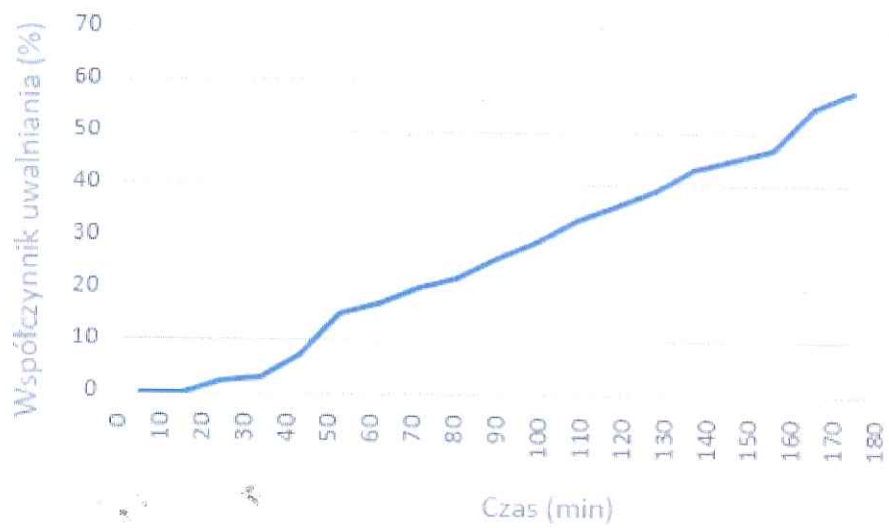




Kwas glutaminowy



Alanina



8. Określenie przybliżonej dawki suplementu wpływającej na odżywienie lub/i poprawę funkcjonowania organizmu.

Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników można przypuszczać, że dawka 1 x 1440 mg PENTAPEPTYDU (3 kapsułki) stanowi porcję produktu, która pozwala na pozytywny wpływ na skład jakościowo-ilościowy mikrobiomu osób ze stanem dysbiozy, natomiast dawka 1 x 960 mg (2 kapsułki) wykazuje działanie inhibujące enzymy neurodegeneracyjne a już dawka 1 x 480 mg (1 kapsułka) pozwala na odpowiedź ze strony układu immunologicznego tj. wzrost prozapalnych interleukin. W wypadku oczekiwanego działania inhibującego enzymy odpowiedzialne za nadciśnienie tętnicze byłaby wskazana dawka 1 x 960 mg produktu (2 kapsułki).

III Dokładana charakterystyka produktu z uwzględnieniem jego składu i przeznaczenia

1. Opis odżywczego charakteru produktu

Produkt charakteryzuje się potencjałem biofunkcyjnym, który został wykazany eksperymentalnie:

- Produkt wykazuje działanie streptogeinowe z uwagi na fakt iż pobudza wzrost bakterii prozdrowotnych, głównie bakterii kwasu mlekowego, co może przyczynić się do zniwelowania stanu dysbiozy w organizmie.
- Produkt może zapobiegać chorobom neurodegeneracyjnym dzięki hamowaniu aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy.
- Produkt może wykazywać działanie regulujące ciśnienie krwi, poprzez hamowanie aktywności angiotensyny.
- Produkt posiada wykazane eksperymentalnie działanie immunostymulujące i immunomodulacyjne.
- Profil uwolnionych w procesie trawienia *in vitro* aminokwasów pozwala stwierdzić, że może być przeznaczony dla szerokiej grupy odbiorców a w szczególności dla osób aktywnych fizycznie.
- Produkt posiada właściwości antyoksydacyjne, co oznacza, że może mieć potencjalny, ochronny wpływ przed reaktywnymi formami tlenu. Może chronić organizm przed negatywnymi skutkami oddziaływania wolnych rodników. Produkty bogate w przeciwutleniacze stanowią ważny element w profilaktyce

powstawiania wielu chorób. Pozwalają obniżyć ryzyko choroby wieńcowej, udaru mózgu, chorób naczyń obwodowych. Chronią przed czynnikami powodującymi raka. Podnoszą ogólną odporność organizmu na zakażenia i infekcje. Łagodzą przebieg wielu chorób.

2. Porównanie produktu PENTAPEPTYD z innymi, podobnymi produktami z tego samego segmentu suplementów diety

Mimo iż rynek suplementów diety w Polsce jest dość mocno rozbudowany, oferta produktów typu bioaktywne peptydy jest relatywnie niewielka a po przeanalizowaniu przykładowych produktów konkurencyjnych nasuwają się następujące wnioski:

1. Większość producentów deklaruje bardzo szerokie działanie swoich produktów, bez potwierdzenia badaniami laboratoryjnymi.
2. Część produktów mimo, iż wskazują na postać suplementów diety opatrzone są etykietą „Przeznaczony do badań”.
3. Znaczna część produktów zawiera enigmatycznie opisane substancje czynne, nieznanego pochodzenia.
4. Znaczna część produktów nie jest produkowana w Polsce.
5. Rozpiętość cenowa jest bardzo duża. Wysoka cena nie jest często adekwatna do zawartości opakowania.

Zestawienie przykładowych produktów zawierających bioaktywne peptydy przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela: Zestawienie produktów zawierających bioaktywne peptydy

| Nazwa produktu | Deklaracje producenta | Dawkowanie | Objętość opakowania | Cena za 1 opakowanie |
|---|--|---|---------------------|----------------------|
| bioaktywne peptydy mleczne (Lactium®) to najnowocześniejszy kompleks enzymy składający się z naturalnych bioaktywnych peptydów, naturalnie występujących w mleku. SKŁAD: Dekapeptyd kazeinowy, bioaktywne peptydy mleczne, substancja mikrokrystaliczna, substancja roślinna, dwutlenek węgla, sole magnezowe, olej z ryb, oleje roślinne, substancje tłuszczowe (źródło witamin). | -wspiera regenerację organizmu | 1 kapsułka dziennie z posiłkiem lub bez. Kapsułka może być przyjmowana w ciągu dnia lub przed snem. | 30 tabletek | 60,00 zł |
| TRIFIT - Aminofree Peptides | - posiada szybko przyswajalne aminokwasy w formie peptydów | 6 gram = 1 porcja/ 4 porcje na dobę | | |

| | | | | |
|--|---|---|---|------------------|
| <p>AminoFree i Peptides zawierają opatentowane peptydy aminokwasów leucyny, waliny i izoleucyny (BCAA) oraz peptydy glutaminy i argininy. Są one niezbędne do odbudowy i budowy tkanki, lepiej się trawią i wchłaniają</p> | <p>- wspomaga regenerację oraz budowę masy mięśniowej - nie zawiera dodatków chemicznych</p> | | <p>400 g</p> | <p>128,00 zł</p> |
| <p>Juvenil plus witamina C</p> <p>Składniki: woda, demineralizowana, kwas L-askorbinowy, Juvenil (zestaw nukleotydów, niskocząsteczkowych peptydów oraz aminokwasów)</p> | <p>- uzupełniający normalną dietę w witaminę C i zestaw nukleotydów, niskocząsteczkowych peptydów oraz aminokwasów - nukleotydy to podstawowe jednostki budujące kwasy nukleinowe DNA i RNA, których znaczenie w organizmie polega na zdolności do regeneracji i tworzenia się nowych komórek. Są również składnikiem ważnych kofaktorów, które uczestniczą w procesach biochemicznych naszego organizmu. Zapotrzebowanie na nukleotydy wzrasta w okresie rozwoju dzieci, wyjątkowej pracy fizycznej i umysłowej oraz u osób starszych. - witamina C przyczynia się do: zmniejszenia uczucia zmęczenia i znużenia; utrzymania prawidłowego metabolizmu energetycznego, pomaga w: prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego, ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym, prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego, utrzymaniu prawidłowych funkcji psychologicznych</p> <p>Przebadano laboratoryjnie</p> | <p>Dorośli: odmierzyć za pomocą załączonej miarki 3 ml, spożywać raz dziennie. Dzieci powyżej 1 roku: odmierzyć za pomocą załączonej miarki 1,5 ml, spożywać raz dziennie.</p> <p>Można mieszać z chłodnymi napojami i potrawami. W celu osiągnięcia efektu fizjologicznego producent zaleca minimum trzymiesięczną kurację. Nie należy przekraczać zalecanej porcji do spożycia w ciągu dnia.</p> <p>Zalecana porcja do spożycia w ciągu dnia zawiera:</p> | <p>100 ml</p> | <p>80,00 zł</p> |
| <p>Ango Kolagen Aktywne Peptydy</p> <p>Składniki: Kolagen Aktywne Peptydy™ (kolagen typu I i III pochodzenia rybiego), witamina C (kwas L-askorbinowy); kapsułka: celuloza roślinna.</p> | <p>- aktywne peptydy kolagenu rybiego pozwolą cieszyć się dobrze nawilżoną, bardziej jędrną i elastyczną skórą. Pomogą wygładzić zmarszczki, jak i przyspieszą regenerację włosów i paznokci. - kolagen Aktywne Peptydy™ zawiera kolagen typu I i III, czyli ten sam rodzaj jaki jest wytwarzany przez fibroblasty w skórze człowieka. Czyni go to wyjątkowo biodostępnym, a dzięki zawartej witaminie C proces syntezy kolagenu przebiega sprawniej. - peptydy kolagenowe otrzymywane są w drodze kontrolowanej, enzymatycznej hydrolizy kolagenu. Podczas niej rozpadają się wiązania molekularne pomiędzy poszczególnymi pasmami kolagenu, a peptydami. Proces ten powoduje zmniejszenie masy cząsteczkowej włókien kolagenowych, dzięki czemu stosowany kolagen jest wysoce przyswajalny i skuteczny. - ponad 1200 mg kolagenu w dawce dziennej - świetnie przyswajalny dzięki witaminie C wspierającej syntezę kolagenu - bez dodatków i wypełniaczy - kapsułki roślinne delikatne dla żołądka</p> | <p>2 kapsułki 2 razy dziennie</p> | <p>120 kapsulek Masa netto: 39,6 g.</p> | <p>62,00 zł</p> |
| <p>Witkol - peptydy kolagenu rybiego typu I Zawartość w 2 kapsułkach oraz %RWS*: Witkol - trójpeptydy kolagenu rybiego 1g Składniki: Peptydy kolagenu rybiego, otoczka kapsułki: hydroksypropylometyloceluloza, substancja wypełniająca: mikrokrystaliczna celuloza, substancja przeciwzbrylająca.</p> | <p>- suplement diety wpływający na stan skóry</p> | <p>60 kapsulek/opakowanie</p> <p>Zalecana dzienna porcja: 2 kapsułki. Sposób użycia: Dwie kapsułki dziennie z jedzeniem, popite wodą. Ostrzeżenie: Produkt tylko dla dorosłych. Nie przekraczać zalecanej porcji do spożycia w ciągu dnia.</p> | <p>Masa netto: 20,0 g</p> | <p>62,00 zł</p> |

| | | | | |
|--|--|--|---|------------------|
| <p>namia Peptide Plus</p> <p>(1 saszetka) zawiera (referencyjna wartość spożycia %): peptydy kolagenowe rybnie – 5000 mg, w tym m.in.: L-prolina – 535 mg, L-lizyna – 170 mg; suszony sok z aceroli - 470 mg, w tym natywna wit. C – 80 mg (100%), Trans-resweratrol – 100 mg.</p> <p>Składniki: peptydy kolagenowe rybnie, suszony sok z aceroli (Malpighia glabra L.), trans-resweratrol (z rdestu Polygonum Cuspidatum).</p> | <p>- produkt dedykowany skórze dojrzałej</p> <p>- w jego skład wchodzi 5 000 mg przebadanych klinicznie peptydów oraz naturalnego pochodzenia trans-resweratrol (z rdestu japońskiego) i witamina C (z aceroli)</p> <p>- zawarte w produkcie peptydy to mieszanka 18 aminokwasów, m.in. hydroksyprolina, glicyna, lizyna i prolina, które biorą udział w budowie kolagenu</p> <p>- deklaracja wyników badań</p> | <p>20 saszetek</p> <p>Zalecana porcja dzienna 1 saszetka</p> | <p>Ilość porcji w opakowaniu: 20</p> <p>Zawartość opakowania netto: 111,4 g</p> | <p>96,00 zł</p> |
| <p>Nutrivi Peptide Holistic Drink Peptide</p> | <p>- wspiera funkcjonowanie organizmu w myśli idei holistycznych</p> <p>- źródło aminokwasów i peptydów kolagenu rybiego, w 100% naturalnego, najlepiej przyswajalnego pochodzenia, o udowodnionym działaniu regenerującym, energetyzującym i antyoksydacyjnym.</p> <p>Obecność synergicznie sprzężonych: witaminy C z aceroli i krzem z skrzypu polnego w wysokich stężeniach wspiera pracę aminokwasów. Kurkumina i wzmacniająca jej działanie piperyna to składnik znany ze swoich właściwości przeciwzapalnych, niezwykle istotnych w profilaktyce antynowotworowej.</p> | <p>2 x 20 ml</p> | <p>750 ml</p> | <p>169,00 zł</p> |

Z powyższego zestawienia zakupiono dwa produkty, które przebadano pod kątem wybranych parametrów jakościowych jak skład, czystość mikrobiologiczna, gramatura opakowania, obecność metali ciężkich. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela: Wyniki analizy przykładowych wskaźników jakości produktów komercyjnych zawierających bioaktywne peptydy

| Parametr jakościowy | Yango Kolagen Aktywne Peptydy | Nutrivi Peptide Holistic Drink Peptide |
|----------------------------|--------------------------------|---|
| Gramatura | Zgodna z deklaracją producenta | Zgodna z deklaracją producenta |
| Skład jakościowo-ilościowy | Głównie kolagen i skrobia | Głównie wolne aminokwasy lizyna, metionina i walina |

| | | |
|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Czystość mikrobiologiczna | Produkt czysty mikrobiologicznie | Obecne bakterie fermentacji mlekowej |
| Obecność metali ciężkich | Podwyższone stężenie kadmu | Podwyższone stężenie ołowiu |

Sugestie dla producenta:

- „ukierunkować” produkt na konkretne działanie, potwierdzone wynikami badań; nie ma działać „na wszystko”
- zalecana dawka ustalona eksperymentalnie, na podstawie badań *in vitro*
- na stronie www. lub/i materiałach promocyjnych zamieścić uzyskane wyniki badań, nawet jeśli na etykiecie nie mogą znajdować się oświadczenia zdrowotne, warto „przemycić” uzyskane wyniki w materiałach reklamowych
- warto zwrócić uwagę na skład aminokwasowy; to uwolnione do ustroju konkretne aminokwasy spełniają daną funkcję w organizmie

IV Opracowanie treści etykiety produktu zgodnie z obowiązującymi regulacjami prawnymi

Unikatowy, innowacyjny, multifunkcyjny suplement diety zawierający bioaktywne peptydy i karnitynę. Wchodzący w skład produktu opatentowany PENTAPETYD ułatwia wzbogacanie codziennej diety o związki mogące wspierać procesy regeneracyjne zachodzących w organizmie, zmniejszać ryzyko rozwoju zmian neurodegeneracyjnych i dysfunkcji układu sercowo-naczyniowego, jaki i przyczyniać się do zapobiegania infekcjom wirusowym i bakteryjnym a także wspomagać proces stabilizacji składu jakościowo-ilościowego mikrobiomu jelitowego*

*wyniki potwierdzone badaniami *in vitro*

Zalecana do spożycia dzienna porcja produktu

2 kapsułki 1 raz dziennie w trakcie lub po posiłku. Popić dużą ilością wody. Jedno opakowanie zawiera 30 kapsułek.

Zawartość składników aktywnych:

| Składnik aktywny | 1 kapsułka | 2 kapsułki |
|---------------------------------------|------------------------|------------|
| Pentapeptyd | 900 µg | 1800 µg |
| Kwas askorbinowy (forma mikropeletek) | 150 mg | 300 mg |
| Acyl – karnityna (forma mikropeletek) | 50 mg | 100 mg |
| Celuloza mikrokrystaliczna | 100mg | 200mg |
| Liczba kapsułek w opakowaniu | 30 kapsułek | |
| Rodzaj kapsułek | Żelatynowe, dojelitowe | |
| Sugerowana dawka dzienna | 2 kapsułki | |

Wartość odżywcza:

| Wartość odżywcza | W 100 g | W 1 kapsułce |
|-------------------------------------|---------|--------------|
| Wartość energetyczna [kJ] | 958 | 8,65 |
| Wartość energetyczna [kcal] | 230 | 2,08 |
| Tłuszcz [g] | <0,10 g | 0,0 g |
| w tym kwasy tłuszczowe nasycone [g] | <0,10 g | 0,0 g |
| Węglowodany [g] | 19,00 g | 0,17 g |
| w tym cukry [g] | 6,18 g | 0,05 g |
| Błonnik | 43,90 g | 0,39 g |
| Białko [g] | 24,80 g | 0,22 g |
| Sól [g] | 0,11 g | 0,0 g |

Składniki: kwas askorbinowy, acyl-karnityna, celuloza mikrokrystaliczna, pentapeptyd; kapsułka żelatynowa, kapsułka dojelitowa.

Produkt bezglutenowy, nie zawiera laktozy, bez dodatku barwników.

Zastosowanie:

Do postępowania dietetycznego w celu zapewnienia prawidłowej podaży peptydów dla osób mających zwiększone zapotrzebowania na aminokwasy.

Ważna informacja:

Jak w przypadku każdego suplementu diety, przed użyciem należy skonsultować się z lekarzem, zwłaszcza w przypadku osób przyjmujących leki, kobiet w ciąży, karmiących piersią lub w razie wątpliwości związanych z aktualnym stanem zdrowia. Zróżnicowana i zbilansowana dieta oraz aktywność fizyczna stanowią podstawę zachowania dobrego stanu zdrowia. Spożycie dziennej porcji produktu PENTAPEPTYD zapewnia deklarowane korzyści dla zdrowia. Produkt przeznaczony dla osób dorosłych, osób w podeszłym wieku i dzieci akceptujących postać kapsułki.

Przeciwwskazania:

Nie stosować w przypadku nadwrażliwości lub uczulenia na którykolwiek ze składników produktu.

Zawartość opakowania:

30 kapsułek

Masa netto: 16,0±1,0 g

Informacja dodatkowe:

Przechowywać w ciemnym i suchym miejscu w temperaturze pokojowej, w sposób niedostępny dla małych dzieci. Osoby przyjmujące leki przed użyciem powinny skonsultować się z lekarzem lub farmaceutą. Produkowane bez użycia sztucznych substancji konserwujących, zapachowych lub barwiących. Produkt wolny od metali ciężkich, takich jak arsen, kadm, ołów czy rtęć. Wyprodukowano w Unii Europejskiej.

| SUPLEMENT DIETY |
|--|
| Środek spożywczy / żywność |
| Cel: uzupełnienie normalnej diety w witaminy, składniki mineralne lub inne substancje wykazujące efekt odżywczy lub inny fizjologiczny. |
| Nie leczy. Nie zapobiega chorobie. |
| Przeznaczony dla osób zdrowych. pełni funkcję odżywczą lub wspomagającą prawidłowo funkcjonujący organizm. |
| Sprzedawany w postaci kapsułek, pastylek, tabletek, pigułek, saszetek z proszkiem, ampułek z płynem, butelek z kroplomierzem i w tym podobnych postaciach płynów lub proszków przeznaczonych do przyjmowania w niewielkich odmierzonych ilościach jednostkowych. |
| Spożywany (przyjmowany doustnie). |

Prace eksperymentalne wzbogacono o badania synergizmu/antagonizmu czterech produktów: HEKSADEKAPEPTYD, PENTAPEPTYD, TETRAPEPTYD i NL-GHK-Cu+Miedź. W pierwszej kolejności wyznaczono wartość IC 0,5 badanej próby (wartość P), następnie przygotowano stężenia bliskie wyznaczonemu IC 0,5. W celu oceny wzajemnego wpływu peptydów, których synergizm badano, przygotowano roztwór wodny w którym stężenie peptydu było równe 480 mg. W analizie wykorzystano 96-dółkową płytkę titracyjną. Do kolejnych studzienek dodawano po 100 mikrolitrów zawiesiny danego produktu. Owinieętą folią aluminiową płytkę inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C. Następnie dokonano pomiaru następujących parametrów: potencjał antyoksydacyjny, właściwości immunostymulujące i immunomodulujące, hamowanie aktywności enzymów neurodegeneracyjnych i wpływu na skład jakościowo-ilościowy mikrobiomu jelitowego. Przy ocenie zależności pomiędzy badanymi produktami zastosowano następującą formułę:

$$R = P_{\text{zbadane}} / P_{\text{oczekiwane}} \longrightarrow P / (P_1 + P_2) - (P_1 * P_2), \text{ gdzie } 0 < P_1, P_2 < 1$$

$$R = \frac{P_{\text{zbadane}}}{P_{\text{oczekiwane}}} \rightarrow R = \frac{P}{(P_1 + P_2) - (P_1 * P_2)}$$

gdzie: $0 < P_1, P_2 < 1$

Gdy:

- $R > 1$ SYNERGIZM

- $R < 1$ ANTAGONIZM

Program statystyczny wyznaczył pozytywne zależności pomiędzy badanymi produktami zawierającymi bioaktywne peptydy grupując je w zestawy przedstawione w tabeli poniżej.

Tab. Zależności pomiędzy produktami zawierającymi bioaktywne peptydy

| Układ | P zbadane | P1 | P2 | R | Wniosek |
|---------------------------------|-----------|-------|-------|------|-----------|
| HEKSADEKAPEPTYD:TETRAPEPTYD | 1.108 | 0.425 | 0.597 | 1.44 | synergizm |
| HEKSADEKAPEPTYD:PENTAPEPTYD | 1.179 | 0.597 | 0.487 | 1.49 | synergizm |
| HEKSADEKAPEPTYD: TETRAPEPTYD+CU | 1.069 | 0.533 | 0.486 | 1.41 | synergizm |
| TETRAPEPTYD:PENTAPEPTYD | 1.108 | 0.425 | 0.597 | 1.44 | synergizm |
| TETRAPEPTYD: TETRAPEPTYD+CU | 1.279 | 0.517 | 0.883 | 1.36 | synergizm |
| PENTAPEPTYD: TETRAPEPTYD+CU | 1.303 | 0.517 | 0.447 | 1.78 | synergizm |

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że badane produkty działają pozytywnie, wzajemnie na siebie tj. synergistycznie, co oznacza, że połączenie minimum dwóch produktów w dawce 480 mg pozwala na silniejsze działanie/efekt prozdrowotny. Z uwagi na inny charakter badanych produktów, zróżnicowany skład aminokwasowy, po etapie trawienia w jelicie cienkim, uwolnienia tychże związków zaczynają one ze sobą „współdziałać” na zasadzie wzajemnych oddziaływań, doprowadzając w efekcie do potęgowania działania funkcjonalnego na organizm człowieka. Z uwagi na powyższe wskazane jest aby łączyć wszystkie cztery produkty w codziennej diecie.

Wykonawca badań i autor sprawozdania:

Prof. UP dr hab. Daria Szymanowska – pracownik naukowo-dydaktyczny Uniwersytetu Przyrodniczego i Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, biegły sądowy z dziedziny biotechnologii i technologii żywności.

prof. dr hab. Daria Szymanowska

profesor Uczelni