



Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny
Zakład Technologii Organicznej i Farmaceutycznej
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

AUTOREFERAT

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Polifenolowo-polisacharydowe koniugaty z surowców zielarskich o potencjale prozdrowotnym

Izabela Pawlaczyk-Graja

Wrocław, 2019

SPIS TREŚCI

1. Imię i Nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016r. poz. 1311)	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2. Wykaz opublikowanych prac, będących podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego	4
4.3. Przedstawienie celu naukowego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	8
4.3.1. Wprowadzenie	8
4.3.2. Cel naukowy	12
4.3.3. Metodologia badań	13
4.3.4. Wyniki i ich omówienie	17
4.3.4.1. Sposób otrzymywania surowego ekstraktu roślinnego a charakter chemiczny i walory użytkowe oczyszczonych bioproduktów	18
4.3.4.2. Możliwości usprawnienia procesu izolowania, przy zachowaniu walorów użytkowych bioproduktu	21
4.3.4.3. Stopień oczyszczenia bioproduktu a jego bioaktywność	24
4.3.4.4. Podniesienie gotowości wdrożeniowej technologii otrzymywania bioproduktu	27
4.3.5. Podsumowanie	31
4.3.6. Bibliografia	32
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	34
5.1. Prace nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora	37
5.2. Prace nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora	39
5.3. Dane bibliometryczne dotyczące dorobku naukowego	43

1. Imię i Nazwisko

Izabela PAWLACZYK-GRAJA (Nazwisko panieńskie: PAWLACZYK)

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

10.07.2000r. – **magister inżynier**

Politechnika Wrocławska

kierunek: biotechnologia

specjalność: procesy biotechnologiczne

promotor pracy magisterskiej: prof. dr hab. inż. Roman Gancarz

tytuł pracy magisterskiej: „Identyfikacja substancji zawartej w *Erigeron canadensis* L., zmniejszającej krzepliwość krwi ludzkiej”

04.07.2006r. – **doktor nauk biologicznych w zakresie biotechnologii**

Akademia Rolnicza we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu)

Wydział Nauk o Żywieniu (obecnie Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności)

promotor rozprawy doktorskiej: prof. dr hab. inż. Roman Gancarz

tytuł rozprawy doktorskiej: „Izolowanie i określanie struktury substancji hamujących krzepliwość krwi ludzkiej z przymiotna kanadyjskiego (*Erigeron canadensis* L.)”,

(Praca doktorska uzyskała wyróżnienie Rady Wydziału Nauk o Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu i Nagrodę Rektora Politechniki Wrocławskiej)

13.04.2014r. – **menedżer projektu badawczo-rozwojowego**

Wyższa Szkoła Bankowa we Wrocławiu (studia podyplomowe)

tytuł pracy dyplomowej: „Studium wykonalności projektu - Środek roślinny wspomagający profilaktykę i leczenie choroby zakrzepowozatorowej.”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

10.2000 – 09.2001 **asystent naukowo – badawczy**

Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii

Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

10.2006 – 09.2010 **asystent naukowo-dydaktyczny**

Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii

Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

08.2010 – 01.2015 **główny badacz**

(rodzaj zatrudnienia: umowa o pracę, umowa zlecenie)
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu,
Ośrodek Badawczo-Rozwojowy
realizacja projektu projekt PO IG WroVasc – Zintegrowane
Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej,

10.2010 – 12.2011 **adiunkt**
Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii
Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

01.2012 – obecnie **adiunkt**
Zakład Technologii Organicznej i Farmaceutycznej
Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

Dodatkowe informacje o dłuższych przerwach w pracy:

03.2015 – 02.2016 urlop macierzyński i wychowawczy

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Polifenolowo-polisacharydowe koniugaty z surowców zielarskich
o potencjale prozdrowotnym

4.2. Publikacje naukowe będące podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

H1 I. Pawlaczyk ✉, L. Czerchawski, J. Kańska, J. Bijak, P. Capek, A. Pliszczyk-Król, R. Gancarz, An acidic glycoconjugate from *Lythrum salicaria* L. with controversial effects on haemostasis. *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**, 131, 63-69
DOI: 10.1016/j.jep.2010.06.001
IF₂₀₁₀=2,466 (pkt. MNiSW=32), cyt.*=15(9 bez autocyt.)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu jej koncepcji, wyborze materiału badawczego, opracowaniu procesu wyodrębniania z surowca roślinnego produktów aktywnych biologicznie, wykonaniu analiz chemicznych dla wszystkich produktów metodami kolorymetrycznymi, GC-MS oraz FT-IR, opracowaniu i interpretacji wyników tych analiz, na zredagowaniu manuskryptu, udziale w sformułowaniu wniosków, korespondencji z redaktorem czasopisma,

przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korekty manuskryptu według ich zaleceń. Praca powstała w ramach mojego stypendium podoktorskiego Narodowego Programu Stypendialnego Republiki Słowackiej. Mój udział w tej pracy szacuję na **50 %**.

- H2 I. Pawlaczyk**, P. Capek ✉, L. Czerchawski, J. Bijak, M. Tsirigotis-Maniecka, A. Pliszczak-Król, R. Gancarz, An anticoagulant effect and chemical characterization of *Lythrum salicaria* L. glycoconjugates. *Carbohydrate Polymers*, **2011**, 86, 277-284
DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.04.048
IF₂₀₁₁=3,628 (pkt. MNiSW=32), cyt.*=18(11 bez autocyt.)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu jej koncepcji, wyborze surowca roślinnego, opracowaniu procesu wyodrębnienia z biomasy produktów aktywnych biologicznie, oraz opracowaniu metodyki ich rozdzielania techniką chromatografii jonowymiennej, na wykonaniu analiz chemicznych dla wszystkich otrzymanych frakcji metodami kolorymetrycznymi oraz FT-IR, na opracowaniu i interpretacji wyników tych analiz, jak też na zredagowaniu większości manuskryptu, udziale w sformułowaniu wniosków, udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korekty manuskryptu według ich zaleceń. Praca powstała w ramach mojego stypendium podoktorskiego Narodowego Programu Stypendialnego Republiki Słowackiej. Mój udział w tej pracy szacuję na **50 %**.

- H3 M. Šutovská**, P. Capek ✉, M. Kocmálová, S. Fraňová, **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, Characterization and biological activity of *Solidago canadensis* complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2013**, 52, 192-197
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.09.021
IF₂₀₁₃=3,096 (pkt. MNiSW=20), cyt.*=10(6 bez autocyt.)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wyborze surowca zielarskiego, opracowaniu metodyki wyodrębnienia bioproduktu z biomasy i jego otrzymaniu, na wykonaniu analiz chemicznych metodami kolorymetrycznymi, na opracowaniu i interpretacji wyników tych analiz, jak też na udziale w zredagowaniu manuskryptu, w sformułowaniu wniosków, w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz w korekcie manuskryptu według ich zaleceń. Mój udział w tej pracy szacuję na **30 %**.

- H4 I. Pawlaczyk**, M. Tsirigotis-Maniecka, P. Capek ✉, M. Matulová, V. Sasinková, P. Dąbrowski, W. Witkiewicz, R. Gancarz, Effects of extraction condition on structural features and anticoagulant activity of *F. vesca* L. conjugates. *Carbohydrate Polymers*, **2013**, 92, 741-750
DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.10.011
IF₂₀₁₃=3,916 (pkt. MNiSW=40), cyt.*=20(12 bez autocyt.)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu jej koncepcji, wyborze materiału badawczego, opracowaniu różnych wariantów procesu wyodrębnienia z surowca roślinnego produktów aktywnych biologicznie, doborze i zaplanowaniu eksperymentów, przygotowaniu schematu blokowego procedury izolowania, wykonaniu analiz chemicznych dla wszystkich produktów metodami kolorymetrycznymi oraz FT-IR, opracowaniu i interpretacji wyników tych analiz,

jak też na zredagowaniu większości manuskryptu, przygotowaniu tabel, udziale w sformułowaniu wniosków, w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz w korekcie manuskryptu według ich zaleceń. Praca powstała w ramach projektu PO IG (2009-20015) WroVasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, realizowanego przez Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy. Mój udział w tej pracy szacuję na **50 %**.

- H5** M. Šutovská, P. Capek ✉, M. Kocmálová, **I. Pawlaczyk**, E. Zaczyńska, A. Czarny, I. Uhliaríková, R. Gancarz, S. Fraňová, Characterization and pharmacodynamic properties of *Arnica montana* complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2014**, 69, 214-221
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.051
IF₂₀₁₄=2,858 (pkt. MNiSW=25), cyt.*=11(8 bez autocyt.)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wyborze surowca zielarskiego, opracowaniu metodyki i wyodrębnieniu bioproduktu z biomasy, wykonaniu analiz chemicznych metodami kolorymetrycznymi, chromatograficznymi GC-MS oraz GPC, na opracowaniu i interpretacji wyników tych analiz, jak też na udziale w zredagowaniu manuskryptu, w sformułowaniu wniosków, w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz w korekcie manuskryptu według ich zaleceń. Praca powstała w ramach projektu PO IG (2009-20015) WroVasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, realizowanego przez Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy. Mój udział w tej pracy szacuję na **25 %**.

- H6** M. Šutovská, P. Capek ✉, I. Kazimierová, L. Pappová, M. Jošková, M. Matulová, S. Fraňová, **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, *Echinacea* complex – chemical view and anti-asthmatic profile. *Journal of Ethnopharmacology*, **2015**, 175, 163–171
DOI: 10.1016/j.jep.2015.09.007
IF₂₀₁₅=3,055 (pkt. MNiSW=40), cyt.*=7(7 bez autocyt.)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wyborze materiału badawczego, opracowaniu metodyki i wyodrębnieniu bioproduktu z surowca roślinnego, na wykonaniu analiz chemicznych metodami kolorymetrycznymi, opracowaniu i interpretacji wyników tych analiz, jak też na udziale w zredagowaniu manuskryptu, w sformułowaniu wniosków, w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz w korekcie manuskryptu według ich zaleceń. Mój udział w tej pracy szacuję na **20 %**.

- H7** **I. Pawlaczyk-Graja** ✉, S. Balicki, R. Ziewiecki, M. Matulová, P. Capek, R. Gancarz, Polyphenolic-polysaccharide conjugates of *Sanguisorba officinalis* L. with anticoagulant activity mediated mainly by heparin cofactor II. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2016**, 93, 1019–1029.
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.082
IF₂₀₁₆=3,671 (pkt. MNiSW=35), cyt.*=7(4 bez autocyt.)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu jej koncepcji, wyborze surowca roślinnego, doborze i zaplanowaniu eksperymentów, opracowaniu procesów wyodrębnienia bioproduktów z biomasy, opracowaniu i interpretacji

rezultatów analiz chemicznych dla wszystkich produktów, wykonanych metodami kolorymetrycznymi, GC-MS, GPC oraz FT-IR, na doborze metodyki badawczej, dotyczącej właściwości antykoagulacyjnych oraz mechanizmów działania wyodrębnionych produktów i ich frakcji, jak też na zredagowaniu większości manuskryptu, udziale w sformułowaniu wniosków, korespondencji z redaktorem czasopisma, w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz w korekcie manuskryptu według ich zaleceń. Mój udział w tej pracy szacuję na **60 %**.

- H8 I. Pawlaczyk-Graja** ✉, Polyphenolic-polysaccharide conjugates form flowers and fruits of Hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq. (Lindm.)) as functional compounds. Evaluation of their mechanisms of anticoagulant activity on human plasma. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2018**, 116, 869-879.

DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.101

IF₂₀₁₇=3,909 (pkt. MNiSW=35), cyt.*=2(1 bez autocyt.)

Mój udział w tej pracy wynosi **100 %**.

- H9 I. Pawlaczyk-Graja** ✉, S. Balicki, K. A. Wilk, Effect of various extraction methods on the structure of polyphenolic-polysaccharide conjugates from *Fragaria vesca* L. leaf. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2019**, 130, 664-674.

DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.013

IF₂₀₁₇=3,909 (pkt. MNiSW=35), cyt.*=0(0 bez autocyt.)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu jej koncepcji, wyborze materiału roślinnego, doborze i zaplanowaniu wszystkich eksperymentów wyodrębnienia bioproduktów i ich frakcji, wyborze metod analizy chemicznej, opracowaniu parametrów ich przeprowadzenia, na doborze metodyki badawczej, dotyczącej właściwości antykoagulacyjnych oraz mechanizmów działania wyodrębnionych produktów i ich frakcji, jak też na zredagowaniu manuskryptu, tabel oraz wykresów, na udziale w sformułowaniu wniosków, korespondencji z redaktorem czasopisma, w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korekcie manuskryptu według ich zaleceń. Kierowałam projektem naukowym, obejmującym badania opisane w tej pracy, finansowanym ze środków Konsorcjum Wrocławskiego Centrum Biotechnologii, Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego. Mój udział w tej pracy szacuję na **80 %**.

- H10 R. Gancarz, I. Pawlaczyk, H. Kleszczyńska**, Wynalazek pt. Roślinny środek przeciwutleniający i sposób wytwarzania roślinnego środka przeciwutleniającego. Patent Polska nr PL 216635, z dnia 24.04.2014r., zgłoszenie patentowe nr P 382973, z dnia 23.07.2007r.

<http://pubserv.uprp.pl/PublicationServer/Temp/95aqigdrnd8louvagsg4hq0ta5/P L216635B1.pdf>

Wynalazek został wystawiony na targach *CosmeticBusiness Poland 2018* oraz na *Międzynarodowych Targach Wynalazków i Innowacyjności INTARG 2018*, gdzie otrzymał srebrny medal w kategorii „Przemysł”.

Mój wkład w powstanie wynalazku polegał na wytypowaniu rodzin roślin leczniczych, a następnie na dokonaniu wyboru surowców zielarskich, stanowiących przedmiot zgłoszenia patentowego, na zaplanowaniu procesów wyodrębnienia z surowców roślinnych bioproduktów, na ustaleniu zakresu

parametrów ich prowadzenia oraz na ustaleniu kolejności tych procesów, na wyodrębnieniu bioproduktów, na opracowaniu i opisanu w przykładach formułacji farmaceutycznych do zewnętrznego stosowania, zredagowaniu większości opisu zgłoszenia patentowego oraz na współpracy z rzecznikiem patentowym w zakresie sformułowania ostatecznej jego wersji. Mój udział jako współtwórcy wynosi **40 %**.

* – liczba cytowań wg Web of Science (dane ze lutego 2019)

Sumaryczny *Impact Factor*, zgodny z rokiem opublikowania wynosi $\Sigma IF = 30,508$, natomiast $\Sigma MNiSW = 294$. Wymienione prace stanowiące cykl były cytowane 90 razy, w tym bez autocytowań 58 razy.

4.3. Przedstawienie celu naukowego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. Wprowadzenie

Surowce roślinne, w tym surowce zielarskie, jako źródło biomasy, stanowią ogromny rezerwuar różnorodnych składników organicznych, zarówno z grupy metabolitów pierwotnych, jak i wtórnych. Rodzaj otrzymywanych bioproduktów, stopień ich oczyszczenia czy przetworzenia, zależą od zadanych im celów użytkowych. Na szczególną uwagę zasługują tzw. wysokoprzetworzone **chemikalia specjalistyczne** (ang. *fine chemicals*), jako komponenty wyrobów o szczególnych właściwościach użytkowych i wysokiej wartości rynkowej [1,2]. W przypadku bioproduktów pochodzenia roślinnego mogą być to pojedyncze związki o wysokim stopniu czystości, jak też unikatowe mieszaniny substancji, otrzymywane w ograniczonych ilościach, na drodze wielostopniowych procesów fizycznych, chemicznych lub biotechnologicznych [2].

Organiczne chemikalia specjalistyczne (ang. *organic fine chemicals* – OFC), bez względu na źródło pochodzenia surowca, mogą stanowić komponenty różnego rodzaju wysokowartościowych produktów specjalistycznych, w szczególności farmaceutyków i biofarmaceutyków, w tym fitofarmaceutyków. Komponentami produktów specjalistycznych mogą być też dodatki kosmetyczne, dodatki do żywności, biocydy, barwniki, substancje zapachowe, specjalistyczne polimery czy środki powierzchniowo czynne oraz inne zaawansowane technologicznie chemikalia, od których w znacznym stopniu zależy wiele sektorów przemysłu [1,2].

Europejski przemysł farmaceutyczny stanowi ogromny kapitał gospodarczy, w dużej mierze oparty na innowacyjnych rozwiązaniach. Jest jednym z najbardziej wydajnych sektorów nowoczesnych technologii, których efektem przede wszystkim są chemikalia specjalistyczne, w tym: substancje syntetyczne, związki pół-syntetyczne oraz pochodzenia naturalnego. **Bioprodukty** jako chemikalia specjalistyczne, które można zaliczyć do dwóch ostatnich wymienionych grup, mogą być zarówno **pochodzenia**

zwierzęcego, mikrobiologicznego, jak i **roślinnego**. Służą do wytworzenia produktów specjalistycznych, o szczególnie wysokiej wartości rynkowej, jak: farmaceutyki, biofarmaceutyki, w tym fitofarmaceutyki oraz inne produkty o potencjale prozdrowotnym, zaliczane do grupy suplementów diety [1,2]. Przemysł farmaceutyczny, tak jak inne gałęzie przemysłu, podlega różnorodnym regulacjom prawnym, w tym takim, które zapewniają kontrolowaną ścieżkę produkcyjną, łączącą względy środowiskowe, zdrowotne i bezpieczeństwa – tzw. standardy BAT (ang. *best available technologies*, BAT) [3]. Dla tej gałęzi przemysłu standardy te wyznacza dokument referencyjny (BREF) [4], określający "Najlepsze dostępne techniki produkcji Związków Organicznych Głęboko Przetworzonych" (OFC) (dyrektywa IPPC 96/61/WE, zastąpiona później przez dyrektywę IED 2010/75/UE) [4,5]. Farmaceutyki i biofarmaceutyki, jako szczególny rodzaj produktów specjalistycznych, bez względu na zastosowaną technologię i rodzaj surowca, poddawane są restrykcyjnej kontroli jakości na wszystkich etapach procesu produkcyjnego, a przede wszystkim w fazie wytwarzania aktywnych biologicznie komponentów (ang. *active pharmaceutical ingredients* – API). Wymaga to przestrzegania zasad aktualnych dobrych praktyk wytwarzania (ang. *current good manufacturing practice* - cGMP), w powiązaniu z dobrymi praktykami laboratoryjnymi (ang. *good laboratory practice* – GLP). W wielu wypadkach technologia wytwarzania wymaga nie tylko spełniania standardów BAT, ale musi też zostać zatwierdzona przez Europejską Agencję ds. Oceny Medycznej (EMA) lub inne organy udzielające homologacji [4].

Bioprodukty o potencjale prozdrowotnym, pozyskiwane z surowców roślinnych, stanowiące **komponenty fitofarmaceutyków**, zyskują coraz bardziej na znaczeniu gospodarczym [6]. Ten rodzaj wysokowartościowych chemikaliów specjalistycznych, analogicznie jak w przypadku syntetycznych składników aktywnych leków, także podlega restrykcyjnym wymogom jakościowym [2,6]. Kontroli podporządkowane są: charakterystyka botaniczna surowca roślinnego (zgodnie z wytycznymi określonymi w uznanych dokumentach, np. w farmakopei) oraz poziom zanieczyszczeń obecnych w biomasie, w tym zanieczyszczeń mikrobiologicznych, pozostałości nawozów, środków ochrony roślin, metali ciężkich oraz substancji radioaktywnych. Raport "*Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*" opublikowany przez WHO, szczegółowo określa wymagania jakościowe dla leków roślinnych i produktów pokrewnych [7].

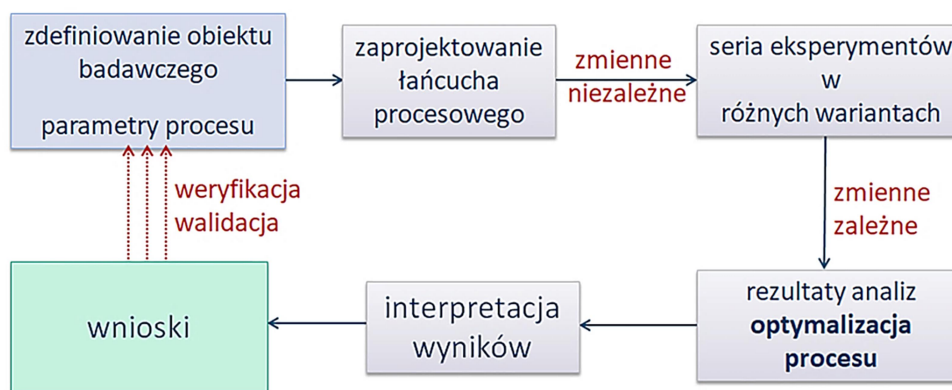
W planowaniu procesów wstępnej obróbki biomasy roślinnej należy wziąć pod uwagę kilka innych, charakterystycznych dla tego rodzaju surowca aspektów, które w zależności od potrzeb, mogą stanowić wadę lub zaletę. W toku przetwarzania biomasy jej komponenty zazwyczaj ulegają nieodwracalnym zmianom chemicznym, takim jak np. utlenianie, hydroliza [8] czy kondensacja składników (obserwowana np. w przypadku polifenoli, które mogą tworzyć silne i potencjalnie nieodwracalne addukty z materiałem ściany komórkowej) [9]. Dodatkowo, niezależnie od tego, czy surowiec był początkowo poddawany jakiegokolwiek obróbce wstępnej, na jego jakość będzie miało wpływ wiele innych czynników, w tym: sposób, w jaki roślina była uprawiana, miejsce uprawy, warunki pogodowe, sposób suszenia biomasy, w tym użyta metoda, temperatura, końcowa zawartość wody w surowcu i temperatura jego przechowywania. Te wszystkie

czynniki będą miały wpływ na ostateczny skład chemiczny biomasy [8,10,11]. Konieczna jest też ocena jakości odpadów powstałych w procesie wytwarzania bioproduktu oraz określenie potencjału do dalszego ich przetwórstwa. Wymaga to antycypacji i kompleksowego zrozumienia całego łańcucha technologicznego, w celu zmaksymalizowania możliwości zagospodarowania całkowitej biomasy. Poważny problem stanowi wybór rozpuszczalników stosowanych w procesie technologicznym. Wpływa to na selektywność uzyskanych bioproduktów, koszty procesu, na sposoby usuwania zużytych rozpuszczalników i bezpieczeństwo ich odparowywania [12]. Dyrektywa REACH (w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów) stanowi zachętę do stosowania rozwiązań uwzględniających zrównoważony rozwój [12,13].

Jedną z najczęściej stosowanych metod separacyjnych, wymagającą użycia rozpuszczalników, która znajduje zastosowanie w wyodrębnianiu różnego rodzaju bioproduktów z surowców naturalnych jest ekstrakcja. Wydajność procesu ekstrakcji typowo waha się w granicach 0,1 - 10% wag. użytej do procesu biomasy i zależy od kilku czynników, w tym od rodzaju surowca, typu wyodrębnianego składnika (składników), użytej metody, ale też zdecydowanie od rodzaju rozpuszczalnika. Z tym wiąże się przeważnie z duża ilość generowanych odpadów, głównie organicznych, w stosunku do produktu końcowego. Aby zmniejszyć ich ilość ważne jest maksymalne poprawienie wydajności użytej techniki separacyjnej [2].

W celu zmaksymalizowania możliwości zagospodarowania bioodpadów, takich jak placek filtracyjny, np. przez kompostowanie i dalsze wykorzystanie w formie dodatków wzbogacających glebę, ważne jest, aby w procesach ekstrakcyjnych unikać grupy rozpuszczalników stanowiących zagrożenie środowiskowe, jak przykładowo substancje chlorowcopochodne, na korzyść zastosowania tych, które są biodegradowalne. Dlatego eliminowanie takich procesów jednostkowych z łańcucha technologicznego może przynosić dodatkowe korzyści. Jednak ograniczenia procesowe danej metody wymuszają niekiedy zastosowanie takiego rozpuszczalnika, który jest problematyczny z punktu widzenia ochrony środowiska. Zatem decyzja o wyborze rozpuszczalnika powinna być podjęta w jak najwcześniejszej fazie tworzenia koncepcji procesowej. Możliwość zapobiegania problemom środowiskowym w początkowym etapie rozwoju koncepcji procesu może znacznie obniżyć koszty regeneracji/redukcji zanieczyszczeń [2].

W celu wyodrębnienia z surowców roślinnych pożądaných składników biologicznie aktywnych, oprócz ekstrakcji, stosuje się też inne techniki separacji bioproduktów. Można je podzielić zgodnie z ideą ich działania na metody mechaniczne, metody fizyczne, metody termiczne oraz metody chemiczne, w tym biochemiczne [14]. Każda z metod ma swoje wady i zalety, jednak w procesie projektowania technologii wytwarzania bioproduktu, w zależności od potrzeb każda z nich może okazać się przydatna. Przed tworzeniem koncepcji technologii stoją trzy główne wyzwania, które należy uwzględnić: wymagania procesowe, związane z naturą wytwarzanych produktów, wybór właściwych metod separacji i ich kolejność oraz optymalne zarządzanie zmiennymi parametrami (Rys.1.).



Rys. 1. Schemat postępowania w planowaniu i realizacji technologii wytwarzania bioproduktu [15], z modyfikacjami.

Technologia wytwarzania bioproduktu ma na celu ustanowienie specyficznego łańcucha procesowego, w efekcie którego powstaje izolat o akceptowalnej czystości oraz wystarczającej bioaktywności [16]. Przy wyborze odpowiednich metod separacji należy pamiętać nie tylko o konieczności stabilizacji surowca, w celu ograniczenia utraty jego bioaktywności, ale przede wszystkim określić akceptowalny stopień oczyszczenia wyodrębnionych substancji oraz optymalną wydajność produktu końcowego.

Współczesna medycyna preferuje stosowanie leków syntetycznych, których strategia działania oparta jest na idei tzw. „magicznej kuli” [17]. Idealny model terapeutyczny zakłada, że pojedyncza substancja bioaktywna, zazwyczaj małącząsteczkowa, o bardzo ustalonej strukturze chemicznej, trafia w cel, którym jest choroba, skutecznie ją zwalczając. Ideę tę bardzo efektywnie rozwija tzw. terapia celowana [18]. Ten sposób leczenia w wielu wypadkach nie sprawdza się w terapii chorób przewlekłych, nacechowanych wieloma złożonymi mechanizmami patogennymi, z powodu trudności w równoczesnym zapanowaniu nad nimi. Leczenie, obejmujące wiele celów, a oparte na zastosowaniu kuracji symultanicznej kilkoma lekami konwencjonalnymi, wymaga bardzo uważnej kontroli i naraża pacjenta na ryzyko licznych skutków ubocznych [19]. Z powyższych względów niedoskonałość terapii lekami syntetycznymi generuje **potrzebę powrotu do substancji leczniczych pochodzenia naturalnego** [20], wyodrębnianych najczęściej z roślin, niejednokrotnie dobrze znanych medycynie ludowej. Wymuszają konieczność udoskonalania sposobów ich otrzymywania, a także odkrywania ich nowego przeznaczenia.

Przyglądając się współczesnej farmakoterapii, okazuje się, że aż około 25% leków aktualnie stosowanych w lecznictwie jest pochodzenia roślinnego. Spośród około 250 substancji leczniczych, uznanych przez WHO za podstawowe i istotne dla zdrowia i życia człowieka, 11% stanowią leki oparte na bioproduktach izolowanych z roślin, a znaczna ich liczba to substancje syntetyczne, otrzymywane jako analogi substancji roślinnych [21]. Przepisy legislacyjne definiujące prawo farmaceutyczne, także w krajach Unii Europejskiej, wymagają, aby każdy biologicznie aktywny składnik formułacji farmaceutycznej poddany został weryfikacji, na dowód że przyczynia się do deklarowanej całkowitej skuteczności danego leku [22]. W świetle prawa sytuacja staje

się skomplikowana, gdy komponentem leczniczym jest mieszanina substancji pochodzenia naturalnego, a każdy jej składnik oceniany osobno nie wykazuje „spektakularnej” aktywności, natomiast w mieszaninie wykazuje efekt synergii. Działania synergistyczne manifestują się często pod wieloma względami, gdy składniki danej kombinacji nie wpływają tylko na pojedynczy cel w organizmie, ale na kilka równocześnie [23,24]. Fitofarmaceutyki, jako wyroby zawierające nie tylko pojedyncze produkty roślinne, ale też ich mieszaniny, skutecznie odpowiadają potrzebie tzw. środków "multi-target/multi-component", gdzie efekty ich działania są potwierdzone klinicznie, aczkolwiek często bez jednoznacznie zdefiniowanych mechanizmów. Są jednak akceptowane, np. poprzez nabyte doświadczenie i wiedzę powstałą na drodze długiej historii leczenia chorób przewlekłych danym surowcem zielarskim [25].

4.3.2. Cel naukowy

Surowce roślinne są w stanie dostarczyć niezliczoną ilość substancji biologicznie aktywnych o potencjale prozdrowotnym, niekiedy o bardzo wyszukanej strukturze chemicznej i specyficznych właściwościach użytkowych. Na szczególną uwagę zasługują te składniki roślinnej biomasy, których udział w niej jest największy, a mianowicie substancje stanowiące elementy ścian komórkowych, w tym: polisacharydy (celuloza, hemicelulozy), ligniny, białka i tłuszcze, możliwe do wyodrębnienia w postaci wolnej lub w formie koniugatów, które można następnie wykorzystać, jako chemikalia specjalistyczne o wysokiej wartości dodanej [26,27].

Założona przeze mnie **hipoteza badawcza** została oparta na przypuszczeniu, że polifenolowo-polisacharydowe koniugaty, wyodrębnione ze ścian komórkowych roślin leczniczych, różnią się między sobą nie tylko ze względu na zastosowany w procesie rodzaj surowca, ale też z uwagi na metody użyte do ich wytworzenia, co powinno mieć także wpływ na walory użytkowe otrzymanych bioproduktów.

Wykonane przeze mnie prace stanowią monotematyczny cykl 9 publikacji oraz patentu, które są przedłożone do oceny jako osiągnięcie naukowe pt. „Polifenolowo-polisacharydowe koniugaty z surowców zielarskich o potencjale prozdrowotnym”, do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk technicznych, w dyscyplinie technologia chemiczna. Zaprezentowane badania obejmują 7 surowców zielarskich, ujętych w publikacjach, a 14 – w patencie, z których na drodze wieloetapowego procesu, poddawanego modyfikacjom, wyizolowałam i oczyściłam grupę produktów o podobnym charakterze chemicznym i różnorodnych właściwościach biologicznych. Mogą one stanowić komponenty wyrobów leczniczych i/lub wspomagających leczenie, do wykorzystania jako *fine chemicals*.

Głównym **celem** przeprowadzonych przeze mnie badań było opracowanie optymalnych warunków ciągu procesowego otrzymywania polifenolowo-polisacharydowych koniugatów roślinnych, które są zaliczane do grupy makromolekuł o licznych właściwościach farmakologicznych.

W kontekście przydatności tego rodzaju substancji dla zdrowia człowieka można by wymienić szeroką gamę właściwości biologicznych, np. zdolność do obniżania pH środowiska jelita grubego, co sprzyja rozwojowi mikroflory probiotycznej [28], rozluźnianie mas kałowych, szczególnie pomocne przy chronicznych zaparciach [29], redukcja ryzyka powstawania nowotworów jelita grubego [30] oraz raka gruczołu piersiowego [31], zdolność do obniżania poziomu glukozy [32] i cholesterolu we krwi [33], wspomaganie regeneracji nabłonka przewodu pokarmowego [34], stymulowanie systemu odpornościowego na różne sposoby [35] i wiele innych.

4.3.3. Metodologia badań

Surowce roślinne zostały wybrane na podstawie obszernych studiów literaturowych, w efekcie których wytypowałam dwie główne grupy roślin leczniczych (Tabela 1), należących do roślin wyższych (naczyniowych): rośliny z rodziny astrowatych (Asteraceae) – surowce użyte w pracach [H3, H5, H6, H10] oraz z rodziny różowatych (Rosaceae) – surowce użyte w pracach [H4, H7, H8, H9, H10]. Dodatkowym czynnikiem, który odgrywał rolę w ostatecznym wyborze surowców zielarskich była nazwa danej rośliny, nawiązująca do nazwy schorzenia lub tkanki ludzkiej, jak np. krew – surowce użyte w pracach [H1, H2, H7, H10]. W wytypowaniu biomasy do zaplanowanych procesów znaczenie miała także część rośliny. Zazwyczaj zakwitające części roślinne są najbardziej bogate w polisacharydy o różnorodnych dodatkowych funkcjach, oprócz strukturalnych, co jest zdeterminowane zmiennością w budowie polisacharydów ścian komórkowych w tych właśnie tkankach [26,27]. Takie też zostały wytypowane do większości prac [H1, H2, H3, H5, H6, H7, H8, H10].

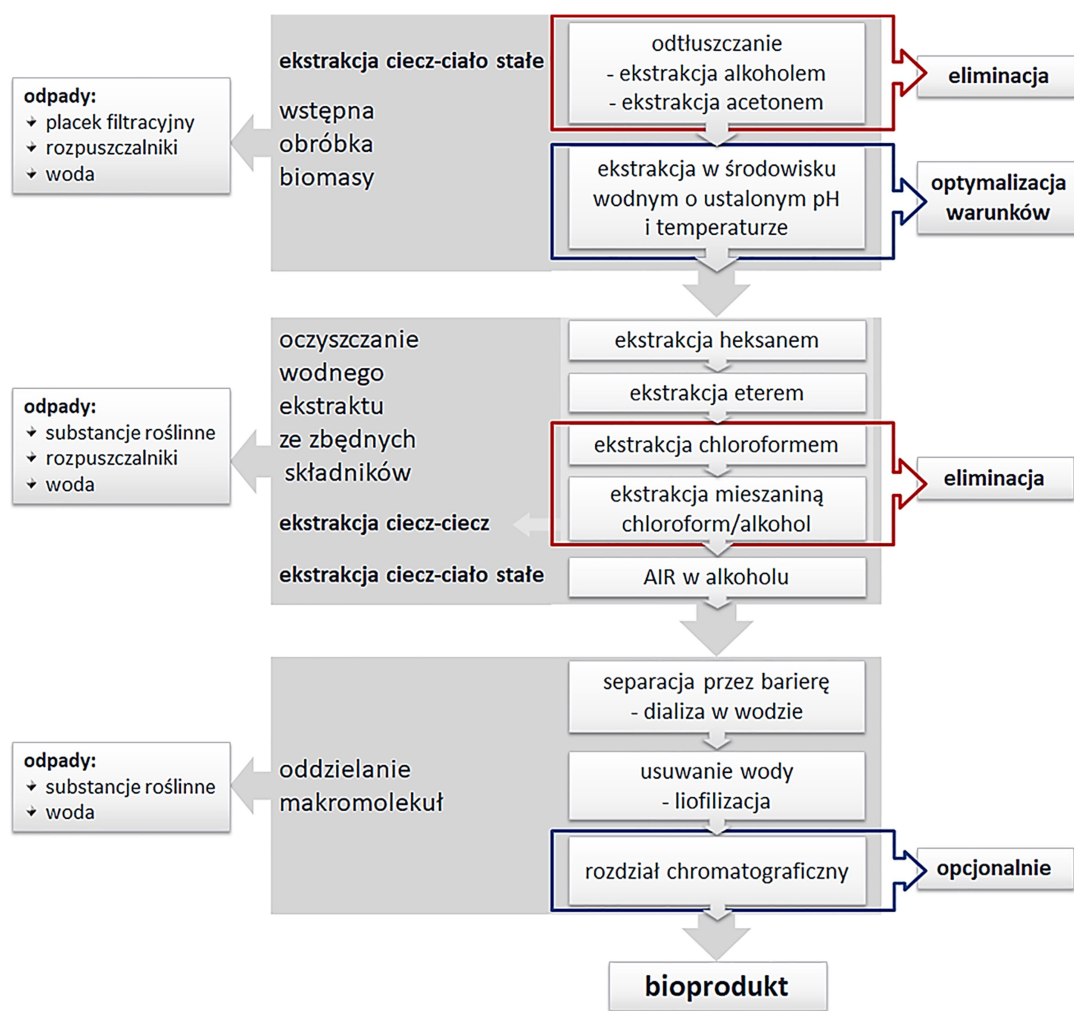
Aby skutecznie wyodrębnić z wybranych surowców roślinnych produkty, które scharakteryzowane zostały jako polifenolowo-polisacharydowe koniugaty, zastosowałam szereg metod separacyjnych (Rys. 2.), jak:

- ekstrakcja z fazy stałej, w różnych warunkach, w środowisku wodnym, w tym maceracja, w środowisku alkoholu – tzw. ekstrakcja AIR (ang. *alcohol-insoluble residue*) [H1-H10],
- ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami [H9],
- ekstrakcja wspomagana mikrofalami [H9],
- ekstrakcja ciec-ciecz [H1-H9],
- separacja przez barierę [H1-H10],
- liofilizacja [H1-H9],
- chromatografia jonowymienna [H1],
- chromatografia podziałowa [H4-H9].

Tabela 1. Rośliny lecznicze, stosowane jako surowiec w medycynie ludowej [36,37], stanowiące biomasę do wyodrębniania koniugatów polifenolowo-polisacharydowych (KPP). OB UW – Ogród Botaniczny Uniwersytetu Wrocławskiego.

Rodzina	Nazwa łacińska	Nazwa polska	Surowiec zielarski	Nr kat. OB UW	Tradycyjne zastosowanie - właściwości [36,37]:	Właściwości użytkowe KPP
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i> L.	krwawnik pospolity	ziele, kwiatostan	004935	przeciwzapalne przeciwwrotoczne bakteriostatyczne	antyoksydacyjne [H10,B3]
	<i>Arnica montana</i> (L.)	arnika góraska	koszyczek	002355	antyseptyczne przeciwzapalne pobudza oddychanie	antykoagulacyjne [B2] przeciwkaszłowe [H5] przeciwastmatyczne [H5] antyoksydacyjne [H10,B3]
	<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert	rumianek pospolity	koszyczek	017659	przeciwzapalne spazmolityczne antyhistaminowe	przeciwplytkowe [B8] antyoksydacyjne [H10,B3]
	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench.	jeżówka purpurowa	korzeń, ziele	011493	immunostymulujące wzmacniające odporność w stanach zapalnych, infekcjach	antykoagulacyjne [B2] przeciwzapalne [H6] przeciwastmatyczne [H6] antyoksydacyjne [H10,B3,B4]
	<i>Erigeron canadensis</i> L.	przymiotno kanadyjskie	ziele, kwiatostan	019361	antyseptyczne przeciwzapalne, przeciwwrotoczne	antykoagulacyjne [B6] przeciwplytkowe [B1,B6] promieniochronne [B14,B17,B18] antyoksydacyjne [A3,H10]
	<i>Solidago virgaurea</i> L.	nawłóć pospolita	ziele, kwiatostan	003501	moczopędne, przeciwbólowe, przeciwzapalne	antykoagulacyjne [B2] antyoksydacyjne [H10,B3]
	<i>Solidago canadensis</i> L.	nawłóć kanadyjska	ziele, kwiatostan	004992	moczopędne, przeciwzapalne, hipotensyjne	przeciwkaszłowe [H3] przeciwastmatyczne [H3]
	<i>Tussilago farfara</i> L.	podbiał pospolity	liść, kwiat	005000	przeciwkaszłowe, przeciwastmatyczne	przeciwutleniające [H10]
Rosaceae	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	rzepik pospolity	ziele, kwiatostan	005054	żółciopędne, ściągające	antykagulacyjne [B17]
	<i>Cerasus avium</i> (L.) Moench	czerecha zwyczajna	kora, kwiat	003962	moczopędnie, przeciwreumatycznie	przeciwutleniające [H10]
	<i>Crataegus laevigata</i> (Poir.) DC.	głóg dwuszyjkowy	kwiaty owoce	003745	rozszerzające naczynia wieńcowe	antykoagulacyjne [H8] antyoksydacyjne [H10]
	<i>Crataegus monogyna</i> L.	głóg jednoszyjkowy	kwiaty owoce	003743	rozszerzające naczynia wieńcowe	antykoagulacyjne [H8] inhibitor czynnika krzepnięcia krwi Xa [H8] antykoagulacyjne [B2]
	<i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.	wiązówka błotna	kwiatostan	005184	przeciwzapalne, napotne, ściągające	antykoagulacyjne [B2,H4, H9], inhibitor czynnika krzepnięcia krwi Xa [H9] promieniochronne [B12,B15,B16]
	<i>Fragaria vesca</i> L.	poziomka pospolita	liść	004954	moczopędne, przeciwbiegunkowe	antykoagulacyjne [B2,H4, H9], inhibitor czynnika krzepnięcia krwi Xa [H9] promieniochronne [B12,B15,B16]
	<i>Rubus plicatus</i> W. et N.	jeżyna fałdowana	liść	013914	moczopędne, przeciwbiegunkowe, hipoglikemiczne	antykoagulacyjne [B2] promieniochronne [B12,B15,B16]
	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	krwiściąg lekarski	kwiatostan	004990	przeciwzapalnie, moczopędnie, przeciwwrotocznie	antykoagulacyjne [H7] inhibitor czynników krzepnięcia IIa i Xa [H7] promieniochronne [B12,B15,B16]
	Lythraceae	<i>Lythrum salicaria</i> L.	krwawnica pospolita	kwiatostan	005291	antyseptycznie, przeciwkrowitocznie, hipoglikemicznie, przeciwbiegunkowo

Kolejność użytych przeze mnie metod nie była przypadkowa, a w każdej z prac przedstawionych w cyklu [H1-H10], stanowiła specyficzny łańcuch procesów jednostkowych, uwzględniający przewidywany efekt końcowy. W przypadku metod ekstrakcyjnych, uwzględniających zastosowanie czynników fizycznych, wspomagających otrzymywanie surowego ekstraktu, jak ultradźwięki oraz mikrofałe, wybrane parametry fizyczne w obu tych metodach zostały poddane optymalizacji, w celu ustalenia wartości zmiennych niezależnych, korzystnych z punktu widzenia atrakcyjności poziomu właściwości biologicznych otrzymanych oczyszczonych produktów.



Rys. 2. Schemat procesowy izolowania polifenolowo-polisacharydowych koniugatów roślinnych.

Permutacje liniowej struktury sekwencji peptydowych i nukleotydowych są jedynym źródłem ich zdolności kodowania w świecie organizmów żywych. Dla węglowodanów, cztery dodatkowe parametry dramatycznie zwiększają ich zdolność kodowania: typy wiązań glikozydowych pomiędzy monomerami, w zależności od tego, które atomy pierścieni cukrowych je tworzą (np. 1→2, 1→3, 1→4 lub 1→6), usytuowanie reszty hydroksylowej przy pierwszym atomie węgla w monosacharydzie, tzw.

anomerycznym (konfiguracje α lub β), rozmiar pierścienia monomeru (piranozowy lub furanozowy) oraz możliwe rozgałęzienia łańcucha głównego. Aby uzyskać charakterystykę struktury polisacharydu, należy zdefiniować większość z wymienionych parametrów [26,27,38]. Z drugiej strony, równie trudne do scharakteryzowania pod względem struktury są makromolekularne matryce polifenolowe – ligniny. Ich właściwości hydrofobowe, czynią z nich niezwykle funkcjonalny materiał, służący roślinom głównie do transportu wody. Tworzą wysoce rozgałęzioną sieć polifenolową, trudną do zbadania pod względem budowy, z uwagi na liczne wiązania pomiędzy monomerami, w wielu przypadkach typu C–C, co czyni ją niezwykle stabilną, trudną do degradacji strukturą. Problemy związane z degradacją lignin na monomery determinują niedogodności w charakterystyce chemicznej tych polimerów. Dlatego też elementy strukturalne klasyfikowane są najczęściej jako pochodne 3 rodzajów prekursorów, z których na drodze biosyntezy powstała dana matryca: pochodne alkoholu *p*-kumarylowego tworzące podjednostki *p*-hydroksyfenylowe (H), pochodne alkoholu koniferylowego identyfikowane jako podjednostki gwajacylowe (G) oraz pochodne alkoholu sinapylowego, które są oznaczane jako podjednostki syringylowe (S). Ligniny za pośrednictwem licznych reszt hydroksylowych, tworzą wiązania z polisacharydami, głównie na trzy różne sposoby – wiązania estrowe z resztami karboksylowymi kwasów uronowych, wiązania eterowe oraz glikozydowe, za pośrednictwem reszt fenylowych lub hydroksylowych obecnych w łańcuchach alifatycznych, głównie z monosacharydami jak glukoza lub mannoza [26].

Otrzymane bioprodukty zostały scharakteryzowane chemicznie:

- technikami spektrofotometrycznymi, przede wszystkim kolorymetrycznymi [**H1–H9**], które umożliwiły ocenę ilościową cukrów, także tych o charakterze kwasowym, polifenoli i białek w każdym z nich,
- techniką spektroskopową FT-IR [**H1–H4**, **H6–H10**], która była niezmiernie przydatna między innymi w otrzymaniu tzw. „finger-printu” dla każdego z analizowanych produktów,
- metodami chromatograficznymi, w tym: chromatografią podziałową GPC [**H5**, **H7**, **H9**] i HPGPC [**H2**, **H3**, **H6**, **H8**], co umożliwiło oszacowanie ich średniej masy cząsteczkowej, jak też metodą chromatografii gazowej GC-MS [**H1–H9**] zapewniając możliwość przeprowadzenia szczegółowej charakterystyki części polisacharydowych otrzymanych bioproduktów,
- metodami ^1H NMR [**H1–H9**] oraz HSQC NMR [**H4–H9**], umożliwiając otrzymanie bardziej szczegółowych informacji o architekturze wyizolowanych i oczyszczonych bioproduktów.

Aktywność biologiczna wyodrębnionych bioproduktów (Tabela 1) badana była metodami *in vitro* jak też *in vivo*, a otrzymane rezultaty porównywano z wynikami otrzymanymi dla substancji ogólnie uznanych za referencyjne, powszechnie stosowanych jako biologicznie aktywne komponenty formulacji farmaceutycznych.

4.3.4. Wyniki i ich omówienie

W ramach pracy habilitacyjnej bazowałam na doświadczeniach badawczych wyodrębniania polifenolowo-polisacharydowych o właściwościach antykoagacyjnych, wypracowanych w ramach pracy doktorskiej pt. „Izolowanie i określanie struktury substancji hamujących krzepliwość krwi ludzkiej z Przymiotna kanadyjskiego (*Erigeron canadensis* L.)”, której promotorem był prof. dr hab. inż. Roman Gancarz. W ramach rozprawy z kwiatostanów przymiotna kanadyjskiego wyodrębniłam makromolekuły o właściwościach antykoagulacyjnych, stosując różne metody separacyjne:

- odtłuszczenie surowca roślinnego na drodze ekstrakcji heksanem na gorąco,
- ekstrakcję pozostałej biomasy roztworem wodnym w warunkach alkalicznych,
- ekstrakcję w układach dwufazowych, kolejno wieloma różnymi rozpuszczalnikami organicznymi, o wzrastającym stopniu polarności; ten etap miał na celu stopniowe usuwanie z fazy wodnej różnego rodzaju małowcząsteczkowych metabolitów wtórnych i sprawdzanie ich potencjału antykoagulacyjnego,
- wytrącenie węglowodanów i ich koniugatów nadmiarem alkoholu jako substancji w nim nierozpuszczalnych (ang. *alcohol-insoluble residue*, AIR) [38],
- dializę w celu usunięcia produktów małowcząsteczkowych,
- odparowywanie do sucha, w celu uzyskania produktu końcowego.

Dalsza praca badawcza pod opieką naukową prof. dr hab. inż. Romana Gancarza nad innymi surowcami roślinnymi zainspirowała mnie do bliższego przyjrzenia się łańcuchowi procesowemu wyodrębniania glikokoniugatów roślinnych i zweryfikowania jego etapów. Tuż po doktoracie podjęłam pierwsze samodzielne działania nad nowymi sposobami otrzymania grupy takich bioproduktów [H10], które posiadały właściwości antyoksydacyjne, działając promieniochronne wobec błon komórkowych, zapobiegając negatywnym skutkom promieniowania UV. Rezultat tych prac uzyskał ochronę patentową nr PL 216635. Stanowiąc duży potencjał wdrożeniowy, został upubliczniony tylko w znikomym stopniu, w postaci publikacji naukowych, głównie pod kątem zademonstrowania funkcji użytkowych, związanych z właściwościami antyoksydacyjnymi roślinnych glikokoniugatów [B3, B4, B11, B12, B15, B16]. Rozwiązanie to stało się dla mnie bodźcem do podjęcia prac nad usprawnieniem procesów otrzymywania polifenolowo-polisacharydowych koniugatów roślinnych.

Dodatkowo, w rezultacie mojego pobytu na podoktorskim stażu naukowym w Zakładzie Glikomateriałów, w Instytucie Chemii, Słowackiej Akademii Nauk w Bratysławie, na Słowacji, nabrałam kolejno nowych umiejętności analizy chemicznej otrzymywanych przeze mnie bioproduktów. Prace nad aspektem technologicznym procesów wyodrębniania ww. makromolekuł, w celu uzyskania optymalnych rezultatów ich otrzymywania, zaczęłam dynamicznie rozwijać wraz z pracą podjętą w Zakładzie Technologii Organicznej i Farmaceutycznej, kierowanym przez prof. dr hab. inż. Kazimierę A. Wilk, na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

W badaniach nad opracowaniem nowej metodologii wyodrębniania koniugatów z surowców roślinnych, wzięłam pod uwagę szczególnie wydajność otrzymywanych

produktów, a następnie celowość kosztów przeprowadzanych procesów. Istotnym elementem była ocena wpływu modyfikacji procesu technologicznego na walory użytkowe otrzymywanych izolatów.

4.3.4.1. Sposób otrzymywania surowego ekstraktu roślinnego a charakter chemiczny i walory użytkowe oczyszczonych bioproduktów

Tradycyjne podejście do wyodrębniania polisacharydów i ich adduktów z innymi substancjami z biomasy roślinnej [38] zakłada w pierwszym kroku procesowym ekstrakcję z fazy stałej, którą najkorzystniej jest przeprowadzić w środowisku wodnym, w ustalonej temperaturze, w określonych warunkach pH, w zależności od charakteru izolowanego polimeru. Właściwie dobrane warunki wstępnej obróbki surowca roślinnego mają kluczowy wpływ na jakość surowego ekstraktu, a przede wszystkim ilość zawartych w nim najbardziej pożądanых substancji. Sposób poprowadzenia ekstrakcji na tym etapie decyduje o stopniu zmian strukturalnych ściany komórkowej - nadmiernej jej degradacji, utlenieniu, rozerwaniu wiązań estrowych, eterowych, glikozydowych, wodorowych lub kowalencyjnych, w przestrzennej sieci tworzących ją polimerów. Zatem warunki prowadzonej ekstrakcji są kluczowe dla powodzenia dalszych etapów wyodrębniania substancji biologicznie aktywnych [26,40,41].

Biomasa roślinna, szczególnie w przypadku roślin dwuliściennych, zawiera wśród metabolitów pierwotnych i wtórnych wiele substancji o różnym stopniu hydrofobowości, np. woski, stanowiące zewnętrzną warstwę ochronną tkanek [26]. Mogą one utrudniać wyodrębnianie substancji wodolubnych. Zdecydowałam o konieczności zweryfikowania potrzeby odtłuszczenia surowca roślinnego za pomocą odpowiednich rozpuszczalników organicznych, jako pierwszego etapu w ciągu procesowym. Analizując parametr wydajności, powiązany z procesem otrzymywania glikokoniugatów z suchej masy roślinnej, porównałam efekt uzyskany dla produktów, które były otrzymywane poprzez odtłuszczenie suchej biomasy w pierwszej kolejności heksanem [B2] lub metanolem i acetonem [H4, H7], z rezultatem uzyskanym dla produktów, w przypadku których nie zastosowano tego etapu [H4, H5, H6, H7], a susz roślinny od razu poddano ekstrakcji w środowisku wodnym o odpowiednim pH. Istotne było przeprowadzenie badań na kilku różnych surowcach roślinnych, aby móc zaobserwować tendencje, stosując taki sam schemat postępowania wobec każdego z nich. Otrzymane rezultaty zestawiałam w Tabeli 2.

Porównując produkty roślinne z czterech różnych surowców zielarskich: kwiatostanów arniki górskiej, kwiatów jeżówki purpurowej, liści poziomki pospolitej, oraz kwiatostanów krwiściągu lekarskiego wyraźnie zaobserwowałam, że otrzymane glikokoniugaty w większości różnią się znacząco pod względem wydajności. Wbrew oczekiwaniom, w większości przypadków potraktowanie biomasy silnie hydrofobowym rozpuszczalnikiem organicznym w postaci heksanu nie zwiększyło ilości otrzymanych hydrofilowych glikokoniugatów roślinnych.

Tabela 2. Produkty roślinne, otrzymane z różnych surowców zielarskich: w przypadku gdy biomasa w pierwszej kolejności została poddana odtłuszczeniu heksanem – [B2] lub metanolem a następnie acetonem [H4, H7], lub bezpośrednio została poddana ekstrakcji w środowisku 0,1 M NaOH [H4, H5, H6, H7]. Wszystkie surowe ekstrakty alkaliczne zostały następnie poddane takim samym procesom oczyszczania, w efekcie dając polifenolowo-polisacharydowe koniugaty.

rodzina	Asteraceae				Rosaceae					
surowiec zielarski	Arnika górska		Jeżówka purpurowa		Poziomka pospolita			Krwieściąg lekarski		
symbol produktu użyty w pracy	-	AM	-	Ep	-	Fv I	Fv III	SoP	So	
wstępne odtłuszczenie	heksan	brak	heksan	brak	heksan	brak	metanol aceton	brak	metanol aceton	
źródło literaturowe	[B2]	[H5]	[B2]	[H6]	[B2]	[H4]	[H4]	[H7]	[H7]	
wydajność (% wag.)	0,9	5,7	1,8	1,8	1,4	8,4	4,5	1,9	2,6	
cukry (% wag.)	11,3	26,0	16,4	26,3	15,2	21,1	31,7	21,0	22,7	
kompozycja monosacharydowa (% wag.)	UA	29,9	46,2	32,7	30	53,0	60,7	35,3	32,6	20,2
	Rha	3,5	6,0	4,2	13	10,0	13,9	25,1	10,1	12,0
	Fuc	brak	brak	brak	1	brak	0,4	0,6	brak	0,4
	Ara	21,1	16,6	28,6	17	6,8	9,4	16,5	24,9	15,9
	Xyl	0,8	mało	2,4	9	1,4	4,4	5,0	0,2	1,9
	Man	0,9	mało	0,6	2	0,9	0,6	0,7	3,1	8,7
	Gal	21,0	12,9	8,0	22	8,6	7,9	12,1	19,8	25,1
Glc	22,8	8,3	23,5	6	19,3	2,7	4,7	8,1	12,6	
polifenole (GAE) (mM)	4,8	1,3	4,8	1,0	6,7	3,3	3,5	1,4	1,0	
białka (% wag.)		1,0		14		1,1	1,3	0,7	0,7	

UA – kwasy uronowe jako suma kwasu galakturonowego i ewentualnie kwasu glukuronowego;
GAE – ekwiwalent kwasu galusowego.

Stwierdziłam, że w przypadku ekstrakcji biomasy w środowisku wodnym, pomijając etap wstępnego odtłuszczenia, po oczyszczeniu produktów ich wydajność była większa. Zawierają one więcej części cukrowej, na niekorzyść części polifenolowej. W przypadku produktu z arniki górskiej [H5] oraz produktu z poziomki pospolitej [H4] zaobserwowałam podobną tendencję, gdzie w części polisacharydowej obu izolatów zauważyłam wzrost ilości kwasów uronowych, jak też nieznacznie ilości ramnozy, na niekorzyść glukozy i galaktozy. Sugeruje to typowo pektynowy charakter części polisacharydowych w tych produktach, a kompozycja podjednostek cukrowych wskazuje, że w każdym przypadku jest to ramnogalakturonian, z dużym prawdopodobieństwem typu I (RG I) [26].

Przykłady produktów otrzymanych z liści poziomki pospolitej [H4] oraz z kwiatostanów krwiesciągu lekarskiego [H7] w wielu aspektach potwierdzają wyżej opisane wnioski. Odtłuszczenie surowca roślinnego innym rodzajem rozpuszczalników organicznych, jak metanol i aceton [H4, H7], czasem skutkuje mniejszą wydajnością otrzymanego glikokoniugatu [H4, Fv III], natomiast bezspornie wpływa na oczyszczony produkt końcowy. Produkt otrzymany z nieodtłuszczonego surowca zawiera większą ilość kwasów uronowych w części polisacharydowej, a kompozycja cukrowa jest bardziej heterogenna, natomiast ilości polifenoli są porównywalne.

Kolejnym ważnym aspektem dotyczącym wstępnej obróbki biomasy, który postanowiłam zbadać było określenie korzystnych warunków środowiska wodnego, w którym poprowadzona powinna zostać wstępna ekstrakcja. W pracach [H4, H8] zaproponowałam różne warianty medium ekstrakcyjnego. W pierwszej kolejności zweryfikowałam wpływ pH [H8] na przykładzie dwóch różnych rodzajów biomasy z tej samej rośliny – z kwiatów oraz z owoców głogu jednoszyjkowego (*Crataegus monogyna* L.) (Tabela 3), popularnego surowca zielarskiego, uznawanego powszechnie za mający szczególnie dobroczynny wpływ na układ krwionośny człowieka [42].

Tabela 3. Charakterystyka chemiczna surowych ekstraktów, otrzymanych z kwiatów oraz z owoców głogu jednoszyjkowego [H8].

		środowisko ekstrakcyjne		
		0,1 NaOH	0,1 M kwas szczawiowy	H ₂ O
ekstrakty z kwiatów	wydajność (% wag.)	16,7	13,9	14,9
	cukry (% wag.)	16,1	15,0	13,7
	kwasy uronowe (UA) (% wag.)	5,5	9,0	6,7
	polifenole (GAE) (mM)	1,0	0,7	0,9
	białka (% wag.)	1,7	0,9	2,4
ekstrakty z owoców	wydajność (% wag.)	14,4	11,5	12,8
	cukry (% wag.)	21,5	25,7	18,8
	kwasy uronowe (UA) (% wag.)	5,0	7,1	6,7
	polifenole (GAE) (mM)	0,8	0,5	0,7
	białka (% wag.)	2,1	0,8	3,3

Bez względu na użytą część rośliny – owoce czy kwiaty, ekstrakcja w warunkach alkalicznych okazała się być najbardziej korzystna z punktu widzenia wydajności otrzymanych surowych produktów oraz pod względem walorów użytkowych oczyszczonych glikokoniugatów. Mimo, że ekstrakty wyodrębnione w środowisku o pH kwasowym zawierały więcej kwasów uronowych, wskazujących na obecność pektyn, to środowisko alkaliczne, bez względu na rodzaj biomasy, zapewniło ekstrakty o lepszym potencjale antykoagulacyjnym. Kompozycja cukrowa oczyszczonych glikokoniugatów, w przypadku produktu z kwiatów sugerowała obecność **RG I** oraz większą ilość polifenoli, niż w przypadku produktu z owocu, którego kompozycja cukrowa sugerowała bardziej złożoną naturę [H8].

Stopień zalkalizowania środowiska ekstrakcyjnego ma istotny wpływ na rodzaj otrzymywanych polisacharydów i związanych z nimi struktur. Odkryto, że środowisko 0,1 M NaOH jest najbardziej przyjazne dla wyodrębniania pektyn, natomiast stężenie NaOH na poziomie 1 M oraz 6 M jest zdecydowanie bardziej korzystne dla słabiej rozpuszczalnych w wodzie hemiceluloz [26,41]. Przeprowadzone przeze mnie w tym kierunku badania [H4] swymi rezultatami wpisały się we wnioski z doniesień literaturowych (Tabela 4).

Tabela 4. Produkty roślinne, otrzymane z liści poziomki pospolitej w różnych warunkach pH wstępnej ekstrakcji, poddane następnie procesowi oczyszczania w taki sam sposób [H4].

symbol produktu użyty w pracy		Fv II	Fv III	Fv IV
warunki wstępnej ekstrakcji		0,65 M NaOH	0,1 M NaOH	bufor octanowy pH=5,0
wydajność (% wag.)		5,3	4,5	3,9
cukry (% wag.)		28,5	31,7	28,6
kompozycja monosacharydowa (% wag.)	UA	30,9	60,7	53,5
	Rha	13,2	13,9	9,2
	Fuc	brak	0,4	0,5
	Ara	22,8	9,4	15,4
	Xyl	6,7	4,4	4,6
	Man	brak	0,6	1,5
	Gal	15,4	7,9	12,2
	Glc	11,0	2,7	3,1
polifenole (GAE) (mM)		1,2	3,5	2,8
białka (% wag.)		0,5	1,3	1,0

Ekstrakcja przeprowadzona w warunkach alkalicznych, w środowisku 0,1 M NaOH zaowocowała ekstraktem, który w toku oczyszczania dał produkt o największej zawartości kwasów uronowych, przy najmniejszym udziale ksylozy, arabinozy i glukozy, w porównaniu z innymi izolatami. Dodatkowo okazało się, że zakwaszone środowisko także sprzyja wyodrębnianiu produktu zawierającego pektyny (53,5 % wag. kwasów uronowych w części cukrowej), jednak tak otrzymany bioprodukt miał bardziej różnorodną strukturę cukrową, mniejszy udział polifenoli i nie wykazywał tak silnych właściwości antykoagulacyjnych, jak miało to miejsce w przypadku izolatu Fv III.

Wnioski te zainspirowały mnie do dalszego zmodyfikowania procedury wydzielania surowego ekstraktu – zaniehbując etap odtłuszczania surowca rozpuszczalnikami organicznymi oraz prowadząc proces wstępnej obróbki biomasy w środowisku 0,1 M NaOH.

4.3.4.2. Możliwości usprawnienia procesu izolowania, przy zachowaniu walorów użytkowych bioproduktu

W celu promowania zrównoważonego rozwoju, w kontekście technologii pozyskiwania wysokowartościowych bioproduktów z surowców zielarskich, koncepcja tzw. "zielonej chemii" faworyzuje zastosowanie nowoczesnych procesów wyodrębniania bioproduktów. Działania te wpisują się w strategię Narodów Zjednoczonych na rzecz Odpowiedzialnego Rozwoju 2030, która deklaruje trwały rozwój, zmniejszenie ilości odpadów, (ponowne) wykorzystanie produktów ubocznych oraz zredukowanie śladu węglowego w procesach przetwórstwa. Powszechnie stosowane, tradycyjne metody ekstrakcji wymagają wysokich nakładów energii, konsumując dużą ilość rozpuszczalników o negatywnym wpływie na środowisko. Nowe, alternatywne technologie muszą być ekonomicznie opłacalne, przyjazne dla środowiska i

wysokowydajne. Ta koncepcja jest znana jako zasada e3 [43]. Alternatywne rozwiązania w porównaniu z konwencjonalną ekstrakcją bioproduktów z surowców zielarskich powinny przewidywać krótszy czas ekstrakcji (przetwarzania), a także mniejsze zużycie energii i rozpuszczalników, korzystnie mniej operacji jednostkowych i zredukowanie emisji CO₂ [44]. Chemat i wsp. [45] opracowali 6 zasad tzw. "zielonej" ekstrakcji: dobrze uzasadnione pozyskiwanie, minimalizowanie stosowania rozpuszczalników organicznych, redukcja zużycia energii, wytwarzanie produktów ubocznych o wysokiej wartości dodanej zamiast odpadów, skrócenie czasu ekstrakcji oraz otrzymywanie naturalnego i bezpiecznego produktu. Zaobserwowano, że na skalę przemysłową zasady te poprawiły zrównoważenie produkcji przy zmniejszeniu zużycia wody i rozpuszczalników organicznych oraz wyeliminowaniu nadmiernego powstawania ścieków i substancji niebezpiecznych, a także redukcji wykorzystania energii z zasobów kopalnianych [46,47].

Sposób otrzymywania polifenolowo-polisacharydowych koniugatów roślinnych na etapie oczyszczania surowych ekstraktów zakładał zastosowanie serii ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz przy udziale różnych rozpuszczalników organicznych, uszeregowanych zgodnie ze wzrastającą polarnością: heksan, eter dietylowy, chloroform, a następnie mieszanina chloroform/metanol (1:1) [H1, H2, H3, H4, H5, H6]. Zaobserwowałam, że w przypadku ostatnich dwóch mediów ekstrakcyjnych do fazy organicznej nie przechodzi zbyt wiele materiału roślinnego, więc sprawność tych dwóch etapów jest znikoma. Dodatkowym argumentem za usunięciem obu etapów z łańcucha procesowego była kwestia toksyczności rozpuszczalników chlorowcopochodnych, które nie powinny mieć kontaktu z produktami przeznaczonymi docelowo do użytku wewnętrznego przez człowieka. Opierając się na powyższych danych, podjęłam decyzję o wyeliminowaniu obu procesów jednostkowych - z użyciem chloroformu oraz jego mieszaniny z metanolem, [H7, H8, H9]. Efekt, jaki osiągnęłam najlepiej prezentuje porównanie produktów z prac [H4 – Fv I] oraz [H9 – FvH] (Tabela 5). Z punktu widzenia charakteru chemicznego jak też właściwości antykoagulacyjnych, wprowadzona przeze mnie modyfikacja nie wpłynęła w znaczący sposób na produkt końcowy. Zaobserwowane zmiany, szczególnie dotyczące poszczególnych monosacharydów w częściach polisacharydowych obu produktów mogą wynikać nie tylko ze zmiany procedury, ale także z różnic w użytym w obu pracach surowcu, jak np. warunki wzrostowe, pogodowe i glebowe roślin. Podsumowując, oba wyeliminowane etapy były zbędne, a ich usunięcie nie tylko skróciło łańcuch procesowy, ale także zredukowało koszt zużycia rozpuszczalników, koszt ich utylizacji oraz koszt energii, niezbędnej do przeprowadzenia obu usuniętych procesów jednostkowych.

W dalszej prowadzonej przeze mnie pracy nad możliwością usprawnienia ciągu procesowego i/lub zminimalizowania kosztów związanych z jego przeprowadzeniem powróciłam do problemu wstępnej obróbki surowca roślinnego. Poddałam ocenie konieczność prowadzenia ekstrakcji alkalicznej w wysokiej temperaturze [H9]. Jak się okazało, w rezultacie wstępnej ekstrakcji alkalicznej w temperaturze pokojowej, wydajność oczyszczonego następnie produktu spadła z 7,7 do poziomu 2,5 % wag. suchej masy roślinnej. Ponadto udział części polifenolowej w bioprodukcje zmalał na

korzyść części polisacharydowej (Tabela 5). Co istotne, aktywność biologiczna również uległa pogorszeniu, zatem poddanie biomasy wstępnej obróbce przy udziale wysokiej temperatury okazało się być niezbędne.

Tabela 5. Produkty roślinne, otrzymane z liści poziomki pospolitej: sposobem uwzględniającym użycie chloroformu oraz jego mieszaniny z metanolem, w procesie oczyszczania ekstraktu [H4] lub sposobem zmodyfikowanym, bez zastosowania obu procesów jednostkowych [H9], gdzie we wstępnej obróbce surowca w środowisku alkalicznym dodatkowo: FvC - ekstrakcję przeprowadzono w temperaturze pokojowej, FvH - ekstrakcję przeprowadzono w temperaturze wrzenia układu, FvU - ekstrakcję wspomagano ultradźwiękami, FvM - ekstrakcję wspomagano mikrofalami.

symbol produktu użyty w pracy		Fv I	FvH	FvC	FvU	FvM
źródło literaturowe		[H4]	[H9]	[H9]	[H9]	[H9]
wydajność (% wag.)		8,4	7,7	2,5	4,9	6,7
cukry (% wag.)		21,1	25,0	26,9	28,3	28,6
kompozycja monosacharydowa (% wag.)	UA	60,7	57,6	24,5	40,6	79,5
	Rha	13,3	2,3	5,4	4,7	1,6
	Fuc	0,4	0,3	0,8	0,6	0,1
	Ara	9,4	8,2	7,9	5,4	6,0
	Xyl	4,4	2,4	1,6	0,8	1,3
	Man	0,6	0,7	3,4	1,9	0,7
	Gal	7,9	12,7	14,8	11,4	4,9
	Glc	2,7	5,8	41,5	34,7	5,9
polifenole (GAE) (mM)		3,3	3,3	1,5	2,9	1,9
białka (% wag.)		1,1	1,1	0,4	0,5	0,9

W tradycyjnym sposobie wstępnej obróbki biomasy ekstrakcja w środowisku alkalicznym, w temperaturze wrzenia układu zwyczajowo prowadzona jest przez 6 godzin [H1-H9]. Podjęłam próbę usprawnienia tego etapu przez zastosowanie czynnika fizycznego, wspomagającego proces ekstrakcji we wstępnej fazie obróbki biomasy w warunkach alkalicznych [H9]. Celem było skrócenie czasu tego etapu oraz możliwie zredukowanie ponoszonego wydatku energetycznego. Postanowiłam zastosować ultradźwięki, a w innym wariantcie mikrofałe. Oba te rozwiązania poddane zostały optymalizacji przy zastosowaniu metodologii analizy powierzchni odpowiedzi (*ang. Response Surface Methodology, RSM*), z zastosowaniem planu eksperymentu typu I-optimal. W przypadku ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami, zmiennymi niezależnymi, które były zweryfikowane były: czas prowadzenia ekstrakcji – przez 10, 20, 40 i 60 minut, oraz moc ultradźwięków – 30, 60, 120 i 240 W. Parametrami stałymi były: temperatura – 20 °C, jak też częstotliwość – 20 kHz. Natomiast zmiennymi w ekstrakcji wspomaganej mikrofalami, które były poddane ocenie w toku eksperymentów były: czas prowadzenia ekstrakcji – przez 15, 20 i 30 minut, moc mikrofal – 100, 200 i 300 W, jak też temperatura procesu – 70, 80 i 95°C. W wykonanych seriach ekstrakcji uwzględnione zostały wszystkie możliwe warianty wymienionych parametrów. Takie postępowanie miało na celu wytypowanie surowego ekstraktu, który byłby optymalny głównie pod względem jego aktywności biologicznej, przy kontrolowanym jednocześnie parametrze wydajności. Uzyskane rezultaty zostały następnie poddane analizie

statystycznej z zastosowaniem testów ANOVA, uwzględniając, jako kluczową odpowiedź, aktywność biologiczną. Optymalne surowe ekstrakty poddane zostały procesowi oczyszczania, a następnie scharakteryzowane (Tabela 5). W zależności od zastosowanego czynnika wspomagającego, otrzymane glikokoniugaty różniły się między sobą pod względem charakteru chemicznego w zdecydowany sposób. Proces wspomagany mikrofalami okazał się wpływać korzystniej na wydajność oczyszczonego produktu, który pod względem charakteru części polisacharydowej był bardzo jednorodny. Z kolei ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami wpłynęła korzystniej na oczyszczony produkt, z uwagi na jego właściwości biologiczne. Oba izolaty okazały się działać inhibitorowo na czynnik Xa enzymatycznego procesu krzepnięcia krwi, za pośrednictwem antytrombiny. Właściwość ta jest charakterystyczna dla stosowanego w medycynie już od prawie 100 lat biofarmaceutyku, którego głównym składnikiem jest heparyna - otrzymywana z tkanek zwierzęcych jak płuca bydłce i jelita świń mieszanina polisacharydów o charakterze kwasowym, bogata w liczne grupy karboksylowe oraz siarczanowe [48].

Wszystkie bioprodukty uzyskane w toku wyżej opisanych badań [H9] zostały rozfrakcjonowane na drodze chromatografii podziałowej, w celu oceny stopnia ich homogenności i rozrzutu mas cząsteczkowych. Ogólnie należy stwierdzić, że w przypadku zastosowania metod ekstrakcji wspomaganych czynnikami fizycznymi, otrzymane bioprodukty, w szczególności ich najbardziej aktywne biologicznie frakcje, charakteryzują się mniejszymi masami cząsteczkowymi. Czynniki fizyczne wpłynęły więc na strukturę ścian komórkowych biomasy, degradując tą polimerową sieć na mniejsze fragmenty. To z kolei spowodowało, że w stosunkowo krótkim czasie prowadzonej ekstrakcji uzyskano zadowalający efekt w postaci akceptowalnej wydajności.

Mniejsza masa cząsteczkowa otrzymanych glikokoniugatów, uzyskanych na drodze wstępnej obróbki biomasy wspomaganej czynnikami fizycznymi, jest bardziej korzystna także z biologicznego punktu widzenia. Mniejsze cząsteczki cechują się zwykle lepszą biodostępnością, co może być to dodatkową zaletą w przypadku walorów prozdrowotnych.

4.3.4.3. Stopień oczyszczenia bioproduktu a jego bioaktywność

Podjmując decyzję o tym, na którym etapie należy zakończyć łańcuch procesowy, istotne jest, aby wziąć pod uwagę wymagany poziom oczekiwanej aktywności biologicznej, a czasem także selektywności działania danego bioproduktu. Należy określić akceptowalny stopień aktywności z punktu widzenia przeznaczenia produktu specjalistycznego. Wyznacznikiem powinien być przede wszystkim cel użytkowy produktu, jednak bardzo istotna jest także analiza techno-ekonomiczna sposobu jego otrzymywania. Im wyższa czystość i aktywność bioproduktu tym wyższy koszt jego wytworzenia, a co za tym idzie - niższa wydajność z użytej biomasy, więcej odpadów, dłuższy czas wytwarzania oraz większy nakład energetyczny. Pociąga to za

sobą wyższą cenę izolatu. Zbiór tych cech jest charakterystyczny dla wysokowartościowych chemikaliów specjalistycznych, stanowiących komponenty (bio)farmaceutyków.

Przykładem takich rozważań są koniugaty polifenolowo-polisacharydowe z krwawnicy pospolitej (*Lythrum salicaria* L.) [H1, H2]. Jest to roślina lecznicza obecnie częściej znana jako roślina łąkowa. Jej łacińska nazwa, pochodząca od greckiego słowa „luthron” – krew, wyraźnie wskazuje, że w medycynie ludowej jako surowiec zielarski funkcjonuje od dawna, znajdując zastosowanie w leczeniu między innymi powikłań związanych z procesami krzepnięcia krwi [49].

Makrocząsteczkowy produkt końcowy, otrzymany z wydajnością około 8 % wag. suchej biomasy, okazał się być dość heterogenny [H1]. W części polisacharydowej zawierał fragmenty ramnogalakturonianu (RG) oraz arabinogalaktanu (AG). W badaniach *in vitro* w osoczu krwi ludzkiej wykazywał interesujące właściwości antykoagulacyjne, jednak nieoczekiwanie, w eksperymentach *in vivo* na modelu zwierzęcym okazał się demonstrować efekt odwrotny do zamierzonego, a mianowicie skracał czas formowania skrzepu. Ten kontrowersyjny rezultat wymagał dalszych badań [H1]. Było to powodem do podjęcia przeze mnie decyzji o konieczności przeprowadzenia dalszych procedur separacyjnych [H2]. Produkt z krwawnicy pospolitej, uzyskany według procesu opisanego w poprzedniej pracy [H1], został rozdzielony na drodze chromatografii jonowymiennej, na złożu anionowymiennej typu DEAE aż na 12 frakcji, które różniły się pod względem właściwości biologicznych i charakteru chemicznego (Tabela 6).

Tabela 6. Oczyszczony produkt z kwiatostanów krwawnicy pospolitej [H1] oraz jego wybrane frakcje [H2]. W czerwonej ramce zaznaczono frakcje o działaniu pro-koagulacyjnym, przeciwnym niż pozostałe.

symbol produktu użyty w pracy		Ls	Ls-F2	Ls-F3	Ls-F4	Ls-F7	Ls-F12
wydajność (% wag.)		8,0	4,4	5,2	11,1	14,3	25,4
cukry (% wag.)		29,7	22,4	27,7	39,5	60,1	13,5
kompozycja monosacharydowa (% wag.)	UA	66,0	38,4	99,5	98,5	2,8	99,5
	Rha	10,2	23,7	0,3	0,7	20,8	mało
	Fuc	0,6	3,3	brak	mało	brak	brak
	Ara	8,7	25,1	0,1	0,2	7	mało
	Xyl	0,5	2,2	brak	mało	2,4	mało
	Man	0,5	1,7	brak	mało	2,6	mało
	Gal	11,6	3,2	mało	0,4	4,9	mało
	Glc	1,9	2,4	brak	0,1	59,4	malo
polifenole (GAE) (mM)		1,2	0,9	0,1	0,1	0,1	2,8
białka (% wag.)		0,8	1,2	0,2	0,2	0,3	1,2

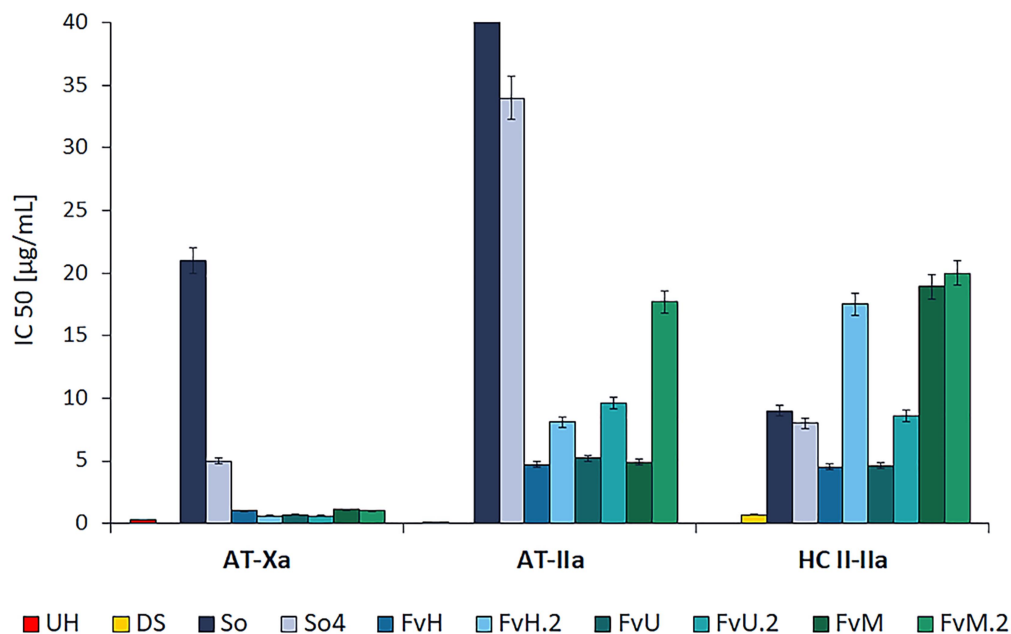
Okazało się, że trzy z otrzymanych 12 frakcji mają interesujące właściwości antykoagulacyjne – Ls-F2, Ls-F7 oraz Ls-F12. Dwie z nich natomiast działają antagonistycznie – frakcje Ls-F3 i Ls-F4 są pro-koagulantami. Cechą charakterystyczną tych ostatnich był szczególny charakter cukrowy ich części polisacharydowych. Składały

się one w 98-99 % wag. z kwasów uronowych, co sugerowało ich wyjątkowo homogenną, pektynową naturę. Ostatnia, 12-ta frakcja posiadała podobną naturę cukrową, jednak udział części polifenowej w całej tej frakcji był znacząco większy od pozostałych, co prawdopodobnie determinowało jej właściwości antykoagulacyjne.

Frakcje o pożądanym właściwościach antykoagulacyjnych stanowiły sumarycznie ponad 44 % rozdzielonego produktu roślinnego, a więc około 3,5 % wag. suchej biomasy. W przypadku tego surowca dodatkowy etap oczyszczania bioproduktu okazał się być niezbędny, aby wyeliminować niepożądane efekty biologiczne. Mimo, że zdecydowanie podniosło to całkowite koszty, znacząco wydłużając łańcuch procesowy.

W trakcie przeprowadzonych dodatkowych badań, dotyczących poszukiwania innych walorów użytkowych produktu z krwawnicy pospolitej, okazało się, że jest on skutecznym środkiem przeciwkaszlowym, a procedura jego otrzymywania nie wymaga zastosowania dodatkowych metod separacyjnych [B7].

Innymi przykładami konieczności rozważenia zasadności przedłużania ciągu procesowego o zastosowanie kolejnych metod separacyjnych są produkty z krwiściagu lekarskiego oraz z poziomki pospolitej [H7, H9]. Każdy z nich w rezultacie chromatografii podziałowej (GPC) udało mi się rozdzielić na kilka frakcji. Aktywność antykoagulacyjna najbardziej aktywnych frakcji była porównywalna lub nieznacznie słabsza niż aktywność biologiczna całego produktu. Dalsze badania wykazały natomiast, że mechanizmy działania produktów roślinnych w porównaniu do wydzielonych z nich najbardziej aktywnych antykoagulacyjnie frakcji różniły się znacząco (Rys. 3.).



Rys. 3. Aktywność inhibitorowa glikokoniugatów roślinnych oraz ich frakcji wobec: czynnika Xa za pośrednictwem antytrombiny (AT-Xa), czynnika IIa za pośrednictwem antytrombiny (AT-IIa), czynnika IIa za pośrednictwem kofaktora heparyny II (HC II-IIa), wyrażona jako IC_{50} . So – produkt z krwiściagu lekarskiego oraz So4 – jego frakcja [H7]; FvH, FvU, FvM – produkty z poziomki pospolitej oraz FvH.2, FvU.2, FvM.2 – ich frakcje [H9].

Najlepsze frakcje preparatów z obu rodzajów surowców zielarskich działały wysoce selektywnie, jako inhibitory czynnika Xa enzymatycznego procesu krzepnięcia krwi, za pośrednictwem antytrombiny (AT). Zatem, pojedyncze frakcje swoim wysoce selektywnym efektem biologicznym odpowiadały strategii działania opartej na idei tzw. „magicznej kuli”. Mieszanki natomiast demonstrowały efekt synergizmu [50], wpisując się w strategię działania typu "*multi-target/multi-component*", charakterystyczną dla mieszanin bioproduktów stanowiących aktywne składniki fitofarmaceutyków.

4.3.4.4. Podniesienie gotowości wdrożeniowej technologii otrzymywania bioproduktu

Produkty pochodzenia naturalnego o właściwościach przeciwutleniających mogą demonstrować swój potencjał antyoksydacyjny w różnorodny sposób [39]. Otrzymane przeze mnie bioprodukty działają promieniochronne wobec błon komórkowych, zapobiegając negatywnym skutkom promieniowania UV [H10], w tym wobec płytek krwi, przeciwdziałając ich aktywacji, agregacji, w efekcie dodatkowo upośledzając proces krzepnięcia krwi [B3, B4, B11]. Makrocząsteczkowe antyoksydanty, które wyodrębniłam jako roślinne glikokoniugaty, znalazły też zastosowanie jako środki promieniochronne, skutecznie zapobiegające działaniu promieniowania jonizującego, przeciwdziałające uszkodzeniom komórek ludzkich przez promienie gamma [B34, B12, B15, B16]. Wynalazek pt. „Roślinny środek przeciwutleniający i sposób wytwarzania roślinnego środka przeciwutleniającego” [H10] uzyskał ochronę patentową nr PL 216635. Rozwiązanie opisane w zgłoszeniu patentowym przewiduje w pierwszym etapie ekstrakcję surowca roślinnego w środowisku wodnym o ustalonym pH, w określonej temperaturze, oddzielenie wodnego ekstraktu i doprowadzenie pH do wartości obojętnej. Kolejny krok to sączenie przez barierę zapewniającą oddzielenie cząsteczek o masie ≥ 5 kDa, co w efekcie daje produkt o wielkocząsteczkowej naturze. W przykładach zaproponowałam zgodne z Farmakopeą Polską, formułacje farmaceutyczne z dodatkiem bioproduktu, możliwe do zastosowań zewnętrznych.

Opisany wyżej wynalazek wraz z wypracowanym przeze mnie know-how, stanowią razem technologię o nazwie „Naturalne związki antyoksydacyjne wytwarzane z roślin leczniczych”, która jest własnością majątkową Politechniki Wrocławskiej, obecnie aktywnie promowaną na rynku przez Wrocławskie Centrum Transferu Technologii Politechniki Wrocławskiej. Na mój wniosek technologia ta została oceniona przez WCTT jako rozwiązanie techniczne, które posiada znaczący potencjał komercjalizacyjny. Z tego względu uzyskałam dofinansowanie ze środków projektu Inkubator Innowacyjności+, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu MNiSW, na podniesienie gotowości wdrożeniowej technologii. Celem było zwiększenia atrakcyjności tej technologii dla zainteresowanego nabywcy, a w konsekwencji możliwość jej komercjalizacji (Oświadczenie WCTT o podniesieniu gotowości wdrożeniowej technologii

otrzymywania bioproduktu, podpisane przez dyrektora WCTT, dr Jacka Firleja, dnia 21.02.2019r. - dokument w Załączniku nr 7 do Wniosku).

Szczegóły tej technologii są objęte tajemnicą handlową i jako poufne, nie mogą być publicznie ujawnione.

W celu podniesienia gotowości wdrożeniowej procesów otrzymywania roślinnych glikokoniugatów, postanowiłam połączyć rozwiązania stanowiące przedmiot patentu PL 216635 [H10] z wiedzą wypracowaną przeze mnie w toku realizacji prac [H1-H9], dotyczącą możliwości usprawnienia łańcucha procesowego. Samodzielnie stworzyłam koncepcję projektu technologicznego, przeznaczonego do zrealizowania w skali półtechnicznej, zaplanowałam ciąg procesów jednostkowych, uwzględniając metody możliwe do zastosowania przy użyciu urządzeń i modułów produkcyjnych, powszechnie stosowanych w przemyśle spożywczym, suplementów diety i farmaceutycznym. Określiłam punkty krytyczne w ciągu procesowym. Spośród surowców roślinnych, zawierających glikokoniugaty o właściwościach antyoksydacyjnych, wymienionych w patencie nr PL 216635 [H10], w szczególności tych, które były przedmiotem moich badań [H1-H9], wytypowałam jeden surowiec zielarski – liść poziomki pospolitej. Przy wyborze kierowałam się też niskimi kosztami zakupu suszu roślinnego, swobodą w dostępie do dużych ilości tego surowca od dostawcy zapewniającego certyfikaty jakości i zgodności oraz dopuszczeniem do obrotu na terenie Polski jako produktu zielarskiego. Kolejnym etapem, który wykonałam było przygotowanie harmonogramu przeprowadzenia ciągu procesowego, w 3 różnych wariantach, spośród których w toku prac został wybrany przeze mnie jeden, najbardziej korzystny. Przygotowałam także zapotrzebowanie materiałowe, uwzględniające wymagania ilościowe i jakościowe.

Prace zostały przeprowadzone na instalacji przemysłowej w Zakładzie Doświadczalnym Wrocławskiego Parku Technologicznego S. A. Zakład Doświadczalny WPT dysponuje zaawansowaną technologicznie, unikatową w skali kraju instalacją produkcyjną [51]. Jest ona dostosowana do potrzeb tzw. branży life science, dedykowana szczególnie dla sektora żywności, suplementów diety i preparatów bioaktywnych. Linia ta szczególnie przeznaczona jest do testowania nowych technologii i podnoszenia ich skali z laboratoryjnej do półtechnicznej. Przydatna jest także do weryfikacji założeń oraz optymalizacji procesów produkcyjnych, zapewniając możliwość przeprowadzenia całości procesu produkcyjnego lub tylko wybranego etapu. Linia składa się z 16 modułów produkcyjnych w skali półprzemysłowej, które działają zgodnie z obowiązującymi systemami kontroli jakości, w tym Systemem Analizy Zagrożeń i Krytycznych Punktów Kontrolnych (HACCP) oraz standardami GMP, GHP.

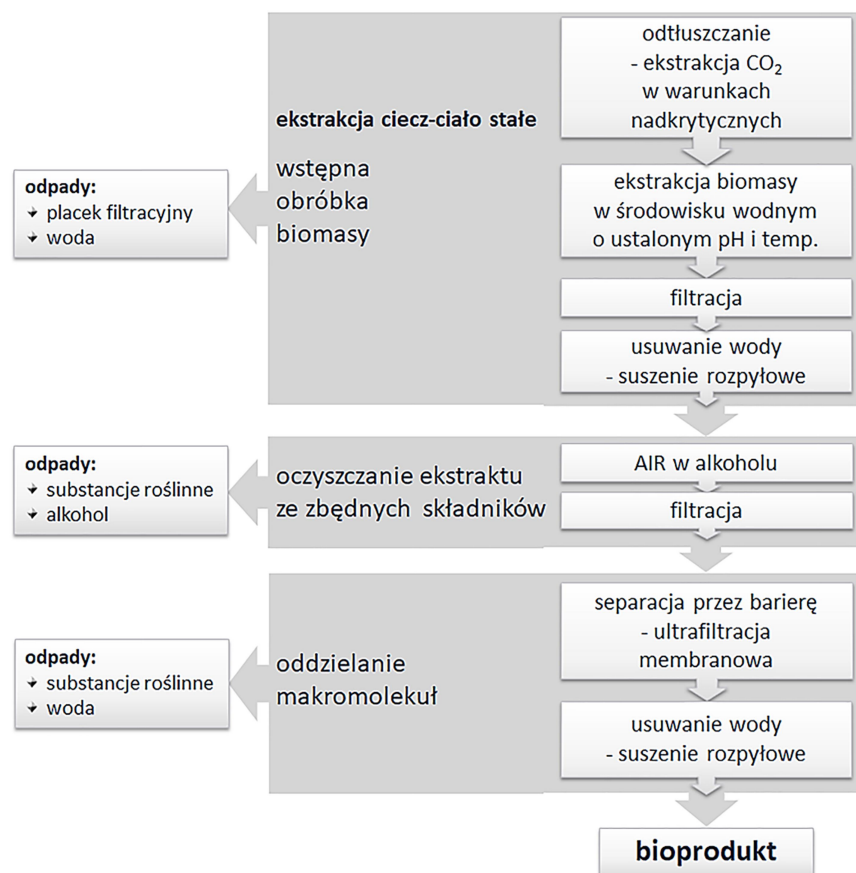
Łańcuch technologiczny został podzielony na cztery etapy. Na każdym z nich osobiście nadzorowałam prace, kontrolując ich postęp i decydując o właściwym doborze parametrów procesów jednostkowych. Składały się one z następujących procesów jednostkowych:

IA. (1 dzień roboczy) - Pilotażowe procesy ekstrakcji surowca roślinnego za pomocą CO₂ w warunkach nadkrytycznych, dwuwariantowo - bez udziału oraz z udziałem odpowiedniego ko-solwenta, w skali kilogramowej, w celu zweryfikowania

przydatności tej metody w ciągu technologicznym. Surowiec poddany w taki sposób wstępnej obróbce został mi przekazany do badań laboratoryjnych, abym w toku izolowania i oczyszczenia roślinnych glikokoniugatów mogła ocenić zasadność zastosowania tej metody ekstrakcyjnej. Rezultat przeprowadzonych przeze mnie badań podyktował wybór jednego z 3 wariantów dalszego postępowania.

- IB.** (2 dni robocze) - Ekstrakcja surowca za pomocą CO₂ w warunkach nadkrytycznych, przeprowadzona w skali półtechnicznej, przy określonych parametrach procesu.
- II.** (3 dni robocze) - Ekstrakcja biomasy w środowisku wodnym o ustalonym pH, w module o obj. roboczej 100 L. Separacja stałych cząstek z na drodze sączenia, z zastosowaniem prasy hydraulicznej. Suszenie rozpyłowe roślinnego ekstraktu.
- III.** (2 dni robocze) - Ekstrakcja stałego ekstraktu roślinnego alkoholem etylowym w module o obj. roboczej 100 L. Separacja stałych nierozpuszczalnych cząstek na drodze sączenia, z zastosowaniem prasy hydraulicznej.
- IV.** (2 dni robocze) - Ultrafiltracja przy wykorzystaniu ceramicznego modułu membranowego o zamkniętym obiegu wody. Suszenie rozpyłowe makrocząsteczkowego produktu końcowego.

Wykonany przeze mnie projekt technologiczny, został uzupełniony o plan HACCP. Projekt zapewnia otrzymanie 1 kg makrocząsteczkowego bioproduktu z 12 kg suchej biomasy, w ciągu 120 roboczogodzin. Ogólnie jego przebieg przedstawia Rys. 4.



Rys. 4. Uogólniony schemat procesowy technologii otrzymywania polifenolowo-polisacharydowych koniugatów roślinnych na skale półtechnicznej.

Dopracowanie procesu technologicznego, poprzez optymalizację pracy urządzeń i niektórych parametrów procesu może podnieść wydajność produktową i zmniejszyć czas produkcji, obniżając tym samym koszty wytworzenia roślinnego koniugatu. Łańcuch procesowy przewiduje wyeliminowanie większości rozpuszczalników organicznych i zastosowanie nowoczesnych metod, możliwych do zastosowania na skalę półtechniczną i techniczną. Zastosowanie ekstrakcji ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym, w początkowym etapie procesu umożliwiło wyeliminowanie większości etapów związanych z koniecznością użycia rozpuszczalników organicznych. Ultrafiltracja membranowa zapewniła sprawne oddzielenie makromolekuł od pozostałych składników roślinnego ekstraktu, przy oszczędności czasu i redukcji zużytej wody. Suszenie rozpyłowe, jako szybka i sprawna metoda usuwania rozpuszczalników, głównie wody, okazała się być bardzo przydatna. W rezultacie opracowanego procesu technologicznego określiłam jego silne i słabe strony. Wśród zalet należy wymienić:

- swobodny dostęp do surowca roślinnego i materiałów potrzebnych do przeprowadzenia procesów,
- możliwość wykorzystania w procesie nieopodatkowanego alkoholu etylowego, pod nadzorem Urzędu Celnego, co pozwala na znaczne obniżenie kosztów surowców,
- zastosowane urządzenia, które są ogólnie dostępne na rynku krajowym i zagranicznym, jako powszechnie stosowane w przemyśle, zajmującym się produkcją żywności oraz komponentów do kosmetyków i fitofarmaceutyków,
- zastosowanie procesu ekstrakcji w warunkach nadkrytycznych, które pozwoliło wyeliminować procesy wymagające użycia niebezpiecznych dla środowiska rozpuszczalników organicznych.

Do słabych stron opracowanej technologii należy zaliczyć:

- wydajność na poziomie około 8 % wag. suchej biomasy, co może stanowić barierę opłacalności dla potencjalnych producentów,
- wieloetapowość ciągu technologicznego, który, jak w tego typu rozwiązaniach, wymaga uwzględnienia dodatkowych procesów pośrednich (np. mycie, przebrojenia), wydłużających czas przeprowadzenia procedur, a co za tym idzie, podnoszących koszty całego przedsięwzięcia.

Opracowana przeze mnie technologia otrzymała srebrny medal w kategorii „Przemysł” na 11. Międzynarodowych Targach Wynalazków i Innowacji INTARG 2018 (200 wynalazków i 95 wystawców z 14 krajów świata), które odbyły się w Katowicach, w dniach 20-21.06.2018r. Technologia jest aktywnie promowana przez WCTT na rynku, np. na 3. Targach CosmeticBusiness Poland 2018 (280 wystawców), dedykowanych dostawcom produktów i usług dla przemysłu kosmetycznego i chemii gospodarstwa domowego, w Warszawie, w dniach 26-27.09.2018r.

Zamierzam w dalszym ciągu rozwijać prace nad tzw. „zielonymi” rozwiązaniami, zastosowanymi w opracowanym przeze mnie łańcuchu technologicznym, również w ramach prowadzonej współpracy międzynarodowej z Zakładem Chemii Słowackiej Akademii Nauk w Bratysławie, na Słowacji.

4.3.5. Podsumowanie

W ramach osiągnięcia habilitacyjnej zaproponowałam usprawniony ciąg procesowy otrzymywania polifenolowo-polisacharydowych koniugatów, o różnych walorach prozdrowotnych z surowców zielarskich, na przykładzie wybranych roślin leczniczych.

- I. Wykazałam, że sposób obróbki wstępnej biomasy, w celu wyodrębnienia z niej makrocząsteczkowych glikokoniugatów, z wybranych surowców zielarskich, wpływa na wydajność otrzymanych bioproduktów, ich charakter chemiczny oraz cechy użytkowe [**H1 - H10**].
- II. Wykazałam, że korzystne jest poddanie surowca działaniu środowiska o pH alkalicznym, uwzględniając prowadzenie tego procesu w wysokiej temperaturze, bez konieczności odtłuszczenia biomasy w pierwszym etapie [**H3, H4, H5, H6, H8, H9**]. Jest to uzasadnione ekonomicznie, zarówno pod względem bardziej korzystnej wydajności produktu końcowego, jak też możliwości skrócenia łańcucha procesowego, wyeliminowania niektórych rozpuszczalników organicznych, wpisując się w standardy BAT.
- III. Zademonstrowałam kolejne możliwości skrócenia łańcucha procesowego, przez wyeliminowanie kilku etapów – dotyczących ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz, przy użyciu chloroformu i jego mieszaniny z metanolem [**H7, H8, H9**]. Takie racjonalne podejście, nie tylko upraszcza schemat postępowania, ale też wiąże się ze zredukowaniem kosztów zużycia i utylizacji rozpuszczalników organicznych, a działania te wpisują się w ideę zrównoważonego rozwoju.
- IV. Wykazałam, że w szczególnych przypadkach, w których czystość bioproduktu końcowego istotnie determinuje jego cechy użytkowe, redukując lub eliminując wady izolatu, wydłużenie łańcucha procesowego i podniesienie kosztów wytworzenia bioproduktu może być uzasadnione [**H1, H2, H7, H9**].
- V. Zademonstrowałam możliwość przeprowadzenia ciągu procesowego otrzymywania glikokoniugatów w skali półtechnicznej, opracowując i weryfikując eksperymentalnie proces technologiczny, który w efekcie redukuje zużycie rozpuszczalników organicznych, ograniczając ich rodzaj do alkoholu etylowego.

Wyniki przedstawionych powyżej prac eksperymentalnych opublikowałam w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o zasięgu międzynarodowym oraz przedstawiłam na forum krajowym i międzynarodowym, w formie ustnych komunikatów konferencyjnych oraz posterów. Uważam, że rezultaty tych badań mają znaczący wkład w istniejący stan wiedzy na temat możliwości wykorzystywania surowców zielarskich do pozyskiwania nowych chemikaliów specjalistycznych o zadanych cechach użytkowych. Zaprezentowany dorobek naukowy powstał w efekcie pracochłonnych eksperymentów na materiałach roślinnych oraz wnikliwych analiz otrzymanych bioproduktów, w większości przeprowadzonych w Zakładzie Technologii Organicznej i Farmaceutycznej, na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

4.3.6. Bibliografia

- [1] P. Pollak, *Fine chemicals: the industry and the business*. John Willey & Sons Inc. 2007.
- [2] A. Lubbea, R. Verpoorte, Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 2011, 34, 785–801.
- [3] Dyrektywa Unii Europejskiej nr 96/61/WE z 24 września 1996 r. w sprawie zintegrowanego zapobiegania i zmniejszania zanieczyszczeń.
- [4] Dokument Referencyjny (BREF) dla najlepszych dostępnych technik dotyczących Produkcji Związków Organicznych Głęboko Przetworzonych (OFC). 08.2006.
- [5] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/75/UE z dnia 24 listopada 2010 r. w sprawie emisji przemysłowych (zintegrowane zapobieganie zanieczyszczeniom i ich kontrola).
- [6] Global Herbal Medicine Market Information, (<https://www.marketresearchfuture.com/reports/herbal-medicine-market-3250>), (dostęp 01. 2019).
- [7] World Health Organization, *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, WHO, Geneva, Switzerland, 1998.
- [8] M.E. Heras-Ramirez, A. Quintero-Ramos, A.A. Camacho-Davila, J. Barnard, R. Talamas-Abbud, J.V. Torres-Munoz and E. Salas-Muñoz, Effect of Blanching and Drying Temperature on Polyphenolic Compound Stability and Antioxidant Capacity of Apple Pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 2012, 5, 2201–2210.
- [9] C.M.G.C. Renard, A.A. Watrelot, C. Le Bourvellec, Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 60, 43–51.
- [10] V. Lavelli and S. Corti, Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: Stability evaluation upon dehydration and storage of dried product. *Food Chemistry*, 2011, 129, 1578–1583.
- [11] C. Le Bourvellec, S. Guyot, C.M.G.C. Renard, Interactions between polyphenols and cell-walls: Modification of polysaccharide extractability. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 75, 251–261.
- [12] J. Wiboonsirikul, S. Hata, T. Tsuno, Y. Kimura and S. Adachi, Production of functional substances from black rice bran by its treatment in subcritical water. *LWT - Food Science and Technology*, 2007, 40, 1732–1740.
- [13] Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów
- [14] S. Ahuja, *Handbook of Bioseparations*, Academic Press, San Diego, 2000.
- [15] G. Hanrahan and K. Lu, Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. *Critical Review in Analytical Chemistry*, 2006, 36, 141–151.
- [16] K. Keller, T. Friedmann, A. Boxman, The bioseparation needs tomorrow. *Trends in Biotechnology*, 2001, 19, 438–441.
- [17] K. Strebhardt, A. Ullrich, Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8, 473–480.
- [18] P. Gotwals, S. Cameron, D. Cipolletta, V. Cremasco, A. Crystal, B. Hewes, B. Mueller, S. Quaratino, C. Sabatos-Peyton, L. Petruzzelli, J.A. Engelman, G. Dranoff, Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nature Review Cancer*, 2017, 17, 286–301.
- [19] S. Frantz, Drug discovery playing dirty. *Nature*, 2005, 437, 942–943.
- [20] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural Products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 2016, 79, 629–661.
- [21] K. Joshi, A. Hankey, B. Patwardhan, Traditional phytochemistry: identification of drug by 'Taste'. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2007, 4, 145–148.
- [22] Dyrektywa 2010/84/UE z dnia 15 grudnia 2010 r. zmieniająca – w zakresie nadzoru nad bezpieczeństwem farmakoterapii – dyrektywę 2001/83/WE w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi (Dz. Urz. UE L 348 31.12.2010, str. 74).
- [23] P. Imming, C. Sinning, A. Meyer, Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Drug Discovery*, 2006, 5, 821–34.
- [24] H. Wagner, Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*, 2011, 82, 34–37.
- [25] K. Ahn, The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. *BMB Reports*, 2017, 50, 111–116.

- [26] P. Albersheim, A. Darvill, K. Roberts, R. Sederhoff, A. Staehelin, Plant cell walls. From chemistry to biology. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, NY, USA, 2011.
- [27] N.C. Carpita, D.M. Gibeaut, Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 1993, 3, 1-30.
- [28] J. Liu, R. Bai, Y. Liu, X. Zhang, J. Kan, C. Jin, Isolation, structural characterization and bioactivities of naturally occurring polysaccharide–polyphenolic conjugates from medicinal plants—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107, 2242–2250.
- [29] S. S. Choo, M. L. Dreher, Handbook of dietary fiber. Marcel Dekker, NY, USA, 2001.
- [30] X. Ji, Q. Peng, M. Wang, Anti-colon-cancer effects of polysaccharides: A mini-review of the mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114, 1127-1133.
- [31] Y. Zhang, D. Sun, Q. Meng, W. Guo, Q. Chen, Y. Zhang, *Grifola frondosa* polysaccharides induce breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial-dependent apoptotic pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 40, 1089–1095.
- [32] Y. Zheng, L. Bai, Y. Zhou, R. Tong, M. Zeng, X. Li, J. Shi, Polysaccharides from Chinese herbal medicine for anti-diabetes recent advances. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121, 1240-1253.
- [33] P. Gunness, M.J. Gidley, Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food Function*, 2010, 1, 149-155.
- [34] K.K.T. Goh, N.D. Pinder, C.E. Hall, Y. Hemar, Rheological and light scattering properties of flaxseed polysaccharide aqueous solutions. *Biomacromolecules*, 2006, 7, 3098–3103.
- [35] A.O. Tzianabos, Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13, 523–533.
- [36] S. Kohlmüntzer, Farmakognozja. PZWL, 2013.
- [37] A. Ożarowski, Ziołolecznictwo, poradnik dla lekarzy. PZWL, 1980.
- [38] M. F. Chaplin, J. F. Kennedy, Carbohydrate Analysis, A practical approach. 2nd Ed. IRL Press, Oxford University Press, Oxford, 1994.
- [39] G. Bartosz, Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2006.
- [40] L. He, X. Yan, J. Liang, S. Li, H. He, Q. Xiong, X. Lai, S. Hou, S. Huang, Comparison of different extraction methods for polysaccharides from *Dendrobium officinale* stem. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 198, 101-108.
- [41] S.E. Broxterman, H.A. Schols, Interactions between pectin and cellulose in primary plant cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 192, 263-272.
- [42] J.M. Rigelsky, B.V. Sweet, Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses, *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2002, 59, 417–422.
- [43] United Nations, Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>, (dostęp 01.2019).
- [44] J. Giacometti, D. Bursać-Kovačević, P. Putnik, D. Gabrić, T. Bilušić, G. Krešić, V. Stulić, F.J. Barba, F. Chemat, G. Barbosa-Cánovas, A.R. Jamburak, Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, 2018, 113, 245–262.
- [45] F. Chemat, N. Rombaut, A. Meullemiestre, M. Turk, S. Perino, A.-S. Fabiano-Tixier, M. Abert-Vian, Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2017, 41, 357–377.
- [46] G. Paggiola, S.V. Stempvoort, J. Bustamante, J.M.V. Barbero, A.J. Hunt, J.H. Clark, Can bio-based chemicals meet demand? Global and regional case-study around citrus waste-derived limonene as a solvent for cleaning applications. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, 2016, 10, 686–698.
- [47] A.-G. Sicaire, M. A. Vian, F. Fine, P. Carré, S. Tostain and F. Chemat, Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds. *Ultrasonic Sonochemistry*, 2016, 31, 319–329.
- [48] J. Xie, S. Murugesan, R.J. Linhardt, Chapter 10 - Physiological, Pathophysiological and Therapeutic Roles of Heparin and Heparan Sulfate, *Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications*, Elsevier Ltd., 2008, 227-251.
- [49] Z. Tunalier, M. Koşar, E. Küpeli, İ. Çaliş, K.H.C. Başer, Antioxidant, anti-inflammatory, anti-nociceptive activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 110, 539-547.
- [50] H. Wagner, Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals, *Fitoterapia*, 2011, 82, 34-37.
- [51] Oficjalna strona Wrocławskiego Parku Technologicznego S. A., <https://www.technologpark.pl/oferta/zaklad-doswiadczalny> (dostęp 02.2019).

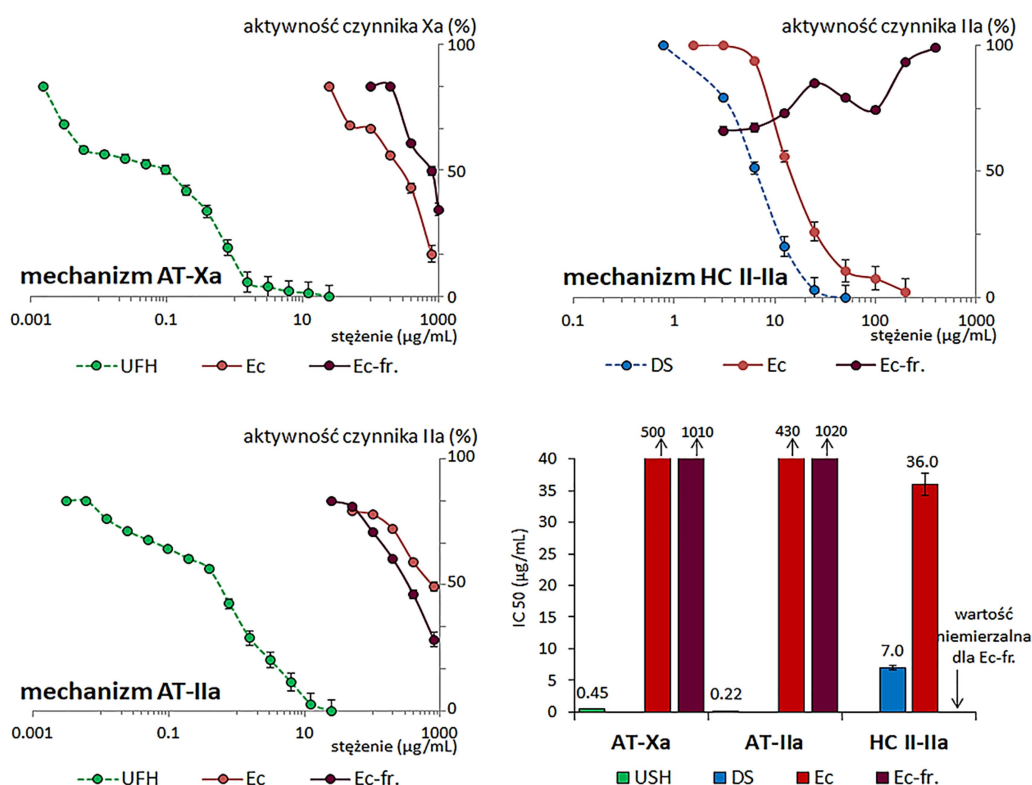
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Badania prowadzone przeze mnie ramach pracy magisterskiej pt.: „Identyfikacja substancji zawartej w *Erigeron canadensis* L., zmniejszającej krzepliwość krwi ludzkiej”, którą wykonałam pod opieką naukową prof. dr hab. inż. Romana Gancarza i obroniłam w 2000r., stały się przesłanką do podjęcia przeze mnie studiów doktoranckich (2001-2006). Moja aktywność naukowa koncentrowała się na wyodrębnieniu z różnych części przymiotna kanadyjskiego ekstraktów i ich składników o potencjale antykoagulacyjnym, ocenionym *in vitro* oraz *in vivo* [A2, A3, A7, A9, B30]. Zidentyfikowałam substancje stanowiące składniki odpowiedzialne za hamowanie procesu krzepnięcia jako makrocząsteczki polisacharydowo-polifenolowe. Poszukiwałam też innych zastosowań dla substancji wyodrębnionych z przymiotna kanadyjskiego, jak przeciwgrzybowe [A4] oraz wpływające stabilizująco na błonę komórkową erytrocytów [A12]. Przymiotno kanadyjskie jest wykorzystywane do produkcji wyciągu, który stanowi komponent leku roślinnego o nazwie Hemorigen, produkowanego w formie tabletek przez Herbapol Wrocław S. A. oraz w postaci nalewki, przez Phytopharm Klęka S. A., a działającego, jako środek pro-koagulacyjny, stosowany w problemach nadmiernych krwawień menstruacyjnych oraz pochodzenia hemoroidalnego. W swoich badaniach dowiedziałam, że wyciąg z tej rośliny leczniczej posiada także składniki, które działają w przeciwny sposób. Wskazałam, że za oba działania, które są w stosunku do siebie antagonistyczne, odpowiadają inne grupy substancji. W swojej pracy badawczej skupiłam się też na poszukiwaniach innych roślin leczniczych, z których ekstrakty miałyby podobne zdolności hamowania procesu osocznego krzepnięcia krwi [A3,A9]. Brałam też udział w pracach badawczych, kierowanych przez prof. dr hab. inż. Romana Gancarza, dotyczących badania wpływu kwasów alfa-aminoalkanofosfonowych i ich pochodnych na stabilność błon erytrocytów [A1], jak też skupionych na poszukiwaniu roślinnych inhibitorów bakteryjnych, użytecznych w zwalczaniu choroby jamy ustnej – halitozy [A11].

W lipcu 2006r. na Wydziale Nauk o Żywieniu (obecnie Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności), w Akademii Rolniczej we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) obroniłam z wyróżnieniem rozprawę doktorską pt. „Izolowanie i określanie struktury substancji hamujących krzepliwość krwi ludzkiej z Przymiotna kanadyjskiego (*Erigeron canadensis* L.)”, której promotorem był Prof. dr hab. inż. Roman Gancarz. Praca uzyskała Nagrodę Rektora Politechniki Wrocławskiej. Znaczne poszerzenie mojej wiedzy teoretycznej na temat substancji o właściwościach antykoagulacyjnych, które od lat 30-tych XX w. znajdują zastosowanie w medycynie, umożliwiło mi udział w stworzeniu 1 artykułu przeglądowego w recenzowanych materiałach konferencyjnych oraz 2 rozdziałów w książce pt. Wykłady z patofizjologii.

Po doktoracie kontynuowałam prace badawcze nad antykoagulantami z przymiotna kanadyjskiego, które są przedmiotem publikacji [B1, B4, B6, B27], rozdziału w książce [B20] oraz wynalazków, które uzyskały ochronę patentową [B30, B31, B32] i jednego zgłoszenia patentowego [B35]. Równocześnie skierowałam moje własne badania naukowe na inne surowce roślinne stanowiące źródło glikokoniugatów o

zdolności do hamowania procesów krzepnięcia krwi. Rezultatem tego były 2 patenty [B31, B33] oraz publikacje [B2, B17, B22, B23, B24, B25]. Prowadziłam także prace badawcze nad koniugatami polifenolowo-polisacharydowymi w szerszym zakresie, niż przedstawiony przeze mnie jako osiągnięcie habilitacyjne. Badania, dotyczące głównie aspektów biologicznych w obszarze ogólnie rozumianego wpływu tych bioproduktów na układ krwionośny człowieka, mogłam pogłębiać dzięki zaproszeniu do udziału projekcie PO IG (2008-2015) WroVasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo Naczyniowej, który był kierowany przez prof. dr hab. Wojciecha Witkiewicza, specjalistę z zakresu kardiochirurgii, pioniera robotyki w polskiej chirurgii, a przede wszystkim dyrektora Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu, Ośrodka Badawczo-Rozwojowego. Jako główny badacz w jednym z zadań projektu WroVasc, pt. „Antykoagulanty pochodzenia roślinnego z perspektywą wykorzystania w profilaktyce i leczeniu zakrzepic. Przeciwwagregacyjne właściwości preparatów roślinnych. Badania nad oddziaływaniem z receptorami błon płytek krwi.,” którego kierownikiem był prof. dr hab. inż. Roman Gancarz, rozwijałam swoją wiedzę i umiejętności także na płaszczyźnie biologii medycznej i biochemii. Na podstawie literatury naukowej (Yoon et al., *Thromb. Res.* 106 (2002) 51-58; Abildgaard & Larsen, *Thromb. Res.* 35 (1984) 257-266) zaadoptowałam metody badania oddziaływań roślinnych antykoagulantów z wybranymi enzymami kaskady krzepnięcia krwi i ich mieszaninami w układzie dynamicznym, do warunków pomiarowych, które stały się możliwe do wykonania przy użyciu czytnika mikropłytek (Rys. 5).



Rys. 5. Enzymatyczne mechanizmy aktywności antykoagulacyjnej bioproduktu z przymiotna kanadyjskiego (Ec) oraz jego najlepszej frakcji (Ec-fr.), przedstawione w formie wykresów zależności od stężenia oraz w formie wartości IC₅₀ [B6].

Dało to możliwość śledzenia kinetyki zachodzących oddziaływań i porównania mechanizmów działania badanych przeze mnie bioproduktów i ich frakcji z antykoagulantami powszechnie stosowanymi w leczeniu [B6, B17].

Dzięki udziałowi w projekcie WroVasc mogłam podjąć współpracę naukową ze specjalistami z różnych dziedzin nauki. W efekcie kontaktów naukowych z zespołem badawczym z Katedry Biochemii Ogólnej, Uniwersytetu Łódzkiego wspólnie rozwinięta została tematyka, dotycząca właściwości przeciwplatekcyjnych otrzymywanych przeze mnie bioproduktów [B3,B8], zapoczątkowana przeze mnie w pracy dotyczącej bioproduktu z przymiotna kanadyjskiego [B6]. Prowadzone były także wspólne prace dotyczące ich właściwości przeciwutleniających wobec różnych elementów krwi, mających fizjologiczne znaczenie w układzie krążenia [B3,B11]. Współpraca naukowa z badaczami z tej jednostki rozwinęła się wychodząc poza ramy projektu WroVasc i skupiła się na dodatkowych cechach użytkowych wyodrębnianych przeze mnie makromolekuł, wynikających z ich właściwości antyoksydacyjnych, a dotyczących aktywności ich promieniochronnej, przeciwko promieniowaniu gamma. Rezultat tych prac, z uwagi na interesujący potencjał wdrożeniowy, został w pierwszej kolejności zabezpieczony w formie zgłoszenia patentowego [B34], a następnie upowszechniony w pracach o zasięgu międzynarodowym [B12,B15,B16,B21].

W 2009r. jako laureatka Narodowego Programu Stypendialnego Republiki Słowacji, odbywając staż doktorski w Instytucie Chemii Słowackiej Akademii Nauk w Bratysławie, na Słowacji, podjęłam trwającą do chwili obecnej współpracę międzynarodową z zespołem badaczy z Centrum Glikomiki. Oprócz prac powstałych w ramach tej współpracy, które stanowią osiągnięcie habilitacyjne, wspólnie z badaczami z Instytutu Chemii oraz z naukowcami z Zakładu Farmakologii, na Wydziale Medycznym Jesseniusa w Martin, Uniwersytetu Komeniusa na Słowacji, prowadzimy dalsze badania dotyczące właściwości przeciwwykrztuśnych i przeciwastmatycznych otrzymanych przeze mnie glikokoniugatów [B7,B10].

Zdobytą wiedzę oraz wypracowane umiejętności w zakresie analizy strukturalnej elementów polisacharydowych ścian komórkowych starałam się wykorzystać w innych tematach badawczych. Wzięłam udział w pracach nad oceną przydatności fizykochemicznego procesu obróbki biomasy roślinnej na drodze wybuchu pary wodnej (ang. *steam explosion*). Metoda ta polega na poddaniu surowca roślinnego działaniu sprężonej gorącej pary wodnej, a następnie na jej dekompresji, w celu degradacji obecnej w ścianach komórkowych hemicelulozy i transformacji ligniny, tym samym zwiększając potencjał hydrolizy celulozy. W pracy [B13] degradacji parą wodną poddana została słoma ściółkowa, użyta następnie do produkcji biogazu. Wykonałam analizy HPGPC oraz FT-IR dla wstępnie przetworzonej biomasy, w porównaniu z surowcem, który nie został poddany działaniu pary wodnej. W efekcie tego określiłam sprawność użytego procesu degradacyjnego, który okazał się być przydatny w celu zwiększenia wydajności produkowanego biogazu. Wzięłam też udział w badaniach, dotyczących oceny zdolności mikroorganizmów grzybowych do wytwarzania nanocząstek złota [B14]. Wykorzystując technikę FT-IR wskazałam na zmiany strukturalne, jakie zachodzą w bogatych w glukozaminę polisacharydach w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej pod

wpływem formujących się nanocząstek tego metalu. Oba doświadczenia badawcze były dla mnie bardzo stymulujące, wskazując mi nowe obszary nauki, w których mogłabym wykorzystać zgromadzoną wiedzę.

W przyszłości planuję pogłębiać wiedzę w zakresie komponentów ścian komórkowych roślin, jako surowców do wytwarzania bioproduktów, które wykazują aktywność biologiczną, przydatną w leczeniu i profilaktyce niezakaźnych chorób cywilizacyjnych (ang. *noncommunicable diseases*, NCDs), stanowiących największą przyczynę zgonów na świecie. Są to cztery główne grupy schorzeń: choroby układu krwionośnego, przewlekłe choroby układu oddechowego, choroby nowotworowe oraz cukrzyca (Raport WHO pt. „*The Global Status Report on Noncommunicable Diseases*”, 2010). W celu otrzymania bioproduktów o potencjale prozdrowotnym, przydatnym w leczeniu i profilaktyce powikłań w układzie krwionośnym oraz przewlekłych schorzeń układu oddechowego, zamierzam wykorzystać nowoczesne metody z obszaru zielonej chemii, jak ekstrakcja z zastosowaniem ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym czy techniki filtracyjne z zastosowaniem membran. Stosując metody matematyczne planowania i optymalizacji eksperymentów, jak metodologia analizy powierzchni odpowiedzi (RSM), wykorzystująca różne typy planów eksperymentów (ang. *design of experiment*), w celu stworzenia modelu zmiennych niezależnych planowanego procesu, będę w stanie skuteczniej prowadzić obserwacje odpowiedzi układu na zadane parametry, w celu doboru optymalnych warunków procesowych.

5.1. Prace nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

Publikacje w czasopismach z bazy JCR (2):

[A1] Kiersnowska, A. Dziamska, I. **Pawlaczyk**, K. Bielecki, H. Kleszczyńska, R. Gancarz, J. Sarapuk, The membrane-disrupting activity of alfa-aminoalkanephosphonic acids and their derivatives. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **2001**, 6, 291-297.
IF₂₀₀₁=0,857 (pkt. MNiSW=15)

[A2] Olas, J. Saluk-Juszczak, I. **Pawlaczyk**, P. Nowak, J. Kołodziejczyk, R. Gancarz, B. Wachowicz, Antioxidant and anti-aggregatory effects of an extract from *Conyza canadensis* on blood platelets *in vitro*. *Platelets*, **2006**, 17, 354-360.
IF₂₀₀₆=1,679 (pkt. MNiSW=20)

Sumaryczny *Impact Factor*, zgodny z rokiem opublikowania, przed uzyskaniem stopnia doktora wyniósł Σ IF = **2,536**, natomiast Σ MNiSW = **35**.

Publikacje w czasopismach spoza bazy JCR (1):

[A3] I. **Pawlaczyk**, L. Czerchawski, R. Gancarz, Extracts from selected plants with anticoagulant activity on human blood plasma. *Herba Polonica*, **2003**, 49, 298-299.
(pkt. MNiSW=14)

Rozdziały w książkach (4):

- [A4] **I. Pawlaczyk**, I. Maliszewska, R. Gancarz, Antifungal activity of water extracts of *Conyza canadensis* L. W: New agrochemicals and their safe use for health and environment, red. H. Górecki, Z. Dobrzański, P. Kafarski, Prague, Brussels, Czech-Pol Trade, cop., **2004**, 114-118. ISBN: 80-239-3289-6.
- [A5] **I. Pawlaczyk**, L. Czerchawski, R. Gancarz, Polisacharydowe antykoagulanty syntetyczne oraz naturalne - pochodzenia bakteryjnego i roślinnego. W: Wykłady z patofizjologii, red. W. Pilecki, M. Sobieszcańska. T. 1, Wrocław, Górnicki Wydawnictwo Medyczne, **2006**, 175-183.
- [A6] L. Czerchawski, **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, Antykoagulanty pochodzenia zwierzęcego. W: Wykłady z patofizjologii, red. W. Pilecki, M. Sobieszcańska. T. 1, Wrocław, Górnicki Wydawnictwo Medyczne, **2006**, 161-174.
- [A7] **I. Pawlaczyk**, G. Poźniak, L. Czerchawski, R. Gancarz, Anticoagulant activity of *Conyza Canadensis* (L.) filtrates separated through polysulfone membranes. W: Chemistry and biochemistry in the agricultural production, environment protection, human and animal health, wyd. H. Górecki, Z. Dobrzański, P. Kafarski. Prague, Brussels, Czech-Pol Trade, cop., **2006**, 231-239. ISBN: 80-239-7759-8.

Pełnotekstowe artykuły w recenzowanych materiałach konferencyjnych (5):

- [A8] **I. Pawlaczyk**, L. Czerchawski, R. Gancarz, Heparyny i heparynoidy pochodzenia roślinnego. W: I Sympozjum Centrum Biomonitoringu, Biotechnologii i Ochrony Ekosystemów Dolnego Śląska, red. H. Górecki. Oficyna Wydawnicza PWr., **2001**, 105-110. ISBN: 83-7085-599-7
- [A9] **I. Pawlaczyk**, L. Czerchawski, R. Gancarz, Aktywność antykoagulacyjna pochodnych cukrowych, izolowanych z wybranych roślin ekosystemu Dolnego Śląska. W: II Sympozjum Centrum Biomonitoringu, Biotechnologii i Ochrony Ekosystemów Dolnego Śląska, red. Z. Dobrzański. Wrocław, Oficyna Wydawnicza PWr., **2002**, 67-75. ISBN: 83-7085-674-8
- [A10] **I. Pawlaczyk**, H. Kleszczyńska, D. Bonarska, L. Czerchawski, R. Gancarz, Natural oligosaccharides with anticoagulant activity and their interactions with model biological membranes. W: Surfactants and dispersed systems in theory and practice. SURUZ 2003, red. K.A. Wilk., Oficyna Wydawnicza PWr., **2003**, 333-336. ISBN: 83-7085-701-9.
- [A11] A. Frąckowiak, I. Maliszewska, **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, K.A. Wilk, The influence of the selected natural products on growth of halitogenic bacteria. W: Surfactants and dispersed systems in theory and practice. SURUZ 2005, red. K.A. Wilk, EDU Agencja Public Relations, **2005**, 367-369. ISBN: 83-920032-3-3.
- [A12] **I. Pawlaczyk**, T. Woźniak, H. Kleszczyńska, R. Gancarz, K.A. Wilk, The influence of polysaccharide fraction isolated from *Conyza canadensis* on erythrocyte membranes. W: Surfactants and dispersed systems in theory and practice. SURUZ 2005, red. K.A. Wilk, Wrocław: EDU Agencja Public Relations, **2005**, 359-362. ISBN: 83-920032-3-3.

5.2. Prace nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora

Publikacje w czasopismach z bazy JCR (17):

- [B1] J. Saluk-Juszczak, B. Olas, **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, B. Wachowicz, Effects of the extract from *Conyza canadensis* on human blood platelet aggregation. *General Physiology and Biophysics*, **2007**, 26, 150-152.
IF₂₀₀₇=1,286 (pkt. MNiSW=20)
- [B2] **I. Pawlaczyk**, L. Czerchawski, W. Pilecki, E. Lamer-Zarawska, R. Gancarz, Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected medicinal plants of Asteraceae and Rosaceae families: chemical characterization and blood anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers*, **2009**, 77, 568-575.
IF₂₀₀₉=3,167 (pkt. MNiSW=32)
- [B3] J. Saluk-Juszczak, **I. Pawlaczyk**, B. Olas, J. Kołodziejczyk, M. Ponczek, P. Nowak, M. Tsirigotis-Wołoszczak, B. Wachowicz, R. Gancarz, The effect of polyphenolic-polysaccharide conjugates from selected medicinal plants of Asteraceae family on the peroxynitrite-induced changes in blood platelet proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2010**, 47, 700-705.
IF₂₀₁₀=2,502 (pkt. MNiSW=20)
- [B4] J. Saluk-Juszczak, B. Olas, P. Nowak, B. Wachowicz, E. Bald, R. Głowacki, **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, Extract from *Conyza canadensis* as a modulator of plasma protein oxidation induced by peroxynitrite *in vitro*. *Central European Journal of Biology*, **2010**, 5, 800-807.
IF₂₀₁₀=0,685 (pkt. MNiSW=20)
- [B5] J. Saluk-Juszczak, J. Kołodziejczyk, M. Tsirigotis-Wołoszczak, **I. Pawlaczyk**, B. Wachowicz, R. Gancarz: *Agrimonia* - biological activity and perspectives for medicinal application. Pt. 1. *Przegląd Menopauzalny*, **2011**, 15, 415-418.
IF₂₀₁₁=0,190 (pkt. MNiSW=13)
- [B6] **I. Pawlaczyk**, L. Czerchawski, W. Kuliczkowski, B. Karolko, W. Pilecki, W. Witkiewicz, R. Gancarz, Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. *Thrombosis Research*, **2011**, 127, 328-340.
IF₂₀₁₁=2,440 (pkt. MNiSW=27)
- [B7] M. Šutovská, P. Capek, S. Fraňová, **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, Antitussive and bronchodilatory effects of *Lythrum salicaria* polysaccharide-polyphenolic conjugate. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2012**, 51, 794-799.
IF₂₀₁₂=2,596 (pkt. MNiSW=25)
- [B8] M. Bijak, J. Saluk-Juszczak, M. Tsirigotis-Maniecka, H. Komorowska, B. Wachowicz, E. Zaczyńska, A. Czarny, F. Czechowski, P. Nowak, **I. Pawlaczyk**, The influence of conjugates isolated from *Matricaria chamomilla* L. on platelets activity and cytotoxicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2013**, 61, 218-229.
IF₂₀₁₃=3,096 (pkt. MNiSW=20)
- [B9] M. Bijak, R. Ziewiecki, J. Saluk-Juszczak, M. Ponczek, **I. Pawlaczyk**, H. Krotkiewski, B. Wachowicz, P.A. Nowak, Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Medicinal Chemistry Research*, **2014**, 23, 2324-2337.
IF₂₀₁₄=1,402 (pkt. MNiSW=10)

- [B10] P. Capek, M. Šutowska, M. Kocmálová, S. Fraňová, **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, Chemical and pharmacological profiles of *Echinacea* complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2015**, 79, 388-391.
IF₂₀₁₅=3,138 (pkt. MNiSW=25)
- [B11] J. Kołodziejczyk-Czepas, M. Bijak, J. Saluk-Juszczak, M. Ponczek, H.M. Żbikowska, P. Nowak, M. Tsirogotis-Maniecka, **I. Pawlaczyk**, Radical scavenging and antioxidant effects of *Matricaria chamomilla* polyphenolic-polysaccharide conjugates. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2015**, 72, 1152-1158.
IF₂₀₁₅=3,138 (pkt. MNiSW=25)
- [B12] H.M. Żbikowska, M. Szejka, J. Saluk-Juszczak, **I. Pawlaczyk-Graja**, R. Gancarz, A.K. Olejnik, Polyphenolic-polysaccharide conjugates from plants of Rosaceae/Asteraceae family as potential radioprotectors. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2016**, 86, 329-337.
IF₂₀₁₆=3,671 (pkt. MNiSW=35)
- [B13] M. Gaworski, S.J. Jabłoński, **I. Pawlaczyk-Graja**, R. Ziewiecki, P. Rutkowski, A. Wieczyńska, R. Gancarz, M. Łukaszewicz, Enhancing biogas plant production using pig manure and corn silage by adding wheat straw processed with liquid hot water and steam explosion. *Biotechnology for Biofuels*, **2017**, 10, 1-13.
IF₂₀₁₇=5,497 (pkt. MNiSW=45)
- [B14] I. Maliszewska, W. Tylus, J. Chęćmanowski, B. Szczygieł, **I. Pawlaczyk-Graja**, W. Pusz, A. Baturó-Cieśniewska, Biomineralization of gold by *Mucor plumbeus*: the progress in understanding the mechanism of nanoparticles' formation. *Biotechnology Progress*, **2017**, 33, 1381-1392.
IF₂₀₁₇=1,947 (pkt. MNiSW=30)
- [B15] M. Szejka, T. Popławski, A. Czubatka-Bienkowska, A.K. Olejnik, **I. Pawlaczyk-Graja**, R. Gancarz, H. Żbikowska, A comparative study on the radioprotective potential of the polyphenolic glycoconjugates from medicinal plants of Rosaceae and Asteraceae families versus their aglycones. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, **2017**, 171, 50-57.
IF₂₀₁₇=3,165 (pkt. MNiSW=30)
- [B16] M. Szejka, T. Popławski, J. Sarnik, **I. Pawlaczyk-Graja**, F. Czechowski, A.K. Olejnik, R. Gancarz, H. Żbikowska, Polyphenolic glycoconjugates from medical plants of Rosaceae/Asteraceae family protect human lymphocytes against γ -radiation-induced damage. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2017**, 94, 585-593.
IF₂₀₁₇=3,909 (pkt. MNiSW=35)
- [B17] M. Tsirogotis-Maniecka, **I. Pawlaczyk-Graja**, R. Ziewiecki, S. Balicki, M. Matulová, P. Capek, F. Czechowski, R. Gancarz, The polyphenolic-polysaccharide complex of *Agrimonia eupatoria* L. as an indirect thrombin inhibitor - isolation and chemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2019**, 125, 124-132.
IF₂₀₁₇=3,909 (pkt. MNiSW=35)

Sumaryczny *Impact Factor*, zgodny z rokiem opublikowania, po uzyskaniu stopnia doktora, na podstawie prac spoza cyklu, stanowiącego osiągnięcie habilitacyjne, wyniósł **Σ IF = 45,738**, natomiast **Σ MNiSW = 447**.

Publikacje w czasopismach spoza bazy JCR (2):

- [B18] **I. Pawlaczyk**, M. Tsirigotis-Maniecka, L. Czerchawski, W. Pilecki, J. Saluk-Juszczak, B. Wachowicz, D. Bonarska-Kujawa, K. Pyrkosz-Biardzka, H. Kleszczyńska, W. Kuliczkowski, W. Witkiewicz, R. Gancarz, Antykoagulanty pochodzenia roślinnego z perspektywą wykorzystania w leczeniu zakrzepic. *Przegląd Lekarski*, **2013**, 3, 157-161.
(pkt. MNiSW=6)
- [B19] **I. Pawlaczyk**, R. Ziewiecki, L. Czerchawski, H. Krotkiewski, R. Gancarz, Biosensory jako narzędzie do wykorzystania w badaniach krwi oraz wybranych białek krwi. *Przegląd Lekarski*, **2013**, 3, 131-134.
(pkt. MNiSW=6)

Rozdziały w książkach (2):

- [B20] **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, Biological properties of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. W: Drug Plants II, red. A.S. Awaad, V.K. Singh, J.N. Govil, Houston, Texas, USA, Studium Press LLC, **2010**, 483-490. ISBN: 1-933699-18-3.
- [B21] J. Kołodziejczyk-Czepas, M. Lewik-Tsirigotis, J. Saluk-Juszczak, **I. Pawlaczyk**, M. Bijak, B. Wachowicz, R. Gancarz, Agrimonia - antioxidative effects and perspectives for medicinal application. W: Recent progress in medicinal plants. Vol. 34, Phytoconstituents and physiological processes, red. J.N. Govil, G. Kaushik, N. Rai. USA, Studium Press LLC, **2012**, 21-33. ISBN: 978-1-933699-24-0.

Pełnotekstowe artykuły w recenzowanych materiałach konferencyjnych (6):

- [B22] M. Tsirigotis-Wołoszczak, **I. Pawlaczyk**, W. Pilecki, L. Czerchawski, R. Gancarz, Polyphenolic-polysaccharide conjugates with anticoagulant activity from *Agrimonia eupatoria* (L.): chemical characterization of the compounds separated with anion exchange chromatography. W: Proceedings of the 6th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, red. R. Řápková, J. Čopíková, E. Šárka, Prague, Czech Chemical Society, cop., **2010**, 164-168. ISBN: 978-80-86238-78-4.
- [B23] **I. Pawlaczyk**, O. Lisowska, M. Lewik-Tsirigotis, J. Turjan, P. Capek, R. Gancarz, Isolation process of polyphenolic glycoconjugates from *Fragaria vesca* (L.) with the anticoagulant activity on human blood plasma. W: Proceedings of the 7th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, red. R. Řápková, J. Čopíková, E. Šárka, Prague, Czech Chemical Society, cop., **2011**, 191-195. ISBN: 978-80-86238-90-6.
- [B24] **I. Pawlaczyk**, A. Wieczyńska, P. Capek, M. Lewik-Tsirigotis, R. Ziewiecki, R. Gancarz, Anticoagulant activity of the polysaccharide-polyphenolic conjugate from *S. officinalis* L. W: Proceedings of the 8th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, red. R. Řápková, J. Čopíková, E. Šárka, Prague, Czech Chemical Society, cop., **2012**, 23-27. ISBN: 978-80-86238-28-9.
- [B25] R. Ziewiecki, M. Tsirigotis-Maniecka, A. Wieczyńska, K. Gurbała, **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, Anticoagulant activity of the polysaccharide-polyphenolic conjugates isolated from *F. ulmaria* (L.) Maxim. W: Proceedings of the 9th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, red. R. Řápková, J. Čopíková, E. Šárka, Prague, Czech Chemical Society, cop., **2013**, 68-72. ISBN: 978-80-86238-58-6.
- [B26] A. Wieczyńska, M. Tsirigotis-Maniecka, R. Ziewiecki, K. Gurbała, **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, Separation of polyphenolic glycoconjugates isolated from *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

by size exclusion chromatography. W: Proceedings of the 9th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, red. R. Řápková, J. Čopíková, E. Šárka, Prague, Czech Chemical Society, cop., **2013**, 64-67. ISBN: 978-80-86238-58-6.

[B27] S.J. Balicki, R. Gancarz, **I. Pawlaczyk-Graja**, The influence of ultrasounds assisted extraction parameters on the acid polysaccharides content in the alkaline extracts of *Erigeron canadensis* L. - a preliminary study. W: Proceedings of the 9th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, red. R. Řápková, J. Čopíková, E. Šárka, Prague, Czech Chemical Society, cop., **2016**, 20-23. ISBN: 978-80-86238-59-3.

Skrypty (2):

[B28] **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, Chemia organiczna: chemia leków: laboratorium: analiza substancji organicznych. Wrocław: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, **2009**. ISBN: 978-83-7493-466-4.

[B29] **I. Pawlaczyk**, Roman Gancarz, Synthetic organic drugs laboratory: drug analysis. Wrocław University of Technology, PRINTPAP, **2011**. ISBN: 978-83-62098-45-3.

Patenty (4):

[B30] **I. Pawlaczyk**, R. Gancarz, L. Czerchawski, Z. Kawala, opubl. **31.07.2008**. Tytuł: „Sposób wytwarzania preparatu hamującego krzepliwość krwi.” Patent nr PL 198837, zakres terytorialny Polska, zgłosz. nr P 351697 z 14.01.2002.

[B31] R. Gancarz, **I. Pawlaczyk**, L. Czerchawski, opubl. **31.05.2012**. Tytuł: „Sposób wytwarzania środka hamującego krzepliwość krwi.” Patent nr PL 211520, zakres terytorialny Polska, zgłosz. nr P 380474 z 21.08.2006.

[B32] R. Gancarz, **I. Pawlaczyk**, L. Czerchawski, opubl. **31.07.2017**. Tytuł: „Środek leczniczy do profilaktyki i leczenia powikłań zakrzepowych.” Patent nr PL 226269, zakres terytorialny Polska, zgłosz. nr P 392257 z 27.08.2010.

[B33] **I. Pawlaczyk-Graja**, M. Tsirigotis-Maniecka, opubl. **31.10.2018**. Tytuł: „Sposób wytwarzania środka przeciwzakrzepowego, środek przeciwzakrzepowy oraz jego zastosowanie.” Patent nr PL 230337, zakres terytorialny Polska, zgłosz. nr P 413885 z 09.09.2015.

Zgłoszenia patentowe (2):

[B34] H. Żbikowska, J. Saluk, **I. Pawlaczyk-Graja**, M. Szejka, Tytuł: Zastosowanie roślinnego środka przeciwutleniającego w ochronie przed promieniowaniem jonizującym. Zgłosz. pat. nr P 412248 z 06.05.2015.

[B35] **I. Pawlaczyk-Graja**, Tytuł: Sposób wytwarzania środka przeciwdziałającego koagulacji krwi, środek przeciwdziałający koagulacji krwi oraz jego zastosowanie. Zgłosz. pat. nr P 413886 z 09.09.2015.

5.3. Dane bibliometryczne dotyczące dorobku naukowego

Liczbowe zestawienie dorobku naukowego (na dzień 01.03.2019r.)

	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
Indeks Hirscha (wg. Web of Science)	1	12	12
Indeks Hirscha (wg. Scopus)	1	12	12
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	2	26	28
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie JCR	1	2	3
Publikacje w czasopismach spoza listy MNiSW	3	12	15
Rozdziały w monografiach	4	4	8
Prace opublikowane w materiałach konferencyjnych	5	6	11
Całkowita liczba publikacji	6	40	46
Sumaryczny IF - zgodnie z rokiem opublikowania	2,536	76,247*	78,782
Sumaryczna liczba punktów MNiSW	35	741*	802
Liczba cytowań publikacji (wg. Web of Science)	2	350	352
Liczba cytowań publikacji z wyłączeniem autocytowań (wg. Web of Science)	2	248	250
Liczba cytowań publikacji (wg. Scopus)	2	356	358
Liczba cytowań publikacji z wyłączeniem autocytowań (wg. Scopus)	2	267	269
Uzyskane patenty	0	5	5
Zgłoszenia patentowe	1	2	2
Komunikaty niepublikowane, przedstawione na konferencjach zagranicznych	10	27	37
Udział w konferencjach zagranicznych	8	18	26
Komunikaty niepublikowane, przedstawione na konferencjach krajowych	6	9	15
Udział w konferencjach krajowych	6	8	14
Komunikaty konferencyjne sumarycznie	16	36	52
Kierownictwo projektów badawczych	1	1	2
Udział w projektach badawczych	2	5	7

* w tym dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:
pkt. MNiSW (wraz z pracami spoza listy JCR)

IF= **30,508**
= **294**

Zestawienie czasopism z listy JCR, w których opublikowano prace naukowe:

Czasopismo	IF (zgodny z rokiem opublikowania)	IF (2017)	Punkty MNIŚW (zgodne z rokiem opublikowania)
przed doktoratem (2)			
[A1] <i>Cell Mol Biol Let</i> (2001)	0,857	1,291	15
[A2] <i>Platelets</i> (2006)	1,679	2,356	20
po doktoracie (26, *9)			
[B1] <i>General Physiol. Biophys.</i> (2007)	1,286	1,479	20
[B2] <i>Carbohydr. Polym.</i> (2009)	3,167	5,158	32
[B3] <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> (2010)	2,502	3,909	20
[B4] <i>Cent. Eur. J. Biol.</i> (2010)	0,685	0	20
[H1] <i>*J. Ethnopharmacol.</i> (2010)	2,466	3,115	32
[B5] <i>Prz. Menopauzalny/Menopause Rev.</i> (2011)	0,190	0	13
[B6] <i>Thromb. Res.</i> (2011)	2,440	2,779	27
[H2] <i>*Carbohydr Polym</i> (2011)	3,628	5,158	32
[B7] <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> (2012)	2,596	3,909	25
[H3] <i>*Int. J. Biol. Macromol.</i> (2013)	3,096	3,909	20
[B8] <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> (2013)	3,096	3,909	20
[H4] <i>*Carbohydr Polym</i> (2013)	3,916	5,158	40
[H5] <i>*Int. J. Biol. Macromol.</i> (2014)	2,858	3,909	25
[B9] <i>Med. Chem. Res.</i> (2014)	1,402	1,607	10
[H6] <i>*J. Ethnopharmacol.</i> (2015)	3,055	3,115	40
[B10] <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> (2015)	3,138	3,909	25
[B11] <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> (2015)	3,138	3,909	25
[H7] <i>*Int. J. Biol. Macromol.</i> (2016)	3,671	3,909	35
[B12] <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> (2016)	3,671	3,909	35
[B13] <i>Biotech. Biofuels</i> (2017)	5,497	5,497	45
[B14] <i>Biotech. Progr.</i> (2017)	1,947	1,947	30
[B15] <i>J. Photochem. Photobiol.</i> (2017)	3,165	3,165	30
[B16] <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> (2017)	3,909 (2017)	3,909	35
[H8] <i>*Int. J. Biol. Macromol.</i> (2018)	3,909 (2017)	3,909	35
[B17] <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> (2019)	3,909 (2017)	3,909	35
[H9] <i>*Int. J. Biol. Macromol.</i> (2019)	3,909 (2017)	3,909	35
Σ	78,782	92,642	776

*- publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Jożelba Panłacy - Graja