

**Imię i nazwisko autora pracy:** Hubert Iwiński

**Tytuł pracy:** Analiza właściwości przeciwpasożytniczych i przeciwpierwotniakowych wybranych ekstraktów ziołowych

**Tytuł pracy w języku angielskim:** Analysis of antiparasitic and antiprotozoal properties of selected herbal extracts

**Dziedzina:** Nauki rolnicze

**Dyscyplina:** Technologia żywności i żywienia

**Data sporządzenia streszczenia** 28.03.2023

**Słowa kluczowe:** ekstrakty ziołowe, fitoncydy, właściwości przeciwpasożytnicze, przeciwpierwotniakowe, kokcydioza, olejki eteryczne

## ABSTRACT

Increasing microbial resistance is a key issue in both public health and animal husbandry. One of the main causes is the excessive use of antibiotics in medicine, veterinary medicine and animal husbandry. This is an extremely important aspect, both in terms of quality and safety of animal products. Reducing the amount or being able to completely eliminate antibiotics in the production of eggs or meat makes it possible to obtain premium quality products. What is more, it is characterised by better quality parameters due to the use of alternative products, most often of natural origin, showing a number of positive side effects such as a reduction in fat in the pectoral muscle or a more favourable fatty acid profile.

These activities generated the need to find an effective alternative to the antibiotics. The search for effective solutions, i.e. preparations based on substances of natural origin, including those of plant origin, has become one of the main directions of research. The results so far allow us to conclude that the use, both preventive and curative, of extracts, essential oils or micronised herbs can be an effective alternative to antibiotics. Consequently, the proposed solutions of natural substitutes for antibiotics could lead to foods characterised not only by zero antibiotic content, but also by no lesser quality and consumer acceptance.

One of the biggest problems facing companies in the meat industry are diseases caused by protozoa such as *Eimeria* spp, *Histomonas melagridis* (e.g. coccidiosis, black head disease) or bacteria such as *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* (necrotic enteritis, salmonellosis or colibacteriosis). They are responsible for the largest production losses of several to several billion dollars per year. There is currently a very high demand in the food

market for natural preparations as an effective alternative to the antibiotics used to date. The demand includes products that are characterised by the simultaneous fulfilment of three characteristics: efficacy in low concentrations; natural origin of the active substances; and a realistic, for economic conditions, price. During the PhD disertation, a series of studies and implementation work was carried out, which ultimately led to the development of manufacturing technology and the creation of three finished products (currently produced by AdiFeed) with effective antimicrobial properties.

Initially, selected extracts and distillates of e.g.. common barberry, empress tree, yellow horned poppy and others were investigated. However, despite their effectiveness, due to the limited availability (on an industrial scale) in 2020 and the strongly increasing price of this raw material, as well as technological difficulties (e.g. in standardising the extracts), it was decided to use other, i.e. essential oil-based mixtures. Further research work within the framework of the implementation doctorate made it possible to analyse the antiprotozoal properties of new compositions based on essential oils from eucalyptus, cedar lavender and tea tree. Their high efficacy against *Euglena gracilis*, *Gregarina blattarum*, *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum*, *Pentatrichomonas hominis* of 0.001-0.009% was demonstrated. (**Antibiotics 2022a** Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures). The efficacy of clove, cinnamon, rosemary and garlic oils in combination with metals and acids was proven in **Molecules 2023**, In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. At the same time, it was proven the lack of toxicity against human fibroblast cell lines (NHFD). An additional important element described in the above publication was the development of standardised garlic distillates based on nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry. It has been shown that the gas chromatography-mass spectrometry coupled technique used to date for volatile sulphur compounds does not quantify the actual composition. A cheap and simple solution was proposed to standardise the composition of the mixture, i.e. NMR measurement and integration of the chemical shifts of the protons of the allylic groups of the corresponding mono-, di-, tri-, tetra- and pentasulphides.

These studies enabled the creation of the first formulation versions of the complex preparation. The resulting formulations were subjected to further analyses of their antimicrobial properties. The compound formulation, containing, among others, methyl salicylate, 1,8-cyeneol and *trans*-anethole, exhibited antibacterial efficacy against multidrug-resistant serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium and Kentucky. The high efficacy of the preparation was maintained even against the Kentucky serotype, which has resistance

genes to 18 different antibiotics belonging to five different classes. The proposed mixtures have been proven to have high efficacy against pathogens present and transmitted through food (**Antibiotics 2022b** In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on *Salmonella* spp. Isolated from Chicken Broiler).

The obtained research results based on mixtures of essential oils, selected organic acids and metal ions resulted in **6 patent applications** and consequently in obtaining patent protection for them in the territory of the RP (DB.P.434642.7, DB.P.434643.5, DB.P.434644.5, DB.P.434645.13, DB.P.434646.7, DB.P.434647.7).

The most important, implementation effect of the doctoral thesis is the implementation into production at AdiFeed Sp. z o.o. of a series of preparations, i.e. **adiBiotic®**, **naturBiotic®**, **adiNext®**, based on mixtures of natural phytoncides, obtained in the experiments of the implementation part of the PhD.

## STRESZCZENIE

Narastająca oporność mikroorganizmów jest obecnie kluczowym zagadnieniem zarówno zdrowia publicznego, jak i chowu zwierząt. Jedną z głównych przyczyn jest nadmierne stosowanie antybiotyków w medycynie, weterynarii i chowie zwierząt. Jest to niezwykle istotny aspekt, zarówno pod względem jakości, jak i bezpieczeństwa produktów pochodzenia zwierzęcego. Zmniejszenie ilości lub możliwość całkowitego wyeliminowania antybiotyków w produkcji jaj czy mięsa pozwala na uzyskanie produktów o jakości premium. Co więcej, charakteryzującej się lepszymi parametrami jakościowymi ze względu na stosowanie alternatywnych produktów, najczęściej pochodzenia naturalnego, wykazujących szereg pozytywnych efektów ubocznych jak m.in. zmniejszenie tłuszczu w mięśni piersiowym czy korzystniejszego profilu kwasów tłuszczowych.

Działania te wygenerowały potrzebę znalezienia skutecznej alternatywy dla dotychczas stosowanych antybiotyków. Jednym z głównych kierunków badań stało się poszukiwanie skutecznych rozwiązań, tj. preparatach opartych na substancjach pochodzenia naturalnego w tym pochodzenia roślinnego. Dotychczasowe wyniki pozwalają stwierdzić, iż wykorzystanie, zarówno prewencyjne jak i lecznicze, ekstraktów, olejków eterycznych czy też zmikronizowanych ziół mogą stanowić skuteczną alternatywę dla antybiotyków. W konsekwencji proponowane rozwiązania mogą prowadzić do powstania żywności cechującej się nie tylko zerową zawartością antybiotyków, ale też porównywalną jakością o wyższej akceptacji konsumenckiej.

Jednym z największych problemów z którymi spotykają się przedsiębiorstwa w branży mięsnej, są choroby wywoływane przez pierwotniaki m.in. *Eimeria* spp, *Histomonas melagridis* (np. kokcydioza, czarna główka) czy też bakterie takie jak *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. oraz *Escherichia coli* (nekrotyczne zapalenie jelit, salmonelloza czy kolibakterioza). Odpowiadają one za największe straty produkcyjne na poziomie od kilku do kilkunastu miliardów dolarów rocznie. W chwili obecnej na rynku spożywczym istnieje bardzo duże zapotrzebowanie na naturalne preparaty, będące skuteczną alternatywą dla dotychczas stosowanych antybiotyków. Zapotrzebowanie obejmuje produkty, które charakteryzują się spełnieniem jednocześnie trzech cech: skuteczność w niskich stężeniach; naturalne pochodzenie substancji aktywnych oraz realna, dla warunków ekonomicznych, cena. W trakcie realizacji doktoratu wykonano szereg badań i prac wdrożeniowych, które ostatecznie doprowadziły do opracowania **technologii wytwarzania** oraz powstania **trzech wyrobów**

**gotowych** (produkowanych w chwili obecnej przez firmę AdiFeed) o skutecznych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Początkowo przebadano wybrane ekstrakty i destylaty m.in. berberysu zwyczajnego paulownii omszonej, siwca żółtego i innych. Jednak pomimo ich skuteczności, ze względu na ograniczoną w roku 2020 dostępność (na skalę przemysłową) i silnie wzrastającą cenę tego surowca oraz trudności technologiczne (m.in. w standaryzacji ekstraktów) zdecydowano się na wykorzystanie innych, tj. opartych na olejkach eterycznych mieszaninach. Dalsze prace badawcze w ramach doktoratu wdrożeniowego pozwoliły na dokonanie analizy właściwości przeciwpierwotniaczych nowych kompozycji opartych na olejkach eterycznych z eukaliptusa, lawendy cedru i drzewa herbacianego. Udowodniono ich wysoką skuteczność wobec *Euglena gracilis*, *Gregarina blattarum*, *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum*, *Pentatrichomonas hominis* wynoszącą w dawkach 0.001–0.009%. (publikacja **Antibiotics 2022a** Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures). Skuteczność olejków: goździkowego, cynoamonowego, rozmarynowego i czosnkowego w połączeniu z metalami i kwasami przedstawiono w pracy **Molecules 2023**, In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. Jednocześnie udowodniono ich brak toksyczności wobec linii komórkowych ludzkich fibroblastów (NHFD). Dodatkowym istotnym elementem opisanych w powyższej publikacji było opracowanie standaryzacji destylatów czosnkowych, opartych na spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Udowodniono, że stosowana do tej pory technika chromatografii gazowej, sprzężonej ze spektrometrią mas w przypadku lotnych związków siarki nie oddaje ilościowo faktycznego składu. W standaryzacji składu mieszaniny zaproponowano tanie i proste rozwiązanie, tj. pomiar NMR i integracja przesunięć chemicznych protonów grup allilowych odpowiednich mono-, di-, tri-, tetra- i pentasiarczków.

Badania te umożliwiły stworzenie pierwszych wersji receptur preparatu złożonego. Uzyskane formułacje poddano dalszym analizom ich właściwości przeciwbakteryjnych. Kompozycja złożona, zawierająca m.in. salicylanu metylu, 1,8-cyneol i *trans*-anetol, wykazywała skuteczność bójcą wobec wielolekoopornych serotypów *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium i Kentucky. Wysoka skuteczność preparatu została zachowana nawet w przypadku serotypu Kentucky, posiadającego geny oporności na 18 różnych antybiotyków należących do 5 różnych klas. Udowodniono, że zaproponowane mieszaniny charakteryzują się wysoką skutecznością wobec patogenów obecnych i przenoszonych poprzez żywność (publikacja **Antibiotics 2022b** In Vitro Evaluation of

Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on Salmonella spp. Isolated from Chicken Broiler).

Uzyskane wyniki badań oparte na mieszaninach olejków eterycznych, wybranych kwasów organicznych oraz jonów metali, zaowocowały powstaniem **6 zgłoszeń patentowych**, a w konsekwencji uzyskaniem ochrony patentowej dla nich na terytorium RP tj. (DB.P.434642.7, DB.P.434643.5, DB.P.434644.5, DB.P.434645.13, DB.P.434646.7, DB.P.434647.7)

Najważniejszym, wdrożeniowym efektem doktoratu jest wprowadzenie do produkcji w firmie AdiFeed Sp. z o.o. serii preparatów tj. **adiBiotic®**, **naturBiotic®**, **adiNext®** bazujących na mieszaninach naturalnych fitoncydów, uzyskanych w doświadczeniach części doktoratu.

