



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie



Wydział
Biotechnologii
i Hodowli Zwierząt

Paulina Agnieszka Boško

Ocena wartości odżywczej i właściwości
antyoksydacyjnych
liści rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.)

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Nauk o Zwierzętach Monogastrycznych
pod kierunkiem
dr hab. inż. Wioletty Biel, prof. ZUT

Szczecin, 2024

Pragnę wyrazić swoją wdzięczność

Dr hab. inż. Wioletcie Biel, prof. ZUT

za pomoc, cierpliwość, nieocenione wsparcie w trakcie studiów doktoranckich,
opiekę merytoryczną w czasie przygotowywania rozprawy doktorskiej.

St. technik Lidii Kowalczyk

za naukę, pomoc przy wykonywanych analizach laboratoryjnych,
za cenne wskazówki i uwagi.

Dr hab. inż. Katarzynie Michalek, prof. ZUT

za wskazanie drogi i wsparcie.

Dziękuję wszystkim **Pracownikom Katedry Nauk o Zwierzętach**

Monogastrycznych

za życzliwość i miłą atmosferę podczas realizacji badań.

Pragnę podziękować również

Moim Rodzicom Annie i Dariuszowi Boško

za to, że nigdy we mnie nie zwątpili,
dzięki Wam mogłam się kształcić i osiągać kolejne sukcesy.

Mai Jeż i Magdalenie Król,

za cenne wskazówki, sugestie i uwagi,
a także za nieocenione wsparcie.

Bartłomiejowi Kik,

za wiarę i wsparcie.

Wszystkim Osobom obecnym,
podczas całej mojej drogi naukowej.

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską zatytułowaną:

„Ocena wartości odżywczej i właściwości antyoksydacyjnych liści rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.)”

[P–1] **Boško P.**, Biel W., Witkowicz R., Piątkowska E. 2024. Chemical composition and nutritive value of sea buckthorn leaves. *Molecules*. 29, 3550. DOI: 10.3390/molecules29153550 [załącznik 1]

IF₂₀₂₃= 4,2; 140 pkt. MEiN₂₀₂₃

Mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w nadzorze nad realizacją badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Indywidualny wkład w publikację: 75%

[P–2] **Boško P.**, Biel W., Smetanska I., Witkowicz R., Piątkowska E. 2024. Sea buckthorn leaves as a potential source of antioxidant substances. *Applied Science*. 14, 5038. DOI: 10.3390/app14125038 [załącznik 2]

IF₂₀₂₃= 2,5; 100 pkt. MEiN₂₀₂₃

Mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w nadzorze nad realizacją badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Indywidualny wkład w publikację: 65%

Wszystkie prace wchodzące w skład cyklu stanowiącego niniejszą rozprawę doktorską zostały opublikowane w otwartym dostępie (Open Access).

Ogólna liczba punktów za cykl prac stanowiących rozprawę doktorską według wykazu czasopism naukowych MEiN z dnia 3 listopada 2023 r., zgodna z rokiem ukazania się prac wynosi 240 punktów.

Sumaryczny Impact Factor (IF) za cykl prac stanowiących rozprawę doktorską zgodny z rokiem ukazania się prac wynosi 6,70.

Oświadczenia współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych wraz z określeniem ich indywidualnego udziału wykazano w załączniku 3.

Spis treści

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską zatytułowaną.....	
Wykaz skrótów i akronimów.....	
1. Streszczenie.....	12
2. Abstract.....	15
3. Wstęp i uzasadnienie podjętych badań.....	18
4. Hipoteza i cele badawcze.....	24
4.1. Hipoteza.....	24
4.2. Cele badawcze.....	24
5. Materiał i metody.....	25
5.1. Materiał badawczy.....	25
5.2. Metody badawcze.....	25
5.2.1. Publikacja P-1.....	25
5.2.1.1. Podstawowy skład chemiczny.....	25
5.2.1.2. Frakcje włókna pokarmowego.....	26
5.2.1.3. Ocena składu aminokwasowego.....	26
5.2.1.4. Określenie wartości odżywczej białka.....	26
5.2.1.5. Analiza statystyczna.....	27
5.2.2. Publikacja P-2.....	28
5.2.2.1. Przygotowanie ekstraktów.....	28
5.2.2.2. Ocena aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem wolnego rodnika DPPH ⁺	28

5.2.2.3.	Ocena aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem wolnego kationorodnika ABTS ^{•+}	29
5.2.2.4.	Ocena aktywności przeciwutleniającej metodą fotochemiluminescencji (PCL)	29
5.2.2.5.	Polifenole ogółem	30
5.2.2.6.	Flawonoidy ogółem	30
5.2.2.7.	Flawonole ogółem	30
5.2.2.8.	Antocyjany ogółem	31
5.2.2.9.	Ocena poszczególnych flawonoli i antocyjanidyn	31
5.2.2.10.	Proantocyjanidyny	32
5.2.2.11.	Taniny ogółem	32
5.2.2.12.	Identyfikacja alkaloidu chelerytryny	32
5.2.2.13.	Analiza statystyczna	33
6.	Wyniki i ich omówienie	34
6.1.	Publikacja P-1	34
6.2.	Publikacja P-2	45
7.	Podsumowanie i wnioski	60
8.	Spis publikacji cytowanych w opisie rozprawy doktorskiej	61
9.	Spis tabel i rycin	81
9.1.	Spis tabel	81
9.2.	Spis rycin	82
10.	Wykaz załączników	83
10.1.	Załącznik 1	83
10.2.	Załącznik 2	97
10.3.	Załącznik 3	118
11.	Dodatkowe informacje	128

11.1. Edukacja	128
11.2. Doświadczenie zawodowe	128
11.3. Działalność dydaktyczna	128
11.4. Działalność organizacyjna.....	129
11.5. Działalność popularyzująca naukę	130
11.5.1. Wygłoszone referaty na konferencjach międzynarodowych i krajowych ...	130
11.5.2. Uczestnictwo w konferencjach krajowych i międzynarodowych	130
11.6. Szkolenia, kursy i warsztaty	130
11.7. Staże naukowe	132
11.8. Dorobek publikacyjny	132
11.8.1. Prace w czasopiśmie punktowanych	132
11.8.2. Doniesienia i komunikaty na konferencjach, seminariach, warsztatach międzynarodowych i krajowych	133
11.8.3. Prace popularno–naukowe	134

Wykaz skrótów i akronimów

AA	aktywność antyoksydacyjna, <i>antioxidant activity</i>
ABTS ⁺⁺	2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian), <i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate</i>
ACL	związki rozpuszczalne w tłuszczach, <i>lipid-soluble antioxidant</i>
ACW	związki rozpuszczalne w wodzie, <i>water-soluble antioxidant</i>
ADF	włókno kwaśno-detergentowe, <i>acid detergent fibre</i>
ADL	lignina kwaśno-detergentowa, <i>acid detergent lignin</i>
Ala	alanina, <i>alaninę</i>
ALT	aminotransferaza alaninowa, <i>alanine aminotransferase</i>
Arg	arginina, <i>argininę</i>
Asp	kwask asparaginowy, <i>aspartic acid</i>
BNW	bezażotowe związki wyciągowe, <i>nitrogen free extract</i>
C	cyjanidyna, <i>cyanidin</i>
CEL	celuloza, <i>cellulose</i>
CHE	chelerytryna, <i>chelerythrine</i>
CS	wskaźnik aminokwasu ograniczającego, <i>chemical score</i>
CVD	choroby układu krążenia, <i>cardiovascular disease</i>
Cys	cysteina, <i>cysteinę</i>
DE	delfinidyna, <i>delphinidin</i>
DIO	otyłość indukowana dietą, <i>diet-induced obesity</i>
DPPH ⁺⁺	1,1-difenylo-1-pikrylohydrazyl, <i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>
EAA	aminokwasy niezbędne, <i>essential amino acids</i>
EAAI	wskaźnik aminokwasów niezbędnych, <i>essential amino acid index</i>
FAO	Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GAE	ekwiwalent kwasu galusowego, <i>gallic acid equivalent</i>
Glu	kwask glutaminowy, <i>glutamic acid</i>
Gly	glicyna, <i>glycine</i>
HCEL	hemiceluloza, <i>hemicellulose</i>
His	histydyna, <i>histidine</i>
HPTLC	wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa, <i>high-performance thinlayer chromatography</i>

Ile	izoleucyna, <i>isoleucine</i>
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości, <i>low-density lipoprotein</i>
Leu	leucyna, <i>leucine</i>
Lys	lizyna, <i>lysine</i>
Met	metionina, <i>methionine</i>
MH	wzorzec aminokwasów białka dla człowieka dorosłego, <i>mature human protein standards</i>
NDF	włókno neutralno-detergentowe, <i>neutral detergent fiber</i>
NEAA	aminokwasy endogenne, <i>non-essential amino acid</i>
P	peonidyna, <i>peonidin</i>
PAC	proantocyjanidyny (skondensowane taniny), <i>proanthocyanidins (condensed tannins)</i>
PCA	analiza głównych składowych, <i>principal component analysis</i>
PCL	fotokemiluminescencja, <i>photochemiluminescence</i>
PG	pelargonidyna, <i>pelargonidin</i>
Phe	fenyloalanina, <i>phenylalanine</i>
Pro	prolina, <i>proline</i>
PSA	antygen swoisty dla prostaty, <i>prostate specific antigen</i>
PUFA	wielonienasycone kwasy tłuszczowe, <i>polyunsaturated fatty acids</i>
QE	kwercetyna, <i>quercetin</i>
QEE	ekwiwalent kwercetyny, <i>quercetin equivalent</i>
R	rutozyd, <i>rutoside</i>
RSA	zdolność do eliminowania wolnych rodników (aktywność przeciwrodnikowa), <i>radical-scavenging activity</i>
SEAA	aminokwasy względnie egzogenne, <i>semi-essential amino acids</i>
Ser	seryna, <i>serine</i>
s.m.	sucha masa, <i>dry matter (DM)</i>
TA	kwask taninowy, <i>tannic acid</i>
TAC	antocyjany ogółem, <i>total anthocyanin</i>
TF	flawonoidy ogółem, <i>total flavonoid</i>
TFL	flawonole ogółem, <i>total flavonol</i>
Thr	treonina, <i>threonine</i>
TNF- α	czynnik martwicy nowotworów α , <i>tumor necrosis factor α</i>

TP	polifenole ogółem, <i>total polyphenol</i>
Trp	tryptofan, <i>tryptophan</i>
TRX	trolox, <i>trolox</i>
TT	taniny ogółem, <i>total tannin</i>
Tyr	tyrozyna, <i>tyrosine</i>
Val	walina, <i>valine</i>
WE	wzorzec aminokwasów białka jaja kurzego, <i>whole egg protein standards</i>

1. Streszczenie

Wraz ze wzrostem kosztów żywności i pasz, w przemyśle produkcji zwierzęcej konieczne staje się poszukiwanie alternatywnych źródeł materiałów paszowych, w szczególności produktów pozyskanych z przetwórstwa rolno-spożywczego, będących pozostałością przy przetwarzaniu surowców roślinnych. Z uwagi na ślad węglowy w zrównoważonym łańcuchu żywnościowym oraz czynniki ekonomiczne i społeczne, coraz większego znaczenia w żywieniu zwierząt nabiera wykorzystanie produktów ubocznych powstałych przy produkcji owoców. Zarówno dyskwalifikaty, jak i produkty uboczne przetwarzania owoców, mogą być skutecznie wykorzystywane w żywieniu zwierząt jako źródło funkcjonalnych składników pasz do wytwarzania produktów zwierzęcych o lepszej jakości. Produkty uboczne przemysłu spożywczego są często dla przetwórców zbędne, a przez to tańsze w pozyskaniu przez producentów zwierząt. Przykładem takiego surowca może być rokitnik zwyczajny (*Hippophae rhamnoides* L.). Wszystkie części rokitnika zwyczajnego stanowią źródło wielu substancji o charakterze odżywczym i prozdrowotnym. Obecnie wykorzystywane są głównie owoce i nasiona. Po zbiorze owoców pozostają liście, które można wykorzystać, jako materiał paszowy, o równie wysokiej wartości odżywczej.

Celem przeprowadzonych badań była wszechstronna ocena wartości pokarmowej, profilu związków bioaktywnych oraz potencjału antyoksydacyjnego liści rokitnika zwyczajnego czterech odmian – Ascola, Habego, Hergo i Leikora, zebranych w trzech kolejnych latach – 2014, 2015, 2016.

W materiale badawczym oceniono zawartość podstawowych składników odżywczych, frakcje włókna pokarmowego oraz skład aminokwasowy. Dokonano również oceny jakości białka wykorzystując dwa wzorce aminokwasów (dla zwierząt i ludzi). Określono potencjał antyoksydacyjny etanolowych ekstraktów liści rokitnika z użyciem technik spektrofotometrycznych (ABTS, DPPH) i fotochemiluminescencji (PCL) oraz jakościową i ilościową analizę związków fenolowych. Oznaczono zawartość polifenoli, flawonoidów, flawonoli, antocyjanów, proantocyjanidyn oraz tanin ogółem. Przeprowadzono również analizy mające na celu określenie zawartości rutozydu, kwercetyny, delfinidyny, peonidyny, cyjanidyny, a także chelerytryny.

W pierwszej publikacji [P-1] wykazano zróżnicowanie składu chemicznego liści rokitnika. Analizowane źródła zmienności (rok, genotyp) wpłynęły zarówno na skład podstawowy, aminokwasowy, a także zawartość substancji bioaktywnych. Zawartość

białka w liściach rokitnika była wysoka i wyniosła średnio (odmiany i roku zbioru) 18,26 g/100 s.m. Średnia zawartość aminokwasów egzogennych w białku liści rokitnika zwyczajnego wyniosła 37,88 g/16 g N, uwzględniając wzorzec dla dorosłego człowieka (MH), i 44,23 g/16 g N, w odniesieniu do wzorca dla zwierząt (WE). Bez względu na wzorzec białka (MH, WE) pierwszym aminokwasem limitującym jakość białka liści rokitnika zwyczajnego, był tryptofan. Wartość wskaźnika aminokwasu ograniczającego (CS) w przypadku tryptofanu podlegała statystycznej modyfikacji przez wszystkie testowane czynniki. Wyniki przeprowadzonych analiz nad składem podstawowym oraz aminokwasowym wskazują, że liście rokitnika zwyczajnego mogą być cennym surowcem do wykorzystania jako materiał paszowy, jako częściowy zamiennik typowych źródeł białka w żywieniu zwierząt.

Ocenę potencjału przeciwutleniającego żywności prowadzi się przy pomocy testów w różnych układach i wykorzystujących odmienne mechanizmy reakcji. W drugiej publikacji [P-2] zastosowano testy oceniające zdolność ekstraktów do hamowania wolnych stabilnych rodników: DPPH⁺ i ABTS⁺. Zastosowanie do oceny potencjału antyoksydacyjnego rodnika DPPH pozwala na ocenę jedynie przeciwutleniaczy hydrofobowych, w przeciwieństwie do rodnika ABTS, który reaguje zarówno z przeciwutleniaczami hydrofobowymi, jak i hydrofilowymi. W pracy zastosowano również jedną z niestandardowych metod oceny potencjału przeciwutleniającego - metodę fotochemiluminescencji (PCL, photochemiluminescence). Ekstrakty z liści rokitnika wykazały silne działanie przeciwutleniające w testach DPPH i ABTS (RSA, od 56,33 do 98,25%). Materiał badawczy redukował znacząco zarówno rodnik DPPH⁺, jak i ABTS⁺ w badanych próbach. Ze względu na lipofilową naturę rodnika DPPH⁺, zaobserwowano niewielką różnicę w aktywności antyoksydacyjnej badanych odmian mierzonej metodą DPPH w porównaniu z testem ABTS. Dokonano również oceny potencjału przeciwutleniającego liści rokitnika metodą PCL. Metoda ta nie potwierdziła zróżnicowania potencjału antyoksydacyjnego surowca pochodzącego z różnych sezonów wegetacyjnych. Poddane analizie ilościowej związki fenolowe, są ogólnie uważane za główne czynniki determinujące zdolność antyoksydacyjną roślin. Zawartość flawonoidów ogółem w liściach rokitnika zwyczajnego była wysoka i wyniosła 281,76 mg QEE/1 g s.m. Średnia zawartość flawonoli wyniosła 80,19 mg QEE/1 g s.m. Zawartość poszczególnych flawonoidów w badanym materiale wykazywała różnice statystyczne przy analizowanych czynnikach eksperymentalnych – odmiana i sezon wegetacyjny. Na zawartość proantocyjanidyn, antocyjanów i tanin ogółem istotny wpływ miało pochodzenie surowca

(sezon wegetacyjny). Badane liście rokitnika zwyczajnego są bogatym źródłem PAC (do 18,517 mg/ 1g s.m.). Wykazano, że liście rokitnika zwyczajnego są również doskonałym źródłem rutozydu, kwercetyny oraz delfinidyny, peonidyny i cyjanidyny. Analizy w ramach publikacji P-2 potwierdziły obecność chelerytryny w liściach rokitnika zwyczajnego.

Przeprowadzone badania w pracy doktorskiej stanowią zarówno kompleksową analizę wartości odżywczej liści rokitnika zwyczajnego, jak i ocenę ich właściwości antyoksydacyjnych. Badania wykazały, że produkt uboczny, powstały przy produkcji owoców rokitnika zwyczajnego, może być cennym materiałem paszowym o dużym potencjale prozdrowotnym.

Słowa kluczowe: *Hippophae rhamnoides* L., makroskładniki, metabolity wtórne, potencjał antyoksydacyjny, produkt uboczny, dodatek funkcjonalny

2. Abstract

As food and feed costs increase, the animal production industry needs to look for alternative sources of feed materials, in particular products obtained from agri-food processing, which are residues from the processing of plant raw materials. Due to the carbon footprint of a sustainable food chain and economic and social factors, the use of by-products from fruit production is becoming increasingly important in animal nutrition. Both disqualified products and fruit processing by-products, can be effectively used in animal nutrition as a source of functional feed ingredients to produce better quality animal products. Food industry by-products are often redundant for processors and therefore cheaper to obtain by animal producers. An example of such a raw material is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). All parts of sea buckthorn are a source of many nutritional and health-promoting substances. Currently, mainly fruits and seeds are used. After harvest, the leaves remain and can be used as fodder material with equally high nutritional value.

The aim of the research was a comprehensive assessment of the nutritional value, profile of bioactive ingredients and antioxidant potential of sea buckthorn leaves of four cultivars – Ascola, Habego, Hergo and Leikora, collected in three years – 2014, 2015, 2016.

In the research material the levels of basic nutrients, dietary fiber fractions and amino acid composition were assessed. Protein quality was also assessed using two amino acid standards (for animals and humans). The antioxidant potential of ethanol extracts of sea buckthorn leaves was determined using ABTS, DPPH and PCL techniques, as well as qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds. The levels of polyphenols, flavonoids, flavonols, anthocyanins, proanthocyanidins and total tannins were specified. Analyzes were also carried out to determine the content of rutoside, quercetin, delphinidin, peonidin, cyanidin, and chelerythrine.

The first publication [P-1] showed differences in the chemical composition of leaves sea buckthorn. The analyzed sources of variability (year, genotype) influenced both the basic and amino acid composition as well as the content of bioactive substances. Protein content in sea buckthorn leaves was high and amounted to an average (variety and harvest year) of 18.26 g/100 dry matter. Average content of exogenous amino acids in sea buckthorn leaf protein was 37.88 g/16 g N, considering the standard for an adult human (MH), and 44.23 g/16 g N, related to the animal standard (WE). Irrespective of protein

standard (MH, WE), the first amino acid limiting the quality of sea buckthorn leaf protein, was tryptophan. Limiting amino acid index value (CS) in the case of tryptophan was statistically modified by all tested factors. The results of the analyzes carried out on the basic and amino acid composition indicate that sea buckthorn leaves may be a valuable raw material for use as feed material, as a partial replacement for typical protein sources in animal nutrition.

The assessment of the antioxidant potential of food is carried out using tests in various systems and using different reaction mechanisms. In the second publication [P–2], tests were used to assess the ability of extracts to inhibit free stable radicals: DPPH^{•+} and ABTS^{•+}. The use of the DPPH radical to assess the antioxidant potential allows for the assessment of only hydrophobic antioxidants, unlike the ABTS radical, which reacts both with hydrophobic and hydrophilic antioxidants. The study also uses one of the non-standard methods for assessing antioxidant potential – photochemiluminescence (PCL) method. Sea buckthorn leaf extracts showed strong antioxidant activity in DPPH and ABTS tests (RSA, from 56.33 to 98.25%). The research material significantly reduced both the DPPH^{•+} and ABTS^{•+} radicals in the tested samples. Due to the lipophilic nature of the DPPH^{•+} radical, a slight difference was observed in the antioxidant activity of the tested varieties measured by the DPPH method compared to the ABTS test. The antioxidant potential of sea buckthorn leaves was also assessed using the PCL method. This method did not confirm differences in the antioxidant potential of raw materials from different growing seasons. Phenolic compounds, also measured quantitatively, are generally considered to be the main factors determining the antioxidant capacity of plants. The content of total flavonoids in sea buckthorn leaves was high and amounted to 281.76 mg QEE/1 g of dry matter. The average flavonol content was 80.19 mg QEE/ 1 g dry matter. The content of individual flavonoids in the tested material showed statistical differences with the analyzed experimental factors – variety and growing season. The origin of the raw material (growing season) had a significant influence on the content of proanthocyanidins, anthocyanins and total tannins. The tested sea buckthorn leaves are a rich source of PAC (up to 18.517 mg/ 1g dry matter). It has been shown that sea buckthorn leaves are also an excellent source of rutoside, quercetin, delphinidin, peonidin and cyanidin. Analyzes in publication P–2 confirmed the presence of chelerythrine in sea buckthorn leaves.

The research conducted in the doctoral thesis constitutes both a comprehensive analysis of the nutritional value of sea buckthorn leaves and an assessment of their

antioxidant properties. Research has shown that the by-product resulting from the production of sea buckthorn fruit can be a valuable feed material with high health-promoting potential.

Keywords: *Hippophae rhamnoides* L., macronutrients, secondary metabolites, antioxidant potential, by-product, functional additive

3. Wstęp i uzasadnienie podjętych badań

Celem rolnictwa jest dostarczanie płodów rolnych, w tym surowców z różnego rodzaju roślin, na cele pokarmowe (dla ludzi) oraz paszowe (dla zwierząt). Bezpieczeństwo żywnościowe stanowi jedno z najważniejszych światowych wyzwań. Związane jest to, przede wszystkim, z rosnącą liczbą ludności. Szacunkowe wyliczenia wskazują, że liczba ludności na świecie w 2050 roku może osiągnąć ponad 10 miliardów (Binder i in., 2019; Andersone i in., 2023). Dlatego też rosnącą potrzebą jest zwiększenie globalnej produkcji żywności. Jednocześnie, wraz ze wzrostem kosztów żywności i pasz, w przemyśle produkcji zwierzęcej konieczne staje się poszukiwanie alternatywnych źródeł materiałów paszowych, w szczególności produktów pozyskanych z przetwórstwa rolno-spożywczego, będących pozostałością przy przetwarzaniu surowców roślinnych (Ferreira-Santos i in., 2024; Hamieau i in., 2024). Z uwagi na ślad węglowy w zrównoważonym łańcuchu żywnościowym oraz czynniki ekonomiczne i społeczne, coraz większego znaczenia w żywieniu zwierząt nabiera wykorzystanie produktów ubocznych powstałych przy produkcji owoców (Sapkota i in., 2021). Zarówno dyskwalityfikaty, jak i produkty uboczne przetwarzania owoców, mogą być skutecznie wykorzystywane w żywieniu zwierząt jako źródło funkcjonalnych składników pasz do wytwarzania produktów zwierzęcych o lepszej jakości.

Przykładem takiego surowca może być rokitnik zwyczajny (*Hippophae rhamnoides* L.) należący do rodziny oliwnikowatych (*Elaeagnaceae*), liściasty, dwupienny krzew, kojarzony w Polsce zwykle z regionem nadmorskim, gdzie porasta wydmy, tworząc gęste zarośla (Niesteruk i in., 2013; Gátlan i Gutt, 2021). Uprawą w Polsce tego gatunku zajmuje się wąskie grono plantatorów. Pierwsze sadzonki sprowadzono z Łotwy. To kraj, w którym stale rosną nasadzenia tej rośliny. W 2020 roku rokitnik był trzecim co do wielkości nasadzeń gatunkiem owoców uprawianych na plantacjach na Łotwie, po jabłoniach i porzeczkach czarnych (Drevinska i Moroëko-Bièevska, 2022). Ze względu na cenne właściwości odżywcze i prozdrowotne, rokitnik jest plasowany w pierwszej dziesiątce surowców do produkcji żywności funkcjonalnej według Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations), a także kosmetyków i leków (Arora i in. 2012; Zakynthinos i Varzakas, 2015; Suryakumar i Gupta, 2021). Kraj, w którym rokitnik jest rośliną bardzo popularną są również Chiny, gdzie wykorzystywany jest zarówno na skalę przemysłową, jaki i w medycynie tradycyjnej (Nybom i in., 2023; Mei i in., 2023).

Rokitnik zwyczajny jest rośliną łatwą w uprawie i bardzo tolerancyjną, dlatego można go uprawiać nawet na mało żyznym, piaszczystym i wapiennym podłożu. Rośnie również w warunkach suszy (Rongsen, 1992; Ahmad i Kamal, 2002). Roślina ta od wieków stosowana była w medycynie niekonwencjonalnej w różnych częściach świata (Pundir i in., 2021; Chen i in., 2023; Bayir i in., 2024). W starożytnym Tybecie stosowano ją przy zaburzenia żołądkowo-jelitowych, w Mongolii jako środek uspokajający, a Grecy wykorzystywali jako środek weterynaryjny (Bouloumpasi i in., 2024; Coscarella i in., 2024; Tapia-Quirós i in., 2024).

Owoce rokitnika znane są z wysokiego stężenia witaminy C, zawartości karotenoidów, tokoferoli i innych związków bioaktywnych, a także z wartościowego profilu lipidowego (Guo i in., 2017; Wei i in., 2022; Ciesarová i in., 2020; Dong i in., 2023). Dienaité i in. (2020) zidentyfikowali w wyciekach z owoców rokitnika zwyczajnego ponad 28 metabolitów wtórnych o działaniu przeciwutleniającym. Główną grupę wspomnianych związków stanowiły flawonole, w tym – izoramnetyna, kwercetyna, glikozydy kemferolu oraz katechiny.

Karotenoidy zlokalizowane są głównie w miękkich częściach owoców rokitnika zwyczajnego, nadając im charakterystyczny pomarańczowo-żółty kolor (Teleszko i in., 2015). Zawartość karotenoidów ogółem wynosi od 53 do 97 mg/100 g suchej masy owoców rokitnika zwyczajnego (Pop i in., 2014). Owoce zawierają dwie różne frakcje oleju: jedną uzyskaną z nasion i drugą z miąższu. Nienasycone kwasy tłuszczowe i tokoferole są głównymi składowymi obu tych frakcji, jednakże różnią się one znacząco pod względem stężenia. Olej z nasion zawiera większe stężenie tokoferoli i kwasu alfa-linolenowego, podczas gdy olej z miąższu ma większe stężenie kwasu palmitooleinowego (Kallio i in., 2002). Owoce, miąższ i olej z nasion rokitnika są stosowane w żywieniu człowieka i w żywieniu zwierząt wykazując pozytywny wpływ na zdrowie (Criste i in., 2020; Vilas-Franquesa i in., 2020; Qin i in., 2020; Boško i in., 2021; Tkacz i in. 2021). Yan i in. (2023) wykazali, że dodatek wycieków z owoców rokitnika zwyczajnego, na poziomie od 1,0 do 2,0% ma korzystny wpływ na produkcję, funkcję odpornościową i status antyoksydacyjny odsadzanych prosiąt. Badanie przeprowadzone przez Dannenberger i in. (2018) wykazało wpływ suplementacji wyciekami z rokitnika zwyczajnego w diecie rosnących świń na zawartość kwasów tłuszczowych we krwi i podwzgórze, na obwodowe parametry odpornościowe oraz na receptor mineralokortykoidowy i receptor glukokortykoidowy w podwzgórze i śledzionie.

Nasiona zawarte w owocach rokitnika zwyczajnego pozyskuje się najczęściej ze względu na zawartość tłuszczu surowego – ok. 12% (Nogala-Kalucka i in., 2010) i korzystny profil kwasów tłuszczowych (Li i in., 2016). Stanowią również dobre źródło szeregu różnych związków bioaktywnych (m.in. różne flawonoidy, głównie kemferol i kwercetynę, a także proantocyjanidyny, katechiny, saponiny triterpenoidowe) (Kalio i in., 2002; Sławińska i in., 2023). Wykazano, że suplementacja olejem z nasion rokitnika zwyczajnego normalizuje ciśnienie krwi u osób z nadciśnieniem tętniczym, (średnie ciśnienie skurczowe zmniejszyło się o 9,57 mmHg, a średnie ciśnienie rozkurczowe o 4,96 mmHg, po 30 dniach suplementacja olejem), a także statystycznie istotnie zmniejsza stężenie cholesterolu, w tym frakcji LDL (low-density lipoprotein) oraz triacylogliceroli u osób z hipercholesterolemią. Poprawia również status antyoksydacyjny zarówno u osób z nadciśnieniem, jaki i u osób z ciśnieniem prawidłowym (Vashishtha i in., 2016).

Nie tylko owoce, nasiona, ale także inne elementy tej rośliny zostały uznane za cenne źródło składników odżywczych i związków bioaktywnych (Xing i in., 2002; Górnaś i in., 2016; Tian i in., 2018; Wang i in., 2022a). Wykazano, że zarówno liście, jak i łodygi z rokitnika znacząco obniżają poziom stresu oksydacyjnego, m.in. dzięki obecności proantocyjanidyn i innych związków fenolowych (Skalski i in., 2019).

W Polsce nadal jest to surowiec niszowy. Jedną z potencjalnych przyczyn niskiej popularności uprawy rokitnika zwyczajnego w naszym kraju, może być technologia zbioru owoców, która jest procesem złożonym. Na proces pozyskania surowca składają się dwa główne etapy. Pierwszy etap obejmuje pozyskanie surowca w wyniku ścięcia pędów rośliny wraz z jej owocami, zaś drugi – mrożenie otrzymanych pędów wraz z owocami rokitnika. Po zamrożeniu, owoce rokitnika zostają oddzielone poprzez mechaniczne potrząsanie, a pozostałe łodygi i liście można by z powodzeniem wykorzystać jako materiał paszowy dla zwierząt, czy surowiec do produkcji wyrobów spożywczych dla ludzi (Radenkovs i in., 2018).

Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 767 (2009) z późniejszymi zmianami (Rozp. 1903/2018) pojęcie „produkty uboczne przemysłu rolno–spożywczego” znajduje się w określeniu „materiały paszowe”. Są to produkty pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, których zasadniczym celem jest zaspokajanie potrzeb żywieniowych zwierząt. Zalicza się do nich surowce w stanie naturalnym, świeże lub konserwowane, oraz produkty pozyskane z ich przetwórstwa przemysłowego. Przez określenie „uboczny” takie materiały mogą sugerować stwierdzenie, iż są mało wartościowe, nieprzydatne w żywieniu zwierząt. Jednak wartość odżywcza materiałów

paszowych, które pochodzą z produkcji rolno-spożywczej jest znacząca i należy zwiększyć badania nad nimi by móc właściwie wykorzystać w żywieniu różnych gatunków zwierząt, zarówno gospodarskich, jak i towarzyszących. Produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego nadal zawierają duże ilości składników bioaktywnych o wysokim potencjale antyoksydacyjnym (Bouloumpasi i in., 2024; Tapia-Quirós i in., 2024; Coscarella i in., 2024). Wykorzystanie produktów ubocznych (m.in. wytloki, pestki, liście różnych roślin) ma także wymiar ekonomiczny, jakim jest czerpanie zysków z odpadów wytwarzanych przy przetwórstwie owoców, będących zarazem tanim źródłem związków prozdrowotnych (González-García i in., 2014; Bodó i in., 2017). Wykorzystanie tego typu surowców, w żywieniu zwierząt gospodarskich zmniejsza negatywny wpływ przemysłu rolno-spożywczego na środowisko oraz zwiększa rentowność produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego (Samolińska i in., 2019). Obecnie nabiera to szczególnie znaczącego wymiaru w związku z wprowadzanymi przez Komisję Europejską regulacjami prawnymi dotyczącymi ograniczenia marnotrawienia żywności, jako wkładu w rozwój zrównoważonej biogospodarki (Aschemann-Witzel i Stangherlin, 2021; Çakmakçı i in., 2023).

Liście rokitnika zwyczajnego przyciągają coraz większą uwagę na świecie ze względu na ich potencjalną wartość zdrowotną (Vilas-Franquesa i in., 2020; Boško i in., 2021). Stanowią bogate źródło fitozwiązków, takich jak związki fenolowe (w tym polifenole i flawonoidy), polisacharydy, karotenoidy czy saponiny (Jaroszewska i Biel, 2017; Sytařová i in., 2020; Trivedi i in., 2022; Čulina i in., 2024). W literaturze udokumentowano działanie przeciwutleniające, hepatoprotekcyjne, immunomodulujące, antyoksydacyjne, kardioprotekcyjne, przeciwcukrzycowe, związków fenolowych zawartych w liściach rokitnika zwyczajnego, a nawet ich wpływ na zmniejszenie aktywność czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α) (Kwon i in., 2011; Bhardwaj i in., 2015; Jain i in., 2015; Vashishtha i in., 2016; Enkhtaivan i in., 2017; Kwon i in., 2017; Cho i in., 2017; Khajuria i in., 2018; Kumar i in., 2022; Liu i in., 2023).

Mając na uwadze fakt, iż na całym świecie nadwaga i otyłość osiągnęły rozmiary epidemii, wysoce interesujące wyniki badań opublikowali Lee i in. (2011). Autorzy podawali dodatek zliofilizowanych i sproszkowanych liści rokitnika zwyczajnego do diety (1% i 5%) zwierzętom modelowym – myszom – z otyłością indukowaną dietą wysokotłuszczową. Po sześciu tygodniach obserwacji stwierdzono zahamowanie przyrostu masy ciała w sposób zależny od dawki. Co więcej znacząco zmniejszył się udział tkanki tłuszczowej (trzewnej). Ponadto badania krwi zwierząt wykazały obniżenie poziomu

leptyny, triacylogliceroli i całkowitego cholesterolu oraz poziomu aminotransferazy alaninowej (ALT, alanine aminotransferase) w porównaniu ze zwierzętami, które stanowiły kontrolę (dieta wysokotłuszczowa).

W Polsce nowotwory złośliwe stanowią drugą, po chorobach układu krążenia, przyczynę zgonów (URL 1). W literaturze naukowej pojawia się coraz więcej doniesień dotyczących działania przeciwnowotworowego ekstraktów z liści rokitnika zwyczajnego. Rak prostaty to nowotwór złośliwy, który jest najbardziej rozpowszechnionym nowotworem wśród mężczyzn powyżej 50 roku życia zarówno w Polsce, jak i na świecie. Ekstrakty z liści rokitnika zwyczajnego przebadano pod kątem regulacji receptorów androgenowych (AR) w komórkach raka prostaty. Wykazano, że ekstrakty z liści rokitnika zwyczajnego obniżyły poziom genów reagujących na androgeny oraz antygenu swoistego dla prostaty (PSA), którego to podwyższony poziom pozwala na wczesne wykrycie tego nowotworu. Autorzy badań sugerują, że liście rokitnika mogą znaleźć zastosowanie jako żywność funkcjonalna i mogą odgrywać kluczową rolę w profilaktyce, szczególnie u osób o wysokim ryzyku zachorowania (Masoodi i in., 2020).

Jak wskazują liczne publikacje naukowe, w tym analizy mikrobiologiczne, liście rokitnika zwyczajnego mogą być bezpiecznie stosowane w żywieniu zwierząt gospodarskich (zarówno przeżuwających, jak i monogastrycznych). Stwierdzono, że mają korzystny wpływ na wzrost i wydajność zwierząt gospodarskich m.in. kurcząt brilerów, owiec czy prosiąt (Vlaicu i in., 2017; Liu i in., 2019; Singh i in., 2020; Ma i in., 2022; Saracila i in., 2022; Hao i in., 2023; Yan i in., 2023).

Liście rokitnika zwyczajnego są cennym surowcem, nie tylko ze względu na zawartość związków bioaktywnych i właściwości antyoksydacyjne, ale również dlatego, że mogą służyć jako częściowy zamiennik typowych źródeł białka, zwłaszcza w żywieniu zwierząt gospodarskich (Biel i Jaroszewska, 2016; Gradt i in., 2017; Sharma i in., 2018; Kumar i in., 2022). Wykazano, że wpływ na zawartość tego składnika w liściach ma termin zbioru (Li i Wardle, 2003). Warto podkreślić jest to, że białko liści rokitnika jest źródłem również cennych aminokwasów, takich jak lizyna, metionina i cysteina (Xing i in., 2002; Christaki, 2012). Jest więc to bardzo obiecujący surowiec do wykorzystania nie tylko jako dodatek (Naumenko i Popova, 2020).

Badania nad rokitnikiem zwyczajnym są ważne i mogą doprowadzić do powstania nowych dróg jego wykorzystania w Polsce, w tym żywności/paszy. Jednak doniesienia literaturowe na temat profili wielu bioaktywnych składników w produkcie ubocznym, jakim są liście, są nadal bardzo nieliczne. Konieczność scharakteryzowania metabolitów

wtórnych, a także głównych składników odżywczych wynika również z wcześniejszych doniesień (Cui i in., 2018; Tkacz i in., 2020). Mając na uwadze powyższe, tematyka badawcza niniejszej rozprawy doktorskiej wydaje się być uzasadniona i wpisuje się w obecny problem poszukiwania możliwości efektywnego wykorzystania w hodowli i produkcji zwierząt naturalnych, roślinnych produktów ubocznych z przemysłu rolno–spożywczego.

4. Hipoteza i cele badawcze

4.1. Hipoteza

Postawiono hipotezę badawczą zakładającą wysoką wartość odżywczą i funkcjonalną liści rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) ze szczególnym uwzględnieniem jakości białka, frakcji włókna pokarmowego, a także składników bioaktywnych i aktywności antyoksydacyjnej.

Powyższe założenia zweryfikowano w dwóch etapach badawczych [P-1, P-2]

4.2. Cele badawcze

Celem głównym badań była wszechstronna ocena wartości pokarmowej, profilu składników bioaktywnych oraz potencjału antyoksydacyjnego liści rokitnika zwyczajnego czterech odmian – Ascola, Habego, Hergo i Leikora zebranych w trzech kolejnych latach (2014, 2015, 2016). Ocena taka pozwoliła wskazać możliwości wykorzystania tego surowca w żywieniu zwierząt. Cel ten był realizowany poprzez następujące cele szczegółowe:

1. Ocena podstawowych składników odżywczych [P-1]
2. Ocena frakcji włókna pokarmowego [P-1]
3. Ocena składu aminokwasowego [P-1]
4. Ocena jakości białka liści rokitnika zwyczajnego za pomocą wskaźnika aminokwasu ograniczającego (CS) oraz zintegrowanego wskaźnika aminokwasów egzogennych (EAAI) uwzględniając dwa wzorce (skład aminokwasowy białka jaja kurzego oraz wzorzec białkowy przeznaczony dla człowieka dorosłego) [P-1]
5. Ocena potencjału przeciwutleniającego liści rokitnika zwyczajnego z użyciem technik ABTS i DPPH oraz przy wykorzystaniu fotochemiluminescencji (PCL) [P-2]
6. Analiza ilościowa i jakościowa związków fenolowych [P-2]
7. Analiza alkaloidu benzofenantrydynowego chelerytryny w liściach rokitnika zwyczajnego [P-2]

5. Materiał i metody

5.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły liście rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) z trzech kolejnych lat zbioru (2014–2016). Próby pochodziły z doświadczeń przeprowadzonych w Rolniczej Stacji Doświadczalnej w Lipniku należącej do Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (k. Stargardu, 53°42' N, 14°97' S). W badaniach wykorzystano cztery odmiany żeńskie: Ascola, Habego, Hergo i Leikora. Odmiany te charakteryzują się wysoką odpornością na nasionnicę rokitnikową (*Rhagoletis batava*) – szkodnika stwarzającego największe zagrożenie w nasadzeniach rokitnika zwyczajnego, powodując duże straty plonów. Liście do analizy zebrano w pełnej dojrzałości owoców (jagód), co przypadało w każdym roku średnio w okresie pomiędzy 1 a 15 sierpnia. Wykorzystano w badaniach liście bez oznak uszkodzeń. Po zebraniu świeży materiał badawczy został zważony, następnie pozostawiony do wysuszenia w temperaturze otoczenia przy ograniczonym dostępie światła przez 3–4 dni do uzyskania powietrznie suchej masy. Po wysuszeniu materiał został ponownie zważony w celu obliczenia współczynnika podsuszenia. Z materiału podsuszonego przygotowano reprezentatywne próby, które zmielono do przy użyciu młynka laboratoryjnego KNIFETEC 1095 (Foss Tecator, Höganäs, Szwecja) i przechowywano w sterylnych pojemnikach do czasu wykonania analiz chemicznych.

5.2. Metody badawcze

5.2.1. Publikacja P-1

5.2.1.1. Podstawowy skład chemiczny

Podstawowy skład chemiczny liści rokitnika zwyczajnego oznaczono zgodnie z Association of Official Analytical Chemists (AOAC 2019). W celu oznaczenia suchej masy (s.m.) próby wysuszono w suszarce laboratoryjnej (UE 400, Memmert, Schwabach, Niemcy) w temperaturze 105°C do uzyskania stałej masy. Zawartość popiołu surowego (PS) oznaczono poprzez spalenie prób w piecu muflowym (Czylok, Polska) w temperaturze 580°C. Białko surowe (BS) określono w oparciu o oznaczony azot ($N \times 6,25$) metodą Kjeldahla przy użyciu aparatu do mineralizacji Büchi Scrubber B414 i do destylacji Büchi 324 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Szwajcaria). Tłuszcz surowy (TS)

oznaczono poprzez ciągłą ekstrakcję za pomocą eteru dietylowego metodą Soxhleta. Włókno surowe (WS) oznaczono w analizatorze Ankom²²⁰ Fiber Analyzer (ANKOM Technology, New York, USA). Zawartość bezazotowych związków wyciągowych (BNW) obliczono odejmując od 100 sumaryczną zawartość wilgotności, białka ogółem, tłuszczu surowego, włókna i popiołu surowego (Pomeranz i in., 1994). Wszystkie oznaczone oraz wyliczone składniki odżywcze wyrażono w przeliczeniu na suchą masę (s.m.).

5.2.1.2. Frakcje włókna pokarmowego

Frakcje włókna pokarmowego oznaczono metodą detergentową z zastosowaniem metody Van Soest i in. (1991). Oznaczenia wykonywano przy użyciu aparatu Ankom²²⁰ Fiber Analyzer (ANKOM Technology, New York, USA). Oznaczone zostały poszczególne frakcje: włókno neutralno-detergentowe (NDF, neutral detergent fibre), przy użyciu SLS (siarczanu sodowo-laurylowego), włókno kwaśno-detergenowe (ADF, acid detergent fibre) – przy użyciu bromku cetylo-trójmetylo-amoniowego, lignina kwaśno-detergentowa (ADL, acid detergent lignin) – przy użyciu 72% kwasu siarkowego. Zgodnie z metodą, zawartość hemiceluloz (HCEL, hemicellulase) wyliczano z różnicy pomiędzy NDF i ADF, natomiast zawartość celulozy (CEL, cellulase) z różnicy pomiędzy ADF i ADL. Wszystkie oznaczone oraz wyliczone frakcje włókna pokarmowego wyrażono w przeliczeniu na suchą masę (s.m.).

5.2.1.3. Ocena składu aminokwasowego

Udział aminokwasów (oprócz tryptofanu) w białku liści rokitnika zwyczajnego oznaczono w analizatorze aminokwasów AAA-400 (INGOS s.r.o., Praga, Czechy). Procedura analityczna stosowana była zgodnie z zaleceniami producenta. Materiał poddawano hydrolizie w 6 M HCl przez 24 h w temp. 110°C. Oznaczanie aminokwasów zawierających siarkę przeprowadzano po utlenieniu w mieszaninie kwasu mrówkowego i nadtlenu wodoru (9:1) w temp. 110 °C przez 24 h. Tryptofan oznaczono zgodnie z metodą AOAC (1990). Aminokwasy wyrażono w g/16 g N, co odpowiada g/100 g białka.

5.2.1.4. Określenie wartości odżywczej białka

Oznaczony skład aminokwasowy posłużył do oceny wartości odżywczej białka liści rokitnika zwyczajnego.

Wskaźnik aminokwasu ograniczającego (CS, chemical score) obliczono (Block i Mitchel, 1946) z zastosowaniem dwóch standardów: aminokwasów dla człowieka dorosłego (MH, mature human) (FAO/WHO, 1991) oraz aminokwasów białka jaja kurzego (WE, whole egg) (FAO/WHO/UNU, 1985). Do obliczenia wskaźnika CS użyto następującego równania:

$$CS = a_i/a_s \times 100\%$$

gdzie:

a_i – zawartość aminokwasu egzogenne białka badanego,

a_s – zawartość aminokwasu egzogenne białka wzorcowego.

Zintegrowany wskaźnik aminokwasów niezbędnych (EAAI, essential amino acid index) obliczono (Oser, 1959) jako średnią geometryczną wszystkich aminokwasów egzogenne do zawartości tych aminokwasów w danym wzorcu zgodnie z założeniami:

$$EAA = \sqrt[n]{(a_1/a_{1s}) \times 100 \times \dots \times (a_n/a_{ns}) \times 100}$$

gdzie:

EAA – aminokwasy niezbędne (essential amino acids)

a_n – zawartość aminokwasu białka badanego,

a_{ns} – zawartość aminokwasu białka wzorcowego,

Zintegrowany wskaźnik aminokwasów niezbędnych (EAAI, essential amino acid index) obliczono w następujący sposób:

$$EAAI = 10^{\log EAA}$$

gdzie:

$$\log EAA = 1/n(\log (a_1/a_{1s}) \times 100 + \log (a_2/a_{2s}) \times 100 + \dots + \log (a_n/a_{ns}) \times 100)$$

5.2.1.5. Analiza statystyczna

Wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i analizy głównych składowych (PCA, principal component analysis) przy użyciu oprogramowania STATISTICA v13.30 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornia, USA). Do oceny istotności różnic (najmniejszej istotnej różnicy) pomiędzy wartościami średnimi zastosowano test Tukeya przy $p = 0,05$.

5.2.2. Publikacja P-2

5.2.2.1. Przygotowanie ekstraktów

Wysuszone zmielone próby liści (1 g) ekstrahowano rozpuszczalnikiem etanolem (95% etanol) przez 2 h. Tak sporządzone ekstrakty szczelnie zamknięto i pozostawiono w lodówce (-20°C) do czasu rozpoczęcia pomiarów.

Przygotowane ekstrakty posłużyły do oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej (AA, *antioxidant activity*) metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem rodnika DPPH⁺ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) i ABTS^{•+} (2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian). Ekstrakty posłużyły również do określenia polifenoli ogółem, flawonoidów ogółem, flawonoli ogółem i tanin ogółem. Zgodnie z zastosowanymi i podanymi w dalszej części metodami do oznaczenia antocyjanów zastosowano zakwaszony metanol (1% v/v HCl), natomiast do oznaczenia proantycyjanidyn zastosowano aceton 70%.

Do analiz z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC, high performance thin layer chromatography) przygotowano ekstrakty z zastosowaniem zakwaszonego metanolu (mieszanina metanolu i kwasu chlorowodorowego 25%, 4:1, v/v) jako rozpuszczalnika celem oznaczenia rutozydu, kwercetyny, cyjanidyny, delfinidyny, pelargonidyny, peonidyny i chelerytryny.

Wszystkie ekstrakty użyte w analizach przygotowano według identycznego schematu. Odważono około 0,5 g (naważka z dokładnością do czterech miejsc po przecinku) materiału roślinnego na 1 ml rozpuszczalnika. Tak przygotowane próby wytrząsano przez 30 minut w młynku miksującym MM 200 (Retsch GmbH, Haan, Niemcy). Po wytrząsaniu próby wirowano przez 15 minut przy 5000 obr./min w temperaturze 4°C w wirówce Centrifuge 5415 R (Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy). Po wirowaniu ekstrakty przefiltrowano przez filtry celulozowe o wielkości porów $0,45\ \mu\text{m}$ i przeniesiono do probówek Eppendorf'a. Filtraty przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz.

5.2.2.2. Ocena aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem wolnego rodnika DPPH⁺

Analizę właściwości antyoksydacyjnych badanego materiału roślinnego przeprowadzono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem rodnika DPPH⁺ (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl) (Brand-Williams i in., 1995). Postęp reakcji redukcji i jednocześnie odbarwienie roztworu rodnikowego mierzono w spektrofotometrze UV-VIS

(Analytik Jena, SPECORD® PLUS, Jena, Niemcy) przy długości fali $\lambda = 515$ nm, 10 min po dodaniu roztworu DPPH⁺. Materiałem odniesienia był roztwór troloksu.

Wyniki aktywności antyoksydacyjnej DPPH badanych prób wyrażano w przeliczeniu na ekwiwalent troloksu ($\mu\text{M TRX/g s.m.}$). W tym celu przygotowano roztwory troloksu o różnych stężeniach, aby określić krzywą wzorcową ($y = -0,0183x + 0,7762$; $R^2 = 0,9992$).

5.2.2.3. Ocena aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem wolnego kationorodnika ABTS⁺

Ocenę właściwości antyoksydacyjnych badanego materiału roślinnego przeprowadzono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem rodnika z wykorzystaniem kationorodnika ABTS⁺ (kwas 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (Re i in., 1999). Postęp reakcji redukcji i jednocześnie odbarwienie roztworu rodnika kationowego mierzono na spektrofotometrze UV-VIS (Analytik Jena, SPECORD® PLUS, Jena, Niemcy) przy $\lambda = 734$ nm, 6 min po dodaniu roztworu ABTS⁺. Wyniki aktywności antyoksydacyjnej badanych prób wyrażano w przeliczeniu na ekwiwalent troloksu ($\mu\text{M TRX/g}$). W tym celu przygotowano roztwory troloksu o różnych stężeniach, aby wyznaczyć krzywą wzorcową ($y = -0,0127x + 0,6292$; $R^2 = 0,9989$).

Określono również zdolność do eliminowania wolnych rodników (RSA, radical-scavenging activity) DPPH⁺ i rodnika ABTS⁺ korzystając z wzoru:

$$\text{RSA (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

gdzie:

RSA – zdolność do hamowania wolnych rodników,

A₀ – średnia absorbancja próby zerowej (kontroli) (dla ABTS) i próbki na początku reakcji (dla DPPH),

A₁ – średnia absorbancja próby badanej (w ciągu 6 min dla ABTS; w ciągu 10 min dla DPPH).

5.2.2.4. Ocena aktywności przeciwutleniającej metodą fotochemiluminescencji (PCL)

Ocenę potencjału przeciwutleniającego przeprowadzono metodą fotochemiluminescencji (PCL, photochemiluminescence) przy użyciu aparatu Photochem (Analytik Jena, Lipsk, Niemcy). Analizę przeprowadzono z użyciem standardowych

protokołów i zestawów odczynników dla związków rozpuszczalnych w wodzie (ACW, water-soluble antioxidant) (Zielinska i in., 2008). Do przygotowania ekstraktów wykorzystano wodę dejonizowaną pozyskaną z urządzenia Milli-Q RG (Milli-Q system, Millipore, France) ($30 \text{ s} \times 2$).

Wyniki aktywności antyoksydacyjnej pozyskanej metodą PCL również wyrażono w przeliczeniu na ekwiwalent troloxu ($\mu\text{M TRX/g s.m.}$).

5.2.2.5. Polifenole ogółem

Zawartość polifenoli ogółem (TP, total polyphenol) oznaczono metodą spektroskopii UV-VIS (ultraviolet and visual light spectroscopy) (Analytik Jena, SPECORD[®] PLUS, Jena, Niemcy) z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu (Ainsworth i Gillespie, 2007), stosując kwas galusowy jako wzorzec. Absorbancję mierzono przy $\lambda = 765 \text{ nm}$. Zawartość związków polifenolowych ogółem wyrażano w przeliczeniu na ekwiwalent kwasu galusowego (GAE, gallic acid equivalent) w 1 g s.m. materiału badawczego. W tym celu zostały przygotowane roztwory kwasu galusowego o różnych stężeniach by wyznaczyć krzywą wzorcową ($y = 0,0115x + 0,0332$; $R^2 = 0,9997$).

5.2.2.6. Flawonoidy ogółem

Zawartość flawonoidów ogółem (TF, total flavonoids) oznaczono metodą spektroskopii UV-VIS (ultraviolet and visual light spectroscopy) (Analytik Jena, SPECORD[®] PLUS, Jena, Niemcy) z zastosowaniem chlorku glinu (AlCl_3) (Ordonez i in., 2006). Absorbancję mierzono przy $\lambda = 420 \text{ nm}$. Otrzymane wynik wyrażono w przeliczeniu na ekwiwalent kwercetyny (QEE, quercetin equivalent) w 1 g s.m. materiału badawczego. W tym celu zostały przygotowane roztwory kwercetyny o różnych stężeniach by wyznaczyć krzywą wzorcową ($y = 0,0187x + 0,0087$; $R^2 = 0,9964$).

5.2.2.7. Flawonole ogółem

Zawartość flawonoli ogółem (TFL, total flavonols) oznaczono metodą spektroskopii UV-VIS (Analytik Jena, SPECORD[®] PLUS, Jena, Niemcy) z zastosowaniem roztworu chlorku glinu (AlCl_3) oraz octanu sodu (Kumaran i Karunakaran, 2007). Absorbancję mierzono przy $\lambda = 440 \text{ nm}$. Otrzymane wynik wyrażono w przeliczeniu na ekwiwalent kwercetyny (QEE) w 1 g s.m. materiału badawczego. W tym celu zostały przygotowane roztwory kwercetyny o różnych stężeniach by wyznaczyć krzywą wzorcową ($y = 0,5297x - 0,2227$; $R^2 = 0,9934$).

5.2.2.8. Antocyjany ogółem

Zawartość antocyjanów ogółem (TAC, total anthocyanin) oznaczono metodą spektroskopii UV–VIS (Analytik Jena, SPECORD® PLUS, Jena, Niemcy) z zastosowaniem zakwaszonego metanolu (1% v/v HCl) (Mirecki i Teramura, 1984). Absorbancję określono przy długości fali 530 i 657 nm. Stężenia antocyjanów (mg/g s.m.) obliczono z następującego wzoru:

$$\text{TAC (mg/g s.m.)} = [A_{530} - 0,25 \times A_{657}] \text{ TV} / [d_{\text{wt}} \times 1000]$$

gdzie:

A_{530} – absorbancja prób przy długości fali 530 nm,

A_{657} – absorbancja prób przy długości fali 657 nm,

TV – całkowita objętość ekstraktu (ml),

d_{wt} – naważka (g).

5.2.2.9. Ocena poszczególnych flawonoli i antocyjanidyn

Poddano analizie materiał badawczy na obecność poszczególnych flawonoli [rutozydu (R, rutoside) i kwercetyny (QE, quercetin)] i antocyjanidyn [cyjanidyny (C, cyaniding), pelargonidyny (PG, pelargonidin), peonidyny (P, peonidin), delfinidyny (DE, delphinidin (DE) metodą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC, high–performance thin–layer chromatography). Przygotowano roztwory wzorcowe dla wszystkich oznaczanych substancji, o stężeniu 1mg/ml. Roztwory wzorcowe oraz próby badane przygotowano jako ekstrakty z zastosowaniem zakwaszonego metanolu (mieszanina metanolu i kwasu chlorowodorowego 25%, 4:1, v/v). Oznaczenia wykonano na aluminiowych płytkach 10×10 cm (Aluminiumoxid 60 F₂₅₄, typ E, Merck, Darmstadt, Niemcy), dedykowanych do analiz TLC. Przed użyciem płytki aktywowano metanolem. Następnie suszono je w temperaturze 60°C przez godzinę. Próbki oraz wzorzec naniesiono punktowo szklanymi kapilarami o pojemności 1 lub 2 µl za pomocą Vomaticator Linomat (CAMAG, Muttenz, Szwajcaria). Jako pierwsze naniesione zostały standardy, w celu wyznaczenia krzywej wzorcowej, następnie naniesiono przygotowane ekstrakty. Tak przygotowane płytki przenoszono do automatycznej komory (CAMAG ADC, Muttenz, Szwajcaria) w celu rozwinięcia chromatogramów. Faza mobilna w komorze składała się z mieszaniny chloroform/metanol/acetone/amoniak (10:22:53:0,2, v/v/v/v), rozdzielanie

próbek trwało 40 min, w szklanych komorach chromatograficznych (Sigma-Aldrich, Niemcy). Po wysuszeniu w ciemnym miejscu, płytki skanowano z zastosowaniem skanera TLC Scanner 3 (CAMAG, Muttenz, Szwajcaria). Uzyskane wyniki obliczono przy użyciu oprogramowania Visual Cats 1.3.4. Wartości poszczególnych związków wyrażono w μg na 1 g s.m.

5.2.2.10. Proantocyjanidyny

Zawartość proantocyjanidyn (PAC, proanthocyanidin) oznaczono metodą spektroskopii UV–VIS (Analytik Jena, SPECORD® PLUS, Jena, Niemcy) z zastosowaniem kwasu butanolowego (Porter i in., 1986). Absorbancję mierzono przy $\lambda = 550 \text{ nm}$. Zawartość PAC obliczono według następującego wzoru:

$$\text{PAC (\%)} = A_{550} \times 78,26 \times \text{wr} / \% \text{ s.m.}$$

gdzie:

A_{550} – absorbancja prób przy długości fali 550 nm,

wr – współczynnik rozcieńczenia,

% s.m. – procentowa zawartość suchej masy w badanej próbce.

5.2.2.11. Taniny ogółem

Zawartość tanin (TT) oznaczono metodą spektrofotometryczną z zastosowaniem odczynnika Folina–Ciocalteu (Tambe i Bhambar, 2014), stosując kwas taninowy (TA, tannic acid) jako wzorzec. Absorbancję mierzono przy $\lambda = 725 \text{ nm}$ przy użyciu spektrofotometru UV–VIS (Analytik Jena, SPECORD® PLUS, Jena, Niemcy). Otrzymane wyniki wyrażono w przeliczeniu na ekwiwalent kwasu taninowego (mg/g sm.). W tym celu zostały przygotowane roztwory kwasu taninowego o różnych stężeniach, celem wyznaczenia krzywej wzorcowej ($y = 0,0009x + 0,0016$; $R^2 = 0,9961$).

5.2.2.12. Identyfikacja alkaloidu chelerytryny

Wybrany alkaloid – chelerytryna (CHE, chelerythrine) analizowano za pomocą techniki HPTLC, stosując procedurę opisaną w podrozdziale 5.2.2.9. Wyniki CHE wyrażono w μg na 1 g s.m.

5.2.2.13. Analiza statystyczna

Przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i analizę głównych składowych (PCA) przy użyciu oprogramowania STATISTICA v13.30 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornia, USA). Przed przeprowadzeniem analizy ANOVA sprawdzono jednorodność wariancji (test Levene'a). Do oceny istotności różnic (najmniejszej istotnej różnicy) pomiędzy wartościami średnimi zastosowano test Tukeya przy $p = 0,05$.

6. Wyniki i ich omówienie

6.1. Publikacja P-1

Zawartość podstawowych składników odżywczych, w tym białka oraz jego skład aminokwasowy to główne cechy charakteryzujące wartość pokarmową paszy. Surowce pozyskiwane z rokitnika zwyczajnego są uważane za cenne źródło składników odżywczych i substancji biologicznie czynnych (Janceva i in., 2024). Unikatowy skład owoców oraz oleju z rokitnika zwyczajnego stał się podstawą licznych badań dotyczących ich wpływu na organizm ludzki i zwierzęcy, natomiast niewiele jest pozycji pokazujących wartość odżywczą liści, a tym bardziej w kontekście żywienia zwierząt.

Skład chemiczny roślin jest uzależniony od wielu czynników, w dużym stopniu zależy od odmiany, czynników pogodowych i agrotechnicznych oraz warunków zbioru, transportu i przechowywania. Z tych powodów w publikacji P-1 oceniono podstawowy skład chemiczny, zawartość aminokwasów, wartość odżywczą białka oraz frakcje włókna pokarmowego liści rokitnika zwyczajnego czterech odmian – Ascola, Habego, Hergo i Leikora, z 2014 – 2016.

W tabeli 1 przedstawiono podstawowy skład chemiczny badanego surowca, uwzględniając jako zmienną badane odmiany rokitnika zwyczajnego oraz rok zbioru.

Tabela 1. Podstawowy skład chemiczny badanego suszu liści rokitnika zwyczajnego

Czynnik		s.m. ¹	BS	TS	WS	PS	BNW
		g/100 g	g/100 g s.m.				
Rok	2014	95,14 b ²	20,77 c	6,87 c	10,47 a	5,76 c	56,14 a
	2015	95,35 c	15,66 a	5,35 b	10,50 a	4,06 a	64,43 c
	2016	92,98 a	18,34 b	5,00 a	11,90 b	5,21 b	59,55 b
Odmiana	Ascola	94,22 a	18,76 c	5,29 a	12,14 c	5,19 b	58,61 a
	Hergo	94,22 a	17,18 a	5,84 b	10,21 b	4,69 a	61,49 b
	Habego	94,65 b	19,08 c	5,97 b	11,88 c	5,09 b	57,97 a
	Leikora	94,86 c	18,00 b	5,84 b	9,59 a	5,07 b	61,49 b

¹ s.m. - sucha masa, BS - białko surowe, WS - włókno surowe, TS - tłuszcz surowy, PS - popiół surowy, BNW - bezazotowe związki wyciągowe; ² średnie oznaczone co najmniej jedną taką samą literę (a, b, c) nie różniły się statystycznie przy p=0,05 (dla wszystkich kolumn i czynników osobno).

Biorąc pod uwagę zawartość wody w powietrznie suchym materiale liści badanych odmian rokitnika zwyczajnego analiza statystyczna wykazała istotne różnice pod względem suchej masy. Niezależnie od odmiany, wilgotność powietrznie suchego surowca wynosiła średnio ok. 5,51 g. Zawartość podstawowych składników odżywczych

z poszczególnych lat zbioru różniła się statystycznie istotnie pod względem poziomu białka, tłuszczu, popiołu surowego oraz BNW. Potwierdziło to, że wartość pokarmowa liści rokitnika zwyczajnego jest istotnie modyfikowana przez warunki środowiskowe. W badaniach wykazano również statystycznie istotne różnice składników podstawowych w liściach w zależności od ocenianej odmiany. Liście rokitnika zwyczajnego cechowały się wysokim poziomem białka surowego, w przedziale g 17,8 – 19,2 g/100 s.m. w zależności od badanej odmiany (tab. 1). Badania Liang i in. (2018) wykazały zawartość białka surowego w zakresie od zaledwie 13,5 g/100 g s.m. łądyg do 17,5 g/100 g s.m. w liściach. Natomiast Jaroszewska i Biel (2017) stwierdziły wyższą wartość – 24,97 g białka surowego w 100 g s.m. liści rokitnika zwyczajnego.

Zawartość tłuszczu w znacznie większym stopniu niż białko, węglowodany ogółem czy włókno surowe decyduje o energii zawartej w materiale paszowym. Powszechnie wiadomo, że owoce rokitnika zawierają duże ilości tłuszczu. Wykazano, że w przeliczeniu na 100 g s.m. nawet 44 g tłuszczu surowego (Jaroszewska i in., 2018). Z owoców rokitnika pozyskuje się olej. Jest to olej bogaty w nienasycone kwasy tłuszczowe o korzystnym stosunku kwasów n-6 do n-3 (max. 1,33:1) (Dulf, 2012; Teleszko i in., 2015; Yang i Kallio, 2002; Máté i in., 2022). Natomiast surowiec będący przedmiotem badań, czyli liście zawierały do 6,87 g tłuszczu surowego w 100 g s.m. Istotnie najmniej tłuszczu zawierały liście rokitnika odmiany Ascola w porównaniu do pozostałych odmian (odpowiednio 5,29% i 5,84–5,97% s.m.). Uzyskane wyniki były zgodne z wcześniejszymi badaniami Jaroszewskiej i Biel (2017), które stwierdziły zawartość tłuszczu surowego na poziomie 5,31 – 5,67% s.m. liści. Otrzymane wyniki w publikacji P-1 stanowią podstawę do dalszych badań dotyczących jakości tłuszczu liści rokitnika zwyczajnego celem określenia ich dokładnego profilu kwasów tłuszczowych (w przygotowaniu).

Węglowodany proste (monosacharydy) są głównym źródłem energii dla zwierząt. Natomiast złożone, w tym włókno pokarmowe to bardzo zróżnicowana grupa substancji, które nie są hydrolizowane przez enzymy w jelicie cienkim zwierząt monogastrycznych. Pod określeniem włókno pokarmowe kryje się bardzo rozbudowany kompleks substancji, które z punktu widzenia budowy chemicznej należą do węglowodanów. Występowanie licznych frakcji włókna pokarmowego i związane z tym ich różny charakter oddziaływania na organizm powoduje znaczące utrudnienie w interpretacji jego pozytywnego czy też negatywnego wpływu (Jeukendrup i in., 1996; Scanes i in., 2022). BNW składające się z cukrów prostych (mono- i disacharydów), strawnej skrobi i produktów jej hydrolizy,

dekstryn i kwasów organicznych stanowiły dominującą część suchej masy liści rokitnika (średnio 60% s.m.). Włókno surowe jest frakcją ścian komórkowych pasz zbudowaną z celulozy inkrustowanej ligniną i hemiceluloz. Badane liście rokitnika zwyczajnego charakteryzowały się zawartością tej frakcji węglowodanowej w zakresie od 9,59% s.m. (odm. Leikora) do 12,14% s.m. (odm. Ascola). Materiał roślinny zebrany w pierwszym roku eksperymentu cechował się istotnie najniższą zawartością włókna surowego (10,47% s.m.), jednocześnie największą białka surowego (20,77% s.m.). Sheikh i in. (2011) stwierdzili aż 15% s.m. włókna surowego w liściach rokitnika zwyczajnego.

Obecnie coraz większą uwagę zwraca się na włókno pokarmowe (błonnik). Jedną z głównych funkcji włókna pokarmowego jest modulacja procesów trawiennych, stanowi ono również główny substrat dla fermentacji mikrobiologicznej. Zarówno włókno surowe oraz włókno pokarmowe to węglowodanowe składniki pokarmu, które warunkują jego właściwości dietetyczne. Natomiast w żywieniu zwierząt monogastrycznych funkcjonował głęboko zakorzeniony pogląd o konieczności ograniczania udziału włókna pokarmowego (głównie frakcji włókna surowego) w mieszankach paszowych, ze względu na obniżone możliwości jego trawienia, a także negatywny wpływ na strawność pozostałych substancji odżywczych (Ngalavu i in., 2020; Djordjević i in., 2022). Coraz częściej zwraca się uwagę, że jest to składnik odżywczy mający pozytywny wpływ na funkcjonowanie przewodu pokarmowego zwierząt. Stwierdzono również korzystne działanie włókna pokarmowego przy zwalczaniu biegunek i zaparć czy w leczeniu zespołu jelita drażliwego. Wykazano również jego działanie przeciwzapalne i antynowotworowe na układ pokarmowy (Kumar i in., 2020; Ávila i in., 2021). Z tego też powodu włókno pokarmowe traktowane może być jako składnik pożądaný w diecie albo jako składnik antyodżywczy (Deehan i in., 2024; Kayser i in. 2024; Mohanto i Aye, 2024), o czym decydują udział włókna pokarmowego w dawce oraz jego frakcje. W wyniku stosowania różnych definicji i metod oznaczania w badaniach nad włóknem pokarmowym kluczowe jest określenie nie tylko całkowitego poziomu tego składnika, ale również jego frakcji. Dlatego w badaniu określono udział włókna neutralno–detergentowego (NDF) oraz pozostałe frakcje włókna pokarmowego (tab. 2), które oznaczono i oszacowano metodą detergentową (Van Soest i in., 1991).

Tabela 2. Frakcje włókna pokarmowego (g/100 g s.m.) w badanym suszu liści rokitnika
zwyčajnego

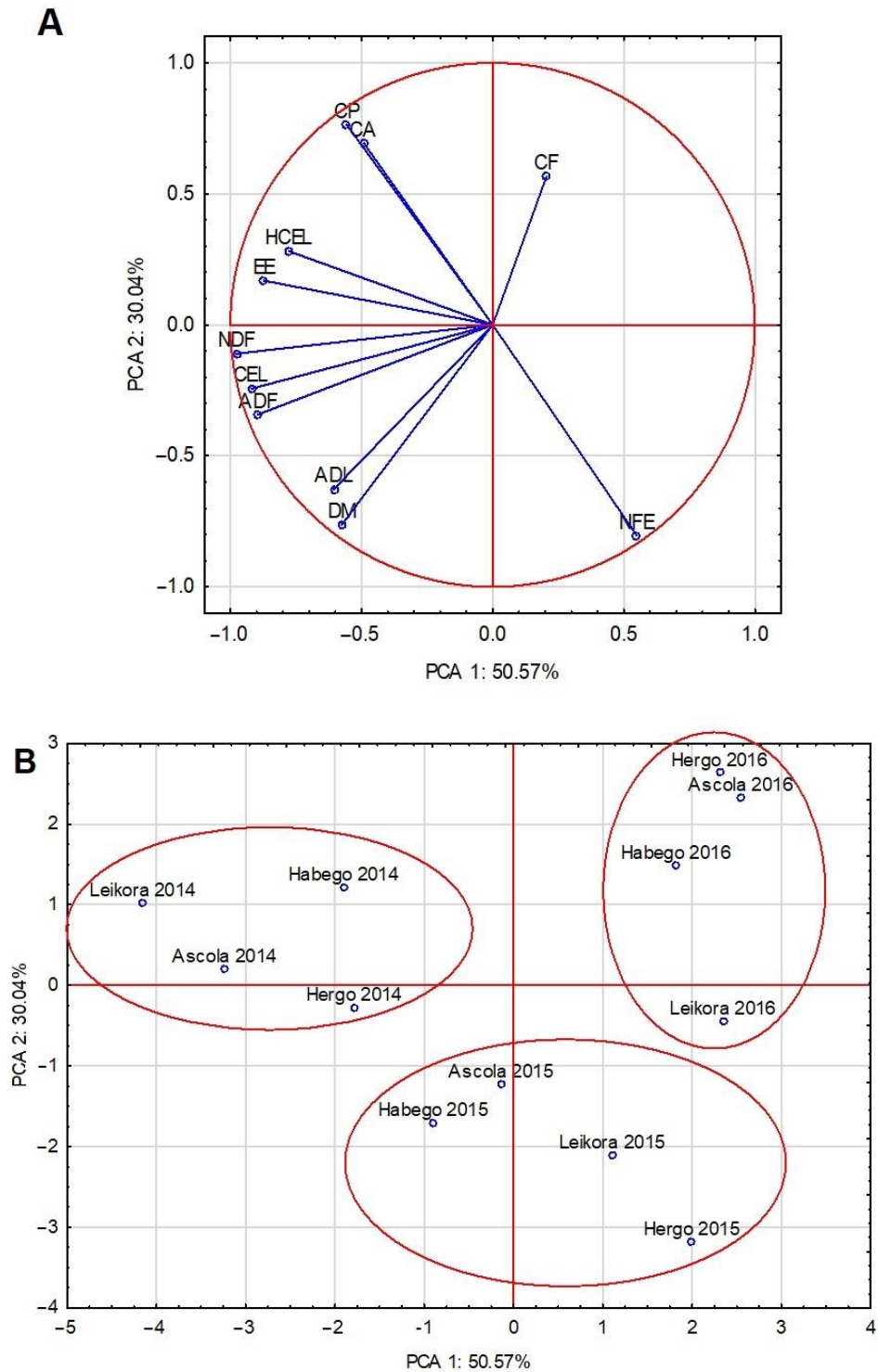
Czynnik		NDF ¹	ADF	ADL	HCEL	CEL
Rok	2014	31,61 c ²	20,81 c	6,18 b	10,80 b	14,64 c
	2015	25,61 b	18,63 b	6,55 c	6,99 a	12,08 b
	2016	21,06 a	13,79 a	5,09 a	7,28 a	8,70 a
Odmiana	Ascola	27,37 c	18,90 b	6,02 a	8,47 a	12,88 b
	Hergo	24,38 a	15,92 a	5,75 a	8,47 a	10,17 a
	Habego	25,97 b	18,47 b	6,08 a	7,50 a	12,38 b
	Leikora	26,67 b, c	17,68 b	5,90 a	8,98 a	11,78 b

¹ NDF - włókno neutralno-detergentowe (neutral detergent fiber), ADF - włókno kwaśno-detergentowe (acid detergent fiber), ADL - ligninia kwaśno-detergentowa (acid detergent lignin), HCEL - hemiceluloza (hemicellulose), CEL - celuloza (cellulose); ² średnie oznaczone co najmniej jedną taką samą literę (a, b, c) nie różniły się statystycznie przy p=0,05 (dla wszystkich kolumn i czynników osobno).

Włókno NDF obejmuje sumę hemicelulozy, celulozy i ligniny, a w skład frakcji ADF wchodzi lignina oraz celuloza. Liście rokitnika odmiany Ascola charakteryzowały się istotnie najwyższym poziomem frakcji NDF. Generalnie badane liście rokitnika zwyčajnego charakteryzowały się niskimi poziomami frakcji ADL i HCEL. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu potwierdziły wcześniejsze badania o udziale poszczególnych frakcji włókna pokarmowego w liściach rokitnika zwyčajnego (Sheikh i in., 2011; Roomi i in., 2015; Jaroszewska i Biel, 2017).

Włókno pokarmowe jest ważnym elementem diety człowieka. Frakcje wchodzące w skład włókna pokarmowego wykazują właściwości lecznicze znajdujące zastosowanie w ograniczaniu otyłości, cukrzycy, a nawet w stwardnieniu rozsianym (Hatami i in., 2024). Otyłość jest światową epidemią stanowiącą poważne wyzwanie dla zdrowia publicznego, zwiększającą obciążenie ekonomiczne systemów opieki zdrowotnej, a także jest piątą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie z powodu chorób układu krążenia i nowotworów (Azmi i in., 2021). Badania wykazały, że liście rokitnika zwyčajnego mogą łagodzić szkodliwe skutki otyłości indukowanej dietą (DIO, diet-induced obesity) i jej powikłania metaboliczne, takie jak dyslipidemia, stan zapalny, stłuszczenie wątroby czy insulinooporność (Kwon i in., 2017). Już wcześniej Pichiah i in. (2012) przeprowadzając badania na myszach zasugerowali, że liście rokitnika zwyčajnego mogą być pomocne w leczeniu otyłości, ale należy przeprowadzić odpowiednie badania na ludziach.

Przeprowadzona analiza PCA (ryc. 1) potwierdziła zróżnicowanie składu chemicznego liści badanych odmian rokitnika pochodzących z różnych okresów wegetacyjnych.



Rycina 1. Współrzędne czynnikowe zmiennych (A) i przypadków (B) dla podstawowych składników chemicznych i frakcji włókna pokarmowego liści rokitnika zwyczajnego w układzie współrzędnych pierwszej pary składowych

Wyjaśnienia: DM - sucha masa (dry matter), CP - białko surowe (crude protein), CF - włókno surowe (crude fiber), EE - tłuszcz surowy (jako ether extract), CA - popiół surowy (crude ash), NFE - związki bezazotowe wyciągowe (nitrogen free extract), NDF - włókno neutralno-detergentowe (neutral detergent fiber), ADF - włókno kwaśno-detergentowe (acid detergent fiber), ADL - ligninia kwaśno-detergentowa (acid detergent lignin), HCEL - hemiceluloza (hemicellulose), CEL - celuloza (cellulose).

Wydaje się, że dominujący wpływ na skład chemiczny liści rokitnika miały warunki klimatyczne, co potwierdza propozycja grupowania zaprezentowana na rycinie 1 A i B. Taka konstatacja osłabia potrzebę wnikliwej analizy składu chemicznego liści odmian rokitnika. Pewnym zaburzeniem tej tezy jest lokalizacja przypadku „Leikora 2016” w sąsiedztwie przypadków z roku 2015. Surowiec z roku 2015 był zasobniejszy w NFE i ADL. Natomiast surowiec z roku 2014, szczególnie odmian Leikora i Ascola, cechował się wyższym poziomem tłuszczu surowego, HCEL i NDF oraz dużą, dodatnią korelacją pomiędzy tłuszczem surowym i HCEL. Natomiast odmiany Hergo, Ascola i Habego w roku 2016 zawierały znacząco więcej włókna surowego.

Najważniejszym czynnikiem determinującym wartość odżywczą białka jest jego skład aminokwasowy, który zależy również od wielu czynników, w tym od gatunku rośliny, miejsca uprawy i pozyskania. W piśmiennictwie jest deficyt informacji dotyczących informacji o składzie aminokwasowym i jakości białka surowca jakim są liście rokitnika zwyczajnego. Dlatego kolejnym etapem poznania wartości pokarmowej badanego surowca było określenie składu aminokwasowego by następnie ocenić również jakość białka w oparciu o metody chemiczne. W tabelach 3 i 4 przedstawiono odpowiednio profil aminokwasów egzogennych i endogennych (g/16 g N) w badanym surowcu uwzględniając badane odmiany oraz rok zbioru.

Istnieje około 300 aminokwasów, składników białkowych, będących najważniejszymi w pożywieniu, ze względu na fakt, iż budują białka organizmu, jest jedynie dwadzieścia. Spośród 20 aminokwasów białkowych zawartych w pokarmie, zarówno człowiek jak i zwierzęta potrafią syntetyzować tylko część z nich (NEAAs, non-essential amino acid). Pozostałe aminokwasy należy dostarczyć z pożywieniem (EAAs, essential amino acids). Jest też grupa aminokwasów względnie egzogennych (SEAAs, semi-essential amino acids), czyli takie, które mogą być syntetyzowane w organizmie, ale tylko po dostarczeniu z zewnątrz innych aminokwasów. Do tej grupy zaliczana jest tyrozyna i cysteina. Organizm wytwarza je sam, jedynie, gdy dostępne są odpowiednie ilości aminokwasów będących ich prekursorami (Hou i in., 2015; Lopez i Mohiuddin, 2024). Tyrozyna syntetyzowana jest pod warunkiem, iż dostarczona z pożywieniem zostanie fenyloalanina – aminokwas egzogenny. Podobnie jest z cysteiną, która syntetyzowana jest z metioniny.

Są to dwa istotne aminokwasy. Dla przykładu, jak pokazano, tyrozyna jest ważnym elementem budulcowym hormonów, a także substancji biologicznie czynnych (m.in. adrenalina, dopamina, tyroksyna, trójiodotyronina, noradrenalina) (Dratman i Martin,

2020). Jak wykazano, dodatek fenyloalaniny i tyrozyny wpływa pozytywnie na dobrostan zwierząt zmniejszając ich stres, szczególnie w momentach stresogennych oraz w sytuacjach narażenia na niebezpieczeństwo (Salamanca i in., 2020). Zawartość niezbędnych aminokwasów w białku liści rokitnika zwyczajnego była stosunkowo wysoka (tab. 3).

Tabela 3. Zawartość aminokwasów egzogennych (g/16 g N) w badanym suszu liści rokitnika zwyczajnego

Czynnik	Lys ²	Aminokwasy siarkowe		Thr	Ile	Trp	Val	Leu	His	Aminokwasy aromatyczne		
		Met	Cys							Phe	Tyr	
Rok	2014	5,24 b ³	7,93 a	1,22 b	4,49 b	3,62 b	0,27 a	4,37 b	7,19 c	2,02 c	4,18 b	3,00 a
	2015	3,90 a	7,62 a	0,92 a	3,07 a	2,83 a	0,42 c	3,66 a	4,81 a	1,17 a	3,34 a	2,78 a
	2016	4,88 b	8,07 a	1,23 b	3,97 b	3,14 a b	0,37 b	4,15 a b	6,18 b	1,93 a b	3,86 b	2,93 a
Odm. ¹	Ascola	4,70 a	7,86 a	1,19 a b	3,93 a	3,45 a	0,31 a	4,22 a	6,18 a	2,09 a	3,91 a	3,30 b
	Hergo	4,51 a	7,69 a	0,91 a	3,73 a	2,81 a	0,45 b	3,99 a	5,91 a	1,82 a	3,76 a	2,25 a
	Habego	4,82 a	8,25 a	1,28 b	4,16 a	3,24 a	0,33 a	4,04 a	6,60 a	1,88 a	3,82 a	3,26 b
	Leikora	4,66 a	7,70 a	1,10 a b	3,55 a	3,28 a	0,31 a	3,99 a	5,55 a	1,82 a	3,68 a	2,80 a,b

¹ Odm. - odmiana (cv., cultivar); ² Lys - lizyna (lysine), Met - metionina (methionine), Cys - cysteina (cysteine), Thr - treonina (threonine), Ile - izoleucyna (isoleucine), Trp - tryptofan (tryptophan), Val - walina (valine), Leu - leucyna (leucine), His - histydyna (histidine), Phe - fenyloalanina (phenylalanine), Tyr - tyrozyna (tyrosine); ³ średnie oznaczone co najmniej jedną taką samą literę (a, b, c) nie różniły się statystycznie przy p=0,05 (dla wszystkich kolumn i czynników osobno).

W większości przypadków nie wykazano istotniej różnicy pomiędzy badanymi odmianami w poziomach zarówno aminokwasów egzogennych (tab. 3), jak i endogennych (tab. 4).

Tabela 4. Zawartość aminokwasów endogennych (g/16 g N) w badanym suszu liści rokitnika zwyczajnego

Czynnik		Asp ¹	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Arg
Rok	2014	10,55 c ²	4,12 c	8,87 a	4,79 c	5,31 c	2,87 a	4,26 a
	2015	6,19 a	2,88 a	8,88 a	3,22 a	3,52 a	2,91 a	4,65 a
	2016	8,39 b	3,50 b	9,00 a	4,00 b	4,43 b	2,93 a	4,45 a
Odmiana	Ascola	8,35 a	3,37 a b	9,30 a	3,51 a	4,41 a b	2,79 a	4,37 a
	Hergo	8,07 a	3,73 b c	8,63 a	4,34 b	4,42 a b	3,02 a	5,01 a
	Habego	9,02 b	4,01 c	8,46 a	4,03 a b	4,78 b	3,07 a	4,31 a
	Leikora	8,08 a	2,89 a	9,29 a	4,14 a b	4,06 a	2,73 a	4,13 a

¹ Asp – kwas asparaginowy (aspartic acid), Ser – seryna (serine), Glu – kwas glutaminowy (glutamic acid), Pro – prolina (proline), Gly – glicyna (glycine), Ala – alanine (alanine), Arg – arginina (arginine);

² średnie oznaczone co najmniej jedną taką samą literę (a, b, c) nie różniły się statystycznie przy p=0,05 (dla wszystkich kolumn i czynników osobno)

Standardową metodą oceny jakości białka pozostaje nadal klasyczna – chemiczna metoda oparta na zawartości aminokwasów niezbędnych dla danego gatunku. W tabeli 5 przedstawiono współczynniki określające wartość odżywczą białka liści rokitnika zwyczajnego, uwzględniając jako zmienną badane odmiany oraz rok zbioru. Średnia zawartość aminokwasów egzogennych w białku liści rokitnika zwyczajnego w przeprowadzonych analizach wynosiła 37,88 g/16 g N uwzględniając wzorzec dla dorosłego człowieka (MH) i 44,23 g/16 g N w odniesieniu do wzorca dla zwierząt (WE).

Tabela 5. Wartość odżywcza białka badanego suszu liści rokitnika zwyczajnego

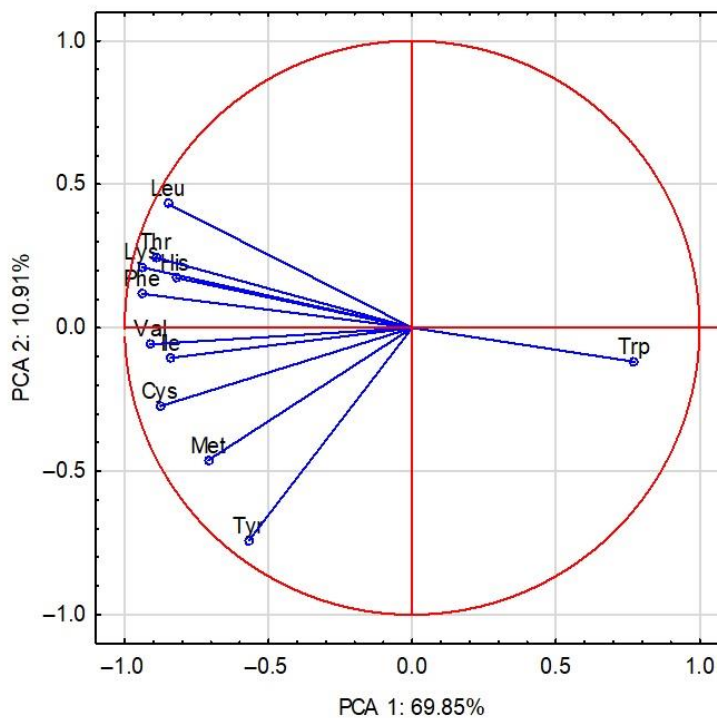
Czynnik		EAAAs ¹ MH ⁴	EAAAs WE ⁵	CS ² MH	CS WE	EAAI ³ MH	EAAI WE
Rok	2014	41,51 b ⁶	43,52 b	26,87 a	15,81 a	80,67 b	66,96 b
	2015	33,35 a	35,11 a	42,02 c	24,72 c	72,45 a	57,94 a
	2016	38,77 b	40,70 b	34,43 b	20,82 b	80,11 b	64,75 b
Odmiana	Ascola	39,05 a	41,14 a	30,79 a	18,11 a	78,37 a	64,90 a
	Hergo	36,03 a	37,84 a	42,70 b	25,87 b	77,86 a	62,27 a
	Habego	39,80 a	41,68 a	33,17 a	19,51 a	78,85 a	64,71 a
	Leikora	36,63 a	38,45 a	31,12 a	18,30 a	75,91 a	60,99 a

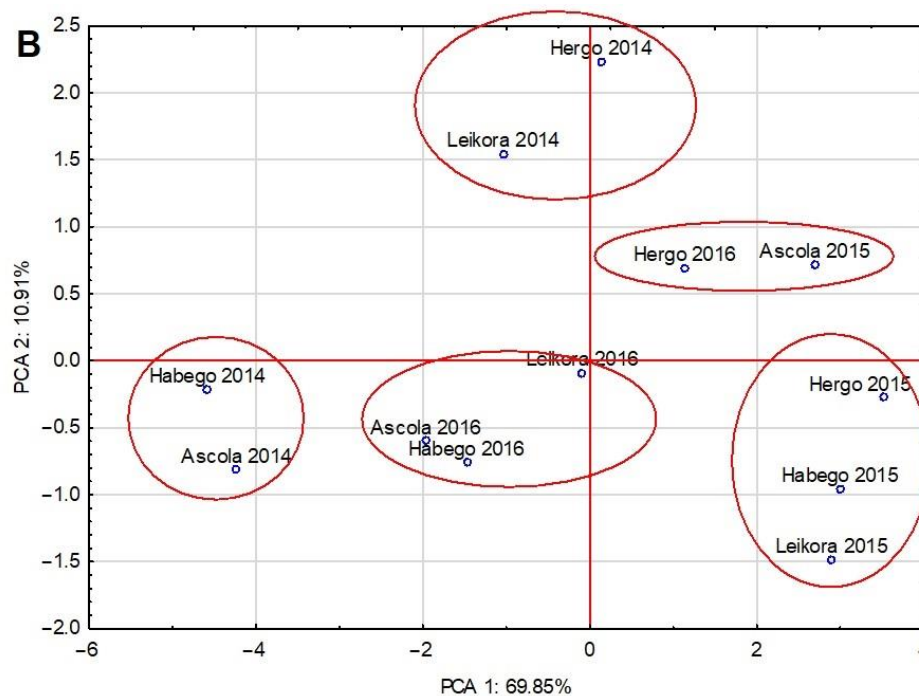
¹ EAAAs – aminokwasy egzogenne (essential amino acids); ² CS – wskaźnik aminokwasu ograniczającego (chemical score of restrictive amino acid(s)); ³ EAAI – wskaźnik aminokwasów egzogennych (essential amino acid index); ⁴ ME - wzorzec aminokwasów białka dla człowieka (mature human protein standards); ⁵ WE - wzorzec aminokwasów białka jaja kurzego (whole egg protein standards); ⁶ średnie oznaczone co najmniej jedną taką samą literę (a, b, c) nie różniły się statystycznie przy p=0,05 (dla wszystkich kolumn i czynników osobno).

Wysoka zawartość aminokwasów egzogennych znalazła odzwierciedlenie w oszacowanym wskaźniku aminokwasów niezbędnych (EAAI, essential amino acid index), który wahał się od 72,45 do 80,67% dla wzorca białkowego dorosłego człowieka (MH, mature human protein standards), a dla zwierząt zgodnie z wzorcem białka jaja kurzego w zakresie od 57,94 do 66,96% (WE, whole egg protein standards). Pierwszym aminokwasem ograniczającym wartość odżywcza białka (CS, chemical score) zarówno wobec MH (CS_{MH}), jak i WE (CS_{WE}) okazał się tryptofan.

Przeprowadzona analiza PCA (ryc. 2) w oparciu o skład aminokwasowy surowca nie pozwala już tak jednoznacznie jak poprzednia analiza PCA (dla składu podstawowego), pogrupować przypadki głównie w oparciu o okres wegetacyjny. Szczególnie jest to widoczne w układzie przypadków (poszczególnych odmian) z roku 2014. Wyraźnie korzystniejszym składem aminokwasowym cechował się surowiec pozyskany z odmian Habego i Ascola (rycina 2 A, B). Liście tych odmian cechowały się większą zawartością waliny, izoleucyny, cystyny, metioniny i tyrozyny w przeciwieństwie do liści odmian Hergo i Leikora. Inną obserwacją płynącą z tej analizy jest większa zawartość tryptofanu w liściach pochodzących z 2015 roku oraz wyraźnie ujemna korelacja tego aminokwasu z treoniną, lizyną, histydyną i fenyloalaniną.

A





Rycina 2. Współrzędne czynnikowe zmiennych (A) i przypadków (B) dla aminokwasów egzogennych liści rokitnika zwyczajnego w układzie współrzędnych pierwszej pary składowych

Wyjaśnienia: Lys - lizyna (lysine), Met - metionina (methionine), Cys - cysteina (cysteine), Thr - treonina (threonine), Ile - izoleucyna (isoleucine), Trp - tryptofan (tryptophan), Val - walina (valine), Leu - leucyna (leucine), His - histydylna (histidine), Phe - fenylalanina (phenylalanine), Tyr - tyrozyna (tyrosine).

Dwuczynnikowa analiza wariancji, która została wykonana, a jej wyniki zamieszczono w tabelach, pozwala na indywidualną ocenę dwóch źródeł zmienności tj. roku i genotypu. W tabelach przedstawiono średnie dla lat i odrębnie średnie dla badanych odmian. Zatem średnie dla poszczególnych lat są średnią ze wszystkich odmian, a średnie dla poszczególnych odmian są średnią z lat badań. W opracowaniu nie przedstawiono interakcji lata \times odmiana bowiem to źródło zmienności nie było statystycznie istotne, co oznacza, że w opracowaniu nie przedstawiono plonowania poszczególnych odmian w poszczególnych latach badań. Doskonalszym obrazem w/w interakcji jest wykonana i przedstawiona analiza składowych głównych (PCA). To w oparciu o jej wyniki można opisać zmienność składu chemicznego odmian w latach, co uczyniono.

Wykonane analizy (wariancji i PCA) potwierdziły zróżnicowanie składu chemicznego liści rokitnika zwyczajnego. Analizowane źródła zmienności (rok, genotyp) wpłynęły zarówno na skład podstawowy, jak i aminokwasowy. Dyskusowanie o zmienności składu chemicznego liści rokitnika zwyczajnego badanych genotypów jest ze względu na ubogość źródeł ograniczona, a wręcz niemożliwa. Natomiast szczegółowa

analiza wpływu okresu wegetacji na skład chemiczny surowca wymaga szczegółowego scharakteryzowania warunków siedliskowych, czego nie uczyniono ze względu na określone wymogi wydawnicze dla P-1.

6.2. Publikacja P-2

Organizm zarówno ludzki, jak i zwierzęcy posiada specyficzne mechanizmy enzymatyczne i nieenzymatyczne działające w celu ochrony przeciwrodnikowej i utrzymania równowagi redoks w komórkach organizmu. Pod wpływem pewnych czynników, zarówno egzo-, jak i endogennych, w przypadku niedostatecznej zdolności organizmu do eliminacji reaktywnych form tlenu (RFT), bilans ten zostaje zaburzony i dochodzi do tzw. zjawiska stresu oksydacyjnego (Pamplona i Costantini, 2011; Valko i in., 2016). Stres oksydacyjny pojawia się gdy wytwarzanie RFT przełamuje mechanizmy obrony antyoksydacyjnej organizmu zwierzęcia. Może ono prowadzić do uszkodzeń struktur komórkowych, a w konsekwencji do różnych stanów chorobowych. Stan taki może występować w okresach krytycznych życia zwierząt (m.in. narodziny, wylęg, odsadzenie czy laktacja) (Durand i in., 2022; Tian i in., 2023). Mechanizmy endogenne nie zawsze wystarczają. W takiej sytuacji do organizmu muszą być dostarczone substancje egzogenne, których głównym zadaniem jest przechwycenie i/lub ustabilizowanie aktywnej cząsteczki, zanim ta dokona zniszczeń (przeciwutleniacze interwencyjne). Wskazuje to na konieczność współdziałania antyoksydantów różnego pochodzenia i o różnych mechanizmach działania (Prior, 2015). W celu ochrony przed wspomnianymi procesami wykorzystywane są związki zaliczane do grupy przeciwutleniaczy rozpuszczalnych w wodzie i tłuszczach. Związki fenolowe to bardzo duża grupa naturalnych związków chemicznych będących wtórnymi metabolitami roślin, występujących powszechnie w świecie roślin, a także zwierząt. Zaliczane są one do grupy antyoksydantów, ponieważ zapobiegają i/lub eliminują powstawanie wolnych rodników. Efekt zdrowotny przeciwutleniaczy polega na neutralizacji wolnych rodników w organizmie (Losada-Barreiro i in., 2017).

Ocenę potencjału przeciwutleniającego żywności prowadzi się przy pomocy testów w różnych układach i wykorzystujących odmienne mechanizmy reakcji (Roginsky i Lissi, 2005; Karadag i in., 2009). W publikacji P-2 zastosowano testy polegające na hamowaniu wolnych stabilnych rodników: DPPH^{•+} i ABTS^{•+}. Zastosowanie do oceny potencjału antyoksydacyjnego rodnika DPPH^{•+} pozwala na ocenę jedynie przeciwutleniaczy hydrofobowych, w przeciwieństwie do rodnika ABTS^{•+}, który reaguje zarówno z przeciwutleniaczami hydrofobowymi, jak i hydrofilowymi. W pracy zastosowano również jedną z niestandardowych metod oceny potencjału przeciwutleniającego – metodę fotochemiluminescencji (PCL, photochemiluminescence). Fotochemiluminescencja została

wykorzystana po raz pierwszy do oceny potencjału przeciwutleniającego przez Popova i in. (1987). Metoda ta cechuje się wysoką czułością, może więc być wykorzystywana do oznaczeń właściwości antyoksydacyjnych zarówno produktów bogatych, jak i mniej zasobnych w składniki wykazujące działanie przeciwutleniające. Metoda ta jest wykorzystywana do zbadania aktywności antyoksydacyjnej zarówno frakcji hydrofilowej (ACW, water-soluble antioxidant capacity) jak i lipofilowej (ACL, lipid-soluble antioxidant capacity) w materiale roślinnym.

W tabeli 6 przedstawiono zawartość polifenoli ogółem (TP, total polyphenol) oraz wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem trzech metod stosowanych do pomiaru właściwości antyoksydacyjnej liści rokitnika zwyczajnego. Liście pochodzące z kolejnych lat badań charakteryzowały statystycznie zróżnicowaną zawartością polifenoli ogółem (od 186,64 do 330,16 mg GAE/1g s.m.), co potwierdza możliwość znacznego modyfikowania jakości surowca (liści) poprzez warunki siedliskowe.

Tabela 6. Zawartość polifenoli ogółem oraz aktywność antyoksydacyjna (w 1 g s.m.) badanego suszu liści rokitnika zwyczajnego

Czynnik	Polifenole ogółem (mg GAE ¹)	TEAC ² ABTS ⁺⁺ (μ M TRX ³)	TEAC DPPH ⁺⁺ (μ M TRX)	PCL (μ M TRX)
Rok				
<i>p</i> ⁴	=0,029	=0,071	<0,000	=0,905
2014	186,64 a ⁵	491,86 a	340,57 b	348,49 a
2015	197,43 ab	493,36 a	350,04 b	313,23 a
2016	330,16 b	494,61 a	299,53 a	310,98 a
Odmiana				
<i>p</i>	=0,239	=0,036	=0,095	=0,148
Ascola	307,02 a	490,47 a	323,49 a	290,76 a
Habego	216,26 a	492,82 ab	329,53 a	245,20 a
Hergo	195,80 a	493,32 b	332,94 a	254,41 a
Leikora	233,25 a	492,50 ab	334,23 a	506,57 a

¹ GAE – ekwiwalent kwasu galusowego (gallic acid equivalent); ² TEAC - potencjał przeciwutleniający (trolox equivalent antioxidant capacity); ³ TRX - trolox; ⁴ *p* - prawdopodobieństwo odrzucenia hipotezy zerowej (H0; $m_1 = m_2 \dots = m_n$); ⁵ średnie oznaczone co najmniej jedną taką samą literę (a, b, c) nie różniły się statystycznie przy $p=0,05$ (dla wszystkich kolumn i czynników osobno).

Zauważa się również tendencję ($p=0,239$) sugerującą zróżnicowanie zawartości TP w liściach badanych odmian rokitnika. Zawartość TP w liściach odmiany Ascola wynosiła 307,02 mg GAE/1g s.m., a w liściach odmiany Hergo tylko 195,80 mg GAE/1g s.m. W badaniu Cho i in. (2014) zawartość polifenoli ogółem w herbacie z liści rokitnika zwyczajnego i ekstraktach z zielonej herbaty wahała się odpowiednio od 23 do 66 i od 33

do 118 mg GAE/1 g s.m. Upadhyay i in. (2010) uznali 70% etanol za optymalny rozpuszczalnik do ekstrakcji związków fenolowych z liści rokitnika zwyczajnego. Zaobserwowano zmienność zawartości związków fenolowych w zależności od wielu czynników, takich jak rodzaj lokalizacji, rok zbioru i odmiany (Criste i in., 2020; Sytařová i in., 2020). To duże zróżnicowanie związków odpowiedzialnych za właściwości antyoksydacyjne odnalazło swoje potwierdzenie w zróżnicowanych wynikach testów przeciwutleniających w prezentowanych badaniach (tab. 6).

Ekstrakty z liści rokitnika wykazały silne działanie przeciwutleniające w testach DPPH i ABTS (Tabela 6 i 7). Materiał badawczy redukował znacząco zarówno rodnik DPPH^{•+}, jak i ABTS^{•+} w badanych próbach (RSA, od 56,33 do 98,25%). Aktywność przeciwutleniająca liści rokitnika mierzona za pomocą rodnika ABTS^{•+} zależała od odmiany. Ekstrakty z liści różnych odmian wykazały aktywność antyoksydacyjną w zakresie od 490,47 do 493,32 $\mu\text{M TRX}/1 \text{ g s.m.}$ i były to statystycznie zróżnicowane zawartości stwierdzone w liściach odmian Ascola i Hego. Ze względu na lipofilową naturę rodnika DPPH^{•+}, zaobserwowano niewielką różnicę w aktywności antyoksydacyjnej badanych odmian mierzonej metodą DPPH w porównaniu z testem ABTS. Stosunkowo prosty sposób wykonania oznaczeń w metodzie ABTS sprawia, że jest to analiza rutynowo używana do oznaczania zdolności antyoksydacyjnych próbek przeciwutleniaczy zarówno hydrofobowych, jak i hydrofilowych. Pamiętać jednak należy, że rodnik ten cechuje się dużo większą trwałością niż obecne w surowcu rodniki, co może budzić zastrzeżenia czy taka metoda dobrze opisuje rzeczywiste reakcje z wolnymi rodnikami. Natomiast ograniczeniem metody DPPH jest fakt, że DPPH^{•+} rozpuszcza się jedynie w rozpuszczalnikach organicznych i nie pozwala na oznaczenia antyoksydantów hydrofilowych (Arnao, 2000).

Na właściwości przeciwutleniające może mieć wpływ wiele czynników poza gatunkiem rośliny, m. in. świeżość badanego surowca roślinnego. Właściwości utleniające surowców mogą też ulec zmianie zależnie od sposobu i czasu ich przechowywania. Alabri i in. (2014) sugerują, że podczas przechowywania surowców roślinnych niektóre związki mogą się ulotnić lub ulec rozkładowi, natomiast uzyskany efekt jest uzależniony od wielu czynników, tj. rodzaju surowca czy metody przetwarzania prób.

Tabela 7. Aktywność antyoksydacyjna wyrażona jako RSA (%)

Czynnik	RSA ¹ _{ABTS} (%)	RSA _{DPPH} (%)
Rok		
p^2	=0,074	=0,009
2014	97,27a ³	60,50a
2015	98,25a	56,33a
2016	97,16a	73,41b
Odmiana		
p	=0,176	=0,074
Ascola	97,52a	66,19a
Habego	96,89a	61,87a
Hergo	97,70a	63,51a
Leikora	98,13a	62,08a

¹RSA – aktywność przeciwutleniająca (radical scavenging activity); ² p - prawdopodobieństwo odrzucenia hipotezy zerowej ($H_0: m_1 = m_2 \dots = m_n$); ³ średnie oznaczone co najmniej jedną taką samą literę (a, b, c) nie różniły się statystycznie przy $p=0,05$ (dla obu kolumn i czynników osobno).

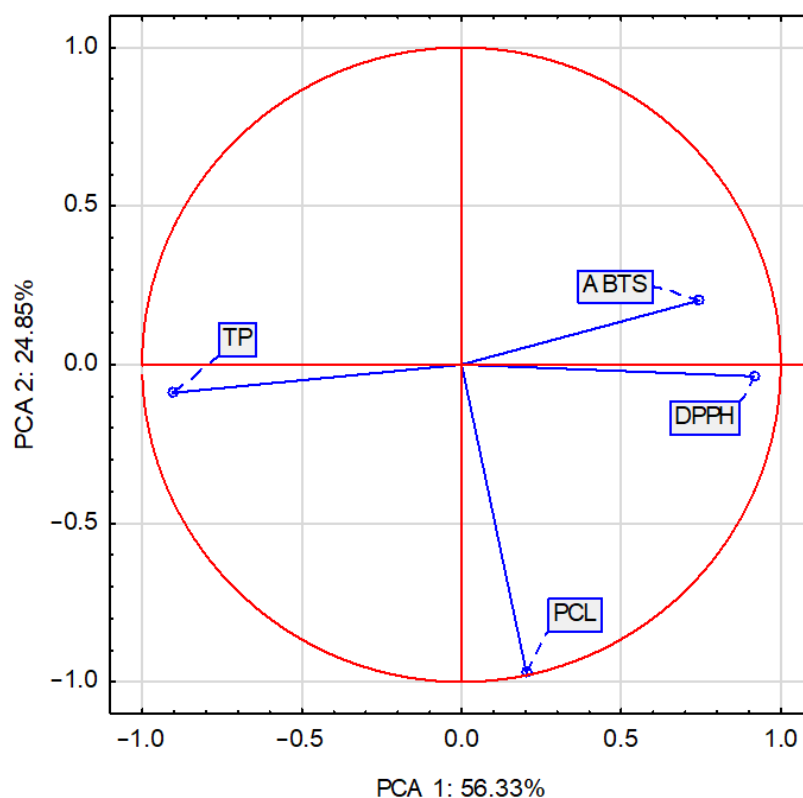
W niniejszych badaniach dokonano również oceny potencjału przeciwutleniającego liści rokitnika metodą PCL_ACW. Metoda ta nie potwierdziła zróżnicowania potencjału antyoksydacyjnego surowca pochodzącego z różnych sezonów wegetacyjnych, ale poprzez wykazaną tendencję statystyczną ($p=0,148$) wyraźnie wskazuje odmianę Leikora jako cechującą się znacząco większą aktywnością antyutleniającą ($506,57 \mu\text{mol Trolox/g s.m.}$). Pomimo braku zróżnicowania aktywności antyoksydacyjnej (AA, antioxidant activity) materiału badawczego określonej metodą PCL interesującym jest fakt, niestety nie potwierdzony statystycznie, że AA liści odmian Habego i Leikora w kolejnych latach wzrastała, a odmian Ascola i Hergo spadała.

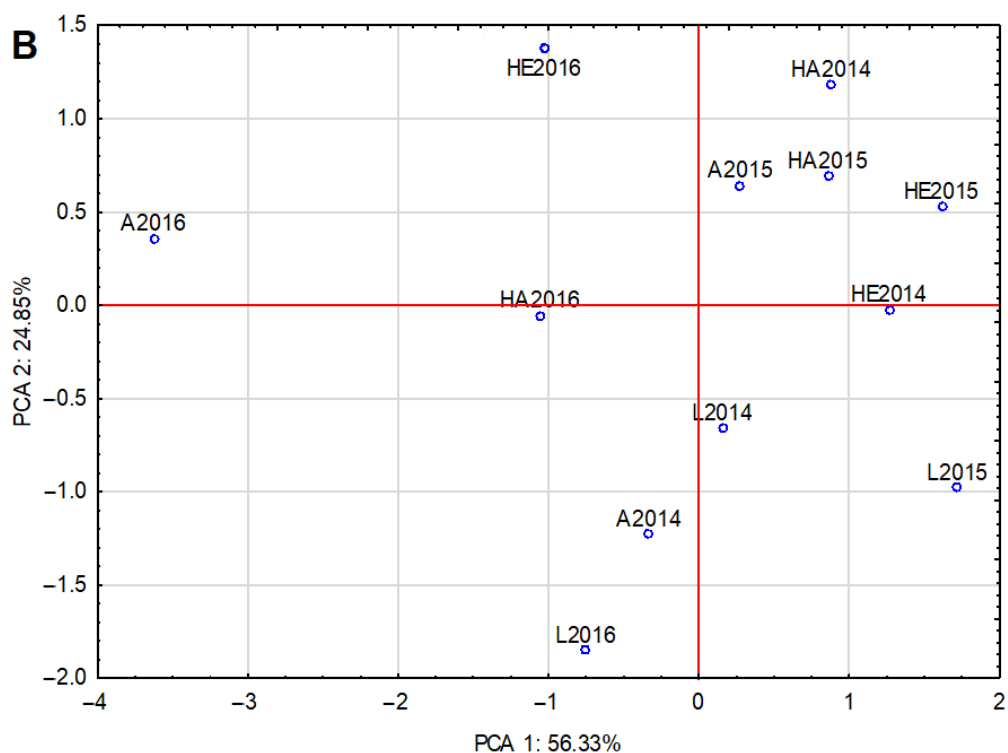
Zastosowane metody pomiaru AA liści rokitnika zwyczajnego nie dały jasnej odpowiedzi, co do zróżnicowania jakości surowca pochodzącego z różnych sezonów wegetacyjnych, ale raczej pozwalają na wskazanie odmiany Leikora, jako odmiany o większej AA liści. Uwzględniając związek między rozwojem chorób cywilizacyjnych a stresem tlenowym, silne właściwości przeciwutleniające liści rokitnika zwyczajnego mogą wskazywać na potencjalne możliwości wykorzystania tego surowca nie tylko w profilaktyce, ale również w terapii licznych chorób (Ma i in., 2021).

Wykres współrzędnych czynnikowych dla zmiennych (Rycina 3A) prezentuje rozrzut zbioru ładunków czynnikowych na dwuwymiarowej płaszczyźnie rozpiętej na dwóch pierwszych składowych. Natomiast rycina 3B przedstawia rozrzut zbioru danych na płaszczyźnie przywołanych wyżej składowych. Przedstawione wykresy potwierdzają

szczególne zróżnicowanie w latach AA i zawartości polifenoli w liściach odmiany Ascola, bowiem ulokowanie tej odmiany na płaszczyźnie składowych obejmuje ćwiartki: I – rok 2015, III – rok 2014 i IV – rok 2016. Ponadto wykres potwierdza znaczne podobieństwo liści odmian Habego i Hergo oraz pewną odrębność liści odmiany Leikora, którą potwierdza również czuła i precyzyjna metoda PCL. Zaskakującym wynikiem analizy PCA jest natomiast ujemne skorelowanie AA (ABTS i DPPH) z TP oraz braku korelacji pomiędzy TP i AA (PCL). Wnioski te potwierdzają istotne statystycznie współczynniki korelacji (tab. 10 i 11). Efekt taki, może sugerować, że za AA liści rokitnika zwyczajnego nie tylko odpowiadają oznaczone flawonoidy czy też taniny, ale być może w większym stopniu pozostałe nieoznaczone frakcje jak np. kwasy fenolowe, karotenoidy, sterole (Żuchowski, 2023). Ponadto zmienność AA surowca roślinnego warunkowa na jest nie tylko przebiegiem sezonu wegetacyjnego, ale również wiekiem fizjologicznym surowca (Biel i in., 2017).

A





Rycina 3. Współrzędne czynnikowe zmiennych (A) i przypadków (B) polifenoli ogółem i testów aktywności antyoksydacyjnej w układzie współrzędnych pierwszej pary składowych

Wyjaśnienia: ABTS^{•+} - kwas 2,2'-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); DPPH^{•+} - 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl); PCL - fotochemiluminescencja (photochemiluminescence assay); TP – polifenole ogółem (total polyphenol); odmiany: A - Ascola; HA - Habego; HE - Hergo; L - Leikora.

Największą grupę polifenoli roślinnych stanowią flawonoidy. W obrębie tej grupy wyróżniono kilka podklas różniących się budową oraz wynikającą z niej aktywnością antyoksydacyjną. Zmierzone ilościowo związki fenolowe są ogólnie uważane za główne czynniki determinujące zdolność antyoksydacyjną roślin. Całkowita zawartość flawonoidów (TF, total flavonoid) w liściach rokitnika zwyczajnego została przedstawiona w tabeli 8. Średnia zawartość TF była wysoka i wyniosła 281,76 mg QEE/1 g s.m. Nie stwierdzono jednak istotnego wpływu sezonu wegetacyjnego, ani odmiany na zawartość TF w liściach rokitnika zwyczajnego. Całkowita zawartość flawonoidów wynosząca 36,58 mg QEE na 1 g ekstraktu została stwierdzona w liściach rokitnika zwyczajnego pochodzącego z Rumunii (Criste i in., 2020). Wartość ta jest stosunkowo niższa od wyników własnych, ale wartości w publikacji P-2 wyrażone są na 1 g s.m., a w przywołanym opracowaniu nie jest to jasno określone. Wang i in. (2022b) stwierdzili zawartość TF w zakresie od 24,57 do 34,83 mg rutyny na 1 g s.m. liści rokitnika zwyczajnego.

Tabela 8. Zawartość flawonoidów i tanin ogółem (w 1 g s.m.) w badanym suszu liści rokitnika zwyczajnego

Czynnik	Flawonoidy ogółem (mg QEE ¹)	Flawonole (mg QEE)	Antocyjany (mg)	Proantocyjanidyny (mg)	Taniny ogółem (mg TA ²)
Rok					
<i>p</i> ³	=0,931	=0,868	=0,004	=0,015	=0,029
2014	281,05 a ⁴	79,29 a	10,928 b	8,634 a	1,429 a
2015	281,66 a	80,71 a	6,932 a	7,860 a	1,445 ab
2016	282,58 a	80,70 a	6,375 a	18,517 b	1,516 b
Odmiana					
<i>p</i>	=0,833	=0,892	=0,430	=0,570	=0,128
Ascola	283,54 a	80,53 a	9,202 a	11,136 a	1,491 a
Habego	282,72 a	81,37 a	7,710 a	14,547 a	1,413 a
Hergo	279,51 a	79,18 a	7,794 a	10,426 a	1,471 a
Leikora	281,28 a	79,56 a	7,608 a	10,573 a	1,479 a

¹QEE- ekwiwalent kwercetyny (quercetin equivalent); ²TA – kwas taninowy (tannic acid);

³*p* - prawdopodobieństwo odrzucenia hipotezy zerowej (H0; $m_1 = m_2 \dots = m_n$); ⁴ średnie oznaczone co najmniej jedną taką samą literą (a, b, c) nie różniły się statystycznie przy $p=0,05$ (dla wszystkich kolumn i czynników osobno).

Flawonole są najlepiej zbadaną grupą flawonoidów. Na zawartość tych związków w liściach rokitnika zwyczajnego nie wpłynęły badane czynniki, ale stwierdzono znaczącą obecność rutozydu i kwercetyny (tab. 9). Zawartość tych związków w liściach badanych odmian była tożsama, ale surowiec z różnych sezonów wegetacyjnych zawierał statystycznie zróżnicowaną ich zawartość (tab. 8). Średnia zawartość flawonoli wyniosła 80,19 mg QEE/ 1 g s.m. liści rokitnika zwyczajnego. Jak pokazują badania zawartość flawonoidów w liściach i owocach rokitnika wynosi odpowiednio od 310 do 2100 mg/100 g suszonych liści i od 120 do 1000 mg/100 g świeżych owoców (Glauzunova i in., 1984; Glauzunova i in., 1985; Chen i in., 1991). Ze względu na różne metody oznaczania oraz stosowane różne standardy niemożliwym jest porównanie uzyskanych wyników. Aczkolwiek powszechnie potwierdzono, że rokitnik zwyczajny jest bogaty w związki fenolowe. Zatem ze względu na znaczną zawartość związków fenolowych badane rośliny rokitnika są obiecującym źródłem naturalnych związków antyoksydacyjnych w paszach i żywności.

Zawartość poszczególnych flawonoidów w badanych materiale była zróżnicowana statystycznie przez analizowane czynniki eksperymentalne. Na zawartość proantocyjanidyn, antocyjanów i tanin ogółem istotny wpływ miało pochodzenie surowca (sezon wegetacyjny).

Oprócz tanin hydrolizujących w roślinach występują proantocyjanidyny (PAC) (inaczej taniny skondensowane lub niehydrolizujące). Stanowią polimery flawanów. Zbudowane są z monomerów katechiny i epikatechiny (Borkowski i Miłkowska, 1997). PAC charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną. Związki te przyciągają coraz większą uwagę w badaniach medycznych, ale i żywieniowych względu na ich różnorodną bioaktywność (działanie przeciwutleniające, przeciwcukrzycowe, przeciwotyłociowe, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne czy kardioprotekcyjne (De La Iglesia i in., 2010; González-Quilen i in., 2020; Qi i in., 2022)). Badane liście rokitnika zwyczajnego są bogatym źródłem PAC, a istotnie najwięcej tych związków stwierdzono w liściach z sezonu wegetacyjnego 2016 roku (18,517 mg/ 1g s.m.). Mimo, że liście badanych odmian nie różniły się statystycznie zawartością PAC (tab. 8), to można zaobserwować tendencję do nieco większej zawartości tych związków w liściach odmiany Habego (14,547 mg/ 1 g s.m.). Ostatnie lata dostarczyły dowodów na to, że skondensowane taniny są obecne w różnych roślinach i mają potencjał przeciwdrobnoustrojowy, w tym działanie przeciwgrzybicze. Luiz i in. (2015) ocenili wpływ frakcji bogatych w polimery proantocyjanidynowe ze *Stryphnodendron adstringens* i wykazali hamowanie wzrostu *Candida albican* (ATCC 10231). Jak wykazały badania Fan i in. (2007), czy Yang i in. (2016) nasiona rokitnika zwyczajnego są bogatym źródłem PAC. Łodygi i inne elementy rokitnika zwyczajnego, wcześniej uważane za produkt uboczny, okazały się również cennym źródłem substancji o obiecującej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Sadowska i in. (2017) dowiedli, że liście i łodygi rokitnika zwyczajnego bogate w skondensowane taniny cechuje działanie przeciwgrzybicze, a także pozytywny wpływ na czynniki wirulencji *Candida* spp., wykazując tym samym potencjał do opracowywania nowych produktów przeciwgrzybiczych wspierających tradycyjnie stosowane leki. Należy również z punktu widzenia właściwości odżywczych surowca, pamiętać o interakcji PACs z białkami, szczególnie bogatymi w prolinę. Jak wykazano w P-1 (Boško i in., 2024) liście rokitnika zwyczajnego zawierają średnio 4 g proliny w 100 g białka, co stanowi 5,28% sumy wszystkich 20 oznaczonych aminokwasów. Biologicznie ważnym efektem tej interakcji jest m.in. blokowanie aktywności enzymów, szczególnie proteolitycznych. Innym efektem obecności PACs może być ograniczenie przyswajalności niektórych składników mineralnych.

Kolejną grupą związków fenolowych oznaczonych w liściach rokitnika zwyczajnego były antocyjany, które również posiadają wielopłaszczyznowe działanie, w tym antyoksydacyjne, anty-mutagenne, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe (Islam, 2006).

Występują one przede wszystkim w owocach jagodowych, nadając owocom atrakcyjne kolory. Największą zawartość antocyjanów i przy tym najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazują owoce jagodowe, takie jak: żurawina, czarna jagoda, malina, truskawka, winogrona i jagody bzu czarnego oraz borówki czarnej. Podkreśla się również ich obecność w innych gatunkach roślin (w tym innych ich częściach morfologicznych) dotychczas nie utożsamianych z ich obecnością. Liście wielu gatunków roślin są bogate antocyjany (Gould i in., 2002). Na przykład batat, oprócz jadalnej bulwy korzeniowej ma również jadalne liście i pędy nadziemne, które zawierają liczne związki polifenolowe, w tym m.in. antocyjany (Li i in., 2019; Su i in., 2019). W badanych liściach rokitnika zwyczajnego stwierdzono ich zawartość w zakresie od 6,375 do 10,928 mg/ 1 g s.m., potwierdzając zarazem zróżnicowanie ich zawartości w surowcu w zależności od roku pozyskania ($p=0,004$). Zawartość antocyjanów w liściach badanych odmian nie była zróżnicowana statystycznie ($p=0,430$). Aczkolwiek liście odmiany Ascola wykazywały tendencję do nieco większej koncentracji tego składnika (9,202 mg/ 1 g s.m.). Wiele publikowanych badań dotyczyło głównie zawartości antocyjanów w owocach. Zwraca się uwagę, że ich zawartość uzależniona jest od barwy owoców. Stwierdzono, że owoce czerwone rokitnika zwyczajnego zawierają więcej antocyjanów niż żółte i jasnożółte (Ercisli i in., 2007).

W publikacji P-2 dokonano również oceny jakościowej flawonoidów (Tabela 9). W przypadku delfinidyny, jak i cyjanidyny zaobserwowano zróżnicowanie zawartości tych związków w liściach rokitnika zwyczajnego przez badane czynniki eksperymentalne. Zdecydowanie większą zawartością tych związków cechował się surowiec pozyskany w sezonie wegetacyjnym 2016, a wśród odmian większą zawartością delfinidyny cechowały się Hergo i Leikora. Nie stwierdzono w badanym surowcu obecności pelargonidyny popularnej w innych surowcach roślinnych.

Tabela 9. Zawartość metabolitów wtórnych ($\mu\text{g}/1 \text{ g s.m.}$) w badanym suszu liści rokitnika zwyczajnego

Czynnik	Rutozyd	Kwercetyna	Delfinidyna	Peonidyna	Cyjanidyna	Chelerytryna
Rok						
p^1	=0,001	=0,003	=0,045	=0,335	=0,005	=0,005
2014	0,246 a ²	0,178 a	0,794 a	36,668 a	0,681 a	0,681 a
2015	0,295 b	0,203 b	0,815 a	41,141 a	0,687 a	0,885 ab
2016	0,335 c	0,223 b	0,972 b	35,942 a	0,723 b	1,043 b
Odmiana						
p	=0,402	=0,270	=0,017	=0,298	=0,052	=0,096
Ascola	0,280 a	0,190 a	0,723 a	33,034 a	0,685 a	0,749 a
Habego	0,296 a	0,207 a	0,783 a	37,863 a	0,700 a	0,845 a
Hergo	0,287 a	0,207 a	1,026 b	39,662 a	0,687 a	0,898 a
Leikora	0,305 a	0,200 a	0,909 ab	41,108 a	0,716 a	0,988 a

¹ p - prawdopodobieństwo odrzucenia hipotezy zerowej (H_0 ; $m_1 = m_2 \dots = m_n$); ² średnie oznaczone co najmniej jedną taką samą literę (a, b, c) nie różniły się statystycznie przy $p=0,05$ (dla wszystkich kolumn i czynników osobno).

Dotychczasowe badania potwierdziły obecność w rokitniku zwyczajnym nielicznych alkaloidów (Tolkachew i in., 2008; Żuchowski, 2023). W prezentowanych badaniach potwierdzono obecność chelerytryny (CHE, chelerythrine) – alkaloidu benzofenantrydynowego. Związek ten wykazuje właściwości pozwalające sądzić, że może być składnikiem wielu nowych leków, szczególnie antynowotworowych (Chen i in., 2022). Zawartość CHE w materiale badawczym była uzależniona od warunków klimatycznych sezonu wegetacyjnego. Zdecydowanie największą zawartość alkaloidu stwierdzono w liściach z roku 2016 (tab. 9). Bliskie zróżnicowania statystycznego były zawartości chelerytryny stwierdzone w surowcu badanych odmian. Liście odmiany Ascola wykazywały wyraźną tendencję do gromadzenia mniejszej ilości tego cennego alkaloidu. Wyciągi z roślin leczniczych zawierające chelerytrynę są składnikami fitopreparatów zarówno dla ludzi, jak i w weterynarii. Badania wykazały, że średnia dzienna dawka *per os* tego alkaloidu do 5 mg na 1 kg masy ciała zwierzęcia jest bezpieczna dla prosiąt (Kosina i in., 2004). Hu i in. (2019) przeprowadzili ocenę właściwości farmakokinetycznych mieszanki sangwinaryny i CHE u kurcząt brojlerów i również wykazali, że dodatek ten do paszy jest bezpieczny.

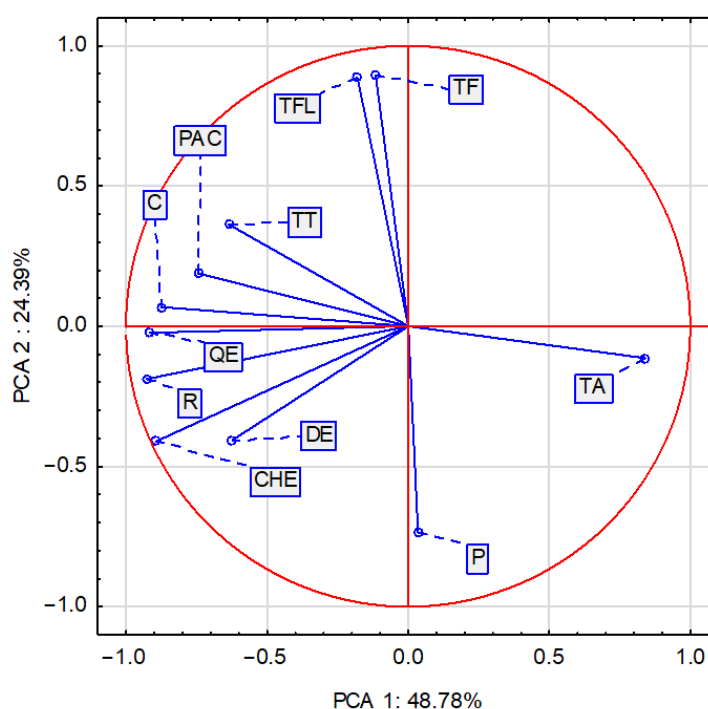
Stan wiedzy na temat aktywności biologicznej związków flawonoidowych wskazuje jednoznacznie, że ich pozytywne działanie na organizm wynika głównie z właściwości antyoksydacyjnych. Jest to możliwe dzięki obecności w ich strukturze grup

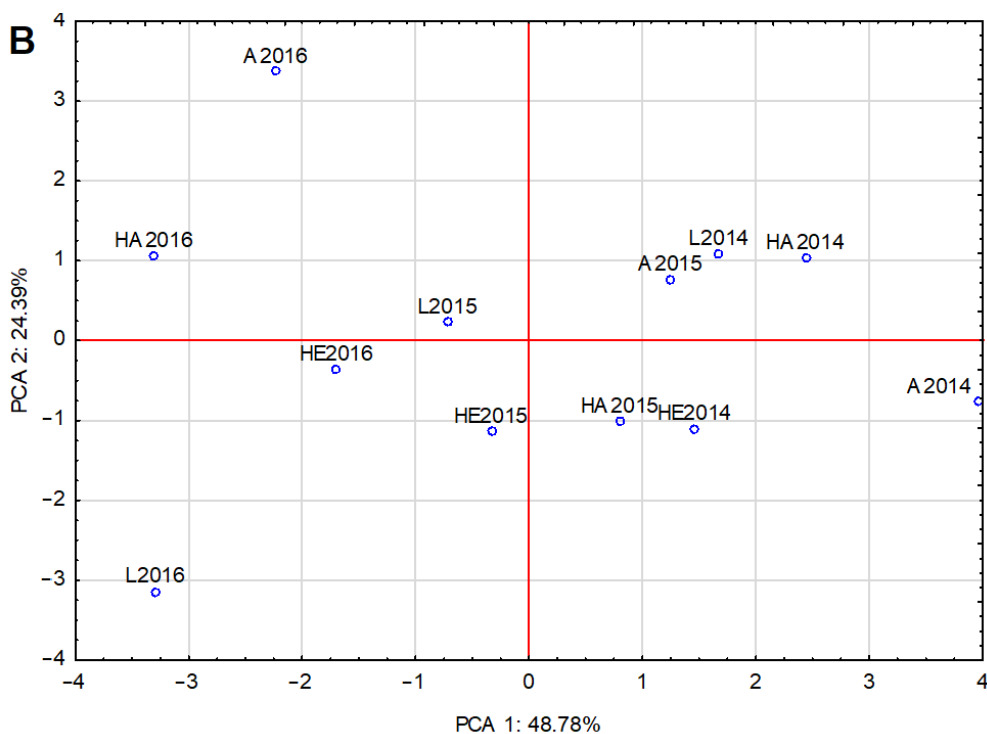
hydroksylowych. Wykazano, że im więcej grup hydroksylowych w cząsteczce, tym silniejsze działanie antyoksydacyjne (Chen i in., 2020; Parcheta i in., 2021). Spośród oznaczonych związków rutozyd ma grup –OH najwięcej, delfinidyna – 6 , kwercetyna i cyjanidyna – 5, a najmniej peonidyna.

Bogactwo związków fenolowych w liściach rokitnika zwyczajnego potwierdziły wcześniejsze badania innych autorów, w tym Wei i in. (2022).

Analiza PCA (Rycina 4) wykonana w oparciu o składniki bioaktywne zawarte w liściach rokitnika zwyczajnego potwierdza znaczne zróżnicowanie jakości liści badanych odmian pozyskanych w różnych sezonach wegetacyjnych (ryc. 4A i 4B).

A





Rycina 4. Współrzędne czynnikowe zmiennych (A) i przypadków (B) dla składników bioaktywnych w układzie współrzędnych pierwszej pary składowych

Wyjaśnienia: C - cyjanidyna (cyanidin); CHE - chelerytryna (chelerythrine); DE - delfinidyna (delphinidin); P - peonidyna (peonidin); PAC- proantocyjanidyny (proanthocyanidin); QE - kwercetyna (quercetin); R - rutozyd (rutin); TA - antocyjany ogółem (total anthocyanin); TF - flawonoidy ogółem (total flavonoid); TFL - flawonole ogółem (total flavonol); TT - taniny ogółem (total tannin); odmiany: A - Ascola; HA - Habego; HE - Hergo; L - Leikora).

Z punktu widzenia pozyskiwania stabilnego jakościowo surowca nie jest to pozytywna konstatacja. Jako przykład można przywołać zmianę jakości surowca odmiany Ascola. Wyraźnie uwidacznia się spadek zawartości antocyjanów na rzecz innych składników aktywnych (szczególnie flawonoidów, flawonoli i tanin ogółem) w kolejnych latach badań. W liściach odmiany Leikora wraz z upływem kolejnych okresów wegetacji zwiększała się zawartość głównie chelerytryny i delfinidyny.

Analizując zależności pomiędzy wyznaczonymi właściwościami surowca wykazano bliski statystycznej istotności ($p=0,091$) współczynnik korelacji ($r=0,509$) pomiędzy metodami DPPH i ABTS, ale zarazem potwierdzono brak korelacji pomiędzy tymi metodami a metodą PCL – ACW (odpowiednio $r=0,180$ i $0,029$) (Tabele 10 i 11). Metody PCL są rzadziej stosowane do oceny jakości surowca roślinnego, dlatego ten brak korelacji trudno przeanalizować na tle innych metod badawczych. Interesujące są również zależności analizowanych właściwości z chelerytryną. Alkaloid ten nie wykazuje związku korelacyjnego z AA, ale zaobserwowano istotne statystycznie zależności z antocyjanami

i flawonolami (rutyna, kwercetyna). Związek korelacyjny z antocyjanami jest ujemny ($r=-0,724$), a z flawonoidami dodatni (odpowiednio $r= 0,902$ i $0,800$) (tab. 10 i 11).

Ujemne korelacje pomiędzy TEAC DPPH i ABTS z polifenolami ogółem (TP) potwierdza również analiza PCA (rycina 3A). Jest to wynik zaskakujący, który może wskazywać na warunkowanie AA przez inne związki niż TP. Wśród związków, które mogą wpływać na dokładność metod zaliczyć można szczególnie związki barwne, bowiem ich produkty reakcji mają większe AA oraz np. alkaloidy. Sprawą odrębną jest natomiast zdolność do wygaszania wolnych rodników, bowiem ujemna korelacja pomiędzy wielkościami TEAC DPPH i TP nie oznacza braku zdolności do wygaszania wolnych rodników zawartych w badanym ekstrakcie. Oznacza to zatem, że grupa związków antyoksydacyjnych wchodzących w TP wykazuje umiarkowaną zdolność do wygaszania wolnych rodników w wyciągu liści rokitnika ($r=0,568$), pomimo przywołanej wcześniej ujemnej korelacji ich zawartości z TEAC DPPH.

Dieta, wraz z czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, jest uważana za główny aspekt wpływający na prawidłowe funkcjonowanie organizmu, a także ma ogromny wpływ na profilaktykę chorób układu krążenia (CVD, cardiovascular diseases). Choroby te są główną przyczyną śmiertelności i zachorowalności na świecie (Woodruff i in., 2024). Jak pokazują wyniki badań jest to też duży problem u psów (Lakhdhir i in., 2020; Maerz, 2020). Dlatego zapobieganie i redukcja czynników ryzyka, które są związane z CVD, są głównymi zadaniami dla specjalistów. Badano rolę różnych składników bioaktywnych, takich jak związki fenolowe w zapobieganiu i leczeniu chorób układu krążenia. Wpływ składników rokitnika zwyczajnego na układ sercowo–naczyniowy jest dobrze udokumentowany w badaniach naukowych (Cenkowski i in., 2006; Visioli i Hagen, 2007; Kiokias i in., 2008). Badania na zwierzętach i ludziach sugerują, że flawonoidy rokitnika zwyczajnego mogą eliminować wolne rodniki, zmniejszenie krzepliwości krwi i jej lepkość i poprawiać pracę serca. Suomela i in. (2006) badali wpływ ekstraktu flawonoli rokitnika zwyczajnego (zawierającego 19,4% aglikonów flawonoli, i 0,25% proantocyjanidyn) na czynniki ryzyka chorób sercowo–naczyniowych uzyskując pozytywne wyniki w eksperymencie. Stosowanie dodatku flawonoli rokitnika zwyczajnego u drobiu w dawce od 0,05 do 0,10% pozytywnie wpłynęło wydajność wzrostu, jakość tuszy czy odkładanie tłuszczu u brojlerów (Ma i in., 2015).

Tabela 10. Istotność statystyczna (p) współczynników korelacji r-Pearsona ($n=12$)

Feature	p<=																											
	0.001	0.010	0.025	0.050	0.100	0.150	0.200	0.350	0.500	1	DPPH	ABTS	RSA ABTS	RSA DPPH	PCL	TP	TF	TFL	PAC	TA	TT	DE	R	QE	P	C	CHE	
DPPH	1.000																											
ABTS	0.091	1.000																										
RSA ABTS	0.105	0.382	1.000																									
RSA DPPH	0.001	0.105	0.285	1.000																								
PCL	0.576	0.930	0.470	0.759	1.000																							
TP	0.001	0.091	0.345	0.054	0.814	1.000																						
TF	0.407	0.443	0.403	0.966	0.149	0.285	1.000																					
TFL	0.513	0.921	0.470	0.591	0.050	0.357	0.000	1.000																				
PAC	0.001	0.417	0.012	0.015	0.962	0.018	0.638	0.666	1.000																			
TA	0.255	0.174	0.691	0.670	0.557	0.241	0.400	0.166	0.219	1.000																		
TT	0.011	0.198	0.782	0.105	0.873	0.004	0.206	0.344	0.098	0.142	1.000																	
DE	0.281	0.306	0.978	0.111	0.566	0.883	0.588	0.481	0.240	0.186	0.195	1.000																
R	0.040	0.756	0.942	0.115	0.681	0.050	0.752	0.942	0.014	0.003	0.089	0.126	1.000															
QE	0.050	0.393	0.709	0.190	0.754	0.113	0.981	0.531	0.018	0.000	0.167	0.104	0.000	1.000														
P	0.123	0.080	0.027	0.390	0.458	0.068	0.168	0.158	0.188	0.743	0.282	0.318	0.731	0.816	1.000													
C	0.021	0.893	0.570	0.071	0.321	0.053	0.602	0.559	0.014	0.019	0.099	0.131	0.003	0.006	0.708	1.000												
CHE	0.158	0.355	0.658	0.104	0.236	0.269	0.490	0.547	0.072	0.008	0.192	0.010	0.000	0.002	0.321	0.002	1.000											

Tabela 11. Wartości współczynników korelacji r-Pearsona (n=12)

Feature	r >=																
	-1	-0.80	-0.60	-0.40	-0.20	0	0.20	0.40	0.60	0.80	1						
	DPPH	ABTS	RSA ABTS	RSA DPPH	PCL	TP	TF	TFL	PAC	TA	TT	D	R	QE	P	C	CHE
DPPH	1.000																
ABTS	0.509	1.000															
RSA ABTS	0.491	0.278	1.000														
RSA DPPH	-0.836	-0.491	-0.337	1.000													
PCL	0.180	0.029	0.231	0.099	1.000												
TP	-0.808	-0.509	-0.299	0.568	-0.076	1.000											
TF	-0.264	-0.245	-0.266	0.014	-0.443	0.336	1.000										
TFL	-0.209	-0.032	-0.231	-0.173	-0.575	0.292	0.900	1.000									
PAC	-0.815	-0.258	-0.694	0.678	0.015	0.667	0.152	0.139	1.000								
TA	0.357	-0.420	-0.128	-0.137	0.189	-0.366	-0.268	-0.427	-0.383	1.000							
TT	-0.699	-0.400	-0.090	0.492	-0.052	0.763	0.393	0.300	0.500	-0.450	1.000						
D	-0.339	0.323	0.009	0.484	0.184	0.048	-0.174	-0.226	0.368	-0.410	0.402	1.000					
R	-0.599	0.101	-0.024	0.479	0.133	0.575	-0.102	-0.024	0.686	-0.780	0.512	0.467	1.000				
QE	-0.577	0.271	-0.121	0.407	-0.102	0.481	-0.008	0.201	0.665	-0.858	0.426	0.492	0.878	1.000			
P	0.470	0.524	0.635	-0.273	0.237	-0.543	-0.426	-0.435	-0.408	-0.106	-0.338	0.315	0.111	-0.075	1.000		
C	-0.656	0.043	-0.183	0.538	0.314	0.569	0.168	0.188	0.683	-0.661	0.498	0.461	0.772	0.735	-0.121	1.000	
CHE	-0.435	0.293	0.143	0.492	0.370	0.347	-0.221	-0.193	0.537	-0.724	0.405	0.705	0.902	0.800	0.313	0.793	1.000

7. Podsumowanie i wnioski

Na podstawie przeglądu literatury i przeprowadzeniu badań (P-1, P-2) opisanych powyżej można stwierdzić, że liście rokitnika zwyczajnego mogą być wykorzystane jako cenny materiał paszowy. Najważniejsze stwierdzenia i wnioski z badań:

1. Wykonane analizy statystyczne wykazały zróżnicowanie składu chemicznego liści rokitnika. Analizowane źródła zmienności (rok, genotyp) wpłynęły zarówno na skład podstawowy, aminokwasowy, a także zawartość substancji bioaktywnych.
2. Zawartość białka w liściach rokitnika była wysoka i wyniosła średnio (odmiany i roku zbioru) 18,26 g/100 g s.m.
3. Średnia zawartość aminokwasów egzogennych w białku liści rokitnika zwyczajnego wyniosła 37,88 g/16 g N uwzględniając wzorzec dla dorosłego człowieka (MH) i 44,23 g/16 g N w odniesieniu do wzorca dla zwierząt (WE).
4. Bez względu na wzorzec białka (MH, WE) pierwszym aminokwasem limitującym jakość białka liści rokitnika zwyczajnego był tryptofan. Wartość wskaźnika aminokwasu ograniczającego (CS) w przypadku tryptofanu podlegała statystycznej modyfikacji przez wszystkie testowane czynniki.
5. Ekstrakty z liści rokitnika wykazały silne działanie przeciwutleniające w testach DPPH, ABTS oraz PCL.
6. Liście rokitnika są doskonałym źródłem związków bioaktywnych, w tym flawonoli (rutozyd i kwercetyna), antocyjanidyn (delfinidyna, peonidyna, cyjanidyna).
7. Liście rokitnika zwyczajnego są źródłem chelerytryny.

Podsumowując można stwierdzić, że liście rokitnika zwyczajnego mogą być cennym dodatkiem diety zwierząt i ludzi ze względu na ich wysokiej jakości białko o dobrym składzie niezbędnych aminokwasów. Surowiec ten może być częściowym substytutem białka dla powszechnie stosowanych materiałów paszowych dostarczających białka w diecie. Należy jednak pamiętać o stosowaniu go w połączeniu z nośnikiem tryptofanu. Bogata zawartość związków biologicznie aktywnych oraz wysoki potencjał antyoksydacyjny sprawia, że liście rokitnika zwyczajnego mogą być wykorzystywane w produkcji zwierzęcej jako wartościowy dodatek paszowy szczególnie dla zwierząt narażonych na stres oksydacyjny i zapalny.

8. Spis publikacji cytowanych w opisie rozprawy doktorskiej

1. Ahmad S.D.; Kamal M. 2002. Morpho-molecular characterisation of local genotype of *Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica* a multi-purpose plant from Northern Areas of Pakistan. *Online Journal of Biological Sciences*, 2: 351–354.
2. Ainsworth E.A.; Gillespie K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2: 875–877.
3. Alabri T.H.A.; Al Musalami A.H.S.; Hossain M.A.; Weli A.M.; Al–Riyami Q. 2014. Comparative study of phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial capacities of fresh and dry leaves crude plant extracts of *Datura metel* L. *King Saud University – Science*, 26: 237–243.
4. Andersone A.; Janceva S.; Lauberte L.; Zaharova N.; Chervenkov M.; Jurkjane V.; Jashina L.; Rieksts G.; Telysheva G. 2023. Granulated animal feed and fuel based on sea buckthorn agro-waste biomass for sustainable berry production. *Sustainability*, 15: 11152.
5. AOAC. *Official Methods of Analysis*, 15th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, USA, 1990.
6. AOAC. *Official Methods of Analysis*, 21th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, USA, 2019.
7. Arnao M.B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 419–421.
8. Arora R.; Mundra S.; Yadav A.; Srivastava R.B.; Stobdan T. 2012. Antimicrobial activity of seed, pomace and leaf extracts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against foodborne and food spoilage pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 11: 10424–10430.
9. Aschemann–Witzel J.; Stangherlin I.D.C. 2021. Upcycled by–product use in agri–food systems from a consumer perspective: A review of what we know, and what is missing. *Technological Forecasting and Social Change*, 168: 120749.

10. Ávila G.; De Leonardis D.; Grilli G.; Lecchi C.; Ceciliani F. 2021. Anti-inflammatory activity of citrus pectin on chicken monocytes' immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 237: 110269.
11. Azmir S.; Ferdousi M.; Liu Y.; Adam S.; Siahmansur T.; Ponirakis G.; Marshall A.; Petropoulos J.N.; Ho J.H.; Syed A.A.; Gibson J.M.; Ammori B.J.; Durrington P.N.; Malik R.A.; Soran H. 2021. The role of abnormalities of lipoproteins and HDL functionality in small fibre dysfunction in people with severe obesity. *Scientific Reports*, 11: 12573.
12. Bayır H.; Şimşek B.İ.; Bayır Y. 2024. *Hippophae rhamnoides* L. botanical, medicinal, traditional, and current use of plant and fruits: a review. *New Trends in Medicine Sciences*, 5: 35–44.
13. Bhardwaj P.; Varshneya C.; Kaistha K.; Tandon T. 2015. In vitro evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9: 929–932.
14. Biel W.; Jaroszewska A. 2016. The nutritional value of leaves of selected berry species. *Science journal on Agriculture*, 74: 405–410.
15. Biel W.; Jendrzeczek E.; Jaroszewska A.; Witkiewicz R.; Piątkowska, E.; Telesiński A. 2017. Nutritional content and antioxidant properties of selected species of *Amaranthus* L. *Italian Journal of Food Science*, 29: 728–740.
16. Binder E.V. 2019, Alternative food and feed products. In Proceedings of the First FAO/WHO/AU International Food Safety Conference, Addis Ababa, Ethiopia, 12–13 February; p. IFSC-1/19/TS2.5. Available online: <https://www.who.int/docs/default-source/resources/bp-alternative-food-and-feed-products.pdf> (dostęp 3.06.2024).
17. Block R.J.; Mitchell H.H. 1946. The correlation of the amino acid composition of proteins with their nutritive value. *Nutrition Research Reviews*, 16: 249.
18. Bodó A.; Csepregi K.; Szata B.E.; Nagy U.D.; Jakab G.; Kocsis M. 2017. Bioactivity of leaves, skins and seeds of berry color variant grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5: 16–22.

19. Borkowski B.; Miłkowska K. 1997. Garbniki skondensowane. *Herba Polonica*, 43: 73–97.
20. Boško P.; Biel W.; Witkowicz R.; Piątkowska E. 2024. Chemical composition and nutritive value of sea buckthorn leaves. *Molecules*, 29: 3550.
21. Boško P.; Małkowska P.; Oberska P.; Bordakov A.; Hrechaniuk I.; Komperda M.; Kapturska A.; Biel W.; Michałek K. 2021. Expression of aquaporin 1, 4, 8 and 9 in the liver of rats fed with the standard diet and supplemented with dried sea-buckthorn leaves (*Hippophae rhamnoides* L.). A pilot study. *Polish Journal of Natural Sciences*, 36: 457–468.
22. Bouloumpasi E.; Hatzikamari M.; Christaki S.; Lazaridou A.; Chatzopoulou P.; Biliaderis C.G.; Irakli M. 2024. Assessment of antioxidant and antibacterial potential of phenolic extracts from post-distillation solid residues of oregano, rosemary, sage, lemon balm, and spearmint. *Processes*, 12: 140.
23. Brand-Williams W.; Cuvelier M.E.; Berset C.L.W.T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT– Food Science and Technology*, 28: 25–30.
24. Cenkowski S.; Yakimishen R.; Przybylski R.; Mui, W.E. 2006. Quality of extracted sea buckthorn seed and pulp oil. *Canadian Biosystems Engineering*, 48: 3.9–3.16.
25. Chen A.; Feng X.; Dorjsuren B.; Chimedtseren C.; Damda T.A.; Zhang C. 2023. Traditional food, modern food and nutritional value of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A review. *Journal Future Foods*, 3: 191–205.
26. Chen J.; Yang J.; Ma L.; Li J.; Shahzad N.; Kim C.K. 2020. Structure–antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Reports*, 10: 2611.
27. Chen N.; Qi Y.; Ma X.; Xiao X.; Liu Q.; Xia T.; Xiang J.; Zeng J.; Tang J. 2022. Rediscovery of traditional plant medicine: An underestimated anticancer drug of chelerythrine. *Frontiers in Pharmacology*, 13.

28. Chen T.G.; Ni M.K.; Li R.; Ji F.; Chen T.; Ni M.K.; Li R.; Ji F. 1991. Investigation of the biological properties of Central Asian Sea Buckthorn growing in the province of Kansu, China. *Chemistry of Natural Compounds*, 27: 119–121.
29. Cho C.H.; Jang H.; Lee M.; Kang H.; Heo H.J.; Kim D.O. 2017. Sea buckthorn (*hippophae rhamnoides* l.) leaf extracts protect neuronal pc–12 cells from oxidative stress. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28/27: 1257–1265.
30. Cho H.; Cho E.; Jung H.; Yi H.C.; Lee B.; Hwang K.T. 2014. Antioxidant activities of sea buckthorn leaf tea extracts compared with green tea extracts. *Food Science and Biotechnology*, 23: 1295–1303.
31. Christaki E. 2012. *Hippophae Rhamnoides* L. (sea buckthorn): A potential source of nutraceuticals. *Food and Public Health*, 2: 69–72.
32. Ciesarová Z.; Murkovic M.; Cejpek K.; Kreps F.; Tobolková B.; Koplík R.; Belajová E.; Kukurová K.; Daško L.; Panovská Z.; Revenco D.; Burčová Z. 2020. Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review. *Food Research International*, 133.
33. Coscarella M.; Nardi M.; Alipieva K.; Bonacci S.; Popova M.; Procopio A.; Scarpelli R.; Simeonov S. 2024. Alternative assisted extraction methods of phenolic compounds using NaDESs. *Antioxidants*, 13: 62.
34. Criste A.; Urcan A.C.; Bunea A.; Pripon Furtuna F.R.; Olah N.K.; Madden R.H.; Corcionivoschi N. 2020. Phytochemical composition and biological activity of berries and leaves from four Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Molecules*, 25: 1170.
35. Cui Q.; Liu J.Z.; Wang L.T.; Kang Y.F.; Meng Y.; Jiao J.; Fu Y.J. 2018. Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *Journal of Cleaner Production*, 184, 826–835.
36. Çakmakçı R.; Salık M.A.; Çakmakçı S. 2023. Assessment and principles of environmentally sustainable food and agriculture systems. *Agriculture*, 13: 1073.

37. Čulina P.; Repajić M.; Elez Garofulić I.; Dragović-Uzelac V.; Pedisić S. 2024. Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity of sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) leaf and berry extracts obtained via optimized microwave-assisted and accelerated solvent extraction. *Processes*, 12: 126.
38. Dannenberger D.; Tuchscherer M.; Nürnberg G.; Schmicke M.; Kanitz E. 2018. Sea buckthorn pomace supplementation in the diet of growing pigs—Effects on fatty acid metabolism, HPA activity and immune status. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 596.
39. De la Iglesia R.; Milagro F.I.; Campión J.; Boqué N.; Martínez J.A. 2010. Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors*, 36: 159–168.
40. Deehan E.C.; Mocanu V.; Madsen K.L. 2014. Effects of dietary fibre on metabolic health and obesity. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 21: 301–318.
41. Dienaitė L.; Pukalskas A.; Pukalskienė M.; Pereira C.V.; Matias A.A.; Venskutonis P.R. 2020. Phytochemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of defatted sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berry pomace fractions consecutively recovered by pressurized ethanol and water. *Antioxidants*, 9: 274.
42. Djordjević M.; Djordjević M.; Šoronja-Simović D.; Nikolić I.; Šereš Z. 2022. Delving into the role of dietary fiber in gluten-free bread formulations: Integrating fundamental rheological, technological, sensory, and nutritional aspects. *Polysaccharides*, 3: 59–82.
43. Dong K.; Binosha Fernando W.M.; Durham R.; Stockmann R.; Jayasena V. 2023. Nutritional value, health-promoting benefits and food application of sea buckthorn. *Food Reviews International*, 39: 2122–2137.
44. Dratman M.B.; Martin J.V. 2020. The many faces of thyroxine. *AIMS neuroscience*, 7: 17.
45. Drevinska K.; Moročko-Bičevska I. 2022. Sea Buckthorn diseases caused by pathogenic fungi. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural Exact and Applied Sciences*, 76: 393–401.

46. Dulf F.V. 2012. Fatty acids in berry lipids of six sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L., subspecies *carpatica*) cultivars grown in Romania. *Chemistry Central Journal*, 6: 106.
47. Durand D.; Collin A.; Merlot E.; Baéza E.; Guilloteau L.A.; Le Floc'h N.; Thomas A.; Fontagné–Dicharry S.; Gondret F. 2022. Review: Implication of redox imbalance in animal health and performance at critical periods, insights from different farm species. *Animal*, 16: 100543.
48. Enkhtaivan G.; John K.M.; Pandurangan M.; Hur J.H.; Leutou A.S.; Kim D.H. 2017. Extreme effects of sea buckthorn extracts on influenza viruses and human cancer cells and correlation between flavonol glycosides and biological activities of extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24: 1646–1656.
49. Ercisli S.; Orhan E.; Ozdemir O.; Sengul M. 2007. The genotypic effects on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries grown in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 115: 27–33.
50. Fan J.; Ding X.; Gu W. 2007. Radical–scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry*, 102: 168–177.
51. FAO/WHO. Protein quality evaluation. Report of a Joint FAO–WHO Expert Consultation. In *Food and Nutrition* 51; FAO: Rome, Italy, 1991.
52. FAO/WHO/UNU. Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO–WHO Nutritional Meeting; Technical Report Series 273; FAO/WHO/UNU: Geneva, Switzerland, 1985.
53. Ferreira–Santos P.; Nobre C.; Rodrigues R.M.; Genisheva Z.; Botelho C.; Teixeira J.A. 2024. Extraction of phenolic compounds from grape pomace using ohmic heating: Chemical composition, bioactivity and bioaccessibility. *Food Chemistry*, 436: 137780.
54. Gâtlan A–M.; Gutt G. 2021. Sea buckthorn in plant based diets. An analytical approach of sea buckthorn fruits composition: nutritional value, applications, and health benefits. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18: 8986.

55. Glauzunova E.M.; Gachechiladze N.D.; Bondar V.V.; Korzinnikov Y.S.; Potapova I.M.; Gur'yanov A.F. 1984. Biochemical fruit characteristics of *Hippophae rhamnoides* L. growing in the Western Pamirs. Horticultural Science Abstracts, 54: 6135.
56. Glauzunova E.M.; Gachechiladze N.D.; Litvinenko V.I.; Popova T.P. 1985. Flavonoids of leaves of sea buckthorn growing in the Western Pamir mountains. Horticultural Science Abstracts, 57: 3263.
57. González–García E.; Marina M.L.; García M.C. 2014. Plum (*Prunus domestica* L.) by–product as a new and cheap source of bioactive peptides: extraction method and peptides characterization. Journal of Functional Foods, 11: 428–437.
58. González–Quilen C.; Rodríguez–Gallego E.; Beltrán–Debón R.; Pinent M.; Ardévol A.; Blay M.T.; Terra X. 2020. Health–promoting properties of proanthocyanidins for intestinal dysfunction. Nutrients, 12: 130.
59. Gould K.S.; Neill S.O.; Vogelmann T.C. 2002. A unified explanation for anthocyanins in leaves? Advances in Botanical Research, 37: 167–192.
60. Górnas P.; Šnē E.; Siger A.; Segliņa D. 2016. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) vegetative parts as an unconventional source of lipophilic antioxidants. Saudi Journal of Biological Sciences, 23: 512–516.
61. Gradt I.; Kühn S.; Mörsel J.T.; Zvaigzne G. 2017. Chemical composition of sea buckthorn leaves, branches and bark. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B: Natural, Exact and Applied Sciences, 71: 211–216.
62. Guo R.; Guo X.; Li T.; Fu X.; Liu R.H. 2017. Comparative assessment of phytochemical profiles, antioxidant and antiproliferative activities of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries. Food Chemistry, 221: 997–1003.
63. Hamieau M.; Loulergue P.; Szydłowska–Czerniak A. 2014. Green solvent extraction of antioxidants from herbs and agro–food wastes: optimization and capacity determination. Apply Science, 14: 2936.
64. Hao X.; Zhang X.; Yang D.; Xie Y.; Mu C.; Zhang J. 2023. Effects of sea–buckthorn flavonoids on growth performance, nutrient digestibility, microbial

- protein synthesis, and plasma antioxidant capacity of finishing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 305: 115783.
65. Hatami A.; Ahmadi–Khorram M.; Keykhaei F.; Esfehiani A.J.; Nematy M. 2024. Association between the risk of multiple sclerosis and dietary proinflammatory/anti–inflammatory food intake and dietary diversity: a case–control study. *Clinical Nutrition Research*, 13: 61–73.
 66. Hou Y.; Yin Y.; Wu G. 2015. Dietary essentiality of "nutritionally non–essential amino acids" for animals and humans. *Experimental Biology and Medicine*, 240: 997–1007.
 67. Hu N.X.; Chen M.; Liu Y.S.; Shi Q.; Yang B.; Zhang H.C.; Cheng P.; Tang Q.; Liu Z.Y.; Zeng J.G. 2019. Pharmacokinetics of sanguinarine, chelerythrine, and their metabolites in broiler chickens following oral and intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 42: 197–206.
 68. Islam S. 2006. Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf: Its potential effect on human health and nutrition. *Journal of Food Science*, 71: 13–121.
 69. Jain K.; Suryakumar G.; Prasad R.; Ganju L.; Singh S.B. 2015. Enhanced hypoxic tolerance by seabuckthorn is due to upregulation of HIF-1 α and attenuation of ER stress. *Journal of Applied Biomedicine*, 1: 71–83.
 70. Janceva S.; Andersone A.; Lauberte L.; Zaharova N.; Telysheva G.; Krasilnikova J.; Rieksts G. 2024. A Comparative assessment of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pruning waste as a potential source of serotonin. *BioResources*, 19: 886.
 71. Jaroszewska A.; Biel, W. 2017. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Journal of Agricultural Research*, 77: 155–162.
 72. Jaroszewska A.; Biel W.; Telesiński A. 2018. Effect of mycorrhization and variety on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn berries. *Journal of Elementology*, 23: 673–684.

73. Jeukendrup A.E.; Saris W.H.; Brouns F.; Halliday D.; Wagenmakers J.M. 1996. Effects of carbohydrate (CHO) and fat supplementation on CHO metabolism during prolonged exercise. *Metabolism*, 45: 915–921.
74. Kallio H.; Yang B.; Peippo P.; Tahvonen R.; Pan R. 2002. Triacylglycerols, glycerophospholipids, tocopherols, and tocotrienols in berries and seeds of two subspecies (ssp. *sinensis* and *mongolica*) of SB (*Hippophaë rhamnoides*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3004–3009.
75. Karadag A.; Ozcelik B.; Saner S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2: 41–60.
76. Kayser E.; Finet S.E.; De Godoy M.R. 2024. The role of carbohydrates in canine and feline nutrition. *Animal Frontiers*, 14: 28–37.
77. Khajuria P.; Raghuwanshi P.; Rastogi A.; Koul A.L.; Zargar R.; Kour S. 2018. Hepatoprotective effect of seabuckthorn leaf extract in streptozotocin induced diabetes mellitus in Wistar rats. *Indian Journal of Animal Research*, 52: 1745–1750.
78. Kiokias S.; Varzakas T.; Oreopoulou V. 2008. In vitro activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 78–93.
79. Kosina P.; Walterova D.; Ulrichová J.; Lichnovský V.; Stiborová M.; Rýdlová H.; Vičar J.; Krečman V.; Brabec M.J.; Šimánek V. 2004. Sanguinarine and chelerythrine: Assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 85–91.
80. Kumar J.; Rani K.; Datt C. 2020. Molecular link between dietary fibre, gut microbiota and health. *Molecular Biology Reports*, 47: 6229–6237.
81. Kumar M.; Devi T.; Lata S. 2022. Nutritional potential of seabuckthorn plant for livestock feeding. *Indian Farmer*, 9: 488–492.
82. Kumaran A.; Karunakaran R.J. 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT – Food Science and Technology*, 40: 344–352.

83. Kwon D.J.; Bae Y.S.; Ju S.M.; Goh A.R.; Choi S.Y.; Park J. 2011. Casuarinin suppresses TNF- α -induced ICAM-1 expression via blockade of NF- κ B activation in HaCaT cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409: 780–785.
84. Kwon E-Y.; Lee J.; Kim Y.J.; Do A.; Choi J-Y.; Cho S-J.; Jung U.J.; Lee M-K.; Park Y.B.; Choi M-S. 2017. Seabuckthorn leaves extract and flavonoid glycosides extract from seabuckthorn leaves ameliorates adiposity, hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation in diet-induced obesity. *Nutrients*, 9: 569.
85. Lakhdir S.; Viall A.; Alloway E.; Keene B.; Baumgartner K.; Ward, J. 2020. Clinical presentation, cardiovascular findings, etiology, and outcome of myocarditis in dogs: 64 cases with presumptive antemortem diagnosis (26 confirmed postmortem) and 137 cases with postmortem diagnosis only (2004–2017). *Journal of Veterinary Cardiology*, 30: 44–56.
86. Lee H.I.; Kim M.S.; Lee K.M.; Park S.K.; Seo K.I.; Kim H.J.; Kim M.J.; Choi M.S.; Lee M.K. 2011. Anti-visceral obesity and antioxidant effects of powdered sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf tea in diet-induced obese mice. *Food and Chemical Toxicology* 49: 2370–2376.
87. Li G.; Lin Z.; Zhang H.; Liu Z.; Xu Y.; Xu G.; Li H.; Ji R.; Luo W.; Qiu Y. 2019. Anthocyanin accumulation in the leaves of the purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. *Molecules*, 24: 3743.
88. Li T.S.C.; Wardle D. 2003. Effect of harvest period on the protein content in sea buckthorn leaves. *Canadian Journal of Plant Science*, 83: 409–410.
89. Li Z.; Wang J.; Xiong Y.; Li Z.; Feng S. 2016. The determination of the fatty acid content of sea buckthorn seed oil using near infrared spectroscopy and variable selection methods for multivariate calibration. *Vibrational Spectroscopy*, 84: 24–29.
90. Liang T.A.N.; Jing Z.H.A.O.; Jia-Lin M.A.; Tian J.I.; Qi, D.; Jian-Wei S.H.E.N. 2018. Analysis of nutritional compositions and nutritional quality evaluation in different parts of yushu hippophae (*Hippophae rhamnoides* L. subsp. sinensis). *Nonelectronic Parts Reliability Data Publication*, 30: 807.

91. Liu Y.F.; Niu J.L.; Tang S.Z.; Nie C.X.; Zhang W.J.; Guo C.Y.; Hou G.T.; Wang W.Q.; Ge W.X. 2019. Effects of sea-buckthorn leaves on performance and serum metabolic profiles in Altay lambs. *South African Journal of Animal Science*, 49: 717–726.
92. Liu Y.; Ran L.; Wang Y.; Wan P.; Zhou H. 2023. Basic characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from sea buckthorn leaves. *Fitoterapia*, 169: 105592.
93. Lopez M.J.; Mohiuddin S.S. 2024. Biochemistry, essential amino acids. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL).
94. Losada-Barreiro S.; Bravo-Diaz C. 2017. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 133: 379–402.
95. Luiz R.L.F.; Vila T.V.M.; De Mello J.C.P.; Nakamura C.V.; Rozental S.; Ishida K. 2015. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *BMC Complementary Medicine and Therapie*, 15, 1–11.
96. Ma J.S.; Chang W.H.; Liu G.H.; Zhang S.; Zheng A.J.; Li Y.; Cai H.Y. 2015. Effects of flavones of SB fruits on growth performance, carcass quality, fat deposition and lipometabolism for broilers. *Poultry Science*, 94: 2641–2649.
97. Ma X.; Yang W.; Kallio H.; Yang B. 2022. Health promoting properties and sensory characteristics of phytochemicals in berries and leaves of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62: 3798–3816.
98. Maerz I. 2020. Clinical and diagnostic imaging findings in 37 rescued dogs with heartworm disease in Germany. *Veterinary Parasitology*, 283: 109156.
99. Masoodi K.Z.; Wani W.; Dar Z.A.; Mansoor S.; Anam-ul-Haq S.; Farooq I.; Hussain K.; Wani S.A.; Nehvi F.A.; Ahmed N. 2020. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) inhibits cellular proliferation, wound healing and decreases expression of prostate specific antigen in prostate cancer cells *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, 73: 104102.

100. Máté M.; Selimaj G.; Simon G.; Szalóki–Dorkó L.; Ficzek G. 2022. Assessment of berries of some Sea Buckthorn genotypes by physicochemical properties and fatty acid content of the seed. *Plants*, 11: 3412.
101. Mei D.; Ma X.; Fu F.; Cao F. 2023. Research status and development prospects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) resources in China. *Forests*, 14: 2461.
102. Mirecki R.M.; Teramura A.H. 1984. Effects of ultraviolet–B irradiance on soybean. V. The dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion. *Plant Physiology*, 74: 475–480.
103. Mohanto K.; Aye A.T. 2024. An analysis of health risk and potential elimination strategies of anti-nutritional factors in cereals and legumes. *Asian Food Science Journal*, 23: 44–51.
104. Naumenko L.; Popova N. 2020. Bioactive substances of sea buckthorn leaves. *NJD-iScience*, 43–41: 38–41.
105. Ngalavu A.; Jiang H.; El–Ashram S.; Tellez–Isaias G.; Farouk M.H.; Nyingwa P.S.; Seidu A.; Tyasi T.L. 2020. Effect of dietary fiber sources on *in-vitro* fermentation and microbiota in monogastrics. *Animals*, 10: 674.
106. Niesteruk A.; Lewandowska H.; Golub Ż.; Świsłocka R.; Lewandowski W. 2013. Zainteresujmy się rokitnikiem. Preparaty z rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) jako dodatki do żywności oraz ocena ich rynku w Polsce. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 62: 571–581.
107. Nogala–Kalucka M.; Rudzinska M.; Zadernowski R.; Siger A.; Krzyzostaniak I. 2010. Phytochemical content and antioxidant properties of seeds of unconventional oil plants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87: 1481–1487.
108. Nybom H.; Ruan C.; Rumpunen, K. 2023. The systematics, reproductive biology, biochemistry, and breeding of Sea Buckthorn – A review. *Genes*, 14: 2120.
109. Ordoñez A.A.L.; Gomez J.G.; Vattuone M.A.; Isla M.I. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) swart extracts. *Food Chemistry*, 97: 452–458.

110. Oser B.L. 1959. An integrated essential amino acid index for predicting biological value of proteins. In Protein and Amino Acid Nutrition; Albanese, A.A., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, pp: 295–311.
111. Pamplona R.; Costantini D. 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. American Journal of Physiology–Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 301: 843–863.
112. Parcheta M.; Świsłocka R.; Orzechowska S.; Akimowicz M.; Choińska R.; Lewandowski W. 2021. Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. Materials, 14: 1984.
113. Pichiah P.T.; Moon H.J.; Park J.E.; Moon Y.J.; Cha Y.S. 2012. Ethanolic extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L) prevents high-fat diet-induced obesity in mice through down-regulation of adipogenic and lipogenic gene expression. Nutrition Research, 32: 856–864.
114. Pomeranz Y.; Meloan C.E. 1994. Carbohydrates. In Food Analysis: Theory and Practice; Pomeranz, Y., Meloan, C.E., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, pp: 625–677, ISBN 978-1-4615-6998-5.
115. Pop R.M.; Weesepeol Y.; Socaciu C.; Pinteana A.; Vincken J.P.; Gruppen H. 2014. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. Food Chemistry, 147: 1–9.
116. Popov I.; Lewin G.; Von Baehr R. 1987. Photochemiluminescent detection of antiradical activity I, Assay of superoxide dismutase. Biochimica et Biophysica Acta, 46: 775–779.
117. Porter L.J.; Hrstich L.N.; Chan B.G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. Phytochemistry, 1: 223–230.
118. Prior R.L. 2015. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. Journal of Functional Foods, 18: 797–810.
119. Pundir S.; Garg P.; Dwiwedi A.; Ali A.; Kapoor V.K.; Kapoor D.; Kulshrestha S.; Ranjan Lal U.; Negi P. 2021. Ethnomedicinal uses, phytochemistry and

- dermatological effects of *Hippophae rhamnoides* L.: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 266: 113434.
120. Qin X.; Zhang T.; Cao Y.; Deng B.; Zhang J.; Zhao J. 2020. Effects of dietary sea buckthorn pomace supplementation on skeletal muscle mass and meat quality in lambs. *Meat Science*, 166: 108141.
121. Qi Q.; Chu M.; Yu X.; Xie Y.; Li Y.; Du Y.; Liu X.; Zhang Z.; Shi J.; Yan N. 2022. Anthocyanins and proanthocyanidins: Chemical structures, food sources, bioactivities, and product development. *Food Reviews International*, 2029479.
122. Radenkovs V.; Püssa T.; Juhneviča–Radenkova K.; Anton D.; Seglina D. 2018. Phytochemical characterization and antimicrobial evaluation of young leaf/shoot and press cake extracts from *Hippophae rhamnoides* L. *Food Bioscience*, 24: 56–66.
123. Re R.; Pellegrini N.; Proteggente A.; Pannala A.; Yang M.; Rice–Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231–1237.
124. Roginsky V.; Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235–254.
125. Rongsen A. 1992. Sea buckthorn a multipurpose plant for Fragile Mountains. ICIMOD Occasional Paper No. 20. International Center for Integrated Mountain Development, Kathmandu, Nepal.
126. Roomi I.; Khan T.; Ali S.; Naqvi A.N. 2015. Investigations into chemical composition and in-sacco degradability of sea–buckthorn leaves for ruminant livestock in Gilgit–Baltistan, Pakistan. *Journal of Business & Economic Statistics*, 7: 97–102.
127. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 767/ 2009 z dnia 13 lipca 2009 r. w sprawie wprowadzania na rynek i stosowania pasz. Dz. U. UE. L.2009.229.1.
128. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1903 2018/1903 z dnia 5 grudnia 2018 r. w sprawie sprostowania załączników IV, VI i VII do rozporządzenia Parlamentu

- Europejskiego i Rady (WE) nr 767/2009 w sprawie wprowadzania na rynek i stosowania pasz oraz w sprawie sprostowania niektórych wersji językowych załączników II, IV, V i VI do tego rozporządzenia. Dz. U. UE. L. 6.12.2018.
129. Sadowska B.; Budzyńska A.; Stochmal A.; Żuchowski J.; Różalska B. 2017. Novel properties of *Hippophae rhamnoides* L. twig and leaf extracts—anti-virulence action and synergy with antifungals studied *in vitro* on *Candida* spp. model. *Microbial Pathogenesis*, 107: 372–379.
130. Salamanca N.; Giráldez I.; Morales E.; De La Rosa I.; Herrera M. 2020. Phenylalanine and tyrosine as feed additives for reducing stress and enhancing welfare in gilthead seabream and meagre. *Animals*, 11: 45.
131. Samolińska W.; Grela E.; Klebaniuk R.; Kiczorowska B.; Kowalczyk–Vasilev E. 2019. Uboczne produkty przemysłu owocowo-warzywnego. W: Powstawanie i zagospodarowanie odpadów generowanych w rolnictwie i przemyśle rolno-spożywczym – stan obecny i perspektywy. Raport 2019. Red. M. Kopik. Europejska Agencja Rozwoju Sp. J. Kopik i wsp.
132. Sapkota T.B.; Khanam F.; Mathivanan G.P.; Vetter S.; Hussain S.G.; Pilat A.L.; Shahrin S.; Hossain M.K.; Sarker N.R.; Krupnik T.J. 2021. Quantifying opportunities for greenhouse gas emissions mitigation using big data from smallholder crop and livestock farmers across Bangladesh. *Science of the Total Environment*, 786: 147344.
133. Saracila M.; Untea A.E.; Panaite T.D.; Varzaru I.; Oancea A–G.; Turcu R.P.; Vlaicu P.A. 2022. Effects of supplementing sea buckthorn leaves (*Hippophae rhamnoides* L.) and chromium (III) in broiler diet on the nutritional quality and lipid oxidative stability of meat. *Antioxidants*, 11: 2220.
134. Scanes C.G. 2022. Carbohydrate metabolism. In *Sturkie’s Avian Physiology*; Colin, G.S., Sami, D., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA; pp: 613–645.
135. Sharma A.; Shukla P.K.; Bhattacharyya A.; Kumar U.; Roy D.; Yadav B.; Prakash A. 2018. Effect of dietary supplementation of sea buckthorn and giloe leaf meal on the body weight gain, feed conversion ratio, biochemical attributes, and meat composition of turkey poults. *Veterinary World*, 11: 93.

136. Sheikh G.G.; Majeed G.; Ajaz A.G. 2011. Nutritional evaluation of some tree leaves, feeds and fodders of Ladakh. *Indian Journal Animal Nutrition*, 28: 427–431.
137. Singh D.N.; Shukla P.K.; Bhattacharyya A.; Roy D.; Singh Y.; Rout P.K. 2020. Effect of dietary supplementation of sea buckthorn leaf meal in coloured breeder and their post hatch chicks on growth performance and serum biochemical attributes during summer season. *Indian Journal of Animal Research*, 54: 1505–1511.
138. Skalski B.; Kontek B.; Lis B.; Olas B.; Grabarczyk Ł.; Stochmal A.; Żuchowski J. 2019. Biological properties of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson twig and leaf extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19: 148.
139. Sławińska N.; Żuchowski J.; Stochmal A.; Olas B. 2023. Extract from sea buckthorn seeds – a phytochemical, antioxidant, and hemostasis study; effect of thermal processing on its chemical content and biological activity *in vitro*. *Nutrients*, 15: 686.
140. Su X.; Griffin J.; Xu J.; Ouyang P.; Zhao Z.; Wang W. 2019. Identification and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato leaves. *Heliyon*, 5.
141. Suomela J.P.; Ahotupa M.; Yang B.; Vasankari T.; Kallio H. 2006. Absorption of flavonoids derived from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and their effect on emerging risk factors for cardiovascular disease in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7364–7369.
142. Suryakumar G.; Gupta A. 2011. Medicinal and therapeutic potential of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 138: 268–278.
143. Sytařová I.; Orsavová J.; Snopek L.; Mlček J.; Byczyński Ł.; Mišurcová L. 2020. Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times. *Food Chemistry*, 310: 125784.
144. Tambe V.D.; Bhambar R.S. 2014. Estimation of total phenol, tannin, alkaloid and flavonoid in *Hibiscus tiliaceus* Linn. wood extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2: 41–47.

145. Tapia–Quirós P.; Granados M.; Sentellas S.; Saurina J. 2024. Microwave–assisted extraction with natural deep eutectic solvents for polyphenol recovery from agrifood waste: Mature for scaling–up? *Science of the Total Environment*, 912: 168716.
146. Teleszko M.; Wojdyło A.; Rudzinska M.; Oszmianski J.; Golis T. 2015. Analysis of lipophilic and hydrophilic bioactive compounds content in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 4120–4129.
147. Tian Y.; Puganen A.; Alakomi H.L.; Uusitupa A.; Saarela M.; Yang B. 2018. Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. *Food Research International*, 106: 291–303.
148. Tian J.; Jiang Q.; Bao X.; Yang F.; Li Y.; Sun H.; Yao K.; Yin Y. 2023. Plant–derived squalene supplementation improves growth performance and alleviates acute oxidative stress-induced growth retardation and intestinal damage in piglets. *Animal Nutrition*, 15: 386–398.
149. TIBCO Software. TIBCO. Available online: <https://www.scribd.com/document/321061529/STATISTICA-Electronic-Manual> (dostęp: 30.03.2024).
150. Tkacz K.; Wojdyło A.; Turkiewicz I.P.; Ferreres F.; Moreno D.A.; Nowicka P. 2020. UPLC-PDA-Q/TOF-MS profiling of phenolic and carotenoid compounds and their influence on anticholinergic potential for AChE and BuChE inhibition and on-line antioxidant activity of selected *Hippophaë rhamnoides* L. cultivars. *Food Chemistry*, 309: 125766.
151. Tkacz K.; Wojdyło A.; Turkiewicz I.P.; Nowicka P. 2021. Triterpenoids, phenolic compounds, macro–and microelements in anatomical parts of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries, branches and leaves. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103: 104107.
152. Tolkachev O.N.; Abizov E.A.; Abizova E.V.; Mal’Tsev S.D. 2008. Phytochemical study of the bark of some plants of the *Elaeagnaceae* family as a natural source of β -carboline indole alkaloids. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42: 630–632.

153. Trivedi V.L.; Attri D.C.; Bahukhandi A.; Nautiyal M.C.; Sati J. 2022. Seabuckthorn (*Hippophae salicifolia*) leaves, a good source of natural antioxidant compounds. *National Academy Science Letters*, 45: 195–198.
154. Upadhyay N.K.; Kumar Y.; Gupta A. 2010. Antioxidant, cytoprotective, and antibacterial effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 3443–3448.
155. URL 1. <https://www.gov.pl/web/zdrowie/jak-sie-chronic-przed-rakiem> (dostęp: 20.08.2024).
156. Valko M.; Jomova K.; Rhodes C.J.; Kuča K.; Musilek K. 2016. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*, 90: 1–37.
157. Van Soest P.J.; Robertson J.B.; Lewis B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583–3597.
158. Vashishtha V.; Barhwal K.; Kumar A.; Hota S.K.; Chaurasia O.P.; Kumar B. 2016. Effect of seabuckthorn seed oil in reducing cardiovascular risk factors: A longitudinal controlled trial on hypertensive subjects. *Clinical Nutrition*, 36: 1231–1238.
159. Vilas-Franquesa A.; Saldo J.; Juan B. 2020. Potential of sea buckthorn-based ingredients for the food and feed industry – A review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2: 17.
160. Visioli F.; Hagen T.M. 2007. Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: Focus on micronutrients. *Pharmacological Research*, 55: 199–206.
161. Vlaicu P.A.; Panaite T.D.; Olteanu M.; Ropota M.; Criste V.; Vasile G.; Grosu I. 2017. Production parameters, carcass development and blood parameters of the broiler chicks fed diets which include rapeseed, flax, grape and buckthorn meals. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 50: 37–45.

162. Wang K.; Xu Z.; Liao X. 2022a. Bioactive compounds, health benefits and functional food products of sea buckthorn: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62: 6761–6782.
163. Wang N.; Wen X.; Gao Y.; Lu S.; Li Y.; Shi Y.; Yang Z. 2022b. Identification and characterization of the bioactive polyphenols and volatile compounds in sea buckthorn leaves tea together with antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. *Frontiers in Nutrition*, 9: 890486.
164. Wei J.; Li S.; Su T.; Zhao J.; Jiang Y.; Zubarev Y. A.; Bi Y. 2022. Phenolic compositions and antioxidant activities of *Hippophae tibetana* and *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* berries produced in Qinghai–Tibet Plateau. *Food Chemistry*, 15: 100397.
165. Wei J.; Su T.; Su H.; Jiang Y.; Li J.; Bi Y. 2022. Comparative assessment of phenolics, antioxidant and antiproliferative activities between *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* and *H. tibetana* leaf in Qinghai–Tibet Plateau. *Food Bioscience*, 46: 101507.
166. Woodruff R.C.; Tong X.; Wadhera R.K.; Loustalot F.; Jackson S.L.; Vaughan A.S. 2024. Cardiovascular disease mortality disparities in black and white adults, 2010–2022. *American Journal of Preventive Medicine*, 66: 914–916.
167. Xing J.; Yang B.; Dong Y.; Wang B.; Wang J.; Kallio H.P. 2002. Effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed and pulp oils on experimental models of gastric ulcer in rats. *Fitoterapia*, 73: 644–650.
168. Yan Y.; Ding Z.; Liang N.; Zhang K.; Yue L.; Li W.; Song X. 2023. Effect of dietary sea buckthorn pomace supplementation on growth performance, serum biochemical, immune, and antioxidant indexes in weaned piglets. *Pakistan Journal of Zoology*, 1–8.
169. Yang B.; Kallio H. 2002. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophae*) lipids. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 160–167.
170. Yang W.; Laaksonen O.; Kallio H.; Yang B. 2016. Proanthocyanidins in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different origins with special

- reference to the influence of genetic background and growth location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64: 1274–1282.
171. Zakyntinos G.; Varzakas T. 2015. *Hippophae rhamnoides*: Safety and nutrition. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 3: 89–97.
172. Zielinska D.; Wiczowski W.; Piskula M.K. 2008. Determination of the relative contribution of quercetin and its glucosides to the antioxidant capacity of onion by cyclic voltammetry and spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 3524–3531.
173. Żuchowski J. 2023. Phytochemistry and pharmacology of sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides*; syn. *Hippophae rhamnoides*): Progress from 2010 to 2021. *Phytochemistry Reviews*, 22: 3–33.

9. Spis tabel i rycin

9.1. Spis tabel

Tabela 1. Podstawowy skład chemiczny badanego suszu liści rokitnika zwyczajnego	34
Tabela 2. Frakcje włókna pokarmowego (g/100 g s.m.) w badanym suszu liści rokitnika zwyczajnego	37
Tabela 3. Zawartość aminokwasów egzogennych (g/16 g N) w badanym suszu liści rokitnika zwyczajnego	40
Tabela 4. Zawartość aminokwasów endogennych (g/16 g N) w badanym suszu liści rokitnika zwyczajnego	40
Tabela 5. Wartość odżywcza białka badanego suszu liści rokitnika zwyczajnego	41
Tabela 6. Zawartość polifenoli ogółem oraz aktywność antyoksydacyjna (w 1 g s.m.) badanego suszu liści rokitnika zwyczajnego	46
Tabela 7. Aktywność antyoksydacyjna wyrażona jako RSA(%)	48
Tabela 8. Zawartość flawonoidów i tanin ogółem (w 1 g s.m.) w badanym suszu liści rokitnika zwyczajnego	51
Tabela 9. Zawartość metabolitów wtórnych ($\mu\text{g}/1 \text{ g s.m.}$) w badanym suszu liści rokitnika zwyczajnego	54
Tabela 10. Istotność statystyczna (p) współczynników korelacji r-Pearsona (n=12)	58
Tabela 11. Wartości współczynników korelacji r-Pearsona (n=12)	59

9.2. Spis rycin

Rycina 1. Współrzędne czynnikowe zmiennych (A) i przypadków (B) dla podstawowych składników chemicznych i frakcji włókna pokarmowego liści rokitnika zwyczajnego w układzie współrzędnych pierwszej pary składowych	37
Rycina 2. Współrzędne czynnikowe zmiennych (A) i przypadków (B) dla aminokwasów egzogennych liści rokitnika zwyczajnego w układzie współrzędnych pierwszej pary składowych	42
Rycina 3. Współrzędne czynnikowe zmiennych (A) i przypadków (B) dla polifenoli ogółem i testów aktywności antyoksydacyjnej w układzie współrzędnych pierwszej pary składowych	49
Rycina 4. Współrzędne czynnikowe zmiennych (A) i przypadków (B) dla składników bioaktywnych w układzie współrzędnych pierwszej pary składowych	55

10. Wykaz załączników

10.1. Załącznik 1

Publikacja [P-1]: Chemical composition and nutritive value of sea buckthorn leaves.

10.2. Załącznik 2

Publikacja [P-2]: Sea buckthorn leaves as a potential source of antioxidant substances.

10.3. Załącznik 3



Oświadczenia współautorów o udziale w przygotowaniu publikacji.

Załącznik 1.

Publikacja [P-1]: Chemical composition and nutritive value of sea buckthorn leaves

Article

Chemical Composition and Nutritive Value of Sea Buckthorn Leaves

Paulina Boško¹, Wioletta Biel^{1,*} , Robert Witkowicz²  and Ewa Piątkowska^{3,*}

¹ Department of Monogastric Animal Sciences, Division of Animal Nutrition and Food, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin, Poland; paulina.bosko@zohomail.eu

² Department of Agroecology and Crop Production, University of Agriculture in Krakow, Mickiewicza 21, 31-120 Krakow, Poland; robert.witkowicz@urk.edu.pl

³ Department of Human Nutrition and Dietetics, Faculty of Food Technology, University of Agriculture in Krakow, Balicka 122, 30-149 Krakow, Poland

* Correspondence: wioletta.biel@zut.edu.pl (W.B.); e.piatkowska@urk.edu.pl (E.P.)

Abstract: Sea buckthorn leaves (SBT_LVs) form notable by-product during harvesting and post-harvest management of the berries. It is already known that sea buckthorn berries are important for their chemical composition and based on this, they occupy a wide field in nutrition. SBT_LVs also have a rich chemical composition, like the berries. The aim of this study was to describe these by-products in the context of protein and complex carbohydrates–dietary fiber fractions, including qualitative and quantitative composition of amino acids. Proximate composition, amino acids, nutritional values of the protein, and dietary fiber fractions of SBT_LVs of four cultivars (cvs.) Ascola, Habego, Hergo, and Leikora were assessed. SBT_LVs from different years of the study had statistically different levels of crude protein, ether extract, crude ash, and nitrogen-free extract (NFE), confirming that the quality of the raw material (leaves) can be significantly modified by habitat conditions. The largest fraction of dietary fiber was neutral detergent fiber (NDF), including the sum of hemicellulose, cellulose, and lignin, followed by the acid detergent fiber fraction (ADF), consisting of lignin and cellulose. The content of essential amino acids in SBT_LV protein was high. Overall, this study confirms that SBT_LVs hold promise as a valuable resource for use as a food ingredient, functional food, and dietary supplement for both humans and animals.

Keywords: *Hippophae rhamnoides* L.; by-products; proximate composition; genotype; amino acids; chemical score; essential amino acids index; dietary fiber



Citation: Boško, P.; Biel, W.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Chemical Composition and Nutritive Value of Sea Buckthorn Leaves. *Molecules* **2024**, *29*, 3550. <https://doi.org/10.3390/molecules29153550>

Academic Editors: Federica Intorre, Eugenia Venneria and Raffaella Comitato

Received: 4 July 2024
Revised: 24 July 2024
Accepted: 25 July 2024
Published: 28 July 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The world population is rapidly increasing, so that we need to increase global food production by 70–100% in order to feed the world in 2050 (for a population of 10 billion) [1,2]. This phenomenon will have serious consequences, including an additional increase in global greenhouse gas (GHG) emissions resulting from livestock production (pork, chicken meat, beef, dairy, and eggs) [3]. Sustainable development goals (SDGs) are the only way for mankind to survive, minimize negative effects on the environment, and keep the planet's population healthy. An increase of 50% in animal feed is necessary; thus, to save the forests, it is extremely important to study the huge amounts of agricultural by-products and use these in the best way possible for animal feed and food. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.), which belongs to the *Elaeagnaceae* family, is an ornamental shrub that is used for soil reclamation and improvement due to its ability to fix nitrogen through its roots [2,4]. It is a plant that contains many valuable nutrients and bioactive substances. For centuries, sea buckthorn (SBT) has been used in folk medicine in different parts of the world. In ancient Tibet, it was used for gastrointestinal disorders; in Mongolia, it was used as a sedative; the Greeks used it as a veterinary remedy [5–7]. In 2018, the eighth

international conference dedicated entirely to sea buckthorn was held in China, indicating a clear growing interest in this plant [8,9]. Sea buckthorn fruit, pulp, and seed oil are widely used in human nutrition (in various forms, from raw to juices, jams, and oils) and are popular feed additives in livestock feeding [10–12]. Sea buckthorn leaf is a by-product of sea buckthorn cultivation and is usually discarded as waste. However, not only sea buckthorn berries, but also the leaves of this plant (both fresh and dried) have been recognized as a valuable source of nutrients and bioactive compounds [13–15]. An interesting process of change in the food industry is currently taking place in technologies related to the processing of plant by-products [16]. This includes, for example, the pomace left over from the pressing of juice and seeds [17]. Companies use broccoli leaves and stalks as additives in herbal infusions. Agro-food waste still contains high amounts of essential nutrients. Experimental results have shown that sea buckthorn leaves and twigs significantly reduce oxidative stress levels, in part due to the presence of proanthocyanidins [18]. The use of SBT_LVs in animal feed can be practiced to obtain value-added animal products and contribute to the circular economy [19,20]. In the light of the fact that food waste is a global problem, using all parts of vegetables and fruits is the most adequate sustainable solution. A sustainable bio-economy requires that by-products and side-streams in agricultural and food production are reinserted into the value cycle, a concept also called valorization or upcycling. The concept constitutes an important sustainability-oriented innovation practice contributing to waste reduction and efficient resource use. SBT_LVs are a valuable raw material, not only because of their content of bioactive compounds and their antioxidant properties but also because they can serve as a partial replacement for previously typical protein sources, especially in livestock nutrition [21]. Various parts of the sea buckthorn plant (woody verdure, seeds, leaves, barks, branches) have a high protein content compared with other berry plants' leaves [22], but the most considerable amounts of protein (14–25 g/100 g dry matter) are found in sea buckthorn leaves, and for this reason, they are used as an unconventional source of protein in animals and human food [23,24]. Based on the results of experiments [25], SBT_LVs should be harvested from late July to early August since leaf protein content peaks around this period of time and starts to decline significantly by the middle of August. SBT_LVs are a source of protein and valuable amino acids such as lysine, methionine, and cysteine [14,26]. Thus, SBT_LVs are promising for the creation of drugs and dietary supplements [27]. In addition, one of the important health-promoting aspects of sea buckthorn leaves is their high fiber content [24]. Dietary fibers, such as mainly non-digestible carbohydrates, are one of the most heterogeneous groups of compounds that are found in natural resources, providing various health-promoting effects via regulating gut microbial composition [28]. SBT_LVs can be considered as a source of dietary fiber and other valuable nutrients contributing to health promotion. Therefore, the aim of this research was to assess the chemical composition of SBT_LVs, with particular emphasis on (1) protein and the qualitative and quantitative composition of amino acids, and (2) complex carbohydrates–dietary fiber fractions.

2. Results and Discussion

Sea buckthorn products are reported to be a source of nutrients and biologically active substances [29,30], but the specific cultivar and year of harvest are important factors that affect the content and composition of SBT_LVs. For these reasons, this study investigated the chemical composition of SBT_LVs from four cultivars from three harvest years.

The contents of basic nutritive components in the examined SBT_LVs are illustrated in Table 1. SBT_LVs from different years of the study had statistically different levels of crude protein, ether extract, crude ash, and nitrogen-free extract (NFE), confirming that the quality of the raw material (leaves) was significantly modified by habitat conditions. SBT_LVs are good sources of crude protein (CP) (from 15.66 to 20.77 g/100 g DM). SBT_LVs are considered to be a good source of protein, with differed significantly between the studied cultivars (Table 1). Leaves of the Hergo cv. contained 17.18 g CP/100 g DM, while in the leaves of the Habego cv., the value was 19.08 g/100 g DM (Table 1). In the study

by Liang et al. [31], the CP content ranged from only 13.5 g/100 g DM in sea buckhorn branches to 17.5 g/100 g DM in leaves. Jaroszewska and Biel [24] reported as much as 24.97 g CP in 100 g DM of SBT leaves.

Table 1. Chemical composition of SBT¹ leaves.

Factor	Factor Level	DM ² g/100 g	CP	EE	CF g/100 g DM	CA	NFE
Year	2014	95.14 b ³	20.77 c	6.87 c	10.47 a	5.76 c	56.14 a
	2015	95.35 c	15.66 a	5.35 b	10.50 a	4.06 a	64.43 c
	2016	92.98 a	18.34 b	5.00 a	11.90 b	5.21 b	59.55 b
Cultivar	Ascola	94.22 a	18.76 c	5.29 a	12.14 c	5.19 b	58.61 a
	Hergo	94.22 a	17.18 a	5.84 b	10.21 b	4.69 a	61.49 b
	Habego	94.65 b	19.08 c	5.97 b	11.88 c	5.09 b	57.97 a
	Leikora	94.86 c	18.00 b	5.84 b	9.59 a	5.07 b	61.49 b

¹ SBT—sea buckthorn; ² DM—dry matter, CP—crude protein, CF—crude fiber, EE—ether extract, CA—crude ash, NFE—nitrogen free extract; ³ means with at least one same letter (a, b, c) did not differ statistically at $p = 0.05$ (for all columns and factors separately).

One special feature of sea buckthorn berry is the high oil content in the soft parts, in addition to the oil found in the seeds [32,33]. SBT_LVs are also a source of raw fat, which is well absorbed by human and animal bodies [20]. Leaves of SBT contained up to 6.87 g EE in 100 g DM. The Ascola cv. contained significantly less crude fat (as EE) than other cultivars (5.29% and 5.84–5.97% DM, respectively). The obtained results were consistent with an earlier study by Jaroszewska and Biel [24], who reported a 5.31–5.67% fat level in SBT_LVs.

The main components of dry matter in SBT_LVs are carbohydrates (CHOs)—total carbohydrates (TC) as NFE and crude fiber (CF). CHOs perform numerous essential roles in living organisms, monosaccharides being the major source of energy for human and animals metabolism, and polysaccharides serving as stores of energy and structural components [34,35]. NFE consisting of simple sugars (mono- and disaccharides), digestible starch and hydrolysis products, dextrans, and organic acids comprised the dominant share of the dry matter. The tested leaves contained on average 60% DM of NFE. Crude fiber included the sum of fibrous substances (cellulose, lignin, hemicellulose, etc.) resistant to enzymes of the digestive tract. In the studied SBT_LVs, we measured from 9.59% (Leikora cv.) to 12.14% DM (Ascola) crude fiber. The samples collected in the first year of the experiment showed significantly least CF (10.47% DM) and most CP (20.77% DM). In an earlier study, Sheikh et al. [36] found as much as 15% DM of CF.

Currently, increasing attention is being paid to nutrient components that are difficult for the monogastric gastrointestinal tract to digest, called dietary fiber. Dietary fiber (DF) has the ability to escape digestion and absorption in the small intestine, which makes it able to affect the way other nutrients are absorbed and metabolized in the gastrointestinal tract. The functionality attributed to fiber varies based on chemical and physical structure [37], and most of the time, it is hard to make a clear differentiation among attributes due to the complexity of carbohydrates found in common feedstuffs and food for humans. The physiological functions of different dietary fibers depend to a great extent on their physicochemical characteristics, one of which is solubility [38,39]. Different reports regard DF either as a functional component for normal digestive organ functioning for organisms [40–42] or as an antinutrient [43,44]. As a result of the use of different definitions and assay methods in research on dietary fiber, considerable problems are encountered when attempting to determine its actual level in food. For this reason, it is crucial to define not only the total level of dietary fiber in the diet, but also its fractional composition, since individual fractions are characterized by diverse action in the human body. Therefore, in our study, we determined the share of neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), acid detergent lignin (ADL), hemicellulose (HCEL), and cellulose (CEL) fractions (Table 2).

Table 2. Dietary fiber fractions of SBT¹ leaves (g/100 g DM²).

Factor	Factor Level	NDF ³	ADF	ADL	HCEL	CEL
Year	2014	31.61 c ⁴	20.81 c	6.18 b	10.80 b	14.64 c
	2015	25.61 b	18.63 b	6.55 c	6.99 a	12.08 b
	2016	21.06 a	13.79 a	5.09 a	7.28 a	8.70 a
Cultivar	Ascola	27.37 c	18.90 b	6.02 a	8.47 a	12.88 b
	Hergo	24.38 a	15.92 a	5.75 a	8.47 a	10.17 a
	Habego	25.97 b	18.47 b	6.08 a	7.50 a	12.38 b
	Leikora	26.67 b c	17.68 b	5.90 a	8.98 a	11.78 b

¹ SBT—sea buckthorn; ² DM—dry matter; ³ NDF—neutral detergent fiber, ADF—acid detergent fiber, ADL—acid detergent lignin, HCEL—hemicellulose, CEL—cellulose; ⁴ means with at least one same letter (a, b, c) did not differ statistically at $p = 0.05$ (for all columns and factors separately).

The largest fraction was NDF, which included the sum of hemicellulose, cellulose, and lignin, followed by ADF, consisting of lignin and cellulose. SBT_LVs were characterized by low ADL and HCEL levels. Leaves of the Ascola cv. were characterized by significantly higher levels of NDF fractions.

The results obtained in the present study confirmed earlier studies of the proportion of dietary fiber fraction in SBT_LVs [24,36,45]. Substances that are part of nutritive fiber show medicinal properties used for limiting obesity, diabetes, and sclerosis. Obesity is a worldwide epidemic conferring a major public health challenge, placing increased economic burden on healthcare systems, and is the fifth leading global cause of death from cardiovascular disease and cancer [46]. Dietary fiber supplementation represent a new paradigm with great potential to enhance weight management efficacy. Studies suggested that SBT_LVs ameliorate the deleterious effects of diet-induced obesity and its metabolic complications such as adiposity, dyslipidemia, inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance [47].

The PCA analysis carried out confirmed the variation in the chemical composition of the leaves of the studied sea buckthorn cultivars from different growing seasons. The climatic conditions seem to have had a dominant effect on the chemical composition of the leaves, which was confirmed by the proposed grouping shown in Figure 1A,B. This observation weakened the need for a thorough analysis of the chemical composition of the leaves of the sea buckthorn cultivars. A certain disturbance to this thesis was the location of the 'Leikora 2016' case in the neighborhood of the 2015 cases. The 2015 raw material was more abundant in NFE and ADL. In contrast, the 2014, especially the Leikora and Ascola cvs., was characterized by EE, HCEL, and NDF and a high positive correlation between EE and HCEL. On the other hand, in 2016, the Hergo, Ascola, and Habego cvs. contained significantly more CF.

Proteins are made up of 20 amino acids. There are few studies in the literature on the amino acid content and quality of SBT_LVs. Tables 3–5 and Figure 2 show the amino acid profile in the examined SBT_LVs and the protein nutritive value. Nutritionally, amino acids are divided into three groups—essential, non-essential, and semi-essential. Out of 20 amino acids, a human being or an animal can synthesize only some of these (NEAAs, non-essential amino acids). Semi-essential amino acids (SEAAs) are synthesized by the body but are designated essential during periods of stress. Nine amino acids, including histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan, and valine, are classified as essential amino acids (EAAs) because they cannot be synthesized by human or other mammalian cells [48,49]. Arginine is regarded as an EAA in birds and fish. The content of essential amino acids in the protein of the SBT_LVs was high. In most cases, there was no significant difference between the cultivar tested in the levels of both EAAs and NEAAs. (Tables 3 and 4). Average EAAs in the protein of SBT leaves in our own experiments amounted to 80.67 g/16 g N for a mature human (MH) and 66.96 g/16 g N for animals (without His) (Table 5). In comparison to the standards for humans and animals (MH and WE), Trp turned out to be the first amino acid (CS) limiting the quality of SBT_LV proteins in all examined samples (Tables 3 and 5). A high content of essential amino acids

(EAAs) was reflected in EAAI results, which ranged in relation to the human standard from 73 to 81% and to the animal standard from 58 to 67% (Table 5). The PCA analysis carried out on the amino acid composition of the raw material no longer allowed the cases to be grouped mainly on the basis of the growing season as clearly as the previous PCA analysis (for the basic composition). This was particularly evident in the arrangement of the 2014 cases (individual cultivars). The raw material obtained from the Habego and Ascola cultivars was clearly characterized by a higher amino acid composition (Figure 2A,B). The leaves of these cultivars were characterized by a higher content of Val, Ile, Cys, Met, and Tyr in comparison to the leaves of the Hergo and Leikora cultivars. Other observations from this analysis included the higher tryptophan content in the leaves from 2015 and the clear negative correlation of this amino acid with Thr, Lys, His, and Phe.

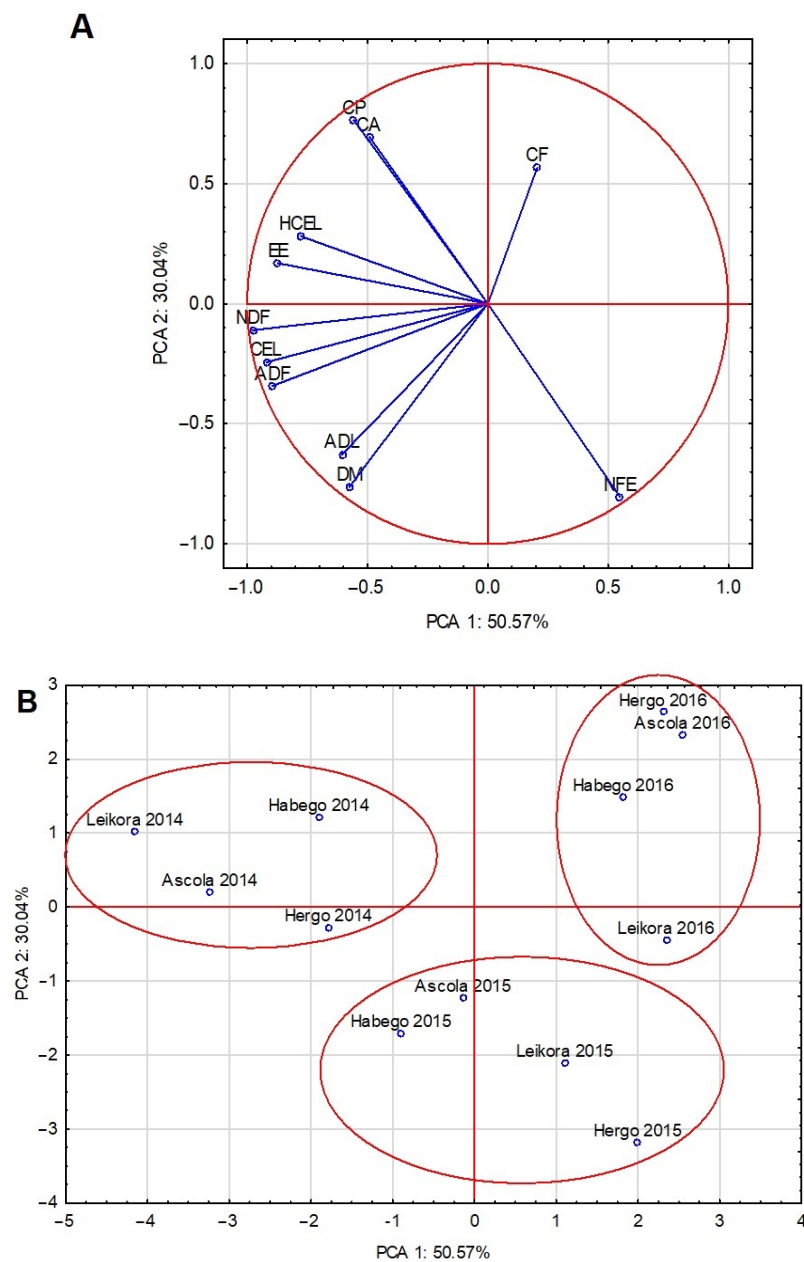


Figure 1. The first two principal component axes for chemical composition and fiber components in SBT_LVs for the variables (A) and for the scores (B); DM—dry matter, CP—crude protein, CF—crude fiber, EE—ether extract, CA—crude ash, NFE—nitrogen free extract, NDF—neutral detergent fiber, ADF—acid detergent fiber, ADL—acid detergent lignin, HCEL—hemicellulose, CEL—cellulose.

Table 3. Essential amino acids (g/16 g N) of SBT¹ leaves.

Factor	Factor Level	Lysine	Sulfur-Containing Amino Acids		Threonine	Isoleucine	Tryptophan	Valine	Leucine	Histidine	Aromatic Amino Acid	
			Methionine	Cystine							Phenylalanine	Tyrosine
Year	2014	5.24 b ²	7.93 a	1.22 b	4.49 b	3.62 b	0.27 a	4.37 b	7.19 c	2.02 c	4.18 b	3.00 a
	2015	3.90 a	7.62 a	0.92 a	3.07 a	2.83 a	0.42 c	3.66 a	4.81 a	1.17 a	3.34 a	2.78 a
	2016	4.88 b	8.07 a	1.23 b	3.97 b	3.14 a b	0.37 b	4.15 a b	6.18 b	1.93 a b	3.86 b	2.93 a
Cultivar	Ascola	4.70 a	7.86 a	1.19 a b	3.93 a	3.45 a	0.31 a	4.22 a	6.18 a	2.09 a	3.91 a	3.30 b
	Hergo	4.51 a	7.69 a	0.91 a	3.73 a	2.81 a	0.45 b	3.99 a	5.91 a	1.82 a	3.76 a	2.25 a
	Habego	4.82 a	8.25 a	1.28 b	4.16 a	3.24 a	0.33 a	4.04 a	6.60 a	1.88 a	3.82 a	3.26 b
	Leikora	4.66 a	7.70 a	1.10 a b	3.55 a	3.28 a	0.31 a	3.99 a	5.55 a	1.82 a	3.68 a	2.80 a b

¹ SBT—sea buckthorn; ² means with at least one same letter (a, b, c) did not differ statistically at $p = 0.05$ (for all columns and factors separately).

Table 4. Non-essential amino acids (g/16 g N) of SBT¹ leaves.

Factor	Factor Level	Aspartic Acid	Serine	Glutamic Acid	Proline	Glycine	Alanine	Arginine
Year	2014	10.55 c ²	4.12 c	8.87 a	4.79 c	5.31 c	2.87 a	4.26 a
	2015	6.19 a	2.88 a	8.88 a	3.22 a	3.52 a	2.91 a	4.65 a
	2016	8.39 b	3.50 b	9.00 a	4.00 b	4.43 b	2.93 a	4.45 a
Cultivar	Ascola	8.35 a	3.37 a b	9.30 a	3.51 a	4.41 a b	2.79 a	4.37 a
	Hergo	8.07 a	3.73 b c	8.63 a	4.34 b	4.42 a b	3.02 a	5.01 a
	Habego	9.02 b	4.01 c	8.46 a	4.03 a b	4.78 b	3.07 a	4.31 a
	Leikora	8.08 a	2.89 a	9.29 a	4.14 a b	4.06 a	2.73 a	4.13 a

¹ SBT—sea buckthorn; ² means with at least one same letter (a, b, c) did not differ statistically at $p = 0.05$ (for all columns and factors separately).

Table 5. Nutritional values of protein of SBT¹ leaves.

Factor	Factor Level	EAAI ² MH ⁵	EAAI WE ⁶	CS ³ MH	CS WE	EAAAs ⁴ MH	EAAAs WE
Year	2014	41.51 b ⁷	43.52 b	26.87 a	15.81 a	80.67 b	66.96 b
	2015	33.35 a	35.11 a	42.02 c	24.72 c	72.45 a	57.94 a
	2016	38.77 b	40.70 b	34.43 b	20.82 b	80.11 b	64.75 b
Cultivar	Ascola	39.05 a	41.14 a	30.79 a	18.11 a	78.37 a	64.90 a
	Hergo	36.03 a	37.84 a	42.70 b	25.87 b	77.86 a	62.27 a
	Habego	39.80 a	41.68 a	33.17 a	19.51 a	78.85 a	64.71 a
	Leikora	36.63 a	38.45 a	31.12 a	18.30 a	75.91 a	60.99 a

¹ SBT—sea buckthorn; ² EAAI, essential amino acid index; ³ CS, chemical score of restrictive amino acid(s); ⁴ EAAAs—essential amino acids; ⁵ ME—mature human protein standards; ⁶ WE—whole egg protein standards; ⁷ means with at least one same letter (a, b, c) did not differ statistically at $p = 0.05$ (for all columns and factors separately).

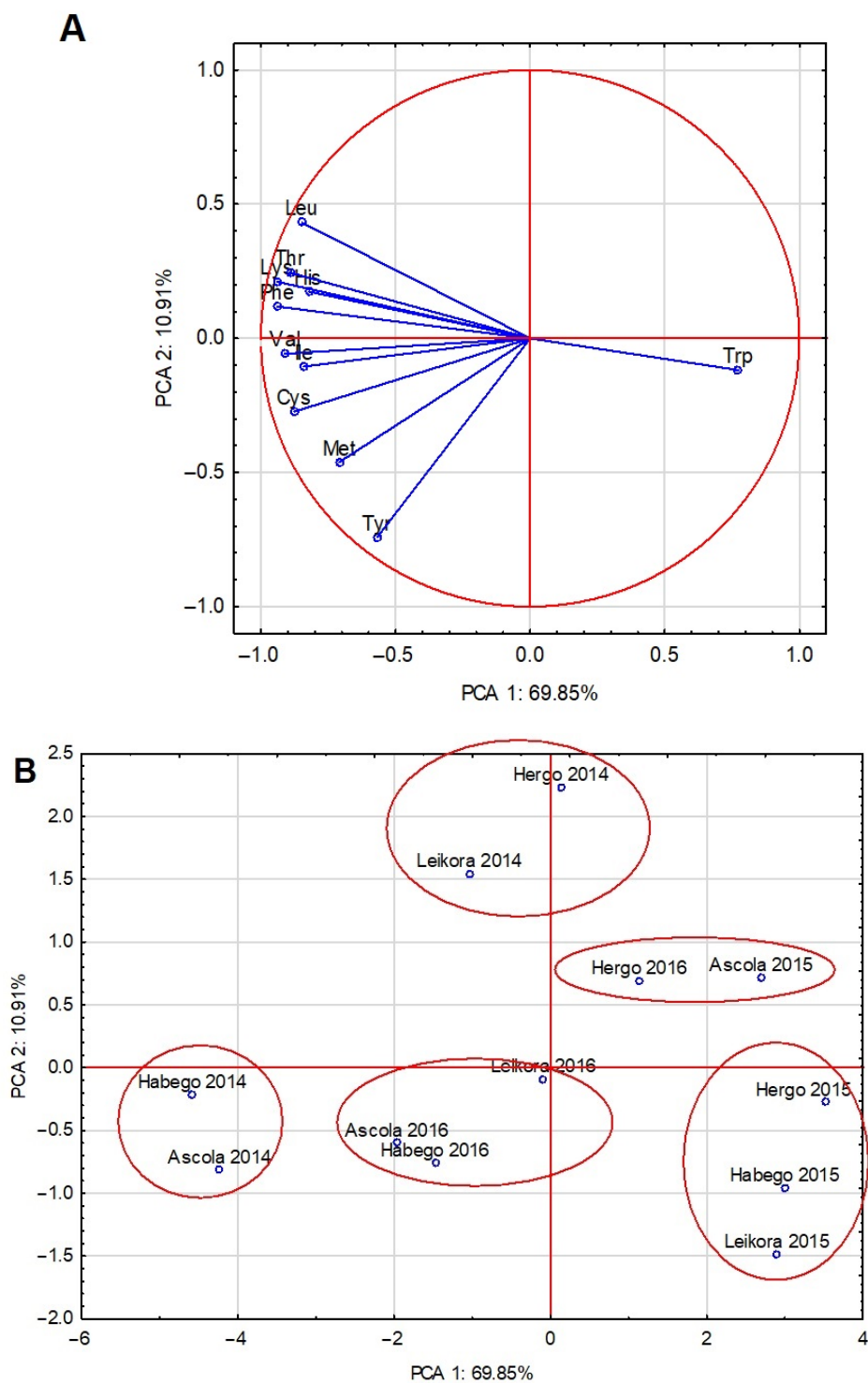


Figure 2. The first two principal component axes for essential amino acids in SBT_LVs for the variables (**A**) and for the scores (**B**); Lys—lysine, Met—methionine, Cys—cysteine, Thr—threonine, Ile—ileucine, Trp—tryptophan, Val—valine, Leu—leucine, His—histidine, Phe—phenylalanine, Tyr—tyrosine.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

The leaves of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) of four cultivars (cvs.) Ascola, Habego, Hergo, and Leikora were collected from an experiment conducted at the Agri-

cultural Experimental Station in Lipnik belonging to the West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Poland (53° 42' N, 14° 97' S), in 2014–2016. The leaves for analysis were taken at full maturity of berries (which was the period from the 1st to the 15th of August). Leaves were weighed and dried at room temperature (18–22 °C) for 3–4 days. Samples were ground to 0.1 mm by use of a KNIFETEC 1095 laboratory mill (Foss Tecator, Höganäs, Sweden).

3.2. Chemical Analyses

3.2.1. Proximate Composition

The chemical composition was determined according to the Association of Official Analytical Chemists [50]. Samples were dried at 105 °C to a constant weight to determine dry matter (method 945.15). Crude protein (N × 6.25, CP) (method 945.18) was analyzed by the Kjeldahl method, using a Büchi Scrubber B414 unit and a Büchi 324 distillation set (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). Crude fat (as an ether extract, EE) was analyzed by the Soxhlet extraction method with diethyl ether (method 2003.06). Crude fiber (CF) (method 962.09) was determined using an ANKOM220 Fiber Analyzer (ANKOM Technology, New York, NY, USA). Crude ash (CA) (method 920.153) was measured by burning in a muffle furnace at 580 °C for 8 h. Nitrogen-free extract (NFE) was estimated according to the following calculation [51]:

$$\text{NFE (\%)} = 100 - \% (\text{moisture} + \text{crude protein} + \text{crude fat} + \text{crude ash} + \text{crude fibre}) \quad (1)$$

All determinations were expressed on a dry matter basis.

3.2.2. Amino Acids

Amino acids were determined using an AAA 400 automatic amino acid analyzer (INGOS, Prague, Czech Republic). Samples were subjected to acid hydrolysis in the presence of 6 M HCl at 105 °C for 24 h. Sulphur-containing amino acids were determined separately in 6 M HCl after oxidative hydrolysis (formic acid þ hydrogen peroxide, 9:1 v/v, 20 h at 4 °C). Tryptophan was determined according to the method described in AOAC [52]. Amino acid determinations were expressed on a g/16 g N basis, equivalent to g/100 g of protein.

3.2.3. Estimation of Nutritive Values of SBT Protein

Chemical score (CS) was calculated on the basis of a procedure described by Block and Mitchell [53] based on comparison of the concentration ratio of the amino acid having the shortest supply (a_i) (received amino acid) to that of this amino acid in a standard (a_s) ($\text{CS} = (a_i/a_s)/100$). Two standards were used: amino acids of the food protein composition appropriate for a mature human (MH) [54,55] and amino acid composition of whole egg protein (WE) [56], considered a complete and balanced food and fodder protein.

Recommended levels of essential amino acid were as follows: Lys—5.5 and 7.0 g/16 g N, Met + Cys—3.5 and 5.7 g/16 g N, Thr—4.0 and 4.7 g/16 g N, Ile—4.0 and 5.4 g/16 g N, Trp—1.0 and 1.7 g/16 g N, Val—5.0 and 6.6 g/16 g N, Leu—7.0 and 8.6 g/16 g N, His—0 and 2.2 g/16 g N, and Phe + Tyr—6.0 and 9.3 g/16 g N, respectively, for mature human and egg protein standards [54–56].

Essential amino acids (EAAs) were estimated in accordance with Oser [57] in terms of the geometric mean of all the concentrations of participating essential amino acids compared with the concentration of the corresponding standard (in g/16 g N):

$$\text{EAA} = \sqrt[n]{a_1/a_{1s} \times 100 \times \dots \times a_n/a_{ns} \times 100} \quad (2)$$

where n is the number of participating amino acids and ns is the number of corresponding amino acids in a standard.

In the classical Oser method [57,58], concentrations of Lys, the sum of Met + Cys, Thr, Ile, Trp, Val, Leu, His, and Phe + Tyr were considered, whereas the standard for a mature human (MH) excluded histidine.

The essential amino acid index (EAAI) was calculated as follows:

$$\text{EAAI} = 10^{\log \text{EAA}} \quad (3)$$

where $\log \text{EAA}$ is described by:

$$\log \text{EAA} = 1/10(\log(a_1/a_{1s}) \times 100 + \log(a_2/a_{2s}) \times 100 + \dots + \log(a_n/a_{ns}) \times 100) \quad (4)$$

3.2.4. Dietary Fiber Fractions

The fiber components were determined using the detergent method according to Van Soest et al. [59], performed with the ANKOM 220 fiber analyzer. Determination of neutral detergent fiber (NDF) was conducted on an ash-free basis and included sodium dodecyl sulphate (Merc 822050). Determination of acid detergent fiber (ADF) included hexadecyltrimethylammonium bromide (Merc 102342), while acid detergent lignin (ADL) was determined by hydrolysis of ADF samples in 72% sulfuric acid. The content of cell wall structural carbohydrates hemicellulose and cellulose was calculated as the following differences:

$$\text{cellulose (CEL)} = \text{ADF} - \text{ADL} \quad \text{hemicellulose (HCEL)} = \text{NDF} - \text{ADF} \quad (5)$$

3.3. Statistical Analysis

A two-factorial analysis of variance (ANOVA) and principal component analysis (PCA) were carried out using the STATISTICA v13.30 software (TIBCO Software Inc. [60], Palo Alto, CA, USA). Tukey's honestly significant difference (HSD) at $p = 0.05$ was used to find the differences between means.

4. Conclusions

The findings clearly indicate that sea buckthorn leaves hold promise as a valuable resource for use as food ingredient, functional food, and dietary supplement for both humans and animals. What is more, SBT_LVs are not only a source of active substances, as shown in the literature, but our studies have shown them to be a valuable component in animal and human diets due to their high-quality protein with a good essential amino acid composition, making the product a partial protein substitute. Leaves, until recently treated as exclusively an agro-weed biomass, can be an important component in the human diet because of their interesting dietary fiber composition.

At a time when sustainability is an important element of a properly conducted agricultural policy, the use of this raw material is extremely valuable. It is important to emphasize the positive effect of dietary fiber on the regulation of the cerebral–intestinal axis and, consequently, on the regulation of many systems in the living organism.

Author Contributions: Conceptualization, P.B. and W.B.; methodology, P.B., W.B., R.W. and E.P.; software, R.W.; validation, P.B., W.B. and R.W.; formal analysis, P.B.; investigation, P.B.; resources, P.B., W.B. and R.W.; data curation, P.B.; writing—original draft preparation, P.B., W.B., R.W. and E.P.; writing—review and editing, P.B., W.B., R.W. and E.P.; visualization, P.B. and R.W.; supervision, P.B., W.B., R.W. and E.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Binder, E.V. Alternative Food and Feed Products. In Proceedings of the First FAO/WHO/AU International Food Safety Conference, Addis Ababa, Ethiopia, 12–13 February 2019; p. IFSC-1/19/TS2.5. Available online: <https://www.who.int/docs/default-source/resources/bp-alternative-food-and-feed-products.pdf> (accessed on 3 June 2024).
2. Andersone, A.; Janceva, S.; Lauberte, L.; Zaharova, N.; Chervenkov, M.; Jurkijane, V.; Jashina, L.; Rieksts, G.; Telysheva, G. Granulated Animal Feed and Fuel Based on Sea Buckthorn Agro-Waste Biomass for Sustainable Berry Production. *Sustainability* **2023**, *15*, 11152. [\[CrossRef\]](#)
3. Sapkota, T.B.; Khanam, F.; Mathivanan, G.P.; Vetter, S.; Hussain, S.G.; Pilat, A.L.; Shahrin, S.; Hossain, M.K.; Sarker, N.R.; Krupnik, T.J. Quantifying opportunities for greenhouse gas emissions mitigation using big data from smallholder crop and livestock farmers across Bangladesh. *Sci. Total Environ.* **2021**, *786*, 147344. [\[CrossRef\]](#)
4. Gâtlan, A.-M.; Gutt, G. Sea Buckthorn in Plant Based Diets. An Analytical Approach of Sea Buckthorn Fruits Composition: Nutritional Value, Applications, and Health Benefits. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 8986. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Suryakumar, G.; Gupta, A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *138*, 268–278. [\[CrossRef\]](#)
6. Pundir, S.; Garg, P.; Dviwedi, A.; Ali, A.; Kapoor, V.K.; Kapoor, D.; Kulshrestha, S.; Ranjan Lal, U.; Negi, P. Ethnomedicinal uses, phytochemistry and dermatological effects of *Hippophae rhamnoides* L.: A review. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *266*, 113434. [\[CrossRef\]](#)
7. Chen, A.; Feng, X.; Dorjsuren, B.; Chimedtseren, C.; Damda, T.A.; Zhang, C. Traditional food, modern food and nutritional value of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A review. *J. Future Foods* **2023**, *3*, 191–205. [\[CrossRef\]](#)
8. International Seabuckthorn Association. Available online: <http://www.isahome.net/> (accessed on 1 May 2024).
9. Bayır, H.; Şimşek, B.İ.; Bayır, Y. *Hippophae rhamnoides* L. Botanical, Medicinal, Traditional, and Current Use of Plant and Fruits: A Review. *New Trend Med. Sci.* **2024**, *5*, 35–44. [\[CrossRef\]](#)
10. Dannenberger, D.; Tuchscherer, M.; Nürnberg, G.; Schmicke, M.; Kanitz, E. Sea Buckthorn pomace supplementation in the diet of growing pigs-effects on fatty acid metabolism, HPA activity and immune status. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 596. [\[CrossRef\]](#)
11. Qin, X.; Zhang, T.; Cao, Y.; Deng, B.; Zhang, J.; Zhao, J. Effects of dietary sea buckthorn pomace supplementation on skeletal muscle mass and meat quality in lambs. *Meat Sci.* **2020**, *166*, 108141. [\[CrossRef\]](#)
12. Mei, D.; Ma, X.; Fu, F.; Cao, F. Research Status and Development Prospects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Resources in China. *Forests* **2023**, *14*, 2461. [\[CrossRef\]](#)
13. Tian, Y.; Puganen, A.; Alakomi, H.L.; Uusitupa, A.; Saarela, M.; Yang, B. Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanolic extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. *Food Res. Int.* **2018**, *106*, 291–303. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Xing, J.; Yang, B.; Dong, Y.; Wang, B.; Wang, J.; Kallio, H.P. Effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed and pulp oils on experimental models of gastric ulcer in rats. *Fitoterapia* **2002**, *73*, 644–650. [\[CrossRef\]](#)
15. Wang, K.; Xu, Z.; Liao, X. Bioactive compounds, health benefits and functional food products of sea buckthorn: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 6761–6782. [\[CrossRef\]](#)
16. Hamieau, M.; Loulergue, P.; Szydłowska-Czerniak, A. Green Solvent Extraction of Antioxidants from Herbs and Agro-Food Wastes: Optimization and Capacity Determination. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 2936. [\[CrossRef\]](#)
17. Ferreira-Santos, P.; Nobre, C.; Rodrigues, R.M.; Genisheva, Z.; Botelho, C.; Teixeira, J.A. Extraction of phenolic compounds from grape pomace using ohmic heating: Chemical composition, bioactivity and bioaccessibility. *Food Chem.* **2024**, *436*, 137780. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Skalski, B.; Kontek, B.; Lis, B.; Olas, B.; Grabarczyk, Ł.; Stochmal, A.; Żuchowski, J. Biological properties of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson twig and leaf extracts. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Aschemann-Witzel, J.; Stangherlin, I.D.C. Upcycled by-product use in agri-food systems from a consumer perspective: A review of what we know, and what is missing. *Technol. Forecast. Soc.* **2021**, *168*, 120749. [\[CrossRef\]](#)
20. Saracila, M.; Untea, A.E.; Panaite, T.D.; Varzaru, I.; Oancea, A.G.; Turcu, R.P.; Vlaicu, P.A. Effects of supplementing sea buckthorn leaves (*Hippophae rhamnoides* L.) and chromium (III) in broiler diet on the nutritional quality and lipid oxidative stability of meat. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Gradt, I.; Kühn, S.; Mörsel, J.T.; Zvaigzne, G. Chemical composition of sea buckthorn leaves, branches and bark. In: Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. *Sect. B Nat. Exact Appl. Sci.* **2017**, *71*, 211–216. [\[CrossRef\]](#)
22. Biel, W.; Jaroszewska, A. The nutritional value of leaves of selected berry species. *Sci. Agr.* **2016**, *74*, 405–410. [\[CrossRef\]](#)
23. Stobdan, T.; Korekar, G.; Srivastava, R.B. Nutritional Attributes and Health Application of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.)—A Review. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2013**, *9*, 151–165. [\[CrossRef\]](#)
24. Jaroszewska, A.; Biel, W. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Chil. J. Agric. Res.* **2017**, *77*, 155–162. [\[CrossRef\]](#)
25. Li, T.S.C.; Wardle, D. Effect of harvest period on the protein content in sea buckthorn leaves. *Can. J. Plant Sci.* **2003**, *83*, 409–410. [\[CrossRef\]](#)
26. Christaki, E. *Hippophae Rhamnoides* L. (Sea Buckthorn): A potential source of nutraceuticals. *Food Public Health* **2012**, *2*, 69–72. [\[CrossRef\]](#)
27. Naumenko, L.; Popova, N. Bioactive substances of sea buckthorn leaves. *NJD-iScience* **2020**, *43–41*, 38–41.
28. Ye, S.X.; Shah, B.R.; Li, J.; Liang, H.S.; Zhan, F.C.; Geng, F.; Li, B. A critical review on interplay between dietary fibers and gut microbiota. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *124*, 237–249. [\[CrossRef\]](#)

29. Boško, P.; Biel, W.; Smetanska, I.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Sea buckthorn leaves as a potential source of antioxidant substances. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 5038. [[CrossRef](#)]
30. Janceva, S.; Andersone, A.; Lauberte, L.; Zaharova, N.; Telysheva, G.; Krasilnikova, J.; Rieksts, G. A Comparative assessment of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pruning waste as a potential source of serotonin. *BioResources* **2024**, *19*, 886. [[CrossRef](#)]
31. Liang, T.A.N.; Jing, Z.H.A.O.; Jia-lin, M.A.; Tian, J.I.; Qi, D.; Jian-wei, S.H.E.N. Analysis of nutritional compositions and nutritional quality evaluation in different parts of yushu hippophae (*Hippophae rhamnoides* L. subsp. *sinensis*). *NPRD* **2018**, *30*, 807. [[CrossRef](#)]
32. Yang, B.; Kallio, H. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophae*) lipids. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13*, 160–167. [[CrossRef](#)]
33. Criste, A.; Urcan, A.C.; Bunea, A.; Pripon Furtuna, F.R.; Olah, N.K.; Madden, R.H.; Corcionivoschi, N. Phytochemical composition and biological activity of berries and leaves from four romanian sea buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) varieties. *Molecules* **2020**, *25*, 1170. [[CrossRef](#)]
34. Jeukendrup, A.E.; Saris, W.H.; Brouns, F.; Halliday, D.; Wagenmakers, J.M. Effects of carbohydrate (CHO) and fat supplementation on CHO metabolism during prolonged exercise. *Metabolism* **1996**, *45*, 915–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Scanes, C.G. Carbohydrate metabolism. In *Sturkie's Avian Physiology*; Colin, G.S., Sami, D., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2022; pp. 613–645. [[CrossRef](#)]
36. Sheikh, G.G.; Majeed, G.; Ajaz, A.G. Nutritional evaluation of some tree leaves, feeds and fodders of Ladakh. *Indian J. Anim. Nutr.* **2011**, *28*, 427–431.
37. Djordjević, M.; Djordjević, M.; Šoronja-Simović, D.; Nikolić, I.; Šereš, Z. Delving into the role of dietary fiber in gluten-free bread formulations: Integrating fundamental rheological, technological, sensory, and nutritional aspects. *Polysaccharides* **2022**, *3*, 59–82. [[CrossRef](#)]
38. Guan, Z.-W.; Yu, E.-Z.; Feng, Q. Soluble dietary fiber, one of the most important nutrients for the gut microbiota. *Molecules* **2021**, *26*, 6802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Fariás-Kovac, C.; Nicodemus, N.; Delgado, R.; Ocasio-Vega, C.; Noboa, T.; Abdelrasoul, R.A.-S.; Carabaño, R.; García, J. Effect of Dietary Insoluble and Soluble Fibre on growth performance, digestibility, and nitrogen, energy, and mineral retention efficiency in growing rabbits. *Animals* **2020**, *10*, 1346. [[CrossRef](#)]
40. Hetland, H.; Choct, M.; Svihus, B. Role of insoluble non-starch polysaccharides in poultry nutrition. *Worlds Poult. Sci. J.* **2004**, *60*, 415–422. [[CrossRef](#)]
41. Kayser, E.; Finet, S.E.; de Godoy, M.R. The role of carbohydrates in canine and feline nutrition. *Anim. Front.* **2024**, *14*, 28–37. [[CrossRef](#)]
42. Deehan, E.C.; Mocanu, V.; Madsen, K.L. Effects of dietary fibre on metabolic health and obesity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2024**, *21*, 301–318. [[CrossRef](#)]
43. Sadeghi, A.; Toghyani, M.; Gheisari, A. Effect of various fiber types and choice feeding of fiber on performance, gut development, humoral immunity, and fiber preference in broiler chicks. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 2734–2743. [[CrossRef](#)]
44. Mohanto, K.; Aye, A.T. An analysis of health risk and potential elimination strategies of anti-nutritional factors in cereals and legumes. *Asian Food Sci. J.* **2024**, *23*, 44–51. [[CrossRef](#)]
45. Roomi, I.; Khan, T.; Ali, S.; Naqvi, A.N. Investigations into chemical composition and in-sacco degradability of sea-buckthorn leaves for ruminant livestock in Gilgit-Baltistan, Pakistan. *JBES* **2015**, *7*, 97–102.
46. Azmir, S.; Ferdousi, M.; Liu, Y.; Adam, S.; Siahmansur, T.; Ponirakis, G.; Marshall, A.; Petropoulos, J.N.; Ho, J.H.; Syed, A.A.; et al. The role of abnormalities of lipoproteins and HDL functionality in small fibre dysfunction in people with severe obesity. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kwon, E.-Y.; Lee, J.; Kim, Y.J.; Do, A.; Choi, J.-Y.; Cho, S.-J.; Jung, U.J.; Lee, M.-K.; Park, Y.B.; Choi, M.-S. Seabuckthorn leaves extract and flavonoid glycosides extract from seabuckthorn leaves ameliorates adiposity, hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation in diet-induced obesity. *Nutrients* **2017**, *9*, 569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hou, Y.; Yin, Y.; Wu, G. Dietary essentiality of "nutritionally non-essential amino acids" for animals and humans. *Exp. Biol. Med.* **2015**, *240*, 997–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Lopez, M.J.; Mohiuddin, S.S. Biochemistry, essential amino acids. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2024.
50. AOAC. *Official Methods of Analysis*, 21st ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, USA, 2019.
51. Pomeranz, Y.; Meloan, C.E. Carbohydrates. In *Food Analysis: Theory and Practice*; Pomeranz, Y., Meloan, C.E., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1994; pp. 625–677. ISBN 978-1-4615-6998-5.
52. AOAC. *Official Methods of Analysis*, 15th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, USA, 1990.
53. Block, R.J.; Mitchell, H.H. The correlation of the amino acid composition of proteins with their nutritive value. *Nutr. Abstr. Rev.* **1946**, *16*, 249.
54. FAO/WHO. Protein quality evaluation. Report of a Joint FAO–WHO Expert Consultation. In *Food and Nutrition 51*; FAO: Rome, Italy, 1991.
55. FAO/WHO/UNU. *Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO-WHO Nutritional Meeting*; Technical Report Series 273; FAO/WHO/UNU: Geneva, Switzerland, 1985.
56. Hidvégi, M.; Béké, F. Mathematical modeling of protein quality from amino acid composition. In *Proceedings of International Association of Cereal Chemistry Symposium*; Lásztity, R., Hidvégi, M., Eds.; Akademiai Kiado: Budapest, Hungary, 1984; pp. 205–286.

57. Oser, B.L. An integrated essential amino acid index for predicting biological value of proteins. In *Protein and Amino Acid Nutrition*; Albanese, A.A., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1959; pp. 295–311.
58. Oser, B.L. Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein. *J. Am. Diet. Assoc.* **1951**, *27*, 396. [[CrossRef](#)]
59. Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.* **1991**, *74*, 3583–3597. [[CrossRef](#)]
60. TIBCO Software. TIBCO. Available online: <https://www.scribd.com/document/321061529/STATISTICA-Electronic-Manual> (accessed on 30 March 2024).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Załącznik 2.

Publikacja [P-2]: Sea buckthorn leaves as a potential source of antioxidant substances

Article

Sea Buckthorn Leaves as a Potential Source of Antioxidant Substances

Paulina Boško ^{1,*}, Wioletta Biel ^{1,*}, Iryna Smetanska ², Robert Witkowicz ³ and Ewa Piątkowska ^{4,*}

¹ Department of Monogastric Animal Sciences, Division of Animal Nutrition and Food, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin, Poland; paulina.bosko@zohomail.eu

² Plant Production and Processing, University of Applied Sciences Weihenstephan-Triesdorf, Markgrafenstr 16, 91746 Weidenbach, Germany; iryna.smetanska@hswt.de

³ Department of Agroecology and Crop Production, University of Agriculture in Krakow, Mickiewicza 21, 31-120 Krakow, Poland; robert.witkowicz@urk.edu.pl

⁴ Department of Human Nutrition and Dietetics, Faculty of Food Technology, University of Agriculture in Krakow, Balicka 122, 30-149 Krakow, Poland

* Correspondence: wioletta.biel@zut.edu.pl (W.B.); e.piatkowska@urk.edu.pl (E.P.)

Abstract: Each year, agro-foods produce thousands of tonnes of by-products that contain high-value, unique nutrients. The application of plant by-products enables agro-food corporations to obtain value from them and avoid using natural resources. The idea of the bio economy protects against environmental pollution and leads to a cheap source of bioactive components, which can be transformed into value-added products for other industries. The numerous publications on the positive impact of sea buckthorn (SBT, *Hippophae rhamnoides* L., Elaeagnaceae family) and its products on human health mainly concern its fruits and seeds. However, there are few data relating to the properties of SBT leaves. The leaves of SBT can be a rich source of nutrients and biologically active substances. In this investigation, we report the study of the leaves of four SBT cultivars. We determined their antioxidant capacities, measured total polyphenols and total flavonoids, and quantified their major polyphenols and alkaloids. The results show that SBT leaves are a source of antioxidants and alkaloids. Additionally, in this raw material, we identified the presence of individual flavonols (rutin and quercetin), individual anthocyanidins (cyanidin, delphinidin, and peonidin), and chelerythrine by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the first time. Through these types of studies, we aim to revalue this raw material, which is not well known in the world. Considering its nutritional properties, we seek to increase the use of its high-value, unique nutrients in food processing, medicine, and animal nutrition, in accordance with the goals of a closed-loop bioeconomy.

Keywords: alkaloids; anthocyanins; by-products; chelerythrine; flavonoids; flavonols; *Hippophae rhamnoides*; nutraceutical value; polyphenols; tannins



Citation: Boško, P.; Biel, W.; Smetanska, I.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Sea Buckthorn Leaves as a Potential Source of Antioxidant Substances. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 5038. <https://doi.org/10.3390/app14125038>

Academic Editor: Malgorzata Muzolf-Panek

Received: 8 May 2024

Revised: 4 June 2024

Accepted: 5 June 2024

Published: 10 June 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

With increasing food/feed costs in the animal production industry, it is necessary to operate using alternative feed resources to conventional food/feeds, especially regarding agricultural and industrial by-products. The use of agro-industrial by-products as functional food/feed materials could be a promising strategy that would reduce feed costs while maintaining the nutritional qualities of the feed. Many recent studies report that various herbs, as rich sources of bioactive compounds with antioxidant properties, are added to food and feed and are widely used as antimicrobial, anti-inflammatory food/feed preservatives and for ingredient stabilization [1–4]. Herb residues and agro-food by-products still contain large amounts of bioactive components with high levels of antioxidant properties. The antioxidant potential of various by-products such as the solid distillation wastes of

Greek oregano, rosemary, Greek sage, lemon balm, and spearmint; olive pomace and leaves, spent coffee grounds, and brewer's spent grain; and fruit and vegetable leaves, pulp, peel, pomace, and seeds have been investigated [5–7].

Also, the twigs and leaves of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L., Elaeagnaceae family), previously regarded as waste material, were shown to be a valuable source of substances with promising antioxidant, antimicrobial activity [8,9]. Among the many health-promoting properties of this plant, a positive effect on the expression of aquaporins, and thus on the production and secretion of bile, can also be observed [10]. Common sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L., Elaeagnaceae family), known as seaberry, Siberian pineapple, sandthorn and sallow thorn, is an ancient plant with modern uses, due to its nutritional and medicinal value. All parts of SBT, e.g., berries, leaves, and seeds or pulp oil, contain abundant nutrients and many bioactive compounds [11,12]. Documentation of indigenous ethnobotanical knowledge of *H. rhamnoides* reveals that this plant was traditionally used to treat a wide variety of illnesses. Sea buckthorn is a multi-purpose plant, and its berries are used in the production of food industry products (juices, drinks, smoothies, jams, sauces, oils) and alcohols (wine, liqueur, beer additives); additionally, its herbal leaf teas provide a high level of access to flavonoids and contain detoxifying properties, and sea buckthorn by-products can be used in the production of fodder supplements, cosmetics, pharmaceuticals, and fuel for firewood [13–15], although the leaves of SBT are not fully utilized. The leaves have attracted increasing attention because of their potential health value [16]. The development of food products often relies on ingredient sourcing and costs. For example, the value of animal-derived ingredients is most affected by the growth rate of these animals, which is clearly influenced by the type of composition of their feed, among other variables. Different feeding products may have a different impact on animal development and, ultimately, on the quality of the end-product or ingredient, leading to different end-point quality. Due to the interesting nutrient profiling of SBT products, several authors have investigated its effect on the final quality of different animal products. SBT leaves and other by-products can be used to feed livestock (both ruminant and monogastric animals), with a stimulatory effect on growth and performance [17–21]. Meat products enriched with nutrients, such as polyunsaturated fatty acids and antioxidants, are gaining much more interest among consumers. It has been reported that SBT leaves contributes positively to the nutritional quality and lipid oxidative stability of chicken breast and thigh meat [22]. For example, broiler production efficiency is quite high per se, because the growth and development of a broiler to its full potential does not take much longer than one month. However, different and more natural strategies are needed to achieve the same or higher levels of production efficiency, plainly because of the increasing consumer awareness of feeding products. Vlaicu et al. [18] compared three different diets in the growing and finishing stages of broiler chicks with a conventional diet, with one including rapeseeds and grape meal and the others including flaxseed meal and SBT meal. It showed that broilers who were fed a diet with SBT and flaxseed meals showed significantly higher concentrations of polyunsaturated fatty acids family n-3 when compared to the control or the group fed with rapeseeds and grape meal.

Sea buckthorn pomace (SBT_P) is an industrial by-product rich in a variety of functional compounds, but it has not yet been effectively used. Therefore, Yan et al. [23] concluded that SBT_P could improve the production, immune function, and antioxidant status of weaned piglets and that the appropriate level of SBP supplementation is from 1.0% to 2.0%

A study by Dannenberger et al. [24] investigated the effect of sea buckthorn pomace (SBT_P) supplementation in the diet of growing German Landrace pigs on fatty acids in the blood and hypothalamus, on peripheral immune parameters and mRNA expression of the corticotropin-releasing hormone, and on the mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hypothalamus and spleen. The fatty acid profiles in the blood plasma were significantly affected by SBT_P supplementation at a C18:2n-6 and n-6/n-3 PUFA ratio compared with the control group. And the authors pointed out that effects derived

from supplementation with a rich source of n-3 fatty acids (such as SBT_P) might be more appreciable on stressful situations.

Sea buckthorn leaves are a rich source of phytochemicals, such as phenolic compounds (including polyphenols and flavonoids), polysaccharides, carotenoids, and saponins [25–27]. Therefore, SBT leaves have various beneficial effects, like antioxidant, hepato-protective, immunomodulatory, antistress, cardioprotective, and antidiabetic actions [13,28–32]. In this regard, sea buckthorn leaves are a potential ingredient because of their nutritional and medical components that are beneficial to human and animal health. Modern research is needed for better utilization of this species for food/fodder and for their pharmaceutical potential.

Nowadays, traditionally grown plants are the centre of attention, and the demand for their production is increasing due to the strategy of inhibiting or delaying diseases using a natural diet [33]. Young branches with leaves are a by-product after the mechanical harvesting of sea buckthorn berries [33,34].

Current research on this plant is very important and can lead to the emergence of new avenues of its utilization, including food/feed and pharmaceutical potential [35]. The potential for the production and sustainable harvest of edible and other useful parts of this plant can also boost the local economy for farmers.

However, literature reports on the profiles of many bioactive components of the leaves of SBT are still very limited. The necessity to characterize secondary metabolites and nutrients also results from previous reports on SBT [36–38]. Hence, this study aimed to determine the antioxidant activity and content of bioactive components of the leaves of four cultivars of SBT collected in Poland.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material, Experiment Set-Up and Sample Preparation

The research material consisted of *Hippophae rhamnoides* L. leaves from an experiment conducted at the Agricultural Experimental Station in Lipnik, belonging to the West Pomeranian University of Technology in Szczecin (53°42' N, 14°97' S), in 2014–2016 (Figure 1). Poland is located in the temperate climate zone. Four cultivars (cv.), Ascola, Habego, Hergo, and Leikora were used in this study. The leaves for analysis were taken before the fruit reached technical maturity. The sample consisted of leaves from one-year-old shoots with no signs of damage or ageing. The leaves were weighed and dried at room temperature (18–22 °C) for 3–4 days. The samples were ground to 0.1 mm by use of a laboratory-mill-type KNIFETEC 1095 (Foss Tecator, Höganäs, Sweden). To determine dry matter (DM), the samples were dried at 105 °C by a constant-weight method based on AOAC [39] (method 945.15).

The remaining milled samples were then stored in individual sealed containers at 4 °C until they were required for further evaluation.

2.2. Extracts Preparation

Dried samples (1 g) were extracted with 95% ethanol for 2 h, and the extracts were stored in a refrigerator (−20 °C) and further determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) assays for the determination of total polyphenols, total flavonoids, flavonols, and total tannins. According to the methods, acidified methanol (1% v/v HCl) was used for the determination of anthocyanins, while 70% acetone was used for the determination of proanthocyanidins.

Extracts for high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) were prepared using acidified methanol (a mixture of methanol and 25% hydrochloric acid, 4:1, v/v) as a solvent for the determination of rutoside, quercetin, cyaniding, delphinidin, pelargonidin, peonidin, and chelerythrine.

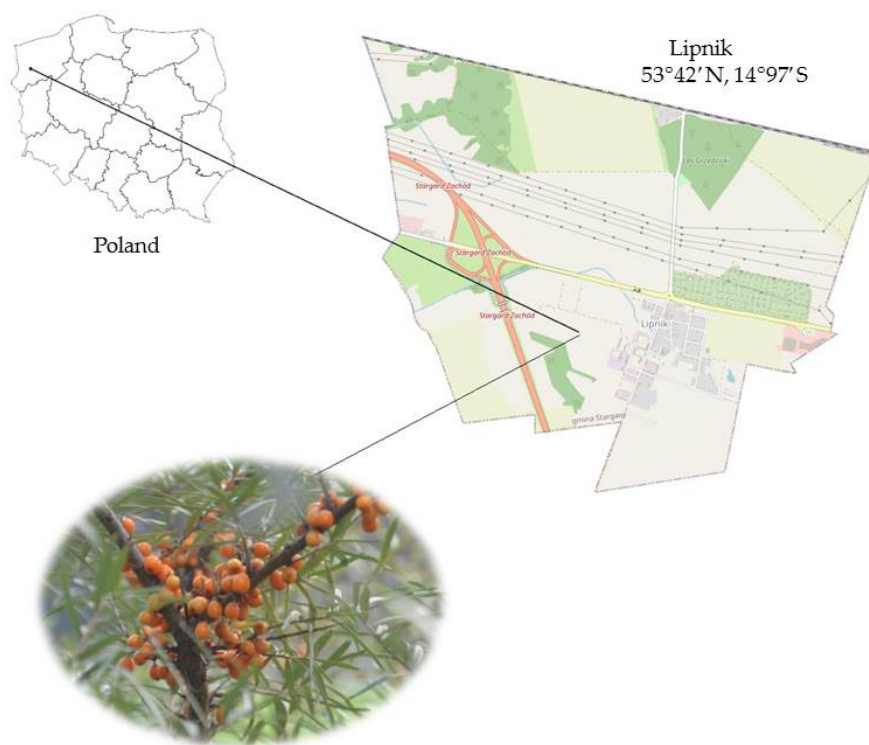


Figure 1. The map of the collection region and *Hippophae rhamnoides* L. leaves.

All the extracts used in the analyses were prepared according to an identical scheme. Approximately 0.5 g (weights to 4 decimal places) of powdered sea buckthorn leaves were weighed per 1 mL of solvent, and the samples thus prepared were shaken for 30 min in an MM 200 mixer mill (Retsch GmbH, Haan, Germany). After shaking, the samples were centrifuged for 15 min at 5.000 rpm at 4 °C in a Centrifuge 5415 R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). After centrifugation, the extracts were filtered through cellulose filters with a pore size of 0.45 µm and transferred to a new Eppendorf tube. The extracts were stored at −20 °C for further analysis.

2.3. Determination of Antioxidant Activity (AA)

2.3.1. DPPH Assay

Total AA was determined by a 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay as described by Brand-Williams et al. [39]. The progress of the reduction reaction and, at the same time, the decolourisation of the radical solution was measured on a UV-VIS spectrophotometer (Analytik Jena, SPECORD® PLUS, Jena, Germany) at $\lambda = 515$ nm, 10 min after addition of the DPPH solution. The Trolox (TRX) equivalent was used to express antioxidant activity in µM TRX per 1 g of SBT leaf DM. For this purpose, Trolox solutions of various concentrations were prepared to determine a standard curve ($y = -0.0183x + 0.7762$; $R^2 = 0.9992$).

2.3.2. ABTS Assay

Antioxidant activity was determined by a spectrophotometric method using the ABTS^{•+} radical (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) [40]. The progress of the reduction reaction and, at the same time, the decolourisation of the cation radical solution was measured on a UV-VIS spectrophotometer (Analytik Jena, SPECORD® PLUS, Jena, Germany) at $\lambda = 734$ nm, 6 min after addition of the ABTS solution. The Trolox equivalent was used to express antioxidant activity in µM TRX per 1 g of SBT leaf DM. For this purpose, Trolox solutions of various concentrations were prepared to determine a standard curve ($y = -0.0127x + 0.6292$; $R^2 = 0.9989$).

The percent inhibition of DPPH•+ radical and ABTS•+ radical generation was also calculated using Formula (1).

$$\text{RSA}\% = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad (1)$$

where RSA—radical-scavenging activity, A₀—the absorbance of control (for ABTS) and of the sample at the beginning of the reaction (for DPPH), and A₁—the absorbance of the sample (in 6 min for ABTS; in 10 min for DPPH).

2.3.3. Photochemiluminescence (PCL) Assay

A PCL assay was carried out to measure the antioxidant capacity of the hydrophilic extract with a Photochem apparatus (Analytik Jena, Leipzig, Germany) against superoxide anion radicals generated in a luminol reaction (photosensitizer) under exposure to UV light. The antioxidant activity of the extract was analysed using the ACW (Water-Soluble Antioxidant) kit and the manufacturer's measurement protocol [41]. Extract solutions in Milli-Q water were vortexed (30 s × 2), sonicated (30 s × 2), and centrifuged at 13,200 rpm for 30 min at 4 °C before analysis. The results were expressed in μM of the TRX equivalent per 1 g of SBT leaf DM.

2.4. Quantification of Antioxidant Compounds

2.4.1. Total Polyphenol (TP) Determination

The TP content was determined by UV-VIS spectroscopy (Analytik Jena, SPECORD® PLUS, Jena, Germany) using the Folin–Ciocalteu reagent [42] and using gallic acid as a standard. Absorbance was measured at λ = 765 nm against a blank sample. The results were expressed in mg gallic acid equivalents (GAE) per 1 g of SBT leaf DM. Gallic acid solutions of various concentrations were prepared to determine a standard curve ($y = 0.0115x + 0.0332$; $R^2 = 0.9997$).

2.4.2. Total Flavonoid (TF) Determination

The content of TFs was determined by UV-VIS spectroscopy (Analytik Jena, SPECORD® PLUS, Jena, Germany) using aluminium chloride (AlCl₃) and using quercetin (QEE) as a standard [40]. Absorbance was measured at λ = 420 nm against a blank. The results were expressed in mg QEE per 1 g of SBT leaf DM. Quercetin solutions of various concentrations were prepared to determine a standard curve ($y = 0.0187x + 0.0087$; $R^2 = 0.9964$).

2.4.3. Total Flavonol (TFL) Determination

The content of TFLs was determined by UV-VIS spectroscopy (Analytik Jena, SPECORD® PLUS, Jena, Germany) using aluminium chloride (AlCl₃) and using QEE as a standard [43]. Absorbance was measured at λ = 440 nm against a blank. The results were expressed in mg QEE per 1 g of SBT leaf DM. Quercetin solutions of various concentrations were prepared to determine a standard curve ($y = 0.5297x - 0.2227$; $R^2 = 0.9934$).

2.4.4. Evaluation of Individual Flavonols (Rutoside and Quercetin)

Evaluations of rutoside (R) and QE were performed on 10 × 10 cm aluminium plates (aluminium oxide 60 F254, type E, Merck, Darmstadt, Germany), dedicated to thin-layer chromatography (TLC) analyses. The plates were activated with methanol prior to use. They were then dried at 60 °C for 1 h. The samples and standards on the thus-prepared stationary phase were spotted with 1 or 2 μL glass capillaries using a Vomaticator Linomat (CAMAG, Muttenz, Switzerland), at a distance of 10 mm from the end of the plate, 10 mm from the edge, and with 10 mm of distance between the bands. Standards were applied first to determine the standard curve (1, 2, 3 and 4 μL), followed by the prepared extracts (2 μL each). The plates thus prepared were transferred to an automated chamber (CAMAG ADC, Muttenz, Switzerland) to develop the chromatograms. The mobile phase in the chamber consisted of a chloroform/methanol/acetone/ammonia mixture (10:22:53:0.2,

$v/v/v$), and the separation of the samples took 40 min in glass chromatographic chambers ($17.5 \times 16 \times 8.2$ cm, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). After drying in the dark, the plates were scanned using a Skaner TLC Scanner 3 (CAMAG, Muttenz, Switzerland). The results obtained were calculated using Visual Cats 1.3.4 software and expressed in μg per 1 g of SBT leaf DM.

2.4.5. Total Anthocyanin (TA) Determination

The TA content was determined using the UV-VIS spectroscopy method (Analytik Jena, SPECORD[®] PLUS, Jena, Germany) [44]. Absorbance of the upper phase was determined at $\lambda = 530$ and $\lambda = 657$ nm. Anthocyanin concentrations (mg/g dry mass) were calculated as follows (2):

$$\text{Total anthocyanins (mg/g DM)} = [A_{530} - 0.25 \times A_{657}] \text{TV} / [d_{\text{wt}} \times 1000] \quad (2)$$

where

A_{530} —absorbance of probe at $\lambda = 530$ nm;

A_{657} —absorbance of probe at $\lambda = 657$ nm;

TV—total volume of extract (mL);

d_{wt} —dried herb weight (g).

2.4.6. Evaluation of Individual Anthocyanidins

The content of cyaniding (C), delphinidin (DE), pelargonidin (PG), and peonidin (P) was measured using the HPTLC, following the same procedure given above in Section 2.4.4. The results of individual anthocyanidins were expressed in μg per 1 g of SBT leaf DM.

2.4.7. Proanthocyanidin (PAC) Determination

The PAC content of the extracts was determined by UV-VIS spectroscopy (Analytik Jena, SPECORD[®] PLUS, Jena, Germany), using butanoic acid according to the method reported by Porter et al. [45]. Absorbance was measured at $\lambda = 550$ nm. The percentage of total proanthocyanidins in the dry mass of sea buckthorn leaves was calculated according to the following Formula (3):

$$\text{Total proanthocyanidins (\%)} = A_{550} \times 78.26 \times \text{df} / \% \text{DM} \quad (3)$$

where

A_{550} —absorbance of probe at $\lambda = 550$ nm;

df—dilution factor;

% DM—percentage of dry mass in the test sample.

2.4.8. Total Tannin (TT) Determination

The TT content was determined using the Folin–Ciocalteu reagent [46], with tannic acid (TA) as the standard. Absorbance was measured at $\lambda = 725$ nm against a blank sample using a UV-VIS spectrophotometer (Analytik Jena, SPECORD[®] PLUS, Jena, Germany). The results were expressed in mg of tannic acid (TA) per 1 g of SBT leaf DM. Solutions of tannic acid of various concentrations were prepared to determine a standard curve ($y = 0.0009x + 0.0016$; $R^2 = 0.9961$).

2.4.9. Chelerythrine (CHE) Determination

Selected alkaloid CHE was analysed using the HPTLC, following the same procedure as described above in Section 2.4.4. The results of CHE were expressed in μg per 1 g of SBT leaf DM.

2.5. Statistical Analyses

A two-factorial analysis of variance (ANOVA) and principal component analysis (PCA) were carried out using the STATISTICA v13.30 software (TIBCO Software Inc. [47], Palo Alto, CA, USA). Before ANOVA was conducted, the homogeneity of variances was checked (Levene's test). Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) at $p = 0.05$ was used to find the differences between means. The means denoted by different letters differed statistically.

3. Results and Discussion

Phenolic compounds are a very large group of common, natural compounds and are secondary metabolites of plants. They belong to the group of antioxidants [48]. Evaluation of the antioxidant potential of raw materials is carried out by tests in different systems and using different reaction mechanisms [49,50]. In this study, tests involving scavenging of free stable radicals were used, DPPH^{•+} and ABTS^{•+}. The use of the DPPH^{•+} radical to assess antioxidant potential only allows for the evaluation of hydrophobic antioxidants, in contrast to the ABTS^{•+} radical, which reacts with both hydrophobic and hydrophilic antioxidants. The PCL method was also used in this study. PCL was first used to assess antioxidant potential by Popov et al. [51]. This method has a high level of sensitivity and can therefore be used to determine the antioxidant properties of both antioxidant-rich and antioxidant-poor products. This method is used to test the antioxidant activity of both the hydrophilic fraction (water-soluble antioxidant capacity ACW) and the lipophilic fraction (lipid-soluble antioxidant capacity ACL) in plant samples.

Table 1 shows the total polyphenol (TP) content and antioxidant activity (AA) of sea buckthorn leaves. SBT leaves from different years of this study had statistically different levels of total polyphenols (from 186.64 to 330.16 mg GAE/1 g DM), confirming that the quality of the raw material (leaves) can be significantly modified by habitat conditions. A trend was also observed ($p = 0.239$) indicating a variation in the TP content of the leaves of the SBT cultivars tested. The TP content in the leaves of the Ascola cv. was 307.02 mg GAE/1 g DM, while in the leaves of the Hergo cv., it was only 195.80 mg GAE/1 g DM. In the study by Cho et al. [52], the TP content in sea buckthorn leaf tea and green tea extracts ranged only from 23 to 66 and from 33 to 118 mg GAE/1 g DM, respectively. Upadhyay et al. [53] also reported that 70% ethanol was optimal for extracting phenolic compounds from sea buckthorn leaves. The variability of TP has been recorded due to the influence of a number of factors, such as the type of locality, the year of harvest, and cultivars [11,24]. This wide variation in the compounds responsible for antioxidant properties was confirmed by the different results of the antioxidant assays in the studies presented (Tables 1 and S1). The free-radical-scavenging activity of SBT leaf extracts was studied for their ability to bleach stable ABTS^{•+} and DPPH^{•+} free radicals, providing information on the reactivity of compounds with a stable free radical. Extracts of SBT leaves exhibited AA potential, as analysed by DPPH and ABTS assays (Tables 1 and S1). The leaf extracts showed a significant reduction in both the DPPH^{•+} and the ABTS^{•+} radicals in the samples tested (RSA, from 56.33 to 98.25%). The AA of the SBT leaves measured with the ABTS^{•+} radical was dependent on the cultivar. SBT leaf extracts from different cultivars showed antioxidant activity ranging from 490.47 to 493.32 $\mu\text{M TRX}/1\text{ g DM}$, and these were the statistically different contents found in the leaves of the Ascola and Hergo cv. Due to the lipophilic nature of the DPPH^{•+} radical, a slight difference in the experimental cultivars was observed in the AA measured by DPPH, in comparison to the ABTS assay. The simplicity of the ABTS method makes it a routinely used analysis for determining the AA of samples. However, it should be borne in mind that this radical has a much higher persistence than the radicals present in the raw materials, which may raise concerns as to whether such a method describes the actual free radical reactions well. On the other hand, a limitation of the DPPH method is that DPPH^{•+} is only soluble in organic solvents and does not allow for the determination of hydrophilic antioxidants [54]. Antioxidant properties can be influenced by many factors in addition to the plant species, including the freshness of the raw material

under investigation. The oxidative properties of raw materials may also change depending on the method and duration of storage. Alabri et al. [55] suggest that some compounds of botanical raw materials may volatilise or decompose during storage, while antioxidant efficacy depends on many factors, i.e., the type of raw material or the method of sample processing.

Table 1. The total polyphenol content and antioxidant activity of SBT¹ leaves.

Factor	Total Polyphenols (mg GAE ² /1 g DM ³)	TEAC ⁴ ABTS ^{•+} (μ M TRX ⁵ /1 g DM)	TEAC DPPH ^{•+} (μ M TRX/1 g DM)	PCL μ M TRX/1 g DM
		Year		
<i>p</i> ⁶	=0.029	=0.071	<0.000	=0.905
2014	186.64 a ⁷	491.86 a	340.57 b	348.49 a
2015	197.43 ab	493.36 a	350.04 b	313.23 a
2016	330.16 b	494.61 a	299.53 a	310.98 a
		Cultivar		
<i>p</i>	=0.239	=0.036	=0.095	=0.148
Ascola	307.02 a	490.47 a	323.49 a	290.76 a
Habego	216.26 a	492.82 ab	329.53 a	245.20 a
Hergo	195.80 a	493.32 b	332.94 a	254.41 a
Leikora	233.25 a	492.50 ab	334.23 a	506.57 a

¹ SBT—sea buckthorn; ² GAE—gallic acid equivalent; ³ DM—dry matter; ⁴ TEAC—Trolox equivalent antioxidant capacity; ⁵ TRX—Trolox; ⁶ *p*—probability of null hypothesis rejection ($H_0: m_1 = m_2 \dots = m_n$); ⁷ means with at least one same letter (a, b) do not differ statistically at $p = 0.05$ (for all columns, separately).

In this study, the antioxidant potential of SBT leaves was also assessed using the PCL_{ACW} method. This method did not confirm the variation in AA of the raw material from the different growing seasons but, through the statistical trend shown ($p = 0.148$), indicates higher levels of AA in the Leikora cv. (506.57 μ M TRX/1 g DM).

The methods used to measure the AA of sea buckthorn leaves did not provide a clear answer as to the variation in the quality of the raw material from different growing seasons; rather, they allow Leikora cv. leaves to be identified as having higher levels of AA. Taking into account the link between the development of civilisation diseases and long-term oxidative stress, the strong antioxidant properties of SBT leaves may indicate the potential use of this raw material not only in the prevention but also in the treatment of many diseases [56].

The factor coordinate plot for the variables (Figure 2A) shows the scatterplot of the set of factor loadings on a two-dimensional plane that includes the first two components. Figure 2B, on the other hand, shows the scatterplot of the data set on the plane of the first two components. The presented graphs confirm the particular variation in the AA and polyphenol content in the leaves of the Ascola cv., since the position of this cultivar on the plane of the components includes the quadrants I—year 2015, III—year 2014, and IV—year 2016. The graph also confirms the significant similarity of the Habego and Hergo cv. and a certain distinctiveness of the Leikora cv., which is also confirmed by the sensitive and precise PCL method. However, one surprising result of the PCA analysis is the negative correlation of AA (ABTS and DPPH) with TP and the lack of correlation between TP and AA (PCL). These results are confirmed by statistically significant correlation coefficients (Tables 2 and 3). Such an effect may indicate that not only labelled flavonols or tannins are responsible for the AA of sea buckthorn leaves but also, and perhaps to a greater extent, other unlabelled fractions such as phenolic acids, carotenoids, and sterols are [57]. Furthermore, the variability of AA in the plant material is determined not only by the course of the growing season but also by the physiological age of the raw material [58].

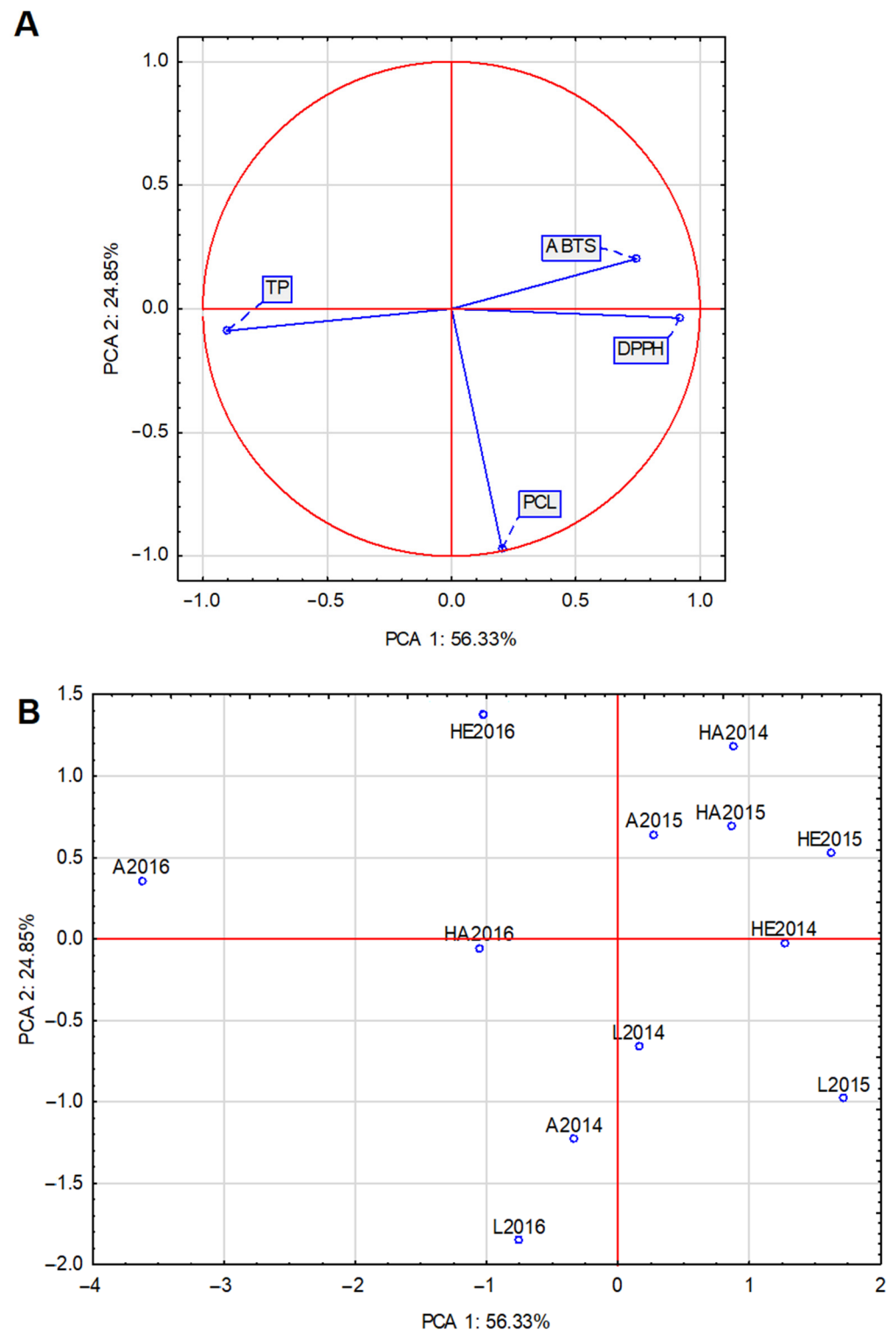


Figure 2. The first two principal component axes for polyphenol content and antioxidant activity in SBT leaves for the variables (A) and for the scores (B), (ABTS—2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); DPPH—1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; PCL—photochemiluminescence assay; TP—Total Polyphenol; A—cv. Ascola; HA—cv. Habego; HE—cv. Hergo; L—cv. Leikora).

Table 3. Cont.

Feature	DPPH	ABTS	RSA ABTS	RSA DPPH	PCL	TP	TF	TFL	PAC	TA	TT	DE	R	QE	P	C	CHE
PCL	0.180	0.029	0.231	0.099	1.000												
TP	−0.808	−0.509	−0.299	0.568	−0.076	1.000											
TF	−0.264	−0.245	−0.266	0.014	−0.443	0.336	1.000										
TFL	−0.209	−0.032	−0.231	−0.173	−0.575	0.292	0.900	1.000									
PAC	−0.815	−0.258	−0.694	0.678	0.015	0.667	0.152	0.139	1.000								
TA	0.357	−0.420	−0.128	−0.137	0.189	−0.366	−0.268	−0.427	−0.383	1.000							
TT	−0.699	−0.400	−0.090	0.492	−0.052	0.763	0.393	0.300	0.500	−0.450	1.000						
DE	−0.339	0.323	0.009	0.484	0.184	0.048	−0.174	−0.226	0.368	−0.410	0.402	1.000					
R	−0.599	0.101	−0.024	0.479	0.133	0.575	−0.102	−0.024	0.686	−0.780	0.512	0.467	1.000				
QE	−0.577	0.271	−0.121	0.407	−0.102	0.481	−0.008	0.201	0.665	−0.858	0.426	0.492	0.878	1.000			
P	0.470	0.524	0.635	−0.273	0.237	−0.543	−0.426	−0.435	−0.408	−0.106	−0.338	0.315	0.111	−0.075	1.000		
C	−0.656	0.043	−0.183	0.538	0.314	0.569	0.168	0.188	0.683	−0.661	0.498	0.461	0.772	0.735	−0.121	1.000	
CHE	−0.435	0.293	0.143	0.492	0.370	0.347	−0.221	−0.193	0.537	−0.724	0.405	0.705	0.902	0.800	0.313	0.793	1.000

¹ DPPH—1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; ABTS—2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; RSA—radical-scavenging activity; PCL—photochemiluminescence assay; TP—Total Polyphenol; TF—Total Flavonoid; TFL—Total Flavonol; PAC—Proanthocyanidin; TA—Total Anthocyanin; TT—Total Tannin; DE—Delphinidin; R—Rutoside; QE—Quercetin; P—Peonidin; C—Cyanidin; CHE—Chelerythrine.

The largest group of plant polyphenols (TPs) are flavonoids (TFs). Within this group, several subclasses have been distinguished, differing in structure and resulting antioxidant activity. The phenolic compounds quantified are generally considered to be the major determinants for the antioxidant capacity of plants. The total flavonoid (TF) content in the leaves of sea buckthorn are shown in Table 4. The average TF content of SBT leaves was high at 281.76 mg QEE/1 g DM. However, there was no significant effect of growing season or cultivar on the TF content of sea buckthorn leaves. The total flavonoid content of 36.58 mg of mg QEE per 1 g of extract was found in the leaves of SBT grown in Romania by Criste et al. [11]. This value is relatively lower than our results, but our results are expressed on 1 g of DM, and this is not clearly stated in the referenced study. Wang et al. [59] found TF content in SBT leaves ranging from 24.57 to 34.83 mg rutin/g DM. The content of these compounds in sea buckthorn leaves was not affected by the factors studied, but the presence of rutoside and quercetin was found to be significant. The content of these compounds in the leaves of the tested cultivars was the same, but the raw material from different growing seasons contained statistically different contents. The average flavonol content was 80.19 mg QEE/1 g DM (Table 4). The flavonoid content in the leaves and fruit of sea buckthorn has been reported to range from 310 to 2100 mg/100 g of dried leaf and 120 to 1000 mg/100 g of fresh fruit, respectively [60–62]. Due to the different methods of determination and the different standards used, it is impossible to compare the results obtained. However, it has been widely confirmed that SBTs are rich in phenolic compounds. The content of individual flavonoids in the studied SBT leaves was statistically differentiated by the experimental factors analysed. The content of proanthocyanidin, anthocyanidin, and total tannins was significantly influenced by the origin of the raw material (growing season). PACs are a group of condensed tannins consisting of catechin and epicatechin monomers that differ from the hydrolysable tannin structure of ellagitannins. PACs have attracted increasing amounts of attention in the fields of nutrition and medicine because of their various bioactivities, such as their antioxidant, anti-diabetic, anti-obesity, anticancer, anti-inflammatory, and cardioprotective effects [63,64]. SBT leaves are a rich source of PACs, and indeed, the highest amount of these compounds was found in SBT leaves from the 2016 growing season (18.517 mg/1 g DM). Although the leaves of the tested cultivars did not differ statistically in their PAC content, a trend towards a slightly higher content level of these compounds can be observed in the leaves of the Habego cv. (14.547 mg/1 g DM). Recent years have provided evidence that PACs are present in the extracts of various plants and have antimicrobial potential, including antifungal effects. For example, Luiz et al. [65] evaluated the effect of proanthocyanidin polymer-rich fractions from *Stryphnodendron adstringens* and successfully showed the inhibition of *Candida albican* (ATCC 10231) planktonic growth and biofilm development. According to the study of Fan et al. [66] and Yang et al. [67], sea buckthorn seeds contain a substantial number of PACs, but little is known about their antimicrobial activity. SBT twigs, previously regarded as a by-product, were shown to be also a valuable source of substances with promising antimicrobial activity. Sadowska et al. [9] reported that SBT-derived twig and leaf extracts rich in PACs exhibit antifungal activity and affect important *Candida* virulence factors, thus having good potential for the development of novel antifungal products supporting traditionally used drugs. From the point of view of the nutritional properties of the raw material, it is also important to bear the interaction of PACs with proteins in mind, especially those rich in proline. The authors of this study found an average of 4 g of proline in 100 g of SBT leaf protein in the raw material assessed, which represents only 5.28% of the sum of all 20 amino acids determined (unpublished data). Biologically important effects of this interaction include blocking the activity of enzymes, particularly proteolytic enzymes. Another effect of the presence of PACs may be to reduce the bioavailability of certain minerals.

Table 4. Total and individual flavonoids in SBT ¹ leaves.

Factor	Total Flavonoids (mg QEE ² /1 g DM ³)	Flavonols mg QEE/1 g DM	Anthocyanins mg/g DM	Proanthocyanidins mg/g DM	Total Tannins mg TA ⁴ /1 g DM
	Year				
<i>p</i> ⁵	=0.931	=0.868	=0.004	=0.015	=0.029
2014	281.05 a ⁶	79.29 a	10.928 b	8.634 a	1.429 a
2015	281.66 a	80.71 a	6.932 a	7.860 a	1.445 ab
2016	282.58 a	80.70 a	6.375 a	18.517 b	1.516 b
	Cultivar				
<i>p</i>	=0.833	=0.892	=0.430	=0.570	=0.128
Ascola	283.54 a	80.53 a	9.202 a	11.136 a	1.491 a
Habego	282.72 a	81.37 a	7.710 a	14.547 a	1.413 a
Hergo	279.51 a	79.18 a	7.794 a	10.426 a	1.471 a
Leikora	281.28 a	79.56 a	7.608 a	10.573 a	1.479 a

¹ SBT—sea buckthorn; ² QEE—quercetin equivalent; ³ DM—dry matter; ⁴ TA—tannic acid; ⁵ *p*—probability of null hypothesis rejection ($H_0: m_1 = m_2 \dots = m_n$); ⁶ means with at least one same letter (a, b) do not differ statistically at $p = 0.05$ (for all columns, separately).

Another group of phenolic compounds labelled in SBT leaves were anthocyanins, which also have diverse effects, including antioxidant, antimutagenic, anti-inflammatory, and anticancer activity [68]. They are mainly found in berries and give the fruit attractive colours. Berries such as cranberries, bilberries, raspberries, strawberries, grapes, elderberries, and blueberries have the highest anthocyanin content and antioxidant activity. Their presence in other plant species (including other morphological parts of plants), which have not been previously identified, is also highlighted. The leaves from many species are remarkably polymorphic for anthocyanin expression [69]. For example, the yam, in addition to the edible root tuber, also has edible leaves and above-ground shoots, which contain numerous polyphenolic compounds and, among others, anthocyanins [70,71]. The anthocyanidin content of the SBT leaves studied ranged from 6.375 to 10.928 mg/g DM, confirming, at the same time, the variation in their content in the raw material depending on the year of harvest ($p = 0.004$). The content of these compounds in the leaves of the cultivars tested was not statistically differentiated ($p = 0.430$), although the leaves of the Ascola cv. tended to have a slightly higher concentration of this component (9.202 mg/g DM). Many studies have investigated the anthocyanidin content of the fruit. It should be noted that their content depends on the colour of the fruit. For example, relatively red berries were found to contain more anthocyanins than yellow and light-yellow berries [72]. A qualitative assessment of flavonoids was also made by determining the amount of rutoside and quercetin in SBT leaves (Table 5).

In the case of delphinidin as well as cyanidin, variation was observed in the content of these compounds in SBT by the experimental factors studied. The raw material obtained in the 2016 growing season was characterised by a significantly higher content of these compounds, and, among the cultivars, Hergo and Leikora were characterised by a higher content of delphinidin. The presence of pelargonidin, which is common in plant raw materials, was not found in the tested raw material.

Previous studies have confirmed the presence of a few alkaloids in the biomass of sea buckthorn, e.g., hyppophamide (seeds), cauilexin (peels of fruits), or harmaine (leaves and branches) [57,73]. This study confirmed the presence of benzophenanthridine alkaloidchelerythrine. This compound shows properties that make it likely that it will be a component of many new drugs, especially anticancer drugs [74].

Table 5. Content of secondary metabolites in SBT¹ leaves.

Factor	Rutoside	Quercetin	Delphinidin µg/1 g DM ²	Peonidin	Cyanidin	Chelerythrine
			Year			
<i>p</i> ³	=0.001	=0.003	=0.045	=0.335	=0.005	=0.005
2014	0.246 a ⁴	0.178 a	0.794 a	36.668 a	0.681 a	0.681 a
2015	0.295 b	0.203 b	0.815 a	41.141 a	0.687 a	0.885 ab
2016	0.335 c	0.223 b	0.972 b	35.942 a	0.723 b	1.043 b
			Cultivar			
<i>p</i>	=0.402	=0.270	=0.017	=0.298	=0.052	=0.096
Ascola	0.280 a	0.190 a	0.723 a	33.034 a	0.685 a	0.749 a
Habego	0.296 a	0.207 a	0.783 a	37.863 a	0.700 a	0.845 a
Hergo	0.287 a	0.207 a	1.026 b	39.662 a	0.687 a	0.898 a
Leikora	0.305 a	0.200 a	0.909 ab	41.108 a	0.716 a	0.988 a

¹ SBT—sea buckthorn; ² DM—dry matter; ³ *p*—probability of null hypothesis rejection (H₀; m₁ = m₂ ... = m_n); ⁴ means with at least one same letter (a, b, c) do not differ statistically at *p* = 0.05 (for all columns, separately).

The content of chelerythrine in SBT leaves was determined by the climatic conditions of the growing season. By far, the highest content of the alkaloid was found in the 2016 raw material. The chelerythrine content in the raw material of the tested cultivars was close to statistical variation. The Ascola cv. showed a clear tendency to accumulate less of this valuable alkaloid. Extracts from medicinal plants with chelerythrine are components of veterinary and human phytopreparations. They display distinct antibacterial and anti-inflammatory properties. Kosina et al. [75] showed that an average daily oral dose of alkaloids up to 5 mg per 1 kg of animal body weight is safe for piglets. Hu et al. [76] conducted a detailed evaluation of the pharmacokinetic characteristics of a mixture of sanguinarine and CHE in broiler chickens following p.o. and showed that this addition to feed is safe because of the first-pass effect after intestinal and liver metabolism.

The state of knowledge on the biological activity of flavonoid compounds clearly indicates that their positive effects on the body are mainly due to their antioxidant properties. This is possible due to the presence of hydroxyl groups in their structure. It has been shown that the more hydroxyl groups in the molecule, the stronger the antioxidant effect [77,78]. Of the labelled compounds, rutoside has the most -OH groups—10, delphinidin has 6, quercetin and cyanidin have 5, and peonidin has the least—4. The abundance of phenolic compounds in SBT leaves confirmed previous studies by other authors, including Wei et al. [79].

The PCA analysis confirmed the significant variation in leaf quality of the studied SBT cultivars harvested in different growing seasons (Figure 3). This is not a positive finding from the point of view of obtaining stable quality raw material. The change in the quality of the raw material of the Ascola cv. can be taken as an example. There is a clear decrease in the anthocyanin content in favour of other active components (especially flavonoids, flavonols, and total tannins) in the following years of this study. In the Leikora cv., the content of mainly chelerythrine and delphinidin increased with successive growing seasons.

The analysis of the correlations between the determined raw material properties showed a correlation coefficient close to statistical significance (*p* = 0.091) (*r* = 0.509) between the DPPH and ABTS methods but, at the same time, confirmed the lack of correlation between these methods and the PCL-ACW method (*r* = 0.180 and 0.029, respectively) (Tables 2 and 3). PCL methods are less frequently used to assess the quality of plant material, so this lack of correlation is difficult to discuss with respect to sea buckthorn AA analyses. Nevertheless, Witkowicz et al. [80], in their study on the AA assessment of buckwheat sprouts, showed a correlation of sprout AA measured by DPPH with PCL-ACW methods (*r* = 0.81). The correlations of the analysed properties with chelerythrine are also interesting. The content of this alkaloid does not show a correlative relationship with AA, but statistically significant relationships were observed between its content and the

content of anthocyanins and flavonols (rutin, quercetin). The correlation relationship with anthocyanins is negative ($r = -0.724$), and with flavonoids, it is positive ($r = 0.902$ and 0.800 , respectively) (Tables 2 and 3).

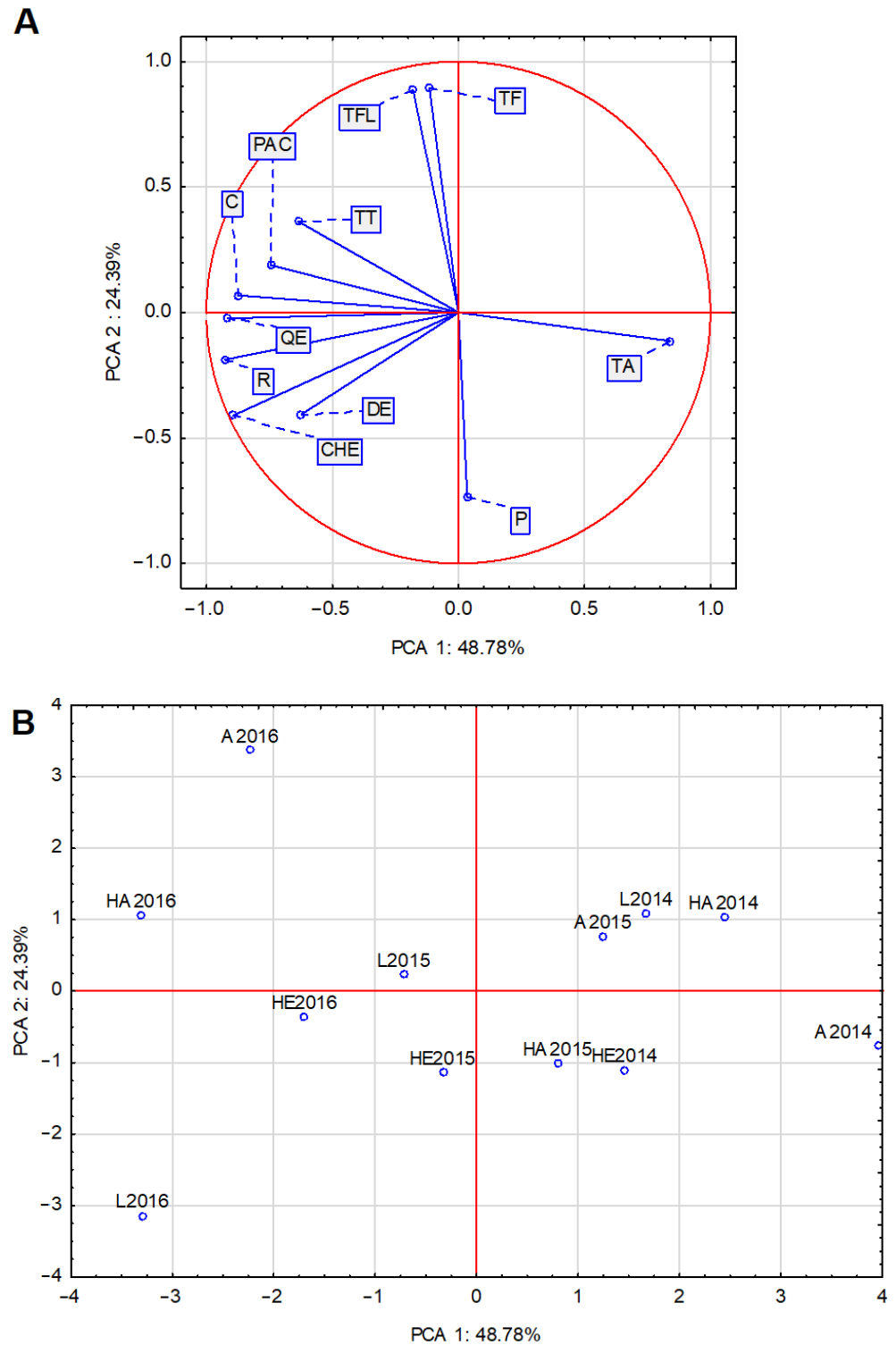


Figure 3. The first two principal component axes for bioactive compound content in SBT leaves for variables (A) and for the scores (B), (C—Cyanidin; CHE—Chelerythrine; DE—Delphinidin; P—Peonidin; PAC—Proanthocyanidin; QE—Quercetin; R—Rutoside; TA—Total Anthocyanin; TF—Total Flavonoid; TFL—Total Flavonol; TT—Total Tannin; A—cv. Ascola; HA—cv. Habego; HE—cv. Hergo; L—cv. Leikora).

Diet, along with genetic and environmental factors, is considered a major aspect affecting longevity, as well as vascular disease outcome. Cardiovascular disease (CVD) is the major cause of mortality and morbidity in the world [81]. Therefore, the prevention of and reduction in risk factors, which are associated with CVD, are the major tasks of health care professionals and scientists. Several investigators have studied the role of different bioactive components such as antioxidants and flavonoids in the prevention and management of CVD. Since synthetic vitamin E and vitamin C have shown inconclusive results regarding their role in cardiovascular health and diseases, various investigators are presently searching for alternate sources of vitamins and other bioactive components such as flavonoids from natural sources like SBT by-products. The effect of the major components of SBT on the cardiovascular system is well documented in scientific research [82–84]. Most prospective cohort studies have indicated some degree of inverse association between flavonoid intake and coronary heart disease. Animal and human studies suggest that sea buckthorn flavonoids may scavenge free radicals, lower blood viscosity, and enhance cardiac function. Suomela et al. [85] studied the effects of flavonol aglycones derived from SBT on the risk factors of cardiovascular disease, as well as their absorption in humans. The flavonols, ingested with oatmeal porridge, did not have a significant effect on the levels of oxidized low-density lipoprotein, C-reactive protein, and homocysteine; on plasma antioxidant potential; or on paraoxonase activity. Total flavonols at two dosages (1.78 mg and 2.39 mg) in oatmeal porridge were rapidly absorbed, and a relatively small amount of sea buckthorn oil added to the porridge seemed to have increased the bioavailability of SBT flavonols consumed at a higher dose. Sea buckthorn by-products appear to be promising ingredients for health benefits, and their inclusion in daily diets should therefore be encouraged.

4. Conclusions

Sea buckthorn leaves have great potential as a source of healthy food/feed, as well as raw materials and ingredients for health care products and animal nutrition. The majority of sea buckthorn research has been conducted in Asia. It is a promising crop for Europe, and recently, it has attracted considerable attention of researchers, producers, and industries. This study has proved that the leaves of sea buckthorn are excellent sources of bioactive compounds, such as rutoside, quercetin, and individual anthocyanidins—compounds with significant antioxidant activity. The isoquinoline alkaloid chelerythrine was also found in sea buckthorn leaves. Therefore, SBT leaves can be used as a source of new antioxidant compounds. These natural antioxidants have attracted considerable attention because of their extensive biological functions and regulatory effects on mammals. Our finding clearly support the notion that SBT leaves, as a natural and non-polluting resource, could be a better choice as a healthy food/feed resource. In addition, it would be beneficial to use SBT leaves with high antioxidant potential as food/feed additives, as well as in-feed growth enhancers as alternatives to antibiotics after the latter's ban in the EU.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app14125038/s1>, Table S1: The antioxidant activity of SBT¹ leaves (RSA%).

Author Contributions: Conceptualization, P.B. and W.B.; methodology, P.B., W.B., I.S., R.W. and E.P.; software, R.W.; validation, P.B., W.B., I.S. and R.W.; formal analysis, P.B.; investigation, P.B. and I.S.; resources, P.B., W.B., I.S. and R.W.; data curation, P.B.; writing—original draft preparation, P.B., W.B., I.S., R.W. and E.P.; writing—review and editing, P.B., W.B., I.S., R.W. and E.P.; visualization, P.B. and R.W.; supervision, P.B., W.B., I.S., R.W. and E.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Redoy, M.R.A.; Shuvo, A.A.S.; Cheng, L.; Al-Mamun, M. Effect of herbal supplementation on growth, immunity, rumen histology, serum antioxidants and meat quality of sheep. *Animal* **2020**, *14*, 2433–2441. [CrossRef]
2. Ulewicz-Magulska, B.; Wesolowski, M. Antioxidant activity of medicinal herbs and spices from plants of the Lamiaceae, Apiaceae and Asteraceae families: Chemometric interpretation of the data. *Antioxidants* **2023**, *12*, 2039. [CrossRef]
3. Sanna, F.; Piluzza, G.; Campesi, G.; Molinu, M.G.; Re, G.A.; Sulas, L. Antioxidant contents in a Mediterranean population of *Plantago lanceolata* L. exploited for quarry reclamation interventions. *Plants* **2022**, *11*, 791. [CrossRef]
4. Singh, T.; Singh, P.; Pandey, V.K.; Singh, R.; Dar, A.H. A literature review on bioactive properties of betel leaf (*Piper betel* L.) and its applications in food industry. *Food Chem. Adv.* **2023**, *3*, 100536. [CrossRef]
5. Bouloumpasi, E.; Hatzikamari, M.; Christaki, S.; Lazaridou, A.; Chatzopoulou, P.; Biliaderis, C.G.; Irakli, M. Assessment of antioxidant and antibacterial potential of phenolic extracts from post-distillation solid residues of oregano, rosemary, sage, lemon balm, and spearmint. *Processes* **2024**, *12*, 140. [CrossRef]
6. Tapia-Quirós, P.; Granados, M.; Sentellas, S.; Saurina, J. Microwave-assisted extraction with natural deep eutectic solvents for polyphenol recovery from agrifood waste: Mature for scaling-up? *Sci. Total Environ.* **2024**, *912*, 168716. [CrossRef]
7. Coscarella, M.; Nardi, M.; Alipieva, K.; Bonacci, S.; Popova, M.; Procopio, A.; Scarpelli, R.; Simeonov, S. Alternative assisted extraction methods of phenolic compounds using NaDESs. *Antioxidants* **2024**, *13*, 62. [CrossRef]
8. Čulina, P.; Repajić, M.; Elez Garofulić, I.; Dragović-Uzelac, V.; Pedisić, S. Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity of sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) leaf and berry extracts obtained via optimized microwave-assisted and accelerated solvent extraction. *Processes* **2024**, *12*, 126. [CrossRef]
9. Sadowska, B.; Budzyńska, A.; Stochmal, A.; Żuchowski, J.; Różalska, B. Novel properties of *Hippophae rhamnoides* L. twig and leaf extracts-anti-virulence action and synergy with antifungals studied in vitro on *Candida* spp. model. *Microb. Pathog.* **2017**, *107*, 372–379. [CrossRef]
10. Boško, P.; Małkowska, P.; Oberska, P.; Bordakov, A.; Hrechaniuk, I.; Komperda, M.; Kapturska, A.; Biel, W.; Michałek, K. Expression of aquaporin 1, 4, 8 and 9 in the liver of rats fed with the standard diet and supplemented with dried sea-buckthorn leaves (*Hippophae rhamnoides* L.). A pilot study. *Pol. J. Nat. Sci.* **2021**, *36*, 457–468. [CrossRef]
11. Criste, A.; Urcan, A.C.; Bunea, A.; Pripon Furtuna, F.R.; Olah, N.K.; Madden, R.H.; Corcionivoschi, N. Phytochemical composition and biological activity of berries and leaves from four romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Molecules* **2020**, *25*, 1170. [CrossRef]
12. Tkacz, K.; Wojdyło, A.; Turkiewicz, I.P.; Nowicka, P. Triterpenoids, phenolic compounds, macro-and microelements in anatomical parts of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries, branches and leaves. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *103*, 104107. [CrossRef]
13. Suryakumar, G.; Gupta, A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *138*, 268–278. [CrossRef]
14. Arora, R.; Mundra, S.; Yadav, A.; Srivastava, R.B.; Stobdan, T. Antimicrobial activity of seed, pomace and leaf extracts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against foodborne and food spoilage pathogens. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, *11*, 10424–10430.
15. Zakyntinos, G.; Varzakas, T. *Hippophae rhamnoides*: Safety and nutrition. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* **2015**, *3*, 89–97. [CrossRef]
16. Vilas-Franquesa, A.; Saldo, J.; Juan, B. Potential of sea buckthorn-based ingredients for the food and feed industry—A review. *Food Prod. Process. Nutr.* **2020**, *2*, 17. [CrossRef]
17. Ma, J.S.; Chang, W.H.; Liu, G.H.; Zhang, S.; Zheng, A.J.; Li, Y.; Cai, H.Y. Effects of flavones of SB fruits on growth performance, carcass quality, fat deposition and lipometabolism for broilers. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 2641–2649. [CrossRef]
18. Vlaicu, P.A.; Panaite, T.D.; Olteanu, M.; Ropota, M.; Criste, V.; Vasile, G.; Grosu, I. Production parameters, carcass development and blood parameters of the broiler chicks fed diets which include rapeseed, flax, grape and buckthorn meals. *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.* **2017**, *50*, 37–45.
19. Singh, D.N.; Shukla, P.K.; Bhattacharyya, A.; Roy, D.; Singh, Y.; Rout, P.K. Effect of dietary supplementation of sea buckthorn leaf meal in coloured breeder and their post hatch chicks on growth performance and serum biochemical attributes during summer season. *Indian J. Anim. Res.* **2020**, *54*, 1505–1511. [CrossRef]
20. Hao, X.; Zhang, X.; Yang, D.; Xie, Y.; Mu, C.; Zhang, J. Effects of sea-buckthorn flavonoids on growth performance, nutrient digestibility, microbial protein synthesis, and plasma antioxidant capacity of finishing lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2023**, *305*, 115783. [CrossRef]
21. Yan, Y.; Liang, N.; Ding, Z.; Zhang, K.; Yue, L.; Mei, W.; Li, W.; Song, X. Effects of sea buckthorn pomace on growth performance, serum metabolites and antioxidant indexes of growing pigs. *Semin. Cienc. Agrar.* **2023**, *44*, 1777–1788. [CrossRef]
22. Saracila, M.; Untea, A.E.; Panaite, T.D.; Varzaru, I.; Oancea, A.-G.; Turcu, R.P.; Vlaicu, P.A. Effects of supplementing sea buckthorn leaves (*Hippophae rhamnoides* L.) and chromium (iii) in broiler diet on the nutritional quality and lipid oxidative stability of meat. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2220. [CrossRef]

23. Yan, Y.; Ding, Z.; Liang, N.; Zhang, K.; Yue, L.; Li, W.; Song, X. Effect of dietary sea buckthorn pomace supplementation on growth performance, serum biochemical, immune, and antioxidant indexes in weaned piglets. *Pak. J. Zool.* **2023**, *1–8*. [CrossRef]
24. Dannenberger, D.; Tuchscherer, M.; Nürnberg, G.; Schmicke, M.; Kanitz, E. Sea buckthorn pomace supplementation in the diet of growing pigs—Effects on fatty acid metabolism, HPA activity and immune status. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 596. [CrossRef]
25. Sytařová, I.; Orsavová, J.; Snopek, L.; Mlček, J.; Byczyński, Ł.; Mišurcová, L. Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times. *Food Chem.* **2020**, *310*, 125784. [CrossRef]
26. Trivedi, V.L.; Attri, D.C.; Bahukhandi, A.; Nautiyal, M.C.; Sati, J. Seabuckthorn (*Hippophae salicifolia*) leaves, a good source of natural antioxidant compounds. *Natl. Acad. Sci. Lett.* **2022**, *45*, 195–198. [CrossRef]
27. Jaroszewska, A.; Biel, W. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Chil. J. Agric. Res.* **2017**, *77*, 155–162. [CrossRef]
28. Khajuria, P.; Raghuwanshi, P.; Rastogi, A.; Koul, A.L.; Zargar, R.; Kour, S. Hepatoprotective effect of seabuckthorn leaf extract in streptozotocin induced diabetes mellitus in Wistar rats. *Indian J. Anim. Res.* **2018**, *52*, 1745–1750. [CrossRef]
29. Liu, Y.; Ran, L.; Wang, Y.; Wan, P.; Zhou, H. Basic characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from sea buckthorn leaves. *Fitoterapia* **2023**, *169*, 105592. [CrossRef]
30. Kwon, E.-Y.; Lee, J.; Kim, Y.J.; Do, A.; Choi, J.-Y.; Cho, S.-J.; Jung, U.J.; Lee, M.-K.; Park, Y.B.; Choi, M.-S. Seabuckthorn leaves extract and flavonoid glycosides extract from seabuckthorn leaves ameliorates adiposity, hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation in diet-induced obesity. *Nutrients* **2017**, *9*, 569. [CrossRef]
31. Kumar, M.; Devi, T.; Lata, S. Nutritional potential of seabuckthorn plant for livestock feeding. *Indian Farmer* **2022**, *9*, 488–492.
32. Bhardwaj, P.; Varshneya, C.; Kaistha, K.; Tandon, T. In vitro evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *J. Med. Plant Res.* **2015**, *9*, 929–932. [CrossRef]
33. Ciesarová, Z.; Murkovic, M.; Cejpek, K.; Kreps, F.; Tobolková, B.; Koplík, R.; Belajová, E.; Kukurová, K.; Daško, L.; Panovská, Z.; et al. Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review. *Food Res. Int.* **2020**, *133*, 109170. [CrossRef]
34. Radenkova, V.; Püssa, T.; Juhnevica-Radenkova, K.; Anton, D.; Seglina, D. Phytochemical characterization and antimicrobial evaluation of young leaf/shoot and press cake extracts from *Hippophae rhamnoides* L. *Food Biosci.* **2018**, *24*, 56–66. [CrossRef]
35. Wei, J.; Li, S.; Su, T.; Zhao, J.; Jiang, Y.; Zubarev, Y.A.; Bi, Y. Phenolic compositions and antioxidant activities of *Hippophae tibetana* and *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* berries produced in Qinghai-Tibet Plateau. *Food Chem. X* **2022**, *15*, 100397. [CrossRef]
36. Cui, Q.; Liu, J.Z.; Wang, L.T.; Kang, Y.F.; Meng, Y.; Jiao, J.; Fu, Y.J. Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *J. Clean. Prod.* **2018**, *184*, 826–835. [CrossRef]
37. Tkacz, K.; Wojdyło, A.; Turkiewicz, I.P.; Ferreres, F.; Moreno, D.A.; Nowicka, P. UPLC-PDA-Q/TOF-MS profiling of phenolic and carotenoid compounds and their influence on anticholinergic potential for AChE and BuChE inhibition and on-line antioxidant activity of selected *Hippophaë rhamnoides* L. cultivars. *Food Chem.* **2020**, *309*, 125766. [CrossRef]
38. AOAC. *Official Methods of Analysis*, 21st ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, USA, 2019.
39. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C.L.W.T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT—Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [CrossRef]
40. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [CrossRef]
41. Zielinska, D.; Wiczowski, W.; Piskula, M.K. Determination of the relative contribution of quercetin and its glucosides to the antioxidant capacity of onion by cyclic voltammetry and spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3524–3531. [CrossRef]
42. Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 875–877. [CrossRef]
43. Ordoñez, A.A.L.; Gomez, J.G.; Vattuone, M.A.; Isla, M.I. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swart extracts. *Food Chem.* **2006**, *97*, 452–458. [CrossRef]
44. Mirecki, R.M.; Teramura, A.H. Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean. V. The dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion. *Plant Physiol.* **1984**, *74*, 475–480. [CrossRef]
45. Porter, L.J.; Hrstich, L.N.; Chan, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **1986**, *1*, 223–230.
46. Tambe, V.D.; Bhambar, R.S. Estimation of total phenol, tannin, alkaloid and flavonoid in *Hibiscus tiliaceus* Linn. wood extracts. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2014**, *2*, 41–47.
47. TIBCO Software. TIBCO. Available online: <https://www.scribd.com/document/321061529/STATISTICA-Electronic-Manual> (accessed on 20 March 2024).
48. Losada-Barreiro, S.; Bravo-Diaz, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *133*, 379–402. [CrossRef]
49. Roginsky, V.; Lissi, E.A. Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* **2005**, *92*, 235–254. [CrossRef]
50. Karadag, A.; Ozelik, B.; Saner, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods* **2009**, *2*, 41–60. [CrossRef]

51. Popov, I.; Lewin, G.; von Baehr, R. Photochemiluminescent detection of antiradical activity I, Assay of superoxide dismutase. *Biomed. Biochim. Acta* **1987**, *46*, 775–779.
52. Cho, H.; Cho, E.; Jung, H.; Yi, H.C.; Lee, B.; Hwang, K.T. Antioxidant activities of sea buckthorn leaf tea extracts compared with green tea extracts. *Food Sci. Biotechnol.* **2014**, *23*, 1295–1303. [[CrossRef](#)]
53. Upadhyay, N.K.; Kumar, Y.; Gupta, A. Antioxidant, cytoprotective, and antibacterial effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3443–3448. [[CrossRef](#)]
54. Arnao, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, *11*, 419–421. [[CrossRef](#)]
55. Alabri, T.H.A.; Al Musalami, A.H.S.; Hossain, M.A.; Weli, A.M.; Al-Riyami, Q. Comparative study of phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial capacities of fresh and dry leaves crude plant extracts of *Datura metel* L. *J. King Saud. Univ. Sci.* **2014**, *26*, 237–243. [[CrossRef](#)]
56. Ma, X.; Yang, W.; Kallio, H.; Yang, B. Health promoting properties and sensory characteristics of phytochemicals in berries and leaves of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 3798–3816. [[CrossRef](#)]
57. Żuchowski, J. Phytochemistry and pharmacology of sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides*; syn. *Hippophae rhamnoides*): Progress from 2010 to 2021. *Phytochem. Rev.* **2023**, *22*, 3–33. [[CrossRef](#)]
58. Biel, W.; Jendrzeczek, E.; Jaroszewska, A.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E.; Telesiński, A. Nutritional content and antioxidant properties of selected species of *Amaranthus* L. *Ital. J. Food Sci.* **2017**, *29*, 728–740. [[CrossRef](#)]
59. Wang, N.; Wen, X.; Gao, Y.; Lu, S.; Li, Y.; Shi, Y.; Yang, Z. Identification and characterization of the bioactive polyphenols and volatile compounds in sea buckthorn leaves tea together with antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 890486. [[CrossRef](#)]
60. Glauzunova, E.M.; Gachechiladze, N.D.; Bondar, V.V.; Korzinnikov, Y.S.; Potapova, I.M.; Gur'yanov, A.F. Biochemical fruit characteristics of *Hippophae rhamnoides* L. growing in the Western Pamirs. *Hortic. Abstr.* **1984**, *54*, 6135.
61. Glauzunova, E.M.; Gachechiladze, N.D.; Litvinenko, V.I.; Popova, T.P. Flavonoids of leaves of sea buckthorn growing in the Western Pamir mountains. *Hortic. Abstr.* **1985**, *57*, 3263.
62. Chen, T.G.; Ni, M.K.; Li, R.; Ji, F.; Chen, T.; Ni, M.K.; Li, R.; Ji, F. Investigation of the biological properties of Central Asian Sea Buckthorn growing in the province of Kansu, China. *Chem. Nat. Compd.* **1991**, *27*, 119–121.
63. de la Iglesia, R.; Milagro, F.I.; Campión, J.; Boqué, N.; Martínez, J.A. Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors* **2010**, *36*, 159–168. [[CrossRef](#)]
64. González-Quilen, C.; Rodríguez-Gallego, E.; Beltrán-Debón, R.; Pinent, M.; Ardévol, A.; Blay, M.T.; Terra, X. Health-Promoting Properties of Proanthocyanidins for Intestinal Dysfunction. *Nutrients* **2020**, *12*, 130. [[CrossRef](#)]
65. Luiz, R.L.F.; Vila, T.V.M.; de Mello, J.C.P.; Nakamura, C.V.; Rozental, S.; Ishida, K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *BMC Complement. Med. Ther.* **2015**, *15*, 1–11. [[CrossRef](#)]
66. Fan, J.; Ding, X.; Gu, W. Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chem.* **2007**, *102*, 168–177. [[CrossRef](#)]
67. Yang, W.; Laaksonen, O.; Kallio, H.; Yang, B. Proanthocyanidins in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different origins with special reference to the influence of genetic background and growth location. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 1274–1282. [[CrossRef](#)]
68. Islam, S. Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf: Its potential effect on human health and nutrition. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 13–121. [[CrossRef](#)]
69. Gould, K.S.; Neill, S.O.; Vogelmann, T.C. A unified explanation for anthocyanins in leaves? *Adv. Bot. Res.* **2002**, *37*, 167–192. [[CrossRef](#)]
70. Li, G.; Lin, Z.; Zhang, H.; Liu, Z.; Xu, Y.; Xu, G.; Li, H.; Ji, R.; Luo, W.; Qiu, Y.; et al. anthocyanin accumulation in the leaves of the purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. *Molecules* **2019**, *24*, 3743. [[CrossRef](#)]
71. Su, X.; Griffin, J.; Xu, J.; Ouyang, P.; Zhao, Z.; Wang, W. Identification and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato leaves. *Heliyon* **2019**, *5*, e01964. [[CrossRef](#)]
72. Ercisli, S.; Orhan, E.; Ozdemir, O.; Sengul, M. The genotypic effects on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries grown in Turkey. *Sci. Hortic.* **2007**, *115*, 27–33. [[CrossRef](#)]
73. Tolkachev, O.N.; Abizov, E.A.; Abizova, E.V.; Mal'Tsev, S.D. Phytochemical study of the bark of some plants of the Elaeagnaceae family as a natural source of β -carboline indole alkaloids. *Pharm. Chem. J.* **2008**, *42*, 630–632. [[CrossRef](#)]
74. Chen, N.; Qi, Y.; Ma, X.; Xiao, X.; Liu, Q.; Xia, T.; Xiang, J.; Zeng, J.; Tang, J. Rediscovery of traditional plant medicine: An underestimated anticancer drug of chelerythrine. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 906301. [[CrossRef](#)]
75. Kosina, P.; Walterova, D.; Ulrichová, J.; Lichnovský, V.; Stiborová, M.; Rýdlová, H.; Vičar, J.; Krečman, V.; Brabec, M.J.; Šimánek, V. Sanguinarine and chelerythrine: Assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 85–91. [[CrossRef](#)]
76. Hu, N.X.; Chen, M.; Liu, Y.S.; Shi, Q.; Yang, B.; Zhang, H.C.; Cheng, P.; Tang, Q.; Liu, Z.Y.; Zeng, J.G. Pharmacokinetics of sanguinarine, chelerythrine, and their metabolites in broiler chickens following oral and intravenous administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2019**, *42*, 197–206. [[CrossRef](#)]

77. Chen, J.; Yang, J.; Ma, L.; Li, J.; Shahzad, N.; Kim, C.K. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2611. [[CrossRef](#)]
78. Parcheta, M.; Świsłocka, R.; Orzechowska, S.; Akimowicz, M.; Choińska, R.; Lewandowski, W. Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. *Materials* **2021**, *14*, 1984. [[CrossRef](#)]
79. Wei, J.; Su, T.; Su, H.; Jiang, Y.; Li, J.; Bi, Y. Comparative assessment of phenolics, antioxidant and antiproliferative activities between *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* and *H. tibetana* leaf in Qinghai-Tibet Plateau. *Food Biosci.* **2022**, *46*, 101507. [[CrossRef](#)]
80. Witkowicz, R.; Biel, W.; Skrzypek, E.; Chłopicka, J.; Gleń-Karolczyk, K.; Krupa, M.; Prochownik, E.; Galanty, A. Microorganisms and biostimulants impact on the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Sprouts. *Antioxidants* **2020**, *9*, 584. [[CrossRef](#)]
81. Woodruff, R.C.; Tong, X.; Wadhera, R.K.; Loustalot, F.; Jackson, S.L.; Vaughan, A.S. Cardiovascular disease mortality disparities in black and white adults, 2010–2022. *AJPM* **2024**, *66*, 914–916. [[CrossRef](#)]
82. Cenkowski, S.; Yakimishen, R.; Przybylski, R.; Muir, W.E. Quality of extracted sea buckthorn seed and pulp oil. *Can. Biosyst. Eng.* **2006**, *48*, 3.9–3.16.
83. Kiokias, S.; Varzakas, T.; Oreopoulou, V. In vitro activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 78–93. [[CrossRef](#)]
84. Visioli, F.; Hagen, T.M. Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: Focus on micronutrients. *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 199–206. [[CrossRef](#)]
85. Suomela, J.P.; Ahotupa, M.; Yang, B.; Vasankari, T.; Kallio, H. Absorption of flavonoids derived from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and their effect on emerging risk factors for cardiovascular disease in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7364–7369. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Załącznik 3.

Oświadczenia współautorów o udziale w przygotowaniu publikacji

mgr inż. Paulina Boško
(imię i nazwisko kandydatki)
Zootechnika i Rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Szczecin, dn. 29 lipca 2024 r.

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Ożgo
Przewodnicząca Rady Naukowej
Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy:

Boško, P.; Biel, W.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Chemical composition and nutritive value of sea buckthorn leaves. *Molecules* 2024, 29, 3550. <https://doi.org/10.3390/molecules29153550>

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w nadzorze nad realizacją badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*



(podpis kandydatki)

dr hab. inż. Wioletta Biel, prof. ZUT
Katedra Nauk o Zwierzętach Monogastrycznych
Pracownia Żywienia Zwierząt i Żywności
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Szczecin, dn. 30 lipca 2024 r.

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Ożgo
Przewodnicząca Rady Naukowej
Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

Oświadczenie współautora

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Boško, P.; Biel, W.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Chemical composition and nutritive value of sea buckthorn leaves. *Molecules* 2024, 29, 3550. <https://doi.org/10.3390/molecules29153550>

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *ustaleniu koncepcji doświadczenia, opracowaniu metodycznym badań, weryfikacji wyników, nadzorem nad realizacją badań oraz merytorycznej ocenie jej ostatecznej wersji.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Paulinę Boško* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład kandydatki *Pauliny Boško* polegający na: *sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w nadzorze nad realizacją badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Wioletta Biel

dr hab. inż. Robert Witkowicz, prof. URK
Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie

Kraków, dn. 29 lipca 2024 r.

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Ożgo
Przewodnicząca Rady Naukowej
Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Boško, P.; Biel, W.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Chemical composition and nutritive value of sea buckthorn leaves. *Molecules* 2024, 29, 3550. <https://doi.org/10.3390/molecules29153550>

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *opracowaniu metodycznym badań, przeprowadzeniu analiz statystycznych, wizualizacji danych, interpretacji niektórych wyników badań oraz zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Paulinę Boško* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład kandydatki *Pauliny Boško* polegający na: *sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Robert Witkowicz

dr Ewa Piątkowska, prof. URK
Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków, dn. 30 lipca 2024 r.

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Ożgo
Przewodnicząca Rady Naukowej
Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Boško, P.; Biel, W.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Chemical composition and nutritive value of sea buckthorn leaves. *Molecules* 2024, 29, 3550. <https://doi.org/10.3390/molecules29153550>

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *opracowaniu metodycznym badań, ocenie niektórych wyników badań oraz ocenie ostatecznej wersji pracy.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Paulinę Boško* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład kandydatki *Pauliny Boško* polegający na: *sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz chemicznych, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*



mgr inż. Paulina Boško
(imię i nazwisko kandydatki)
Zootechnika i Rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Szczecin, dn. 20 lipca 2024 r.

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Ożgo
Przewodnicząca Rady Naukowej
Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy:

Boško, P.; Biel, W.; Smetanska, I.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Sea Buckthorn Leaves as a Potential Source of Antioxidant Substances. Appl. Sci. 2024, 14, 5038. <https://doi.org/10.3390/app14125038>,

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w nadzorze nad realizacją badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*



(podpis kandydatki)

dr hab. inż. Wioletta Biel, prof. ZUT
Katedra Nauk o Zwierzętach Monogastrycznych
Pracownia Żywienia Zwierząt i Żywności
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Szczecin, dn. 25 lipca 2024 r.

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Ożgo
Przewodnicząca Rady Naukowej
Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

Oświadczenie współautora

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Boško, P.; Biel, W.; Smetanska, I.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Sea Buckthorn Leaves as a Potential Source of Antioxidant Substances. Appl. Sci. 2024, 14, 5038. <https://doi.org/10.3390/app14125038>,

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *ustaleniu koncepcji doświadczenia, opracowaniu metodycznym badań, weryfikacji wyników, nadzorem nad realizacją badań oraz merytorycznej ocenie jej ostatecznej wersji.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Paulinę Boško* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład kandydatki *Pauliny Boško* polegający na: *sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w nadzorze nad realizacją badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Wioletta Biel

Prof Dr. Ing. Dr. Agr. Iryna Smetanska
University of Applied Sciences Weihenstephan-Triesdorf
Faculty of Agriculture, Food and Nutrition, Triesdorf
Course Management of Food Products
Plant Production and Processing

Triesdorf, 20 lipca 2024

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Ożgo
Przewodnicząca Rady Naukowej
Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet
Technologiczny w Szczecinie

**Erzeugung und Verarbeitung
von Lebensmitteln
pflanzlicher Herkunft**

Fakultät Landwirtschaft,
Lebensmittel und Ernährung

Hochschule
Weihenstephan-Triesdorf

Markgrafenstr. 16
91746 Weidenbach

Prof. Dr. habil. agr. Dr.-Ing.
Dr. Iryna Smetanska

Tel +49 9826 654-228
Fax +49 9826 654-41228
de iryna.smetanska@hswt.de
www.hswt.de

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Boško, P.; Biel, W.; Smetanska, I.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Sea buckthorn leaves as a potential source of antioxidant substances. Appl. Sci. 2024, 14, 5038. <https://doi.org/10.3390/app14125038>,
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *opracowaniu metodycznym badań, przeprowadzeniu części analiz chemicznych oraz ocenie ostatecznej wersji pracy.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Paulinę Boško* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład kandydatki *Pauliny Boško* polegający na: *sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współdziałaniu w opracowaniu metodyki badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*



Prof. Dr. Iryna Smetanska

dr hab. inż. Robert Witkowicz, prof. URK
Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków, dn. 26 lipca 2024 r.

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Ożgo
Przewodnicząca Rady Naukowej
Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

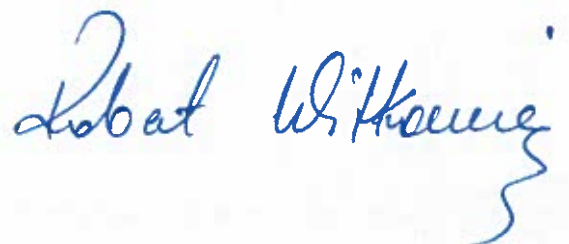
Niniejszym oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Boško, P.; Biel, W.; Smetanska, I.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Sea buckthorn leaves as a potential source of antioxidant substances. Appl. Sci. 2024, 14, 5038. <https://doi.org/10.3390/app14125038>,

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *opracowaniu metodycznym badań, przeprowadzeniu analiz statystycznych, wizualizacji danych oraz merytorycznej ocenie jej ostatecznej wersji.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Paulinę Boško* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład kandydatki *Pauliny Boško* polegający na: *sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*



dr Ewa Piątkowska, prof. URK
Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków, dn. 26 lipca 2024 r.

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Ożgo
Przewodnicząca Rady Naukowej
Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Boško, P.; Biel, W.; Smetanska, I.; Witkowicz, R.; Piątkowska, E. Sea buckthorn leaves as a potential source of antioxidant substances. Appl. Sci. 2024, 14, 5038. <https://doi.org/10.3390/app14125038>,

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *opracowaniu metodycznym badań, przeprowadzeniu części analiz chemicznych, interpretacji niektórych wyników badań oraz ocenie ostatecznej wersji pracy.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Paulinę Boško* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład kandydatki *Pauliny Boško* polegający na: *sformułowaniu hipotezy badawczej, stworzeniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, zebraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*



11. Dodatkowe informacje

11.1. Edukacja

2009–2013: Studia s1 na kierunku biotechnologia na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

2013–2014: Studia s2 na kierunku biotechnologia na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego.

2014–2019: Studia s3 (studia doktoranckie) na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

2015–2018: Szkoła policealna TEB Edukacja w Szczecinie, kierunek – technik weterynarii

2019–obecnie: Studia s2 na kierunku biologiczne podstawy kryminalistyki na Wydziale Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego

2022–2023: Studia podyplomowe Tresura i behawiorystyka zwierząt na Uniwersytecie WSB Merito Szczecin

11.2. Doświadczenie zawodowe

2019–2021: Technik Weterynarii w Przychodnia Weterynaryjna A Na Skarpie w Szczecinie

2022–obecnie: Technik Weterynarii w Przychodnia Weterynaryjna Rodzinna w Szczecinie

11.3. Działalność dydaktyczna

Od pierwszego roku studiów doktoranckich prowadzenie zajęć dydaktycznych na studiach stacjonarnych i na niestacjonarnych WBiHZ, ZUT w Szczecinie. Zajęcia laboratoryjne obejmowały następujące przedmioty: Biologia ogólna, Biotechnologia w produkcji pasz, Dodatki w żywieniu zwierząt amatorskich, Żywienie psów, Żywienie zwierząt i paszoznawstwo oraz Żywność i żywienie, a zdrowie człowieka na kierunkach: biotechnologia, kynologia i zootechnika

11.4. Działalność organizacyjna

Data	Wydarzenie
05.11.2014	Promocja Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, ZUT w Szczecinie na Targach Edukacji i Pracy w Kołobrzegu
18.03.2015	Członek komisji konkursowej w XVI Konkursie Biologicznym dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych organizowany przez ZUT i ZCDN
17.04.2015	Prowadzenie zajęć dla młodzieży szkolnej w ramach „Nocy naukowca” organizowanej przez ZSO nr 4 w Szczecinie pt. „Sztuka czytania etykiet karm dla zwierząt”
29.04.2015	Prowadzenie zajęć dla młodzieży szkolnej w ramach programu „LUTEK” organizowanego przez Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, pt. „Sztuka czytania etykiet karm dla zwierząt”
22.05.2015	Prowadzenie zajęć dla młodzieży szkolnej w ramach „Nocy naukowców” organizowanej przez Gimnazjum nr 18 im. Noblistów Polskich w Szczecinie pt. „Sztuka czytania etykiet karm dla zwierząt”
24.09.2015	Prowadzenie zajęć dla młodzieży szkolnej w ramach „Festiwalu Nauki” organizowanej przez Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie pt. „E-lementarz dodatków do żywności”
14.10.2015	Prowadzenie zajęć w ramach „X Jubileuszowej Europejskiej Noc Naukowców” organizowanej przez Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie pt. „Żywność funkcjonalna i jej bezcenny wpływ na organizm”
08.04.2016	Prowadzenie zajęć dla młodzieży szkolnej w ramach „Nocy naukowca” organizowanej przez ZSO nr 4 w Szczecinie, pt. „Pierwsza pomoc przedmedyczna dla psów i kotów”
16.04.2016	Członek komisji konkursowej w XVII Konkursie Biologicznym dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych organizowany przez ZUT i ZCDN
08.04.2017	Członek komisji konkursowej w XVIII Konkursie Biologicznym dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych organizowany przez ZUT i ZCDN
6–7.10.2017	Członek komitetu organizacyjnego Trzecich Warsztatów Kynologicznych

11.5. Działalność popularyzująca naukę

11.5.1. Wygłoszone referaty na konferencjach międzynarodowych i krajowych

- 02.06.2017 Referat wygłoszony w języku polskim pt. „Wpływ dodatku liści rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) na aktywność przeciwutleniającą napojów fermentacyjnych” na Konferencji Nauki Przyrodnicze we Współczesnym Świecie, organizowanej przez Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, ZUT w Szczecinie
- 27.06.2018 Referat wygłoszony w języku polskim pt. „Aktywność antyoksydacyjna liści rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.)” na XLVII Sesji Naukowej Sekcji Żywienia Zwierząt KNZiA PAN, Kraków, 27–29 czerwca, 2018

11.5.2. Uczestnictwo w konferencjach krajowych i międzynarodowych

- 10–11.09.2016 Konferencja weterynaryjna „Praktyczne aspekty w leczeniu i diagnostyce małych i dużych zwierząt” organizowana przez Teb Edukacja
- 14.10.2017 Ogólnopolska Konferencja Behawioryzmu Zwierząt organizowana przez Animal Expert
- 21.10.2017 Konferencja „Wpływ diety na zachowanie psów” organizowana przez Centrum Szkoleniowe Pies
- 07.04.2018 VII Międzyuczelniana Konferencja Dzień Mózgu

11.6. Szkolenia, kursy i warsztaty

- 08.01.2015 Warsztaty „Budżet projektu w programie Horyzont 2020” organizowane przez Nova Skills Sp. z o.o.
- 26.06.2015 „Dietetyka psów i kotów”, szkolenie on-line organizowane przez Centrum Szkolenia Podyplomowego Techników Weterynarii
- 25.07.2015 Kurs „Pierwsza Pomoc i Prewencja Weterynaryjna Psów i Kotów” organizowany przez Zoopiekunowie Firma Usługowo Szkoleniowa SKABAT

- 07 – 11.12.2015 Szkolenie organizowane przez Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych w zakresie:
- szkolenia dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich prowadzenie
 - szkolenia dla osób wykonujących procedury
 - szkolenia dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach
- 11.09.2016 Warsztaty weterynaryjne „Praktyczne aspekty pracy z krwią” organizowane przez Teb Edukacja
- 25.11.2016 Szkolenie dla techników weterynarii, kurs pierwszej pomocy „Pacjent powypadkowy” organizowany przez VetAkademia
- 28.03.2017 Warsztaty „Interpretacja nowych wymagań prawnych Unii Europejskiej dotyczących znakowania żywności” organizowane przez Regionalne Centrum Innowacji i Transferu Technologii ZUT
- 02.04.2017 Szkolenie „Urzędowa kontrola nad bezpieczeństwem żywności w Wielkiej Brytanii” organizowane przez MRCVS, Eville&Jones (UK)
- 19.05.2017 Warsztaty Marty Muchy-Balcerek „GaSa – masaż relaksacyjny psów” organizowane przez Aport – szkolenie psów
- 01.07.2017 Seminarium lek. wet. Jolanty Łapińskiej „Przyczyny i sposoby rozwiązywania problemów behawioralnych psów i kotów po adopcji” organizowane przez Szkołę dla Psów PiesPotrafi.pl
- 30.09.2017 Kursu „Żywienie Psów” organizowany przez TEB Edukacja
- 01.09.2018 Seminarium lek. wet. Jolanty Łapińskiej „Lęki i fobie psów i kotów” organizowane przez Szkołę dla Psów PiesPotrafi.pl
- 23–29.05.2019 Warsztaty EIT Food RIS Venturing School, Uniwersytet Warmińsko–Mazurski w Olsztynie, organizowane przez firmę Matis (Islandia) oraz University of Cambridge
- 10.12.2022 Ogólnopolska Konferencja Behawioryzmu Zwierząt, Agresja kotów organizowane przez Forum Media Polska
- 13.03.2023 ABC Kociej Diety z Agnieszką Cholewiak–Góralczyk organizowane przez Chcę Zostać
- 19.05.2023 ABC Psiej Diety z Agnieszką Cholewiak–Góralczyk organizowane przez Chcę Zostać

- 17.06.2023 Warsztaty Komunikacja psów efektywny trening i terapia behawioralna bazująca na wzajemnym zrozumieniu, prelegent: Katarzyna Wawryniuk, XV Ogólnopolska Konferencja Behawioryzmu Zwierząt
- 19.06.2023 Webinar „Zmiany kliniczne u starszych psów i kotów”, Karolina Hołda Żywnienie Psów i Kotów

11.7. Staże naukowe

- Sierpień 2011 Praktyka studencka w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej w Szczecinie.
- 2013 – 2014 Wymiana studencka w ramach programu Erasmus na Słowackim Uniwersytecie Rolniczym w Nitrze
- październik 2016 – maj 2018 Staż naukowy w ramach program BAYHOST, Plant Production and Processing, University of Applied Sciences Weihenstephan-Triesdorf, Markgrafenstr 16, 91746 Weidenbach, Germany [Uniwersytet Nauk Stosowanych Weihenstephan–Triesdorf, Katedra Produkcji i Przetwórstwa Roślin, Wydział Rolniczy, Triesdorf , Weidenbach, Niemcy]

11.8. Dorobek publikacyjny

11.8.1. Prace w czasopismach punktowanych

1. Michałek K., Dratwa-Chałupnik A., **Boško P.**, Dubik M., Jaszczuk M., Sylwestrzak A., Szczepanik K., Kawecka P., Marczuk N. 2014. Selected haematological and biochemical parameters of the blood plasma of calves during the first month of life before and after the administration of milk replacer supplemented with lactose. *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Agricultura Alimentaria Piscaria et Zootechnica*, 312: 97–104.
2. Biel W., Stankowski S., Jaroszewska A., Pużyński S., **Boško P.** 2016. The influence of selected agronomic factors on the chemical composition of spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) grain. *Journal of Integrative Agriculture*, 15: 1763–1769.
3. Biel W., Jaroszewska A., **Boško P.**, Stankowski S., Sadkiewicz J. 2016. Effects of genotype and weed control on the nutrient composition of winter spelt (*Triticum*

- aestivum* ssp. *spelta* L.) and common wheat (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*). Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science, 66: 27–35.
4. Jaroszewska A., Biel W., Stankowski S., **Boško P.** 2016. Evaluation of the influence of symbiotic mycorrhizal fungi on basic chemical compounds and minerals of sea buckthorn leaves. Journal of Elementology, 21: 1029–1041.
 5. **Boško P.**, Biel W. 2017. Właściwości lecznicze rokitnika zwyczajnego (*Hippophaë rhamnoides* L.). Postępy Fitoterapii, 18: 36–41.
 6. Sytar O., **Boško P.**, Živcák M., Brestic M., Smetanska I. 2018. Bioactive phytochemicals and antioxidant properties of the grains and sprouts of colored wheat genotypes. Molecules, 23: 2282–2296.
 7. **Boško P.**, Małkowska P., Oberska P., Bordakov A., Hrechaniuk I., Komperda M., Kapturska A., Biel W., Michałek K. 2021. Expression of Aquaporin 1, 4, 8 and 9 in the liver of rats fed with standard diet and supplemented with dried sea-buckthorn leaves (*Hippophaë rhamnoides* L.). A pilot study. Polish Journal of Natural Science, 36: 457–468.
 8. **Boško P.**, Biel W., Witkowicz R., Piątkowska E. 2024. Chemical composition and nutritive value of sea buckthorn leaves. Molecules. 29, 3550. [P-1]
 9. **Boško P.**, Biel W., Smetanska I., Witkowicz R., Piątkowska E. 2024. Sea buckthorn leaves as a potential source of antioxidant substances. 2024. Applied Sciences, 14. [P-2]

11.8.2. Doniesienia i komunikaty na konferencjach, seminariach, warsztatach międzynarodowych i krajowych

1. **Boško P.**, Biel W., Jaroszewska A., Kowalewska R. 2015. The effect of organic farming methods on the chemical composition leaves of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). 60th Anniversary of Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry International Scientific Conference organised by West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 17–18 czerwiec 2015; pp. 37–38.
2. **Boško P.** A., Biel W. 2016. Evaluation of the chemical composition of selected varieties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. XLV Scientific Session of Group of Animal Nutrition KNZ PAN, Olsztyn, 21–22 czerwca, 2016.
3. **Boško P.**, Smetanska I., A., Biel W. 2017. The influence of adding sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves on the antioxidant activity of fermented beverages.

- Materiały konferencyjne Nauki Przyrodnicze we Współczesnym Świecie, Szczecin, 2 czerwiec, 2017.
4. Biel W., Kowalewska-Łuczak I., **Bośko P.**, Łysoń E. 2017. Podstawy żywienia psów pracujących. Trzecie Warsztaty Kynologiczne, Szczecin, 6–7 października 2017.
 5. Łysoń E., **Bośko P.**, Biel W. 2017. Składniki mineralne w diecie psów pracujących. Trzecie Warsztaty Kynologiczne, Szczecin, 6–7 października 2017.
 6. **Bośko P.**, Łysoń E., Biel W. 2017. Witaminy w żywieniu psów użytkowych. Trzecie Warsztaty Kynologiczne, Szczecin, 6–7 października 2017.
 7. **Bośko P.**, Biel W. 2018. Zapotrzebowanie na energię psów sportowych i pracujących. Czwarte Warsztaty Kynologiczne, Zakład Karny w Goleniowie, 18 maja 2018.
 8. **Bośko P.**, Biel W., Maciejewska D. 2018. Charakterystyka i porównanie profilu kwasów tłuszczowych liści i owoców rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.). Materiały konferencyjne Biotechnologia – problemy i wyzwania, Szczecin, 8 czerwca, 2018.
 9. Łysoń E., **Bośko P.**, Biel W. 2018. Wpływ gatunku na aktywność przeciwutleniającą liści amarantusa (*Amaranthus* L.). Materiały konferencyjne Biotechnologia – problemy i wyzwania, Szczecin, 8 czerwca, 2018.
 10. **Bośko P.**, Biel W., Smetanska I. 2018. Antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. Materiały konferencyjne XLVII Sesja Naukowa Sekcji Żywienia Zwierząt KNZiA PAN, Kraków, 27–29 czerwca, 2018.
 11. **Bośko P.**, Biel W. 2018. Żywienie w chorobach przyzębia u psów. Piąte Warsztaty Kynologiczne, Szczecin, 30 listopada – 2 grudnia 2018.

11.8.3. Prace popularno–naukowe

Bośko P. 2014. Prozdrowotne właściwości serwatki – niedocenianego skarbu. www.akademiadietetyki.pl (praca wyróżniona w konkursie „Nauka i praktyka w zawodzie dietetyka”).