



Politechnika Wrocławska

DYSCYPLINA: Inżynieria chemiczna

ROZPRAWA DOKTORSKA

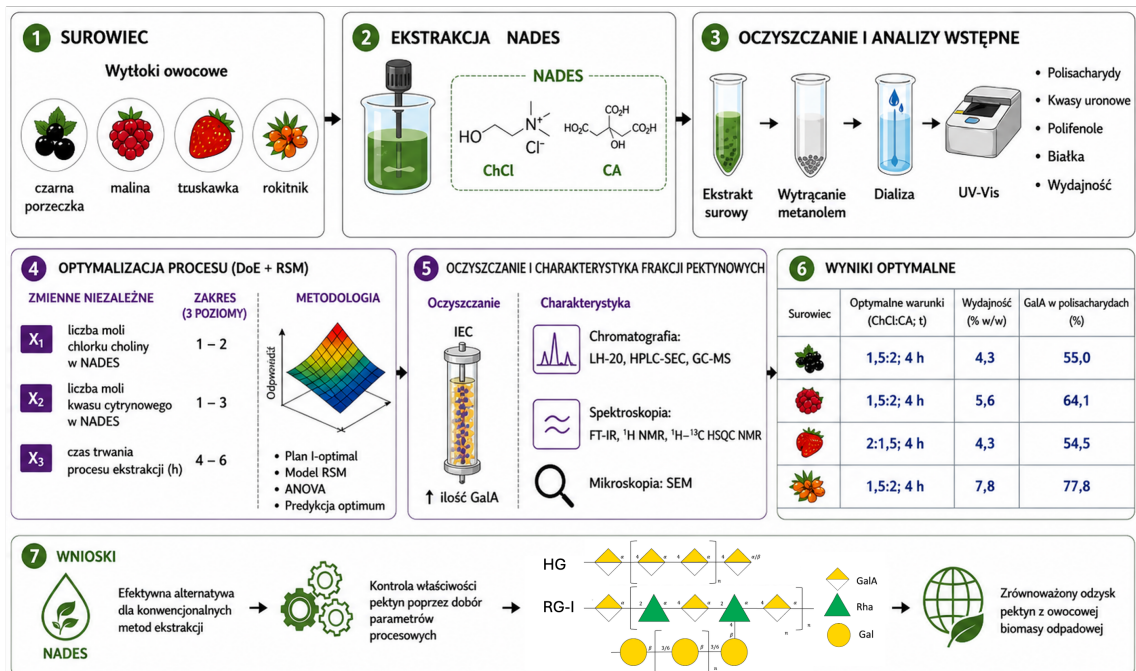
**Wieloskalowa analiza wpływu
parametrów technologicznych procesu ekstrakcji
z zastosowaniem naturalnych mieszanin głęboko
eutektycznych na właściwości pektyn
z wyłoków owocowych**

mgr inż. Ewa Górską

Promotor: dr hab. inż. Izabela Pawlaczyk-Graja, prof. uczelni

WROCŁAW 2026

ABSTRAKT GRAFICZNY



Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim

„Wieloskalowa analiza wpływu parametrów technologicznych procesu ekstrakcji z zastosowaniem naturalnych mieszanin głęboko eutektycznych na właściwości pektyn z wyłoków owocowych”

Rosnące znaczenie zrównoważonych technologii sprzyja poszukiwaniu efektywnych metod odzysku składników z biomasy odpadowej. Wyłoki owocowe stanowią źródło pektyn o szerokim potencjale aplikacyjnym, których właściwości determinowane są strukturą chemiczną. Konwencjonalna ekstrakcja kwasowa wykazuje istotne ograniczenia środowiskowe i technologiczne. Alternatywę stanowią naturalne mieszaniny głęboko eutektyczne (NADES).

Celem pracy była optymalizacja procesu ekstrakcji pektyn z wyłoków owocowych (czarna porzeczka jako surowiec modelowy, malina, truskawka, rokitnik) z wykorzystaniem NADES oraz ocena wpływu parametrów procesowych na właściwości otrzymanych produktów.

Badania wstępne umożliwiły wybór chlorku choliny (ChCl) i kwasu cytrynowego (CA) jako najkorzystniejszego układu NADES. Optymalizację przeprowadzono z wykorzystaniem metodologii planowania eksperymentu (DoE) oraz analizy powierzchni odpowiedzi (RSM), przy uwzględnieniu składu NADES (ChCl, CA) oraz czasu ekstrakcji jako zmiennych niezależnych. Analiza statystyczna (ANOVA) umożliwiła wyznaczenie parametrów optymalnych, które następnie zastosowano do pozostałych badanych surowców. Otrzymane produkty oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (IEC), a dominujące frakcje pektynowe scharakteryzowano technikami spektrofotometrycznymi (UV–Vis) chromatograficznymi (LH-20, HPLC-SEC, GC-MS), spektroskopowymi (FT-IR, ^1H NMR, ^1H – ^{13}C HSQC NMR) oraz mikroskopowymi (SEM). Frakcje pektynowe wykazywały wysokim udział kwasu galakturonowego (GalA), obecność domen HG i RG-I, niskometoksyłowy charakter oraz zdolność do tworzenia kompleksów polifenolowo-polisacharydowych. W warunkach optymalnych (ChCl/CA 1,5:2; 4 h) uzyskano dla wyłoków czarnej porzeczki wydajność 4,29% (w/w) i ok. 55% GalA, dla wyłoków z maliny i rokitnika odpowiednio 5,62% i 7,75% oraz 64,08% i 77,75% GalA, natomiast dla wyłoków truskawki (ChCl/CA 2:1,5; 4 h) - 4,33% i 54,52% GalA. Oczyszczanie metodą IEC zwiększało udział GalA.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że NADES stanowią efektywną i środowiskowo przyjazną alternatywę dla konwencjonalnych metod ekstrakcji pektyn, umożliwiając kontrolę właściwości strukturalnych produktów poprzez odpowiedni dobór parametrów procesowych.

Słowa kluczowe: pektyny, polisacharydy, ekstrakcja, naturalne mieszaniny głęboko eutektyczne, NADES, optymalizacja

Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim

„Multiscale analysis of the influence of technological parameters of the natural deep eutectic solvents extraction process on the properties of the fruit pomace pectin”

The increasing importance of technologies aligned with the principles of sustainable development supports the exploration of efficient methods for recovering valuable compounds from waste biomass. Fruit pomace is recognized as a good source of pectins with a wide range of applications. The functional properties are determined by their chemical structure. Conventional acid-based extraction methods are associated with significant environmental and technological limitations. An alternative approach involves Natural Deep Eutectic Solvents (NADES).

The main objective was to optimize the pectin extraction process from fruit pomace (blackcurrant as a model raw material, raspberry, strawberry and sea buckthorn) using NADES, and to evaluate the impact of technological parameters on the properties of the obtained products.

Preliminary extractions enabled the selection of choline chloride (ChCl) and citric acid (CA) mixture as the most advantageous. Process parameters were optimized using Design of Experiments (DoE) and Response Surface Methodology (RSM), with NADES composition (ChCl, CA) and extraction time as independent variables. Statistical analysis (ANOVA) enabled the identification of optimal parameters, which were subsequently applied to the remaining fruit pomaces. The products obtained under optimal conditions were purified by ion-exchange chromatography (IEC), and the dominant pectin fractions were characterized using spectrophotometric (UV–Vis), chromatographic (LH-20, HPLC-SEC, GC-MS), spectroscopic (FT-IR, ^1H NMR, ^1H – ^{13}C HSQC NMR), and microscopic (SEM) techniques. Pectin fractions were characterized by a high content of GalA, the presence of predominant HG and RG-I domains, a low degree of esterification, and the ability to form polyphenol-polysaccharide conjugates. Under optimal conditions (ChCl/CA 1.5/2; 4 h), blackcurrant pomace yielded 4.29% (w/w) and approximately 55% GalA, raspberry and sea buckthorn pomace yielded 5.62% and 7.75%, and 64.08% and 77.75% GalA, respectively. Strawberry pomace yielded 4.33% and 54.52% GalA (ChCl/CA 2/1.5; 4 h). Purification by IEC was associated with an increase in GalA content.

The obtained results confirm that NADES provide an effective and environmentally friendly alternative to conventional pectin extraction methods, enabling control of the structural properties of products through the appropriate selection of process parameters.

Key words: pectins, polysaccharides, extraction, natural deep eutectic solvents, NADES, optimization

FINANSOWANIE

Narodowe Centrum Nauki (NCN) – PRELUDIUM BIS 2
Projekt badawczy pt.: „Wieloskalowa analiza wpływu parametrów technologicznych procesu ekstrakcji z zastosowaniem naturalnych mieszanin głęboko eutektycznych na właściwości pektyn z wyłoków owocowych”
(2020/39/O/ST8/03514)



NARODOWE CENTRUM NAUKI

STAŻ ZAGRANICZNY

Narodowa Agencja Wymiany Akademickiej



NARODOWA AGENCJA
WYMIANY AKADEMICKIEJ

WSPÓŁPRACE NAUKOWE

Wydział Chemii, Słowacka Akademia Nauk, Bratysława, Słowacja
Opieka naukowa: prof. Peter Capek, dr Zuzana Košťálová



SLOVENSKÁ
AKADÉMIA
VIED

WSPÓŁPRACA PARTNERSKA

Surowiec do badań pozyskano bezpłatnie dzięki wsparciu rzeczowemu producenta
Frunutex sp. z o.o.



PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję Pani dr hab. inż. Izabeli Pawlaczyk-Graji za opiekę naukową, merytoryczne wsparcie oraz pomoc w zaplanowaniu kolejnych etapów stanowiących podstawę niniejszej rozprawy. Dziękuję za cenne wskazówki oraz konsekwentne prowadzenie mnie przez kolejne etapy pracy badawczej.

Pragnę wyrazić szczerze podziękowania Pani dr inż. Marcie Tsirigotis-Manieckiej za nieocenione wsparcie w realizacji badań i uzyskaniu wyników będących częścią tej pracy. Dziękuję za zaangażowanie, chęć pomocy i gotowość do dzielenia się wiedzą.

Dziękuję mgr inż. Aleksandrze Mazurek-Hołys za lata wspólnej pracy w laboratorium, wsparcie w trudnych chwilach i dobrą energię.

Z całego serca dziękuję mojej Rodzinie i Przyjaciółom za nieustające wsparcie, cierpliwość i wiarę w moje możliwości. Dziękuję za okazywaną mi miłość, zrozumienie i inspirację, które towarzyszyły mi na każdym etapie mojej drogi naukowej i osobistej.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	10
SPIS PRODUKTÓW	12
1. PRZEGLĄD LITERATURY	13
1.1. Polisacharydy	13
1.1.1. Wielopoziomowa struktura polisacharydów	13
1.1.2. Budowa chemiczna i struktura domenowa pektyn.....	16
1.2. Struktura pektyn a ich właściwości funkcjonalne	19
1.3. Ekstrakcja pektyn z biomasy roślinnej.....	21
1.3.1. Konwencjonalne metody ekstrakcji pektyn i ich ograniczenia.....	21
1.3.2. Alternatywne metody ekstrakcji pektyn	24
1.3.2.1. Ciecze jonowe (IL)	26
1.3.2.2. Mieszaniny głęboko eutektyczne (DES).....	27
1.3.2.3. Naturalne mieszaniny głęboko eutektyczne (NADES).....	31
1.3.3. Parametry determinujące proces ekstrakcji pektyn.....	36
1.3.3.1. Metody planowania eksperymentu i optymalizacji parametrów procesu....	39
1.4. Odpadowa biomasa roślinna w przetwórstwie owoców	42
2. CEL ROZPRAWY	46
3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	47
3.1. Surowce roślinne	47
3.1.1. Opis i charakterystyka surowców roślinnych	47
3.1.1.1. Czarna porzeczka (<i>Ribes nigrum</i> L.)	47
3.1.1.2. Malina właściwa (<i>Rubus idaeus</i> L.).....	49
3.1.1.3. Poziomka truskawka (<i>Fragaria x ananassa</i> Duchesne)	52
3.1.1.4. Rokitnik zwyczajny (<i>Hippophae rhamnoides</i> L.).....	54
3.1.1.5. Charakterystyka morfologiczna surowców roślinnych.....	56
3.1.1.6. Analiza ilości wody w surowcach roślinnych.....	58

3.2. Proces ekstrakcji.....	60
3.2.1. Ustalenie wstępnych warunków procesowych	60
3.2.1.1. Ekstrakcja polisacharydów w warunkach wodnych	60
3.2.1.2. Charakterystyka chemiczna produktów (I-IV)	63
3.2.1.3. Ustalenie wstępnych parametrów procesowych	67
3.2.1.4. Wpływ zróżnicowanego pH oraz siły jonowej na proces ekstrakcji	68
3.2.1.5. Ekstrakcja z wykorzystaniem wybranych układów NADES.....	72
3.2.2. Optymalizacja parametrów ekstrakcji pektyn w środowisku NADES	75
3.2.2.1. Optymalizacja procesu ekstrakcji pektyn w modelu I-optimal.....	76
3.2.2.2. Ekonomiczne aspekty czasu prowadzenia ekstrakcji	86
3.2.2.3. Weryfikacja wyboru optymalnych parametrów procesowych.....	88
 3.3. Zastosowanie optymalnych parametrów ekstrakcji pektyn do innych rodzajów biomasy odpadowej	91
3.3.1. Wytłoki z owocu maliny	91
3.3.2. Wytłoki z owocu truskawki	92
3.3.3. Wytłoki z owocu rokitnika.....	92
 3.4. Charakterystyka fizyko-chemiczna produktów pektynowych	94
3.4.1. Analiza produktów roślinnych metodami chromatograficznymi oraz spektroskopowymi	94
3.4.1.1. Frakcjonowanie produktów na drodze chromatografii jonowymiennej	95
3.4.1.2. Frakcjonowanie produktów na drodze chromatografii LH-20	101
3.4.1.3. Szacowanie masy cząsteczkowej produktów i ich frakcji pektynowych...	104
3.4.1.4. Analiza FTIR-ATR wybranych produktów i ich frakcji.....	111
3.4.1.5. Charakterystyka polisacharydów metodą GC-MS	114
3.4.1.6. Analiza NMR produktów i ich frakcji pektynowych.....	123
3.4.2. Analiza produktów roślinnych metodami mikroskopowymi.....	129
3.4.2.1. Mikroskopia optyczna.....	129
3.4.2.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa sprzężona ze spektroskopią rentgenowską z dyspersją energii (SEM-EDS).....	131

4. PODSUMOWANIE	138
5. MATERIAŁY I METODY	144
5.1. Aparatura	144
5.2. Materiały i odczynniki.....	144
5.3. Metody	146
6. LITERATURA	154
7. DODATEK	170
8. DOROBIEK NAUKOWY	182

WYKAZ SKRÓTÓW

AA	kwask askorbinowy, $C_6H_8O_6$ (ang. <i>ascorbic acid</i>)
AG	apiogalakuronian
AIR	(wytrącanie) substancji nierozpuszczalnych w alkoholu (ang. <i>alcohol insoluble residues</i>)
AO	szczawian amonu, $(NH_4)_2C_2O_4$ (ang. <i>ammonium oxalate</i>)
Ara	arabinoza
CA	kwask cytrynowy, $C_6H_8O_7$ (ang. <i>citric acid</i>)
CCD	plan centralny kompozycyjny (ang. <i>central composite design</i>)
ChCl	chlorek choliny, $C_5H_{14}ClNO$ (ang. <i>choline chloride</i>)
DA	stopień acetylowania (ang. <i>degree of acetylation</i>)
DE	stopień estryfikacji (ang. <i>degree of esterification</i>)
DES	mieszaniny głęboko eutektyczne (ang. <i>deep eutectic solvents</i>)
df	stopnie swobody (ang. <i>degrees of freedom</i>)
DM	stopień estryfikacji resztą metylową (ang. <i>degree of methylesterification</i>)
EAE	ekstrakcja wspomagana enzymami (ang. <i>enzyme-assisted extraction</i>)
EC	zdolność do tworzenia i stabilizowania emulsji (ang. <i>emulsifying capacity</i>)
ES	stabilność emulsji (ang. <i>emulsifying stability</i>)
EW	równoważnik (ekwiwalent) masy (ang. <i>equivalent weight</i>)
FFD	eksperyment pełnoczynnikowy (ang. <i>full factorial design</i>)
Fuc	fukoza
Gal	galaktoza
GalA	kwask galakturonowy (ang. <i>galacturonic acid</i>)
GFC	chromatografia cieczowa, żelowa (ang. <i>gel filtration chromatography</i>)
Glc	glukoza
GPC	chromatografia podziałowa (ang. <i>gel permeation chromatography</i>)
HBA	akceptor wiązania wodorowego (ang. <i>hydrogen bond acceptor</i>)
HBD	donor wiązania wodorowego (ang. <i>hydrogen bond donor</i>)
HG	homogalakuronian
HM	(pektyna) wysokometylowana (ang. <i>high-methoxyl</i>)
HWE	ekstrakcja wodna na gorąco (ang. <i>hot-water extraction</i>)
IEC	chromatografia jonowymienna (ang. <i>ion exchange chromatography</i>)
IL	ciecze jonowe (ang. <i>ionic liquids</i>)
KPP	koniugaty polifenolowo-polisacharydowe
kWh	kilowatogodzina, $1 \text{ kWh} = 3\,600\,000 \text{ J}$
LA	kwask mlekowy (ang. <i>lactic acid</i>)
LM	(pektyna) niskometylowana (ang. <i>low-methoxyl</i>)
MA-ATPS	dwufazowy układ wodny wspomagany mikrofalami (ang. <i>microwave assisted aqueous two-phase system</i>)
MAC	maceracja
MAE	ekstrakcja wspomagana mikrofalami (ang. <i>microwave-assisted extraction</i>)
Man	mannoza
M_{app}	pozorna względna masa cząsteczkowa (ang. <i>apparent relative molecular weight</i>)
M_n	średnia masa cząsteczkowa (ang. <i>numer-average molecular weight</i>)
M_p	masa cząsteczkowa odpowiadająca maksymalnej wartości dla danego piku (ang. <i>peak molecular weight</i>)
MS	średnia kwadratów wartości (ang. <i>mean square</i>)
MUAE	ekstrakcja wspomagana mikrofalami oraz ultradźwiękami (ang. <i>microwave-ultrasound-assisted extraction</i>)
M_w	średnia wagowa masa cząsteczkowa (ang. <i>weight-average molecular weight</i>)
NADES	naturalne mieszaniny głęboko eutektyczne (ang. <i>natural deep eutectic solvents</i>)
OA	kwask szczawiowy, $C_2H_2O_4$ (ang. <i>oxalic acid</i>)
OHAE	ekstrakcja wspomagana ogrzewaniem Omowym (ang. <i>Ohmic heating-assisted extraction</i>)
OHC	zdolność do wiązania oleju (ang. <i>oil holding capacity</i>)

PDI	wskaźnik polidispersyjności (ang. <i>polydispersity index</i>)
PHWE	ekstrakcja gorącą wodą pod ciśnieniem (ang. <i>pressurized hot water extraction</i>)
RG-I/RG-II	ramnogalaturonian typu I/ ramnogalaturonian typu II
Rha	ramnoza
Rib	ryboza
RT	temperatura pokojowa (ang. <i>room temperature</i>)
SEC	chromatografia wykluczenia (ang. <i>size exclusion chromatography</i>)
SFE	ekstrakcja cieczą w stanie nadkrytycznym (ang. <i>supercritical fluid extraction</i>)
SS	suma kwadratów (ang. <i>sum of squares</i>)
ST	winian sodu, $C_4H_4Na_2O_6$ (ang. <i>sodium tartrate</i>)
SWE	ekstrakcja wodą w stanie podkrytycznym (ang. <i>subcritical water extraction</i>)
t	czas
T	temperatura
TA	kwas winowy, $C_4H_6O_6$ (ang. <i>tartaric acid</i>)
UA	kwasy uronowe (ang. <i>uronic acids</i>)
UAE	ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (ang. <i>ultrasound-assisted extraction</i>)
W	praca (J)
WE	ekstrakcja wodna (ang. <i>water extraction</i>)
WHC	zdolność do wiązania wody (ang. <i>water holding capacity</i>)
XG	ksylogalakturonian
Xyl	ksyloza
Y	wydajność (ang. <i>yield</i>) (%)

SPIS PRODUKTÓW

(eI), (eII), (eIII), (eIV)	ekstrakty przed oczyszczeniem alkoholem i na drodze dializy otrzymane z wyłoków owocowych czarnej porzeczki/maliny/truskawki/ rokitnika – ekstrakcja w wodzie; 4h, 100°C
(I), (II), (III), (IV)	KPP otrzymane odpowiednio z wyłoków owocowych czarnej porzeczki/maliny/truskawki/rokitnika – ekstrakcja w wodzie; 4h, 100°C
(1 - 39)	KPP otrzymane z wyłoków owoców czarnej porzeczki
(N1 - N4)	ekstrakcje wstępne w środowisku NADES, KPP otrzymane z surowca modelowego przy wykorzystaniu jako medium ekstrakcyjnego mieszaniny NADES (ChCl/CA 1:1), z różnym udziałem wody
(38-F1)	frakcja pektynowa nr 1 (F1) uzyskana poprzez oczyszczanie produktu 38 na drodze chromatografii jonowymiennej (produkt optymalny)
(38-F2)	frakcja pektynowa nr 2 (F2) uzyskana poprzez oczyszczanie produktu 38 na drodze chromatografii jonowymiennej (produkt optymalny)
(38-F3)	frakcja pektynowa nr 3 (F3) uzyskana poprzez oczyszczanie produktu 38 na drodze chromatografii jonowymiennej (produkt optymalny)
(M_{H2O})	KPP otrzymane z wyłoków owocowych maliny – ekstrakcja w wodzie; 4h, 100°C
(M_{CA})	KPP otrzymane z wyłoków owocowych maliny – ekstrakcja w CA; 4h, 100°C
(M1)	KPP otrzymane z wyłoków owocowych maliny – ekstrakcja NADES (ChCl/CA 1,5:1); 4h, 100°C
(M2)	KPP otrzymane z wyłoków owocowych maliny – ekstrakcja NADES (ChCl/CA 1,5:2); 4h, 100°C
(M3)	KPP otrzymane z wyłoków owocowych maliny – ekstrakcja NADES (ChCl/CA 2:1,5); 4h, 100°C
(M2-F1)	frakcja pektynowa nr 1 (F1) uzyskana poprzez oczyszczanie produktu M2 na drodze chromatografii jonowymiennej (produkt optymalny)
(M2-F2)	frakcja pektynowa nr 2 (F2) uzyskana poprzez oczyszczanie produktu M2 na drodze chromatografii jonowymiennej (produkt optymalny)
(T_{H2O})	KPP otrzymane z wyłoków owocowych truskawki – ekstrakcja w wodzie; 4h, 100°C
(T_{CA})	KPP otrzymane z wyłoków owocowych truskawki – ekstrakcja w CA; 4h, 100°C
(T1)	KPP otrzymane z wyłoków owocowych truskawki – ekstrakcja NADES (ChCl/CA 1,5:1); 4h, 100°C
(T2)	KPP otrzymane z wyłoków owocowych truskawki – ekstrakcja NADES (ChCl/CA 1,5:2); 4h, 100°C
(T3)	KPP otrzymane z wyłoków owocowych truskawki – ekstrakcja NADES (ChCl/CA 2:1,5); 4h, 100°C
(T3-F1)	frakcja pektynowa nr 1 (F1) uzyskana poprzez oczyszczanie produktu T3 na drodze chromatografii jonowymiennej (produkt optymalny)
(T3-F2)	frakcja pektynowa nr 2 (F2) uzyskana poprzez oczyszczanie produktu T3 na drodze chromatografii jonowymiennej (produkt optymalny)
(R_{H2O})	KPP wyizolowane z wyłoków owocowych rokitnika – ekstrakcja w wodzie; 4h, 100°C
(R_{CA})	KPP otrzymane z wyłoków owocowych rokitnika – ekstrakcja w CA; 4h, 100°C
(R1)	KPP otrzymane z wyłoków owocowych rokitnika – ekstrakcja NADES (ChCl/CA 1,5:1); 4h, 100°C
(R2)	KPP otrzymane z wyłoków owocowych rokitnika – ekstrakcja NADES (ChCl/CA 1,5:2); 4h, 100°C
(R3)	KPP otrzymane z wyłoków owocowych rokitnika – ekstrakcja NADES (ChCl/CA 2:1,5); 4h, 100°C
(R2-F1)	frakcja pektynowa nr 1 (F1) uzyskana poprzez oczyszczanie produktu R2 na drodze chromatografii jonowymiennej (produkt optymalny)
(R2-F2)	frakcja pektynowa nr 2 (F2) uzyskana poprzez oczyszczanie produktu R2 na drodze chromatografii jonowymiennej (produkt optymalny)

1. PRZEGLĄD LITERATURY

1.1. Polisacharydy

1.1.1. Wielopoziomowa struktura polisacharydów

Polisacharydy to naturalne makrocząsteczki zbudowane z jednostek monosacharydowych, połączonych wiązaniami glikozydowymi, które mogą różnić się składem monomerów, rodzajem wiązań glikozydowych oraz stopniem rozgałęzienia łańcucha głównego, co determinuje ich właściwości fizykochemiczne i przekłada się na ich właściwości użytkowe [Zhao i in., 2023; Teng i in., 2024].

Budowa chemiczna polisacharydów charakteryzuje się wysokim stopniem skomplikowania. Polisacharydy, podobnie jak białka, prezentują wielopoziomową organizację strukturalną, co doprowadziło do konieczności adaptacji odpowiedniej nomenklatury. W rezultacie terminologia przyjęta dla białek została zaadaptowana również w odniesieniu do polisacharydów. Hierarchia dla obu typów makrocząsteczek opiera się na strukturze pierwszorzędowej, drugorzędowej, trzeciorzędowej oraz czwartorzędowej [Diener i in., 2019]. Choć obie grupy biopolimerów dzielą te same poziomy zorganizowania strukturalnego, istnieją między nimi znaczące różnice w mechanizmach ich formowania.

Struktura pierwszorzędowa polisacharydu opiera się na sekwencji jednostek monosacharydowych połączonych wiązaniami kowalencyjnymi. Organizacja łańcucha głównego może być opisywana jako tzw. kłębek statystyczny, czyli rzeczywista struktura, jaką tworzą pojedyncze monomery w rzeczywistych warunkach roztworu [Meng i in., 2026]. Struktura tego łańcucha jest bardziej złożona niż w przypadku białek, ponieważ pierwszorzędowa budowa polisacharydów obejmuje nie tylko rodzaj i rozmieszczenie reszt monosacharydowych, ale również wielkość form cyklicznych, które tworzą te monomery (*p* - piranozy lub *f* - furanozy), ich konfigurację (D lub L), rodzaj wiązania glikozydowego (np. 1→4, 1→6 itd.) oraz konfigurację anomerycznego atomu węgla (C1) (α lub β). Co więcej, niektóre monosacharydy mogą zawierać dodatkowe grupy funkcyjne (np. metylową, acetylową, aminową). Wszystkie te cechy determinują znacznie wyższy stopień skomplikowania oraz większą liczbę możliwych wariantów strukturalnych w polisacharydach już na poziomie ich pierwszorzędowej struktury [Fittolani i in., 2020; Drusch i in., 2024].

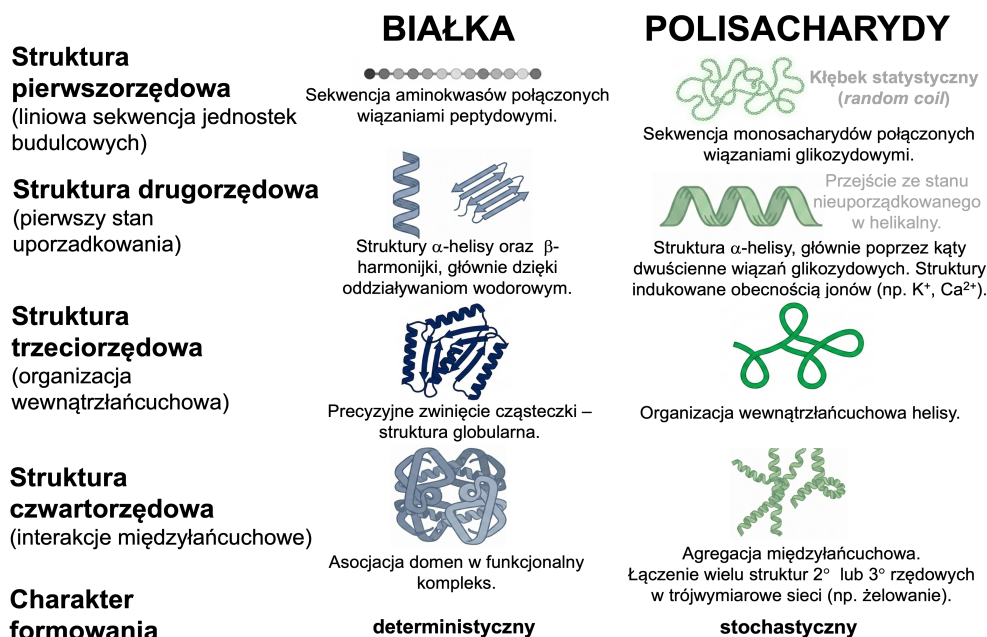
Podobnie jak w przypadku białek, struktura drugorzędowa polisacharydów obejmuje formy α -helisy i β -kartki, stabilizowane wiązaniami wodorowymi [Meng i in., 2026; Diener i in., 2019; Du i in., 2022]. Jednakże w większości przypadków polisacharydy formują regularny układ przestrzenny struktury pierwszorzędowej, czego efektem są struktury helikalne, takie jak amyloza w skrobi lub struktury liniowe, przykładowo jak łańcuchy celulozy czy chityny. Zmiana konformacji z postaci nieuporządkowanej na uporządkowaną wiąże się ze wzrostem sztywności łańcucha oraz indukuje chiralność cząsteczki [Schefer i in., 2015; Diener i in., 2019; Fu i in., 2024].

W przypadku polisacharydów trzeciorzędowa konformacja związana jest z obecnością powtarzalnych sekwencji struktury pierwszorzędowej oraz z licznymi możliwymi oddziaływaniami niekowalencyjnymi pomiędzy grupami hydroksylowymi, karboksylowymi i aminowymi monomerów. W efekcie prowadzi to do uporządkowania struktur drugorzędowych w bardziej złożone układy [Fu i in., 2024]. Elastyczność struktur drugorzędowych wpływa na ich stopień usztywnienia, a także stopień skręcenia struktur trzeciorzędowych. Przykładem są superhelisy, powstające w wyniku intensywnego zwijania się łańcucha polisacharydowego lub występowania interakcji pomiędzy jego fragmentami [Chavda i in., 2024; Diener i in., 2019].

Struktura czwartorzędowa polisacharydów odnosi się do agregatów tworzonych między ich łańcuchami w wyniku oddziaływań niekowalencyjnych. Może obejmować zarówno interakcje pomiędzy podobnymi łańcuchami w obrębie struktur trzeciorzędowych, jak i między łańcuchami tworzącymi struktury drugorzędowe. Powstałe agregaty umożliwiają formowanie rozbudowanych sieci trójwymiarowych, także o dużym stopniu rozgałęzienia łańcuchów głównych [Diener i in., 2019; Fu i in., 2024]. Struktura trzecio- oraz czwartorzędowa polisacharydów zależy od ich pierwszo- i drugorzędowej natury, mających wpływ na oddziaływania elektrostatyczne cząsteczki polisacharydu, wynikające z liczby, rozmieszczenia oraz stopnia protonacji grup funkcyjnych, tym samym determinując oddziaływania wewnątrz- i międzycząsteczkowe [Drusch i in., 2024].

W przypadku niektórych polisacharydów, np. dla pektyn, stabilizacja struktur często wymaga obecności specyficznych jonów, np. Ca^{2+} , podczas gdy w przypadku białek ich stabilność strukturalna opiera się głównie na oddziaływaniach niekowalencyjnych [Cao i in., 2020; Fu i in., 2024; Adhav i in., 2023]. W przeciwieństwie do powtarzalnych strukturalnie białek, o czym decyduje ich deterministyczny charakter, polisacharydy mają

w większości charakter stochastyczny, co skutkuje ich większą zmiennością strukturalną oraz niejednorodnością [Diener i in., 2019].



Ryc. 1. Porównanie organizacji strukturalnej białek oraz polisacharydów
[na podstawie: Diener i in., 2019; Du i in., 2022; Fu i in., 2024].

Szczegółowa charakterystyka chemiczna polisacharydów wymaga zastosowania zaawansowanych technik analitycznych, do których zalicza się:

- metody mikroskopowe, takie jak: mikroskopia sił atomowych (AFM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM);
- metody spektrofotometryczne, obejmujące oznaczenia kolorymetryczne, w tym: metodę fenolowo-siarczanową, metodę *m*-hydroksybifenylową, testy antyoksydacyjne (np. DPPH), test z czerwienią kongo w celu wykrycia struktur helikalnych;
- metody spektroskopowe, takie jak: spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektroskopia w podczerwieni (FT-IR), spektroskopia Ramana, dichroizm kołowy (CD), spektrometria mas (MS), w tym techniki obejmujące różne metody jonizacji cząsteczek oraz różne analizatory mas, np. ESI-MS, EI-MS MALDI-TOF;
- metody chromatograficzne, w tym: chromatografia podziałowa (GPC/SEC), wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia gazowa (GC), w tym również chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS), chromatografia jonowymienna (IEC), wysokosprawna chromatografia

- anionowymienna z detekcją amperometryczną (HPAEC-PAD), chromatografia żelowa z detekcją MALLS; chromatografia na porowatym węglu grafitowym (PGC);
- metody elektroforetyczne, np. elektroforeza kapilarna (CE);
 - metody chemiczne, np. miareczkowanie (oznaczanie DE i DA), analiza metylacyjna;
 - metody reologiczne, takie jak: wiskozymetria, analiza oscylacyjna;
 - inne metody, takie jak: dyfrakcja rentgenowska (XRD), dynamiczne (DLS) i statyczne (LLS) rozpraszanie światła, metody rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (WAXS, SAXS), pomiar potencjału Zeta [Kozioł i in., 2022; Chan i in., 2017; Chaitanya i in., 2026; Zheng i in., 2023; Pandeirada i in., 2025; Ren i in., 2019; Kong i in., 2026; Diener i in., 2019; Obodo-Ovie i in., 2025; Du i in., 2022; Fu i in., 2024; Meng i in., 2026].

Współczesne podejście opiera się na integracji metod, co umożliwia analizę zależności wynikających z budowy chemicznej cząsteczki oraz jej właściwościami funkcjonalnymi.

Wśród polisacharydów szczególną uwagę poświęca się pektynom, których złożona budowa oraz właściwości funkcjonalne mają kluczowe znaczenie w kontekście procesów ich ekstrakcji i modyfikacji.

1.1.2. Budowa chemiczna i struktura domenowa pektyn

Pektyny, obok celulozy, hemiceluloz, lignin oraz białek, stanowią główny składnik strukturalny ścian komórkowych roślin naczyniowych [Obomighie i in., 2025]. Pektyny zbudowane są z reszt kwasu D-galakturonowego (GalA) połączonych wiązaniami α -(1 $\rightarrow$ 4) glikozydowymi [Chan i in., 2017]. Zgodnie z założeniami Organizacji Narodów Zjednoczonych, Komisji ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) łańcuch polisacharydowy może być sklasyfikowany jako pektyna, jeżeli w jego strukturze ilość GalA przekracza 65% [Freitas i in., 2021]. Skład monomerów pektyn obok GalA obejmuje także monosacharydy obojętne, w tym głównie: L-ramnozę (Rha), D-galaktozę (Gal), L-arabinozę (Ara), D-ksylozę (Xyl), L-fukozę (Fuc) [Pińkowska i Złocińska, 2014]. Monosacharydy te, oprócz Rha występującej w łańcuchu głównym, obecne są w łańcuchach bocznych, tworząc ich kolejne rozgałęzienia [Zheng i in., 2023]. W strukturze pektyny występują różnego typu wiązania glikozydowe, głównie α -(1 $\rightarrow$ 4), jak również α - i β (1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) i (1 $\rightarrow$ 6). Wiązania α zazwyczaj sprzyjają większej elastyczności łańcucha, podczas gdy wiązania β częściej prowadzą do

powstawania struktur o wyższym stopniu uporządkowania, co może wpływać na wzrost ich sztywności [Assifaoui, 2025]. Pektyny odpowiadają za regulację właściwości mechanicznych ściany komórkowej, nadając jej większą sprężystość i utrzymując w niej cząsteczki wody. Determinują też inne właściwości ściany komórkowej, w tym jej porowatość, rozkład ładunku powierzchniowego, stabilizację pH i równowagę jonową, co wpływa na transport jonów oraz małych cząsteczek przez tę barierę biologiczną [Voragen i in., 2009; Obomighie i in., 2025]. Pektyny ulegają naturalnym modyfikacjom poprzez działanie enzymów podczas procesów wzrostu i dojrzewania rośliny, jak też pod wpływem warunków stresowych [Kozioł i in., 2022].

Cząsteczka pektyny składa się z naprzemiennie ułożonych fragmentów liniowych, jednorodnych, zbudowanych z monomerów GalA, określanych jako tzw. regiony gładkie (ang. *smooth regions*) oraz niejednorodnych obszarów o dużym lub bardzo dużym stopniu rozgałęzienia struktur bocznych (ang. *hairy regions*) [Kong i in., 2026; Pińkowska i Złocińska, 2014].

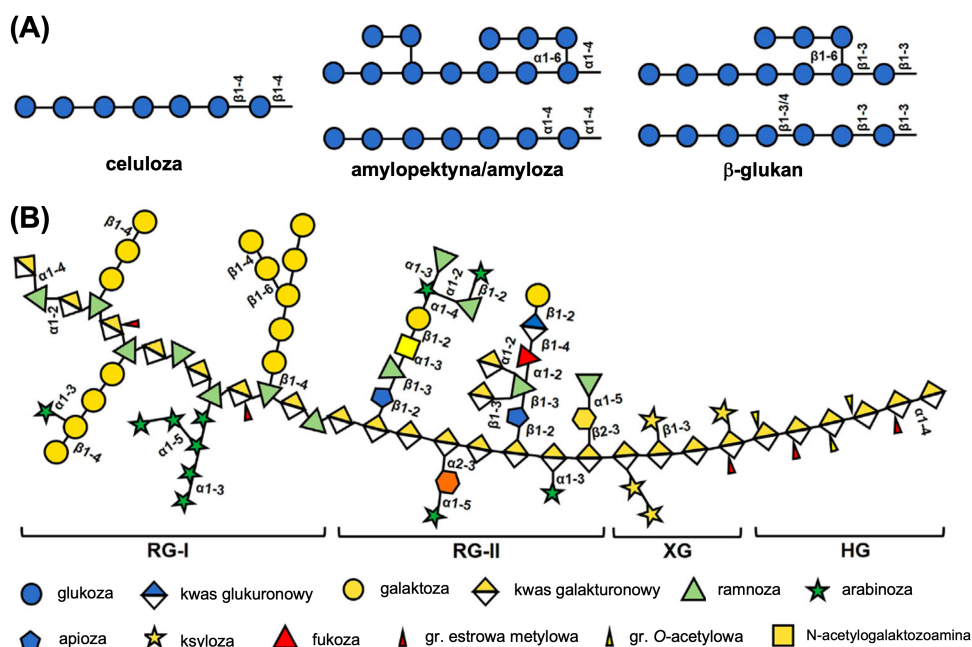
Pierwszorzędowa struktura pektyn, heteropolisacharydów ściany komórkowej, składa się z trzech głównych domen: homogalakuronianu (HG), ramnogalakuronianu I (RG-I) oraz ramnogalakuronianu II (RG-II).

HG stanowi dominującą domenę pektynową w obrębie ściany komórkowej (ok. 60-65%). Łańcuch zbudowany jest z reszt GalA połączonych wiązaniami glikozydowymi α -(1 $\rightarrow$ 4) [Voragen i in., 2009; Muñoz-Almagro i in., 2021; Hadid i in., 2025]. Reszty GalA w łańcuchu głównym tej domeny mogą ulegać estryfikacji grupami metylowymi w pozycji C-6 oraz acetylowaniu w pozycjach O-2 i/lub O-3 [Voragen i in., 2009; Pińkowska i Złocińska, 2014].

Region RG-I, stanowiący od 20 do 35% struktury pektyny, charakteryzuje się szkieletem złożonym z naprzemiennie ułożonych reszt GalA i Rha. Cząsteczka ramnozy może być podstawiona w pozycji O-4 liniowymi lub rozgałęzionymi łańcuchami bocznymi, złożonymi z cukrów neutralnych, np. Ara, Gal, tworzących arabinogalaktany [Hilz i in., 2005; Muñoz-Almagro i in., 2021].

RG-II jest domeną mniej rozpowszechnioną (< 10% całkowitej struktury) o wysokim stopniu skomplikowania [Muñoz-Almagro i in., 2021]. Region ten składa się z co najmniej 8 reszt GalA wraz z czterema rodzajami możliwych łańcuchów bocznych, zbudowanych z 12 różnych typów monosacharydów [Chen i Lahaye, 2021]. Charakteryzuje się obecnością nietypowych cukrów, do których zalicza się apiozę (Api),

fukozę (Fuc), a także kwas 2-keto-3-dezoksy-D-mannooktulozonowy (KDO), kwas 3-dezoksy-D-likso-2-heptulozonowy (DHA) oraz kwas borowy odpowiedzialny za tworzenie mostków boranowych [Kumar i in., 2023; Zdunek i in., 2021; Freitas i in., 2021].



Ryc. 2. Struktura wybranych polisacharydów naturalnych: (A) homoglukany (polimery glukozy o zróżnicowanych typach wiązań glikozydowych) oraz (B) pektyny zbudowane z różnych monosacharydów połączonych wiązaniami glikozydowymi typu α i β [na podstawie: Zheng i in., 2023].

Wśród domen pektynowych wyróżnia się również rzadziej występujące domeny, takie jak ksylogalakturenian (XG) oraz apiogalakturenian (AG), a także wymienia się w obrębie łańcuchów bocznych obecność innych fragmentów składających się z cukrów obojętnych, w tym: galaktan, arabinogalaktan oraz ksylogalaktan [Zdunek i in., 2021; Zheng i in., 2023; Roy i in., 2023]. Wspomniane domeny współistnieją w obrębie jednej cząsteczki.

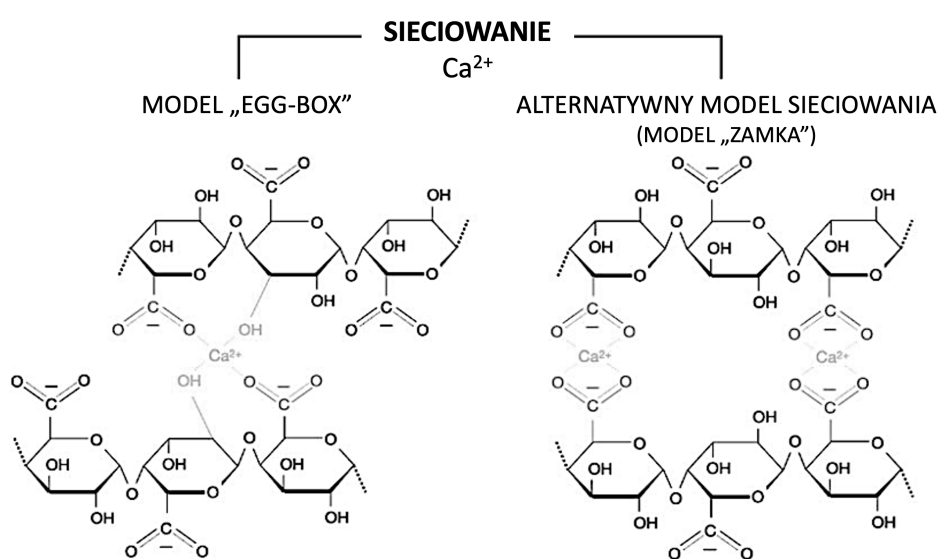
Jednym z podstawowych czynników umożliwiających klasyfikację pektyn jest stopień estryfikacji GalA (ang. *degree of esterification*, DE lub ang. *degree of methylesterification*, DM). Parametr ten określa stosunek ilości podjednostek GalA w formie zestryfikowanej, do całkowitej ilości podjednostek GalA posiadających wolne reszty $-\text{COOH}$ w łańcuchu głównym pektyny [Freitas i in., 2021]. Na podstawie tego kryterium wyróżnia się dwie grupy pektyn o różnych zastosowaniach: pektyny wysokometylowane (ang. *high-methoxyl*, $\text{HM} > 50\%$) oraz pektyny niskometylowane (ang. *low-methoxyl*, $\text{LM} < 50\%$) [Marić i in., 2018; Chandel i in., 2022].

Złożoność strukturalna pektyn oraz ich silne powiązanie ze składnikami ściany komórkowej sprawiają, że ich efektywna separacja stanowi istotne wyzwanie technologiczne.

1.2. Struktura pektyn a ich właściwości funkcjonalne

Właściwości funkcjonalne i biologiczne pektyn są ściśle związane z ich strukturą molekularną, obejmującą DE, M_w , ilość GalA oraz kompozycję pozostałych monosacharydów w cząsteczce. Elementy te zależą od rodzaju użytej biomasy, z której pektyny zostały wydrebnione, a także zastosowanej metody ekstrakcji oraz jej parametrów procesowych [Hadidi i in., 2025].

Stopień estryfikacji pektyny determinuje jej właściwości żelujące. Pektyny HM wymagają do tego celu środowiska o $pH < 3,5$ oraz dużego stężenia tych makromolekuł. Ponadto wyższy stopień estryfikacji pektyn sprzyja żelowaniu w przedziale wyższych temperatur [Pińkowska i Złocińska, 2014]. Z kolei pektyny LM do procesu sieciowania wymagają obecności jonów dwuwartościowych, głównie Ca^{2+} , a zjawisko żelowania zachodzi w środowisku o wartościach pH w przedziale 2-6. Proces ten opiera się na tworzeniu mostków jonowych pomiędzy wolnymi grupami karboksylowymi, szczególnie w regionach HG o niskim stopniu estryfikacji, zgodnie z modelem „egg-box” [Marić i in., 2018; Obomighie i in., 2025]. Wraz z malejącym stopniem zestryfikowania pektyn LM do zajścia zjawiska żelowania wymagana jest wyższa temperatura i środowisko o charakterze bardziej kwasowym [Pińkowska i Złocińska, 2014].



Ryc. 3. Struktura homogalakturenianu oraz mechanizmy jego sieciowania podczas żelowania pektyn [Obomighie i in., 2025].

Pektyny HM oraz LM prezentują odmienne właściwości użytkowe. Pektyny HM zazwyczaj wykorzystywane są w przemyśle spożywczym jako środki żelujące, stabilizatory, emulgatory oraz zagęszczacze, natomiast pektyny LM, ze względu na zdolność do wiązania wody w procesie żelowania, znajdują zastosowanie jako m.in. zamienniki tłuszczu w różnych produktach spożywczych [Marić i in., 2018]. Istotnym czynnikiem wpływającym na stopień DE, oprócz temperatury oraz czasu prowadzenia ekstrakcji, jest środowisko medium ekstrakcyjnego. Wyodrębnianie pektyn w warunkach alkalicznych prowadzi do obniżenia DE na skutek reakcji saponifikacji [Cho i in., 2019]. DE pektyn jest odwrotnie skorelowany ze stopniem amidacji. Modyfikacja pektyn LM za pomocą amoniaku ma na celu ulepszenie ich właściwości żelujących [Pińkowska i Złocińska, 2014].

Wysoki udział GalA, sprzyjający dominacji liniowych regionów HG w cząsteczkach pektyn, zwiększa liczbę dostępnych grup karboksylowych zdolnych do utworzenia mostków jonowych [Guo i in., 2024]. Natomiast obecność grup acetylowych w pozycjach O-2 i O-3 podjednostek cukrowych uniemożliwia ściśle upakowanie łańcuchów HG, co utrudnia tworzenie interakcji i osłabia wytrzymałość mechaniczną żelu [Azzouzi i in., 2023].

Oprócz właściwości żelujących, struktura pektyn determinuje również ich zachowanie w układach koloidalnych, w tym zdolność emulgowania [Chen i in., 2025]. Właściwości te zależą od obecności regionów rozgałęzionych (RG-I) oraz kowalencyjnie związanych frakcji białkowych [Zie i in., 2025]. Grupy acetylowe oraz metylowe w pektynach zmniejszają ich polarność, co sprzyja stabilizacji emulsji typu (O/W) [Chen i in., 2025].

Masa cząsteczkowa (M_w) pektyn wpływa na lepkość roztworu oraz wytrzymałość mechaniczną żelu. Dłuższe łańcuchy polisacharydowe posiadają w swojej strukturze więcej potencjalnych miejsc wiążących, co przekłada się na większą stabilność takiego układu [Ripoll i in., 2023].

Wykazano, że pektyny mogą przejawiać różnorodne właściwości biologiczne, w tym działanie antyoksydacyjne, immunomodulujące, prebiotyczne [Minzanova i in., 2018]. Aktywność przeciwutleniająca pektyn wynika między innymi z obecności reszt GalA, których grupy $-COOH$ oraz $-OH$ uczestniczą w reakcjach z wolnymi rodnikami [Li i in., 2023]. Właściwości prebiotyczne pektyn przypisywane są głównie obecności domen RG-I [Gu i in., 2023], natomiast pektyny o niskim stopniu metylowania wykazują działanie

przeciwzapalne w obrębie przewodu pokarmowego [Wu i in., 2022]. Ponadto udowodniono, że pektyny LM o mniejszej masie cząsteczkowej posiadają właściwości inhibitorowe wobec α -amylazy i α -glukozydazy, enzymów odpowiedzialnych za hydrolizę wiązań glikozydowych i uwalniania Glc do przewodu pokarmowego, która następnie jest wchłaniana do krwioobiegu [Ren i in., 2025]. Pektyny wysokometoksyłowe o średniej Mw potrafią skutecznie wiązać lipazę trzustkową, co przyczynia się m.in. do obniżania poziomu cholesterolu [Ren i in., 2025; Zaid i in., 2019; Tsirigotis-Maniecka i in., 2024].

Zdolność wiązania wody (WHC) oraz oleju (OHC) stanowią istotne cechy funkcjonalne pektyn. Duża ilość GaA w łańcuchu głównym, obecność licznych grup polarnych oraz ograniczony DE zwiększają zdolność pektyny do wiązania wody. Natomiast OHC wynika z obecności rozgałęzionych łańcuchów bocznych, komponentów białkowych oraz grup hydrofobowych. Pektyny o wysokim OHC znajdują zastosowanie jako stabilizatory emulsji (O/W) [Shafie i in., 2019; Huang i in., 2021].

1.3. Ekstrakcja pektyn z biomasy roślinnej

1.3.1. Konwencjonalne metody ekstrakcji pektyn i ich ograniczenia

W celu wyodrębnienia pektyn ze ścian komórkowych biomasy roślinnej opracowano szereg metod ekstrakcyjnych, z których najczęściej stosowane są techniki konwencjonalne oparte na działaniu podwyższonej temperatury oraz substancji chemicznych rozpuszczonych w środowisku wodnym.

Jedną z najpowszechniej stosowanych metod ekstrakcji pektyn z surowca roślinnego jest ekstrakcja wodą w podwyższonej temperaturze (ang. *hot-water extraction*, HWE). Stosowane układy rozpuszczalnikowe to również wodne roztwory kwasów organicznych i nieorganicznych (kwas solny, kwas cytrynowy, kwas azotowy, kwas siarkowy) oraz zasad (wodorotlenek sodu, wodorotlenek potasu) [Zheng i in., 2023; Riyamol i in., 2023]. Metoda ta posiada jednakże wiele ograniczeń, do których zalicza się długi czas prowadzenia procesu oraz wysokie zapotrzebowanie energetyczne. Charakteryzuje się również ograniczoną selektywnością, co może prowadzić do współekstrakcji innych składników z biomasy. Innym istotnym ograniczeniem tej metody są silnie korozyjne właściwości medium ekstrakcyjnego [Riyamol i in., 2023; Hadidi i in., 2025]. Z perspektywy przemysłowej wydajność takiego procesu jest często niewystarczająca.

Pomimo szerokiego zastosowania, metoda ta wiąże się z licznymi ograniczeniami, które istotnie wpływają na efektywność ekstrakcji oraz jakość uzyskiwanych produktów [Macias-Frotto i in., 2025; Arumuganainar i in., 2025].

Ważnym etapem otrzymywania pektyn jest operacja jednostkowa następująca po ekstrakcji, w której przeprowadza się precypitację nierozpuszczalnej w alkoholu frakcji o wysokim stopniu polarności (ang. *alcohol insoluble residue*, AIR), bogatej w polisacharydy, ale też w mono- i oligosacharydy. W tym etapie najczęściej stosuje się alkohol etylowy, oddzielając za jego pośrednictwem substancje takie jak np. polifenole i ich małowcząsteczkowe glikozydy. Ta operacja jednostkowa może również stanowić etap poprzedzający ekstrakcję [Hilz i in., 2005].

Warunki ekstrakcji znacząco wpływają na masę cząsteczkową (Mw), stopień estryfikacji (DE), strukturę oraz właściwości fizykochemiczne wyodrębnionych makrocząsteczek [Shafie i in., 2019; Hadidi i in., 2025]. Dobór odpowiedniego surowca, zastosowanie odpowiednich warunków pH, temperatury i czasu procesu ekstrakcji decyduje o rodzaju wyodrębnianych pektyn oraz o wydajności procesu. Należy zauważyć, że kwasowe środowisko sprzyja wysokiemu odzyskowi GalA (do ~83%) [Konrade i in., 2023], a w przypadku ekstrakcji prowadzonej w warunkach alkalicznych, pomimo relatywnie wysokiej wydajności tego procesu, udział GalA w produkcie końcowym ulega obniżeniu. Ponadto dochodzi do alkalolitycznej degradacji łańcuchów polisacharydowych, co skutkuje mniejszą masą cząsteczkową wyodrębnianych na tej drodze pektyn [Li i in., 2024; Guo i in., 2024] (Tabela 1).

Tabela 1. Konwencjonalne metody ekstrakcji pektyn z biomasy owocowej rodzimych owoców jadalnych.

Metoda ekstrakcji	Biomasa roślinna	Warunki ekstrakcji		Charakterystyka produktu						Literatura
		Medium ekstrakcyjne	Parametry procesu	Y (%)	GalA (%)	UA (%)	DE (%)	Mw (kDa)	inne	
MAC	czerwona porzeczka (owoc)	H ₂ O	RT, 1h, 1:5 w/v	-	60,5	-	57,1	1020	-	Pancerz i in., 2021
HWE	rokitnik (owoc)	H ₂ O	80°C, 4 h	6,1	-	-	-	26,2	-	Shen i in., 2021
	rokitnik (owoc)	H ₂ O	80°C, 4 h, 1:20 w/v	4,7	49,7	-	-	281,5	-	Li i in., 2024
	rokitnik (owoc)	H ₂ O	80°C, 2 h, 1:77 g/ml	17,6	-	-	-	-	-	Yang i in., 2024a
	czarna porzeczka (owoc)	H ₂ O	80°C, 2h; 1:30 w/v	3,6	-	-	-	-	-	Xu i in., 2016
	truskawka (owoc)	H ₂ O	90°C, 3h; 1:20 w/v	3,8 - 5,9	10,94 -16,24	6,88 - 11,63	-	574 – 643	-	Sun i in., 2025a
Kwasowa HWE	rokitnik (owoc)	0,1 M HCl	60°C, 3 h, 1:20 w/v	3,8	63,05	-	-	289,8	-	Li i in., 2024
	wytłoki jabłkowe	0,1 M CA/ cytrynian sodu, pH 5,0	85°C, 3 h, 1:25 w/v	6,1	-	-	42,3	208	HG = 70,3% RG-I = 20,8%	Guo i in., 2024
	śliwka (owoc)	0,1 M CA, pH 1,0-1,5	90°C, 60 min, 1:2 w/v	9,6	47,2	-	45,2	-	EW = 532 g/mol	Konrade i in., 2023
	czerwona porzeczka (owoc)			6,5	83,6	-	57,1	-	EW = 717 g/mol	
	czarna porzeczka (owoc)			11,9	69,2	-	54,7	-	EW = 465 g/mol	
	agrest (owoc)			7,01	74,9	-	57,1	-	EW = 896 g/mol	
	wiśnie (owoc)			4,47	59,1	-	64,1	-	EW = 1390 g/mol	
	truskawka (owoc)	20% r-r CA, pH 3,0	58°C, 1h, 1:4 w/v	7,4	57,0	-	86	-	EC = 33,3% ES = 80,0%	Muñoz-Almagro i in., 2021
	czerwona porzeczka (owoc)			8,8	50,7	-	74	-	EC = 6,7% ES = 80,0%	
	jeżyna (owoc)			7,7	51,8	-	72	-	EC = 33,3% ES = 98,8%	
	malina (owoc)			8,8	60,2	-	66	-	EC = 33,3% ES = 90,0%	
Alkaliczna HWE	rokitnik (owoc)	0,1 M NaOH	60°C, 3 h, 1:20 w/v	6,1	29,24	-	-	6,4	-	Li i in., 2024
	wytłoki jabłkowe	0,1 M CA / cytrynian sodu, pH 8,0	85°C, 3 h, 1:25 w/v	11,7	-	-	34,7	219	HG = 40,1% RG-I = 47,2%	Guo i in., 2024

Otrzymywanie pektyn na skalę przemysłową opiera się głównie na wykorzystaniu dwóch surowców odpadowych - skórek cytrusowych oraz wytlóków jabłkowych. Standardowy ciąg procesowy składa się z następujących etapów:

- przygotowanie wstępne surowca: mycie, blanszowanie, w tym inaktywacja enzymów, np. pektynoesterazy oraz suszenie biomasy, aby zapewnić jej stabilność i ograniczyć rozwój mikroorganizmów;
- ekstrakcja właściwa: hydroliza kwasowa w roztworach kwasów mineralnych, np. HCl , HNO_3 , H_2SO_4 , prowadzona w reaktorach wsadowych z ciągłym mieszaniem, przy pH w przedziale 1-3, w temperaturze około 80-100°C, gdzie proces prowadzony jest zazwyczaj przez 30-180 min, w zależności od rodzaju surowca;
- separacja i klarowanie: filtracja lub wirowanie;
- zagęszczanie: odparowywanie w warunkach obniżonego ciśnienia;
- wytrącanie AIR: z roztworu przy użyciu alkoholu etylowego lub izopropylowego;
- oczyszczanie: przemywanie osadu pektyn alkoholem w celu zredukowania zanieczyszczeń, w tym pozostałości użytego kwasu, rozpuszczalnych w alkoholu substancji takich jak polifenole;
- suszenie: w suszarkach rozpyłowych lub bębnowych oraz mielenie i przesiewanie w celu uzyskania produktu końcowego w postaci proszku o kontrolowanym rozmiarze cząstek [Assifaoui, 2025; Haque i in., 2025; Saydam i in., 2026; Xiang i in., 2024].

Pomimo szerokiego zastosowania przemysłowego, metody konwencjonalne mogą prowadzić do niekontrolowanych zmian strukturalnych ekstrahowanych polisacharydów, co bezpośrednio wpływa na właściwości funkcjonalne.

1.3.2. Alternatywne metody ekstrakcji pektyn

W odpowiedzi na ograniczenia metod konwencjonalnych rozwijane są alternatywne techniki ekstrakcji, zgodne z założeniami zielonej chemii. Z perspektywy przemysłowej kluczowe jest doskonalenie procesów, w szczególności pod względem bezpieczeństwa środowiskowego, redukcji kosztów, poprawy wydajności oraz jakości uzyskanego produktu. Różnorodność procedur stosowanych do wyodrębniania pektyn z surowców owocowych jest szeroko udokumentowana w literaturze. W ostatnich latach dużym

zainteresowaniem cieszą się technologie oparte o rozwiązania z zakresu zielonej chemii, wpisujące się w ideę zrównoważonego rozwoju. Do alternatywnych metod ekstrakcji zalicza się ekstrakcję:

- wspomaganą ultradźwiękami (UAE),
- wspomaganą mikrofalami (MAE),
- wspomaganą ogrzewaniem Omowym (OHAE),
- wspomaganą enzymatycznie (EAE),
- gorącą wodą w podwyższonej temperaturze i w podwyższonym ciśnieniu (PHWE),
- wodą w stanie podkrytycznym (SWE),
- cieczą w stanie nadkrytycznym (SFE),
- cieczami jonowymi (IL),
- mieszaninami głęboko eutektycznymi (DES),
- naturalnymi mieszaninami głęboko eutektycznymi (NADES),
- mieszaninami głęboko eutektycznymi wspomaganymi czynnikiem fizycznym – ultradźwiękami lub mikrofalami [Riyamol i in., 2023; Ejaz i in., 2023; Tsirigotis-Maniecka i in., 2024; Saravanan i Jeevitha, 2024; Hadidi i in., 2025; Nayak i in., 2026; Gurev i in., 2023].

Metody te różnią się mechanizmem działania, jednak ich wspólnym celem jest zwiększenie wydajności oraz skrócenie czasu prowadzenia procesu ekstrakcji, a także podniesienie jakości produktu. Oprócz zastosowania czynników fizycznych i biologicznych, istotnym kierunkiem rozwoju nowoczesnych metod ekstrakcji jest wykorzystanie nowych typów rozpuszczalników o zadanych właściwościach.

Szczególnie interesującą grupę nowoczesnych rozpuszczalników do ekstrakcji polisacharydów stanowią ciecze jonowe oraz mieszaniny głęboko eutektyczne (DES). Wśród nich wyróżnia się naturalne mieszaniny głęboko eutektyczne (NADES), charakteryzujące się wysoką zdolnością do rozpuszczania związków bioaktywnych, biodegradowalnością oraz ograniczonym wpływem na środowisko [Thamer i in., 2026; Freitas i in., 2025].

1.3.2.1. Ciecze jonowe (IL)

Do intensywnie badanych grup nowoczesnych rozpuszczalników należą ciecze jonowe (ang. *ionic liquids*, ILs). Stanowią one układ oddziałujących ze sobą soli organicznych o niskiej temperaturze topnienia ($<100^{\circ}\text{C}$). Każda IL składa się z dużego, asymetrycznego kationu organicznego, np. kationu imidazoliowego, pirydyniowego lub amoniowego, oraz anionu organicznego lub nieorganicznego [Smith i in., 2014]. Asymetria jonów w IL prowadzi do powstawania słabszych sieci krystalicznych, co przekłada się na niską temperaturę topnienia tego rozpuszczalnika [Olasupo i in., 2026]. Ciecze jonowe mogą być projektowane pod kątem określonej polarności i selektywności w zależności od zastosowania, a w kontekście ekstrakcji umożliwiają ukierunkowane wyodrębnianie składników bioaktywnych [Dai i in., 2013]. Charakteryzują się niską prężnością par, co sprawia, że są atrakcyjną alternatywą dla lotnych rozpuszczalników organicznych. Wykazują odporność termiczną oraz chemiczną. Ponadto właściwości IL mogą być modyfikowane poprzez dobór odpowiednich jonów do układu [Olasupo i in., 2026; Alreshidi i in., 2025; Li i in., 2026]. Rozwój badań nad cieczami jonowymi doprowadził do wyróżnienia ich czterech generacji [Alreshidi i in., 2025]:

- I. klasyczne IL - nielotne, wysoce stabilne rozpuszczalniki stanowiące alternatywę dla rozpuszczalników organicznych, wysoce toksyczne i słabo biodegradowalne;
- II. IL o ukierunkowanych właściwościach chemicznych, wykorzystywane jako zielone rozpuszczalniki i katalizatory;
- III. bio-IL - układy oparte na naturalnych składnikach, skoncentrowane na biokompatybilności, biodegradowalności oraz niskiej toksyczności;
- IV. inteligentne oraz funkcjonalne IL – zdolne do adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych (temperatura, światło, pole magnetyczne).

Ciecze jonowe wykorzystywane są w różnych gałęziach przemysłu. Są szeroko stosowane w elektrochemii dzięki wysokiemu przewodnictwu jonowemu, m.in. w procesach katalizy, ekstrakcji i separacji, przetwarzania biomasy oraz syntezie organicznej [Li i in., 2026; Pereira i in., 2026; Alreshidi i in., 2025]. W przypadku ekstrakcji polisacharydów mechanizm działania IL opiera się na zaburzeniu rozbudowanej sieci wiązań wodorowych w ścianie komórkowej, co ułatwia ich rozpuszczanie oraz wyodrębnianie [Norfarhana i in., 2024].

Ciecze jonowe stosowane są również do otrzymywania pektyn. Przykładem są IL, bazujące na kationach choliny $[\text{Ch}]^+$, imidazoliowych $[\text{C}_2\text{C}_1\text{im}]^+$ lub $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}]^+$ oraz anionach leucynianowym $[\text{Leu}]^-$, chlorkowym $[\text{Cl}]^-$, bromkowym $[\text{Br}]^-$ czy tetrafluoroboranowym $[\text{BF}_4]^-$, które zostały użyte do pektyn z biomasy cytrusowej. Ekstrakcja IL wspomagana mikrofalami znalazła zastosowanie w otrzymywaniu pektyn z wydajnością sięgającą 24,7% [Guolin i in., 2012; Wang i in., 2016].

Chlorek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy ($[\text{Bmim}]\text{Cl}$) uznawany jest za jeden z najbardziej efektywnych układów IL, co wynika z jego zdolności do tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy anionem chlorkowym a grupami hydroksylowymi pektyn [Guolin i in., 2012]. Do grupy bio-IL, badanych pod kątem zdolności do ekstrakcji pektyn, zalicza się też układy oparte na resztach aminokwasowych, takie jak alaninian choliny ($[\text{Ch}][\text{Ala}]$), serynian choliny ($[\text{Ch}][\text{Ser}]$), cysteinian choliny ($[\text{Ch}][\text{Cys}]$), prolinian choliny ($[\text{Ch}][\text{Pro}]$), asparaginian choliny ($[\text{Ch}][\text{Asp}]$), walinian choliny ($[\text{Ch}][\text{Val}]$) oraz fenyloalaninian choliny ($[\text{Ch}][\text{Phe}]$) [Wang i in., 2016]. IL stosowane są też w układach dwufazowych z fosforanem potasu [Ventura i in., 2017].

Mimo korzystnych właściwości fizykochemicznych, ciecze jonowe nie są pozbawione wad ograniczających ich praktyczne zastosowanie. Główne wady IL to głównie duże koszty produkcji i trudności w recyklingu oraz utylizacji. IL mogą też wykazywać istotną toksyczność. Wszystkie te problemy ograniczają ich opłacalność ekonomiczną [Olasupo i in., 2026]. Stanowi to przesłankę do poszukiwania rozpuszczalników o niższej toksyczności, tańszych i bardziej przyjaznych środowisku.

1.3.2.2. Mieszaniny głęboko eutektyczne (DES)

W odpowiedzi na ograniczenia cieczy jonowych rozwinięto nową klasę rozpuszczalników, określanych jako mieszaniny głęboko eutektyczne (DES, ang. *deep eutectic solvents*). Są one przykładem mieszanin odpowiednio dobranych składników, które tworzą układ o podobnych do cieczy jonowych właściwościach fizycznych oraz zachowaniu fazowym [Dai i in., 2013]. DES to mieszaniny dwóch lub więcej składników, które po połączeniu w odpowiednim stosunku molowym tworzą fazę ciekłą o temperaturze topnienia niższej, niż w przypadku jej poszczególnych komponentów [Huang i in., 2019; Chandra i in., 2026].

Mieszaniny głęboko eutektyczne składają się z akceptora wiązania wodorowego (HBA) oraz donora wiązania wodorowego (HBD), które tworzy się pomiędzy

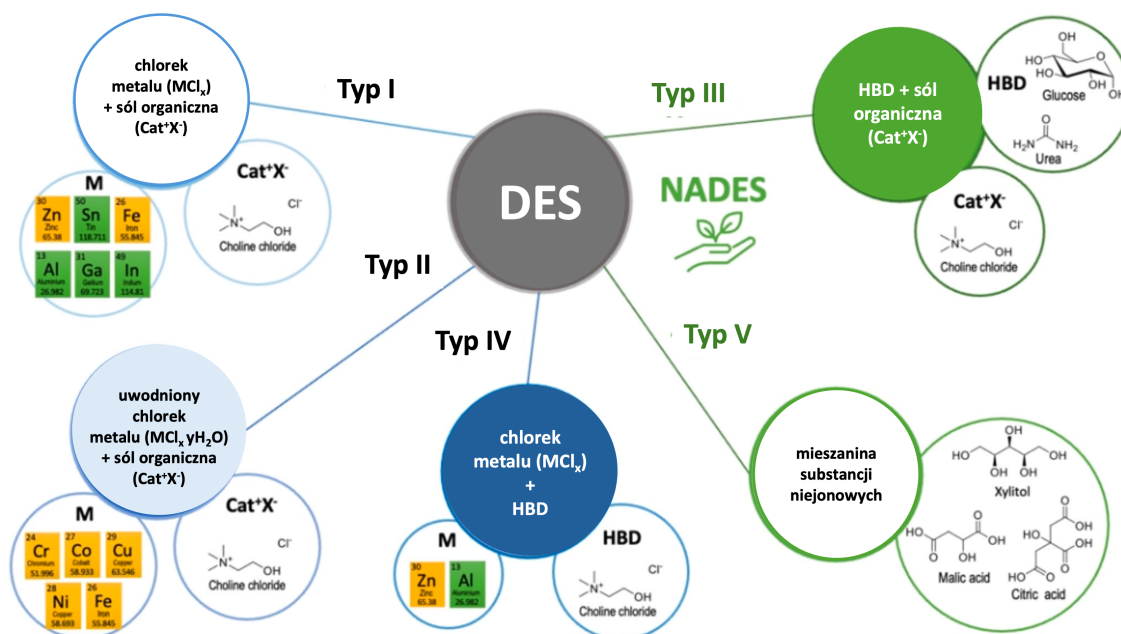
składnikami DES. Powstanie układu międzycząsteczkowych oddziaływań wodorowych prowadzi do delokalizacji ładunku elektrycznego i zakłócenia struktury sieci krystalicznej tak powstałej cieczy, co wpływa na obniżenie temperatury topnienia układu [Luque-Uria i in., 2025].

DES zostały podzielone na 4 kategorie w zależności od rodzaju składników [Zdanowicz i in., 2018]:

- typ I: sól organiczna + sól metalu (bezwodna),
- typ II: sól organiczna + hydrat soli metalu,
- typ III: sól organiczna + HBD,
- typ IV: chlorek metalu + HBD.

Oprócz tego wyróżnia się także V typ, który obejmuje mieszaniny składające się wyłącznie z substancji niejonowych [Luque-Uria i in., 2025].

Zjawisko formowania DES zostało po raz pierwszy opisane przez Abbott i in. (2003), którzy wykazali, że mieszanina chlorku choliny (ChCl) i mocznika (1:2), pomimo wysokich temperatur topnienia poszczególnych składników (odpowiednio 302°C oraz 133°C), tworzy ciecz cechującą się właściwościami typowymi dla rozpuszczalników, której temperatura topnienia nie przekracza 12°C.



Ryc. 4. Klasyfikacja mieszanin głęboko eutektycznych [Luque-Uria i in., 2025].

Mechanizm ekstrakcji polisacharydów z wykorzystaniem DES jest analogiczny do obserwowanego dla cieczy jonowych. DES penetrują ścianę komórkową surowca

roślinnego i poprzez zaburzenie rozbudowanej sieci wiązań wodorowych między składnikami ściany zwiększają rozpuszczalność polisacharydów, co przekłada się na zwiększoną wydajność ekstrakcji.

W układach głębokich rozpuszczalników eutektycznych (DES) funkcję HBA najczęściej pełnią czwartorzędowe sole amoniowe, w szczególności chlorek choliney (ChCl), jak również chlorek chlorocholiney, bromek choliney, mleczan choliney, chlorek allilotrimetyloamoniowy, chlorek tetrametyloamoniowy (TMAC), bromek i chlorek tetrabutylamoniowy (TBAB, TBAC) oraz bromek tetraetyloamoniowy (TEAB). Do grupy HBA zalicza się także betainę oraz sole nieorganiczne w formie bezwodnej lub w postaci hydratów, np. ZnCl_2 , FeCl_3 , KBr , $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Donorami wiązania wodorowego (HBD) jest m.in.: mocznik, glicerol, glukoza, acetamid oraz glikol etylenowy [Huang i in., 2019; Morais i in., 2020].

Odpowiedni dobór składników DES determinuje ich polarność, lepkość i zdolność do solubilizacji ścian komórkowych surowca. Układy zawierające sole nieorganiczne metali (HBA) wykazują wysoką efektywność uwalniania polisacharydów z matrycy roślinnej, jednakże ich zastosowanie w ekstrakcji pektyn jest ograniczone, głównie na rzecz chlorku choliney. DES oparte na solach nieorganicznych, w tym: ZnCl_2/LA (1:10), kwas akrylowy/ChCl/ $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, wykorzystywane są głównie w przetwarzaniu lignocelulozy [Bai i in., 2024; Wu i in., 2024]. Układy ChCl/mocznik (1:2), ChCl/ ZnCl_2 (1:2), ChCl/glikol etylenowy (1:2) stosowano do przetwarzania polisacharydów, w tym celulozy, skrobi oraz pektyn [Zdanowicz i in., 2018; Morais i in., 2020].

Ekstrakcja pektyn z wycieków jabłkowych oraz odpadów cytrusowych z zastosowaniem DES/NADES jest dobrze udokumentowana w literaturze naukowej. Wyodrębnianie pektyn z biomasy cytrusowej przy wykorzystaniu układów takich jak LA/Glc (5:1), LA/glicyna (9:1), fruktoza/CA (1:1), ChCl/CA (1:1), ChCl/OA (1:1), ChCl/glicerol (1:2), ChCl/Glc (5:2), ChCl/kwas jabłkowy (1:1), ChCl/kwas malonowy (1:1), z opcjonalnym dodatkiem wody, prowadzi do wyodrębniania pektyn w szerokim przedziale wydajności, bo 7,4 – 96,0% wag., przy czym najwyższą wydajność otrzymano przy zastosowaniu NADES złożonego z ChCl/Glc (5:2) oraz układu ChCl/kwas malonowy (1:1). Uzyskane w ten sposób pektyny charakteryzował wysoki stopień estryfikacji [Liew i in., 2018; Elgharbawy i in., 2019].

Zastosowanie NADES typu ChCl/CA (1:2), rozcieńczonych wodą w proporcji 1:30 (w/v), do ekstrakcji pektyn z wycieków jabłkowych oraz skórek limonki skutkowało

produktami ($DE > 85\%$) uzyskanymi z wysoką wydajnością, odpowiednio 25% i 37% wag. Oba procesy wspomagano ultradźwiękami, a proces ten prowadzono przez 40 min. [Li i in., 2026; Rai i in., 2025]. Dodatkowo tak wyodrębnione pektyny jabłkowe wykazywały wysoką zdolność żelującą.

DES na bazie betainy oraz CA (1:2) umożliwiła wyodrębnienie pektyn ze skórki mango oraz grejpfruta (odpowiednio 27,6% i 36,5%), o wysokim DE (83,4% i 66,1%) oraz dużej masie cząsteczkowej ($M_w \sim 782$ kDa i ~ 670 kDa) [Chen i in., 2022; Lin i in., 2024]. W przypadku innych surowców, np. kiwi, z którego wydzielono pektyny stosując NADES typu ChCl/glikol etylenowy (1:3), wydajność okazała się być niższa (ok. 9,6% wag.) [Wu i in., 2024a].

Prace doświadczalne opisujące ekstrakcję pektyn z owoców rodzimych, w tym owoców jagodowych, z wykorzystaniem rozpuszczalników DES są ograniczone. Wang i in. (2025c) w wyniku ekstrakcji ChCl/OA (1:2) z wyłoków żurawinowych uzyskali pektynę HM o udziale GalA bliskim 80%, przy wydajności procesu na poziomie 5,03%. Zastosowanie dodatkowego czynnika fizycznego, jakim były ultradźwięki, nie wpływało istotnie na charakterystykę chemiczną produktu, jednak efektywność procesu nieznacznie wzrosła (5,53%).

Ekstrakcja z użyciem DES może wpływać na obniżenie masy cząsteczkowej pektyn względem konwencjonalnej ekstrakcji wodnej. Zaobserwowano też, że DES o charakterze kwasowym często prowadzi do uzyskania pektyny typu HM [Wang i in., 2025c; Chen i in., 2022; Lin i in., 2024], podczas gdy DES o pH alkalicznym sprzyja wyodrębnianiu pektyn niskometoksyloowanych (LM) [Zhang i in., 2025].

DES znajdują zastosowanie m.in. w chemii i biotechnologii, jako rozpuszczalniki, media ekstrakcyjne, katalizatory, a także w elektrochemii, analityce (chromatografia), nanotechnologii (nanomateriały), farmacji oraz biomedycynie [Zdanowicz i in., 2018].

DES charakteryzują się niskim kosztem produkcji, zdolnością do rozpuszczania biopolimerów, biodegradowalnością, niską toksycznością, możliwością regulacji polarności oraz zdolnością do recyklingu [Zdanowicz i in., 2018]. Stanowią zatem atrakcyjną alternatywę dla cieczy jonowych. Szczególną grupę w obrębie DES stanowią naturalne mieszaniny głęboko eutektyczne (NADES), które dzięki wykorzystaniu związków pochodzenia naturalnego wykazują jeszcze wyższy potencjał aplikacyjny w procesach ekstrakcji komponentów biomasy roślinnej.

1.3.2.3. Naturalne mieszaniny głęboko eutektyczne (NADES)

Naturalne mieszaniny głęboko eutektyczne (NADES, ang. *natural deep eutectic solvents*) jako podgrupa DES, składają się ze związków pochodzenia naturalnego, którymi mogą być: kwasy organiczne (np. kwas cytrynowy, kwas jabłkowy), poliole, aminokwasy (np. prolina), monosacharydy (np. Glc, Fru), czwartorzędowe sole amoniowe oraz inne metabolity pierwotne roślin [Jeliński i Cysewski, 2022; Chev  -Kools i in., 2025]. Przypuszcza się, że NADES, obok wody i lipidów, stanowi  trzecią faz  ciek   w komórkach roślinnych, co może wyja nia  mechanizmy biosyntezy oraz transportu cząstek o średniej polarności, które nie rozpuszczają się w wodzie czy tłuszczach [Dai i in., 2013; Choi i in., 2011]. Jednym z najczęściej przywoływanym przykt d w naturalnej mieszaniny g boko eutektycznej jest miód [Chev  -Kools i in., 2025].

Klasyfikacja NADES opiera się na ich składzie i obejmuje siedem kategorii:

- I. czwartorzędowa sól amoniowa (np. ChCl) + monosacharyd/poliol,
- II. czwartorzędowa sól amoniowa + kwas organiczny,
- III. aminokwas + polioli/kwas organiczny,
- IV. monosacharyd + kwas organiczny (np. $\text{Glc} + \text{CA}$),
- V. związek hydrofobowy + kwas tłuszczowy/terpen,
- VI. HBA pochodzenia naturalnego (np. betaina) + mocznik/amid (np. acetamid),
- VII. NADES z dodatkiem wody w celu zmniejszenia lepkości układu lub modyfikacji jego polarności [Roshni i in., 2026].

Układy NADES wykazują wysoką biokompatybilność oraz potencjalnie niski wpływ środowiskowy, wynikający z niskiej toksyczności, co otwiera im drog  do przemysłu spożywczego, kosmetycznego i farmaceutycznego [Chev  -Kools i in., 2025].

Przygotowanie rozpuszczalników g boko eutektycznych przeprowadzane jest najczęściej: poprzez rozcieranie, mieszanie w temperaturze pokojowej lub w podwyższonej, liofilizacj , mieszanie w podwyższonej temperaturze pod zmniejszonym ciśnieniem, przykt dowo przy użyciu wyparki rotacyjnej oraz z wykorzystaniem ultradźwięków lub mikrofal [Satija i in., 2024; Hadidi i in., 2025].

Polarność oraz lepkość nale   do kluczowych właściwości NADES. Odnotowano, że rozpuszczalniki te, przygotowane na bazie kwasów organicznych wykazują polarność zbliżoną do wody, natomiast mieszaniny oparte na polioliach, w tym monosacharydach są mniej polarne. Parametr ten można precyzyjnie modyfikowa  poprzez zmian 

składników, ich stosunków molowych oraz dodatek wody, dzięki czemu możliwe staje się dopasowanie NADES do wybranych zastosowań. Ponadto polarne NADES często charakteryzują się wyższą lepkością niż ich niepolarne odpowiedniki. Lepkość można kontrolować poprzez podniesienie temperatury w procesie ekstrakcji, zmianę proporcji składników rozpuszczalnika lub wprowadzenie trzeciego składnika, przykładowo wody lub glicerolu [Dai i in., 2013; Chevé-Kools i in., 2025]. Woda może stanowić integralną część struktury NADES poprzez udział w sieci wiązań wodorowych, jednak jej nadmierna ilość może prowadzić do osłabienia tych oddziaływań, a w konsekwencji skutkować zmianą właściwości fizykochemicznych rozpuszczalnika. Z tego względu należy uwzględnić ten aspekt podczas projektowania układu ekstrakcyjnego [Luque-Uria i in., 2025].

Szeroki zakres możliwych kombinacji HBA oraz HBD (Tabela 2, Tabela 3) umożliwia projektowanie NADES pod względem wybranych właściwości fizykochemicznych.

Tabela 2. Przykładowe układy akceptorów (HBA) oraz donorów (HBD) wiązania wodorowego w mieszaninach eutektycznych do przetwarzania polisacharydów [Dai i in., 2013; Smith i in., 2014; Zdanowicz i in., 2018; Huang i in., 2019; Satija i in., 2024; Hadidi i in., 2025; Sahin i in., 2026].

HBA	HBD
alanina	kwas mlekowy
betaina	betaina
chlorek choliny	glicerol
glukoza	kwas winowy
kwas cytrynowy	kwas jabłkowy
kwas jabłkowy	kwas szczawiowy
kwas mlekowy	ksylitol
kwas winowy	kwas cytrynowy
prolina	glukoza
seryna	mocznik
octan choliny	kwas malonowy
	mannoza
	kwas benzoesowy
	glikol etylenowy
	kwas adypinowy
	1,1-dimetylomocznik
	tiomocznik
	acetamid

Obok betainy, proliny, alaniny czy glicyny, najczęściej stosowanym HBA jest chlorek choliny, głównie ze względu na niski koszt, dużą dostępność, niską toksyczność i jego wysoką biodegradowalność. Aż około 93% ChCl ulega biodegradacji w przeciągu 14 dni [Zdanowicz i in., 2018]. Ekstrakcja pektyn jest szczególnie efektywna w układach

o obniżonej wartości pH [Chen i in., 2021; Imran i in., 2026]. Kwas cytrynowy jako tani, łatwo dostępny, nietoksyczny oraz wysoce polarny kwas organiczny, posiadający trzy grupy karboksylowe, wykazuje wysoką zdolność do formowania NADES, co uzasadnia jego zastosowanie jako HBD, szczególnie do wyodrębniania pektyn [Mazurek-Hołys i in., 2026].

Tabela 3. Przykładowe układy HBA-HBD w rozpuszczalnikach NADES stosowanych do przetwarzania polisacharydów [Dai i in., 2013; Smith i in., 2014; Zdanowicz i in., 2018; Huang i in., 2019; Satija i in., 2024; Hadidi i in., 2025; Sahin i in., 2026].

HBA	HBD
chlorek cholinyl	glicerol, mocznik, glikol etylenowy, glukoza, kwas organiczny, np. kwas szczawiowy, kwas cytrynowy, kwas jabłkowy, kwas mlekowy
betaina	kwas cytrynowy, kwas mlekowy, glikol etylenowy, maltoza, glukoza, ksylitol, sorbitol, mocznik
sacharyd (dualna natura - HBA/HBD)	glukoza, fruktoza, sacharoza ± woda/kwas organiczny
aminokwas , np. prolina, glicyna	kwas organiczny/poliol

W literaturze naukowej przedstawiono liczne przykłady niekonwencjonalnych metod ekstrakcji pektyn z biomasy owocowej. Zestawienie przykładowych metod alternatywnych względem metod tradycyjnych (Tabela 4) wskazuje na istotne różnice w charakterystyce uzyskanych pektyn, obejmujące masę cząsteczkową (Mw), stopień estryfikacji (DE) oraz ilość GalA w łańcuchu głównym. Metody MAE, UAE oraz EAE umożliwiają skrócenie czasu ekstrakcji, natomiast zastosowanie rozpuszczalników DES i NADES sprzyja zwiększeniu selektywności procesu. Zastosowanie DES, NADES oraz metod łączonych wiązało się z wyższą wydajnością procesu. Masa cząsteczkowa (Mw) uzyskanych pektyn obejmowała szeroki zakres (30 - 8,3x10⁵ kDa), przy czym pektyny otrzymane z wykorzystaniem NADES zazwyczaj charakteryzują się większymi wartościami Mw. Intensywność procesu ekstrakcji wpływała na stopień degradacji łańcuchów polisacharydowych. Zastosowanie układów NADES często prowadzi do uzyskania produktów o większej ilości GalA, co sugeruje większą selektywność procesu względem tego składnika. Wybór metody ekstrakcji powinien być dokonywany w oparciu o założenia dotyczące oczekiwanej charakterystyki produktu końcowego.

Tabela 4. Alternatywne metody ekstrakcji pektyn z biomasy owoców rodzimych.

Metoda ekstrakcji	Biomasa roślinna	Warunki ekstrakcji		Charakterystyka produktu						Literatura
		Medium ekstrakcyjne	Parametry procesu	Y (%)	GalA (%)	UA (%)	DE (%)	Mw (kDa)	inne	
MAE	rokitnik (owoc)	H ₂ O	85°C, 1:10 w/v, 600 W, 6 min	0,26	-	-	-	33,6	-	Wei in., 2019
	rokitnik	EtOH/K ₂ HPO ₄	61°C, 1:77 w/v, 625W, 12 min	28,55	42,26	-	-	820	-	Yang i in., 2024a
	czarna porzeczka (owoc)	H ₂ O	41 min, 1:31 g/ml, 414 W	10,59	6,55	26,17	-	1990	-	Yang i in., 2020
	wytłoki wiśniowe	r-r CA, pH 1,0	1:20 w/v, 300 s, 800 W	14,65	26,40	72,90	68	~ 473	-	Hosseini i in., 2020
MA-ATPS	czarna porzeczka	EtOH/ (NH ₄) ₂ SO ₄ (26,75 %/18,98 %)	60,5°C, 10 min, 587 W, 1:58,5 w/v	55,73 (całkowita)	11,2-19,4	12,5-20,3	-	3,5-4,2 x10 ⁴	Gal>Ara>Man/GalA>Glc/Rha	Yang i in., 2024
UAE	rokitnik (owoc)	EtOH/K ₂ HPO ₄	61°C, 1:77 w/v, 400 W, 30 min	26,13	-	-	-	-	-	Yang i in., 2024a
	rokitnik (owoc)	H ₂ O	73°C, 1:20 w/v, 22 min	8,91	-	0,24	-	-	-	Bao i in., 2024
	rokitnik (owoc)	H ₂ O	8°C, 1:20 w/v, 500 W, 60 min	6,05	52,6	-	-	244,6	-	Li i in., 2024
	truskawka (owoc)	20% r-r CA, pH 3,0	58°C, 1h, 1:4 w/v, 45 kHz	8,9	56,7	-	87	-	EC = 33,3% ES = 90,0%	Muñoz-Almagro i in., 2021
	czerwona porzeczka (owoc)			8,1	51,5	-	86	-	EC = 23,3% ES = 80,5%	
	jeżyna (owoc)			8,4	65,3	-	78	-	EC = 33,3% ES = 90,0%	
	malina (owoc)			10,	67,1	-	71	-	EC = 33,3% ES = 80,0%	
EAE	truskawka (owoc)	celulaza w 0,1 M roztworze octanu sodu, pH 5,0;	40°C, 90 min, 1:20 w/v; inkubacja przy stałym wytrząsaniu 200 obr./min	4,1	73,0	-	22	-	EC = 13,3% ES = 60,0%	Muñoz-Almagro i in., 2021
	czerwona porzeczka (owoc)			2,4	77,8	-	23	-	EC = 1,3% ES = 0%	
	jeżyna (owoc)			4,3	63,0	-	3	-	EC = 26,7% ES = 62,5%	
	malina (owoc)			9,9	69,6	-	15	-	EC = 3,3% ES = 40,0%	
	wytłoki malin	celulaza, papaina, pH 5,0; bufor cytrynianowy	55°C, 5h	-	-	-	39	50	-	Wu i in., 2022

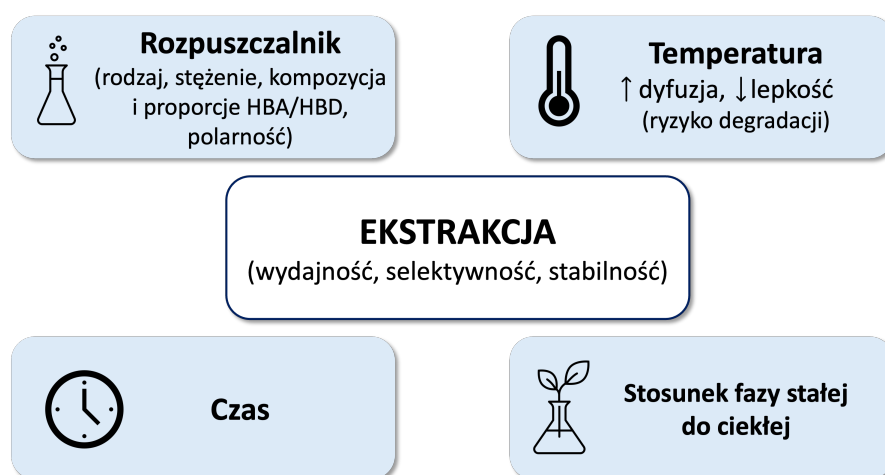
EAE/UAE	truskawka (owoc)			3,9	74,0	-	23	-	EC = 6,7%	
	czerwona porzeczka (owoc)	celulaza w 0,1 M roztworze octanu sodu, pH 5,0;	40°C, 90 min, 1:20 w/v, 45 kHz	2,4	82,6	-	18	-	EC = 3,3% ES = 0%	Muñoz-Almagro i in., 2021
	jeżyna (owoc)			4,8	62,6	-	7	-	EC = 23,3% ES = 54,3%	
	malina (owoc)			10,0	65,9	-	12	-	EC = 3,3% ES = 50,0%	
MUAE	smoczy owoc (skórka)	ChCl/Glc/H ₂ O (5:2:5); 1:35,25 g/ml, NADES/woda 1:3,37 ml/ml	240 W, 14,26 min, sonikacja 46,07 min	19,4	-	-	51	-	-	Tien i in., 2022
SWE	wytłoki jabłkowe	H ₂ O	130°C/150°C/170°C; 5 min; 1:30 w/v	16,7	-	-	-	-	-	Wang i in., 2014
HWE	<i>Averrhoa bilimbi</i>	ChCl/CA (1:1), C _{DES} =3,74% (w/v)	80°C; 2,5 h	14,4	-	-	54	-	WHC = 3,7 g/g OHC = 2,4 g/g	Shafie i in., 2019
	wilcze jagody (owoc)	ChCl/glikol propylenowy (1:2), 20% wody	90°C, 2 h, 1:25 w/v	1,1	20,7	-	2	87	-	Gu i in., 2023
	wytłoki jabłkowe	Obróbka wstępna: ChCl/ LA (1:2) + H ₂ O	Obróbka wstępna: - 40-80°C; 0,5-2 h, 1:8 w/v + 80°C, 10 min (HWE)	17,6-21,3	-	>90	57-78	2,9-8,3 x10 ⁵	DA = 27,9-54,5%	Chen i in., 2021
	<i>Citrus reticulata</i> (skórka)	Obróbka wstępna (10% H ₂ O): - ChCl/ LA (1:2), - ChCl/ glicerol (1:2) + H ₂ O	Obróbka wstępna: 40°C, 1 h, 1:30 w/v + 80°C, 10 min (HWE)	16,3 11,3	46,1 45,9	-	81 41	-	DA = 1,7% DA = 1,1%	Chen i in., 2025
	<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck (skórka)	LA/Glc/ H ₂ O (6:1:6)	88°C, 141 min, 1:29 w/v	32,0	-	-	79	-	-	Liew i in., 2018
	pomarańcze (skórka)	5% r-r ChCl/CA (1:2)	80°C, 150 min, 200 rpm, 1:20 w/v	11,0	28,4	-	24	585; 85; <12	HG = 33,1% RG-I = 59,2%	Ferreira-Lazarte i in., 2026
	wytłoki jabłkowe (miąższ, skórka)	- CA/Glc/ H ₂ O (1:1:3) - kwas mlekowy/Glc/ H ₂ O (5:1:3)	80°C, 1 h, 300 rpm, 1:30 w/v	2,5-4,3 3,9-5,1	-	~50 ~60	59,71 ~53	-	HG>RG-I	Vargas i in., 2025
	wytłoki żurawinowe	ChCl/OA (1:2), 30% H ₂ O	80°C, 90 min, 1:20 w/v	5,0	80,4	-	85	1,2 x10 ³	HG = 96,7% RG-I = 3,3%	Wang i in., 2025c

EC – zdolność do tworzenia i stabilizowania emulsji; ES – stabilność emulsji; LA – kwas mlekowy

Wdrożenie metod niekonwencjonalnych takich jak MAE, UAE, EAE lub SWE na skalę przemysłową jest utrudnione ze względu na koszty zbudowania odpowiedniej instalacji oraz trudności w standaryzacji procesu [Arumuganainar i in., 2025]. W konsekwencji w przemyśle metody konwencjonalne pozostają dominujące. Również dlatego, że rozwój alternatywnych metod ekstrakcji pektyn wymaga nie tylko optymalizacji parametrów procesowych, ale również dostosowania rozwiązań do realiów technologicznych i ekonomicznych przemysłu.

1.3.3. Parametry determinujące proces ekstrakcji pektyn

Proces ekstrakcji pektyn z biomasy roślinnej jest determinowany przez współdziałanie parametrów fizykochemicznych oraz właściwości użytego surowca, w tym budowy ścian komórkowych, których skład i występujące między komponentami interakcje wpływają na przebieg procesu separacji.



Ryc. 5. Parametry wpływające na proces ekstrakcji z zastosowaniem NADES [na podstawie: Sahin i in., 2026].

Temperatura oraz czas uważane są za kluczowe parametry ekstrakcyjne wpływające na kinetykę procesu. Wydajność ekstrakcji polisacharydów rośnie wraz ze wzrostem temperatury [Azzouzi i in., 2023]. W przypadku układów DES i NADES podniesienie temperatury zmniejsza lepkość rozpuszczalnika, ułatwiając penetrację tkanek roślinnych i transfer masy [Hadidi i in., 2025]. Zbyt wysoka temperatura ($>100^{\circ}\text{C}$) prowadzi do degradacji łańcuchów polisacharydowych, co wpływa na obniżenie masy cząsteczkowej i zmianę właściwości funkcjonalnych, np. zdolność do żelowania. Analogiczną zależność

obserwuje się w odniesieniu do czasu prowadzenia procesu. Długotrwała ekstrakcja sprzyja degradacji na drodze hydrolizy lub oksydacji, natomiast zbyt krótki czas procesu może skutkować niepełnym wyodrębnieniem składników, a w konsekwencji niższą wydajnością [Hadidi i in., 2025; Sahin i in., 2025]. Pomimo dobrze udokumentowanego wpływu temperatury i czasu na przebieg ekstrakcji, zależności te mają charakter nieliniowy, a ich wpływ na właściwości uzyskanych pektyn jest często zróżnicowany w zależności od zastosowanego układu ekstrakcyjnego.

Warunki pH środowiska determinują charakter interakcji molekularnych pomiędzy rozpuszczalnikami a wyodrębnianą substancją. Obniżenie pH zazwyczaj sprzyja wzrostowi wydajności procesu wyodrębniania pektyn, co może być efektem hydrolizy nierozpuszczalnej protopektyny i jej przejściem w formę rozpuszczalną. Jednocześnie zbyt agresywne warunki, obejmujące wysoką temperaturę oraz zastosowanie silnych kwasów, prowadzą do degradacji łańcuchów bocznych składających się z neutralnych monosacharydów, zwłaszcza Ara, oraz do zmniejszenia Mw całej makrocząsteczki. W praktyce zakres pH stosowany do ekstrakcji kwasowych polisacharydów mieści się zazwyczaj w przedziale 1,5-3,0. Środowisko kwasowe sprzyja protonacji grup karboksylowych GalA i wpływa na zwiększenie rozpuszczalności pektyny. Ponadto wartość pH ma istotny wpływ na stopień estryfikacji pektyn [Canteri-Schemin i in., 2005; Azzouzi i in., 2023; Iñiguez-Moreno i in., 2024; Zhang i in., 2025; Hadidi i in., 2025]. W literaturze obserwuje się rozbieżności dotyczące optymalnych warunków pH, szczególnie w odniesieniu do zachowania struktury łańcuchów bocznych oraz stopnia estryfikacji, co wskazuje na potrzebę bardziej kompleksowej analizy tych zależności.

Przebieg procesu ekstrakcji w istotnym stopniu zależy od postaci surowca. Kluczowe znaczenie mają poziom wilgoci oraz wielkość cząstek surowca [Sahin i in., 2026]. Większy stopień rozdrobnienia zwiększa powierzchnię właściwą i dostępność składników, co usprawnia transport masy [Azzouzi i in., 2023]. W przypadku świeżej biomasy owocowej znaczenie mają dojrzałość owocu i jego odmiana, natomiast w przypadku biomasy w suchej postaci istotna jest ilość wody wpływająca na ryzyko rozwoju mikroorganizmów. Odnotowano również, że liofilizacja biomasy znacząco poprawia wydajność ekstrakcji w porównaniu do suszenia konwencjonalnego, co przypisuje się zachowaniu porowatej struktury tkanek [Ferreira-Lazarte i in., 2026].

Stosunek fazy stałej do fazy ciekłej decyduje o efektywności wymiany masy w ekstrakcji [Hadidi i in., 2025]. W praktyce laboratoryjnej najczęściej stosunek ten

występuje w przedziale 1:10 – 1:30 (g/ml). Zbyt niski stosunek faz może ograniczać przebieg ekstrakcji i prowadzić do niepełnego uwolnienia składników z matrycy roślinnej, natomiast zbyt wysoki wiąże się z nadmiernym zużyciem rozpuszczalnika, co czyni proces mniej efektywnym ekonomicznie i środowiskowo [Sahin i in., 2025].

Kluczowym aspektem jest dobór rozpuszczalnika. Wybór w przypadku ekstrakcji pektyn obejmuje zarówno tradycyjne układy o charakterze kwasowym, jak i niekonwencjonalne rozwiązania, obejmujące zastosowanie enzymów hydrolitycznych lub rozpuszczalników głęboko eutektycznych z grupy DES, w tym NADES, często w połączeniu z technikami wspomaganyymi jak np. MAE, UAE oraz EAE, których parametry procesowe: moc, częstotliwość, czas ekspozycji, stężenie enzymu itd., wpływają na właściwości wydzielonego produktu [Barrera-Chamorro i in., 2025; Hadidi i in., 2025].

Jak omówiono w poprzednim rozdziale, skład mieszaniny NADES, w tym dobór HBA i HBD oraz ich proporcji determinują polarność i siłę wiązań wodorowych, co ma bezpośrednie przełożenie na interakcje z pektynami. Odpowiednia ilość wody reguluje lepkość NADES oraz modyfikuje sieć wiązań wodorowych, co może wpływać na dyfuzję i w rezultacie na wydajność procesu [Zhang i in., 2020; Hadidi i in., 2025; Sahin i in., 2026].

Nawet ukierunkowana ekstrakcja często prowadzi do współekstrakcji związków towarzyszących pektynom, głównie polifenoli i białek, które mogą z nimi oddziaływać, wpływając na ich strukturę i właściwości poprzez tworzenie kompleksów lub koniugatów [Siemińska-Kuczer i in., 2022; Liang i in., 2025; Zie i in., 2025]. Należy podkreślić, że w przypadku układów NADES zależności pomiędzy składem rozpuszczalnika, jego właściwościami fizykochemicznymi oraz efektywnością ekstrakcji pozostają nadal niewystarczająco poznane, szczególnie w kontekście ich wpływu na strukturę i funkcjonalność pektyn.

Złożoność wzajemnych oddziaływań pomiędzy parametrami procesowymi oraz właściwościami układu ekstrakcyjnego utrudnia jednoznaczne określenie ich wpływu na przebieg procesu i właściwości produktu końcowego. Proces ekstrakcji jest wynikiem współdziałania wielu powiązanych parametrów, dlatego ich analiza wymaga podejścia wieloczynnikowego. Skutecznym narzędziem umożliwiającym optymalizację parametrów procesowych, analizę efektów interakcji pomiędzy nimi oraz wyznaczenie warunków optymalnych przy jednoczesnym ograniczeniu liczby eksperymentów jest

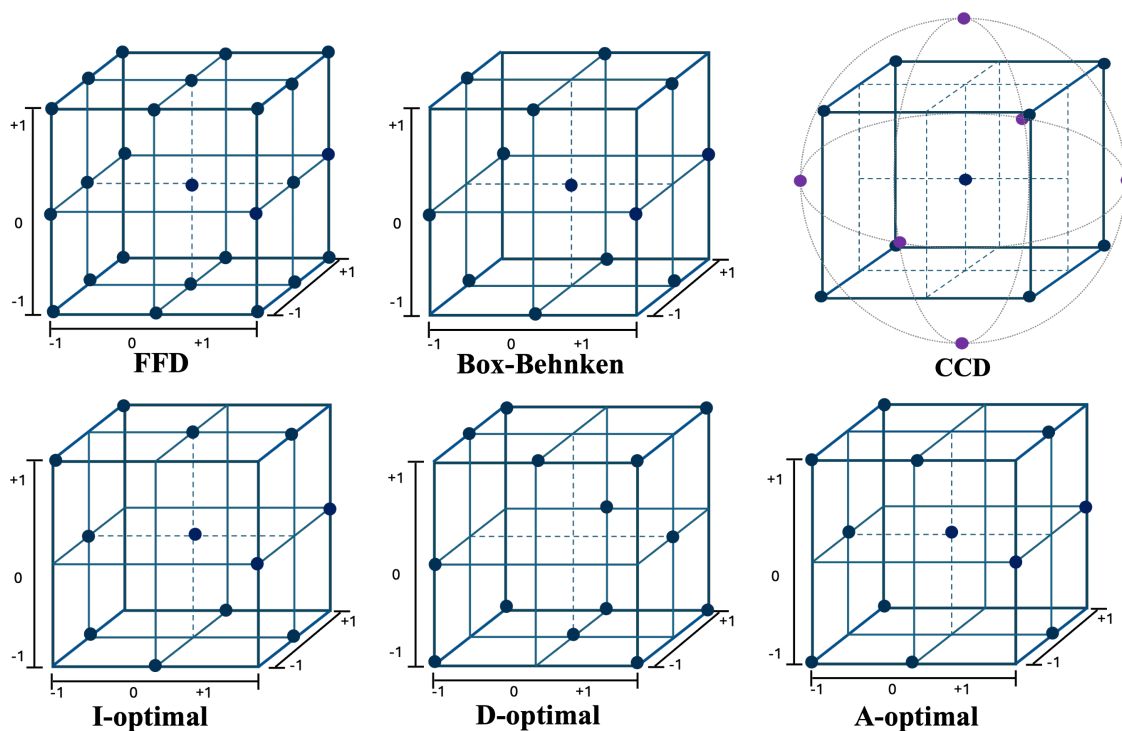
metodologia powierzchni odpowiedzi (RSM), powszechnie stosowana w optymalizacji procesów ekstrakcyjnych [Azzouzi i in., 2023].

Pomimo intensywnego rozwoju metod ekstrakcji oraz rosnącego zainteresowania zastosowaniem układów NADES, nadal brakuje kompleksowych badań umożliwiających jednoznaczne określenie zależności pomiędzy parametrami procesowymi, właściwościami rozpuszczalnika a strukturą i funkcjonalnością uzyskiwanych pektyn, co uzasadnia potrzebę przeprowadzenia wieloskalowej analizy tych zjawisk.

1.3.3.1. Metody planowania eksperymentu i optymalizacji parametrów procesu

Metodologia powierzchni odpowiedzi (ang. *Response Surface Methodology*, RSM), jako część metodologii planowania eksperymentu (ang. *Design of Experiment*, DoE), została zapoczątkowana w latach 50. XX wieku przez Box'a i Wilsona (1951). RSM obejmuje zbiór metod matematycznych oraz statystycznych mających na celu opisanie zależności pomiędzy zmiennymi niezależnymi a jedną lub wieloma zmiennymi zależnymi (odpowiedzią układu), umożliwiając wyznaczenie warunków optymalnych procesu [Witek-Krowiak i in., 2014; Khuri i in., 2010]. Jako wielowymiarowa technika statystyczna RSM stanowi efektywne narzędzie w procesach optymalizacji i projektowania, które dążą do określenia warunków zapewniających maksymalizację wydajności lub innych odpowiedzi układu [Yolmeh i Jafari, 2017].

Wśród modeli optymalizacyjnych opartych o RSM największą popularnością cieszą się: model Box-Behnken, plan centralny kompozycyjny (ang. *central composite design*, CCD) oraz modele planowania optymalnego (ang. *optimal*), określanych również jako algorytmiczne [Witek-Krowiak i in., 2014]. Każdy z nich posiada swoje wady i zalety. Kluczowym etapem optymalizacji jest zdefiniowanie już na wstępnym etapie prac eksperymentalnych celów oraz kryteriów, do których się dąży, dzięki czemu możliwy jest dobór odpowiedniego modelu statystycznego do danych założeń procesowych.



Ryc. 6. Planowanie eksperymentu (DoE) – schematyczne rozmieszczenie punktów eksperymentalnych w przestrzeni 3D dla wybranych planów eksperymentalnych metodologii powierzchni odpowiedzi (RSM), obrazujące główne różnice między tymi modelami [Witek-Krowiak i in., 2014; Yolmeh i Jafari, 2017].

Model Box-Behnken powstał jako ekonomiczna alternatywa dla eksperymentu pełnoczynnikowego (ang. *full factorial design*, FFD), który analizuje kombinacje czynników na wszystkich możliwych poziomach zmiennych niezależnych. W modelu Boxa-Behnkena punkty eksperymentalne zlokalizowane są na krawędziach sześcianu obrazującego plan eksperymentu, oraz w jego centrum, nie występują natomiast na jego wierzchołkach. Model ten unika testowania warunków ekstremalnych (skrajnych). Stosowany jest najczęściej do budowy modeli kwadratowych. Wymaga minimum trzech zmiennych eksperymentalnych, które każdorazowo analizowane są na trzech poziomach [Khuri i in., 2010; Witek-Krowiak i in., 2014]. Natomiast modele typu optimal (*I*, *A*, *D*, *G*, *V*) charakteryzują się wysoką elastycznością w projektowaniu matrycy eksperymentalnej, między innymi poprzez możliwość zdefiniowania liczby poziomów czy też zastosowania dowolnej liczby zmiennych niezależnych, co wiąże się z wysokim stopniem skomplikowania obliczeń. Co więcej, zmienne niezależne mogą być także danymi nieliczbowymi. Do najczęściej stosowanych modeli z tej kategorii zaliczyć można plany *I*-optimal, *D*-optimal oraz *A*-optimal. Model *I*-optimal (ang. *integrated variance*, *I*) ukierunkowany jest na optymalizację eksperymentu pod względem

dokładności predykcji w całej przestrzeni eksperymentalnej. Model ten umożliwia uzyskanie układów eksperymentalnych, które minimalizują średnią wariancję predykcji, czyli tzw. błąd przewidywania w całym obszarze eksperymentalnym [Pawlaczyk-Graja i in., 2019]. Korzystne rozmieszczenie punktów eksperymentalnych sprzyja wysokiej jakości predykcji, co umożliwia estymację odpowiedzi układu w dowolnym punkcie w przestrzeni i znajduje zastosowanie w modelowaniu oraz symulacji parametrów procesowych [Coetzer i Haines, 2017]. W przypadku konieczności przeprowadzenia precyzyjnej estymacji parametrów eksperymentalnych poleca się zastosowanie modelu *D-optimal* (ang. *determinant of the matrix, D*). Model z założenia minimalizuje niepewność wyznaczania współczynników równania [Khuri i in., 2010; Coetzer i Haines, 2017]. Modelem zapewniającym kompromis między stabilnością parametrów a rozmieszczeniem punktów eksperymentalnych w przestrzeni jest plan *A-optimal* (ang. *average, A*). Ma on na celu zadanie minimalizację sumy wariancji współczynników regresji, czyli ograniczenia średniej błędów standardowych dla poszczególnych współczynników modelu regresyjnego [Shahmohammadi i in., 2019; Bodunwa i in., 2022].

Model Box-Behnken, uznawany jest za konwencjonalne i dobrze zweryfikowane podejście w kontekście planowania eksperymentów prac badawczych, podobnie jak CCD, jest szeroko wykorzystywany oraz dobrze opisany w literaturze naukowej, zarówno w obrębie technologii chemicznej, biotechnologii, chemii medycznej i technologii żywności. Analiza baz literaturowych *Web of Science* oraz *Scopus* (dostęp: 15.03.2026), wykonana z zastosowaniem słów kluczowych „*Box-Behnken*” i „*extraction*”, wykazała odpowiednio 5 647 oraz 5 653 prac badawczych w obszarze łączącym oba hasła. Dla porównania, plany optymalne, w tym *I-optimal*, są wciąż relatywnie rzadko opisywane w literaturze naukowej. W analogicznej analizie dla słów kluczowych „*I-optimal*” i „*extraction*” w przytoczonych wcześniej bazach literaturowych otrzymano odpowiednio 156 i 37 hitów, a wzrost zainteresowania tym modelem obliczeniowym nastąpił głównie w ciągu ostatnich 5 lat.

Dostępne doniesienia literaturowe wskazują na potencjalne korzyści wynikające z wykorzystania modelu *I-optimal*. Monton i in. (2025) przeprowadzili analizę porównawczą planów optymalnych (*I*, *D* oraz *A*) badając możliwości ograniczenia toksycznych chemikaliów w ekstrakcji kannabinoidów z biomasy. Najbardziej satysfakcjonujące rezultaty otrzymali dla *I-optimal*. Wykazano również, że model

I-optimal może wykazywać przewagę nad planem Box-Behnken pod względem dokładności predykcji w optymalizacji wydajności procesu ekstrakcji pektyn oraz ilości kwasów uronowych w produktach końcowych na przykładzie wycisków korzenia marchwi [Mazurek-Hołyś i in., 2026]. *I*-optimal znalazł też zastosowanie w optymalizacji procesu skrobi z nasion mango [Torres-Gallo i in., 2025] oraz ekstrakcji polifenoli z *Acanthus ilicifolius* [Nurcholis in., 2024].

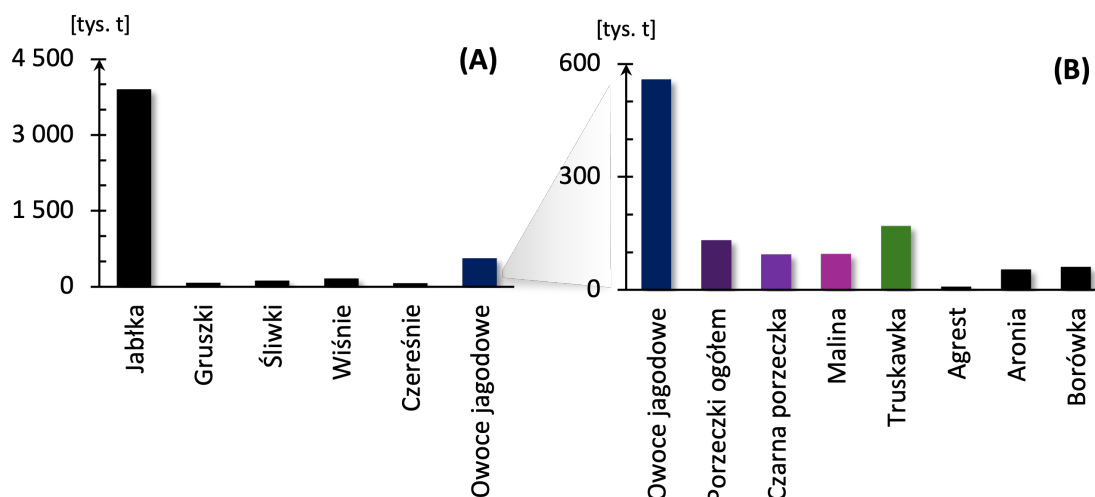
Analiza źródeł literaturowych wskazuje, że badacze podejmowali się prób optymalizacji ekstrakcji polisacharydów z owocu czarnej porzeczki jedynie z zastosowaniem planu Box-Behnken, dodatkowo wspomagając ten proces wybranym czynnikiem fizycznym, w tym ultradźwiękami (UAE), mikrofalami (MAE), enzymami (EAE) i w warunkach podwyższonego ciśnienia (SWE) [Ren i in., 2012; Yang i in., 2020; Yang i in., 2024; Xu i in., 2015; Xu i in., 2016]. Jednakże, jak wynika z analizy źródeł literaturowych, brak jest doniesień o wyodrębnianiu pektyn z wycisków tych owoców z wykorzystaniem naturalnych mieszanin głęboko eutektycznych. W związku z tym w niniejszej pracy podjęto próbę wypełnienia tej luki badawczej wspierając ten wybór zastosowaniem modelu *I*-optimal w optymalizacji parametrów procesowych ekstrakcji pektyn.

1.4. Odpadowa biomasa roślinna w przetwórstwie owoców

Jednym z kluczowych założeń gospodarki o obiegu zamkniętym (GOZ) jest ponowne wykorzystanie odpadów powstających w procesach technologicznych jako surowców w innych łańcuchach produkcyjnych. Koncepcja ta jest ściśle powiązana z ideą symbiozy przemysłowej, zakładającą współpracę między podmiotami gospodarczymi w celu optymalizacji wykorzystania zasobów, energii, wody oraz materiałów odpadowych [Ramm, 2025; Le i in., 2023]. W literaturze wskazuje się, że szczególnie istotnym źródłem biomasy odpadowej są wyciski owocowe, które stanowią produkt uboczny przetwórstwa spożywczego. Obecnie wykorzystywane są m.in. w produkcji pasz i nawozów lub poddawane spalaniu, kompostowaniu bądź pirolizie [Wądrzyk i in., 2025].

Do kluczowych związków biologicznie aktywnych obecnych w ścianach komórkowych roślin należą pektyny, które mogą być efektywnie pozyskiwane z biomasy odpadowej, w szczególności z wycisków owocowych. Analiza danych statystycznych

GUS oraz FAOSTAT wskazuje, że Polska należy do głównych producentów owoców w Europie, w szczególności jabłek, porzeczek, malin oraz truskawek [GUS, FAOSTAT]. Szacuje się, że w 2024 roku krajowa produkcja owoców jagodowych wyniosła ponad 481,7 tys. ton, z czego czarna porzeczka, malina oraz truskawka stanowiły odpowiednio 67,8 tys., 76,8 tys. oraz 158,6 tys. ton [GUS].



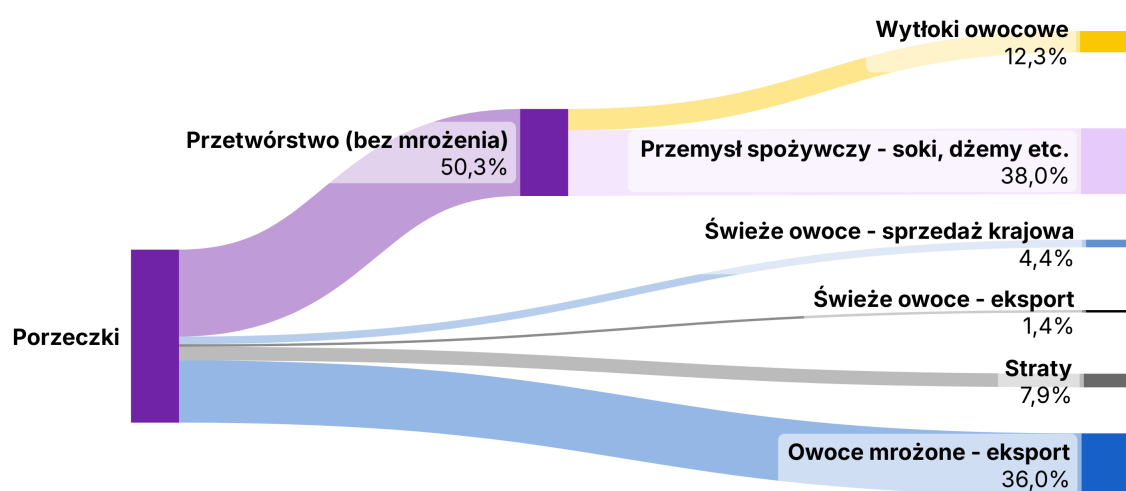
Ryc. 7. Średnia roczna produkcja owoców (A) oraz owoców jagodowych (B) w Polsce w latach 2021–2024 [GUS].

Polska odgrywa istotną rolę nie tylko na europejskim, ale również na światowym rynku owoców. Dane FAOSTAT dotyczące zbiorów owoców na świecie w 2024 roku wskazują, że Polska zajmuje czołowe miejsca wśród 10 największych producentów owoców, takich jak: porzeczki – 2 miejsce (100 200 ton), jabłka – 4 miejsce (3 384 500 ton), maliny - 5 miejsce (976 900 ton), jagody oraz wiśnie - 6 miejsce (odpowiednio 62 000 oraz 110 200 ton), truskawki - 9 miejsce (173 400 ton) [FAOSTAT; MRiRW].

Szacuje się, że znacząca część produkcji owoców trafia do przetwórstwa, co prowadzi do powstawania dużych ilości wyłoków owocowych, stanowiących istotny strumień biomasy odpadowej [Struck i in., 2016]. Ukazuje to skalę wyzwania i podkreśla konieczność opracowania efektywnych strategii przetwarzania oraz ponownego wykorzystania odpadów poprodukcyjnych. Wądrzyk i in. (2025) przeanalizowali przepływy biomasy oraz generowanych odpadów w łańcuchu produkcji na przykładzie czarnej porzeczki (Ryc. 8) [Wądrzyk i in., 2025].

Najszerzej zbadaną i powszechnie wykorzystywaną biomasą do ekstrakcji pektyn w skali przemysłowej są odpady cytrusowe oraz wyłoki z jabłek [May, 1990; Riyamol i in., 2023]. Polska należy do czołowych producentów jabłek na świecie. Wysoka

produkcja oraz duża skala przetwórstwa tych owoców na terenie Polski sprawiają, że ilości biomasy poprodukcyjnej są znaczące, co zapewnia wysoką dostępność tego surowca dla dalszego wykorzystania. Zagospodarowanie tych odpadów jako surowca do ekstrakcji pektyn jest dobrze udokumentowane w literaturze naukowej [Waldbauer i in., 2017; Cho i in., 2019; Chen i Lahaye, 2021; Chen i in., 2025; Chandrasekar i in., 2024]. Odpady z przetwórstwa popularnych w Polsce owoców jagodowych stanowią interesujący, jednak nadal stosunkowo słabo opisany kierunek badań. Uwzględniając średnie koszty produkcji jednej tony owoców w przeciągu ostatnich 5 lat najbardziej ekonomicznie opłacalną uprawą jest czarna porzeczka (895,6 USD/t), następnie truskawka (1084,0 USD/t) i kolejno malina (2358,2 USD/t) [FAOSTAT].

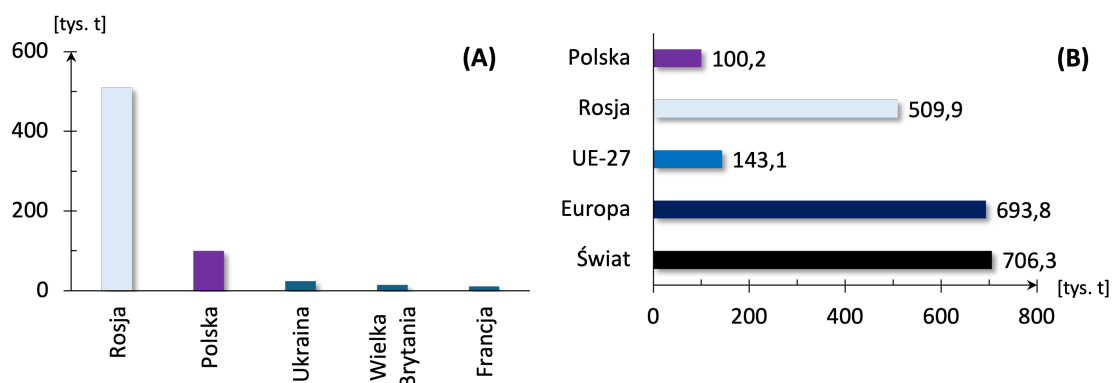


Ryc. 8. Diagram Sankeya przedstawiający główne kierunki wykorzystania zbiorów owoców w Polsce na przykładzie porzeczki [na podstawie: Wądrzyk i in., 2025] (narzędzie online: sankeyart.com).

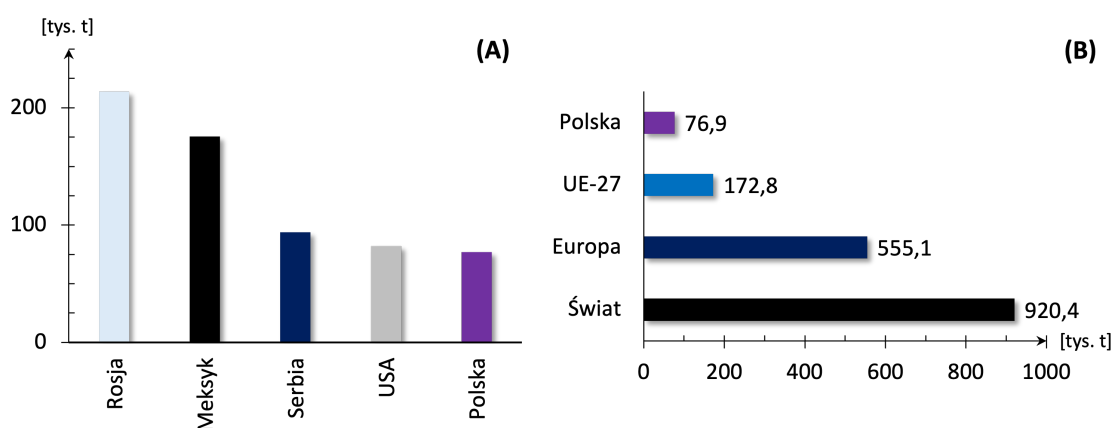
Dane FAOSTAT wskazują, że w 2024 roku jedynie 3,4% wyprodukowanych w Polsce świeżych owoców i szacunkowo ok. 30% w postaci mrożonej przeznaczono na eksport, a ponad 65% zostało zagospodarowanych na rynku krajowym. Efektem tego są znaczne ilości wyłoków owocowych, co stanowi wyzwanie w zakresie zagospodarowania tych odpadów. Roczny tonaż krajowych wyłoków owoców jagodowych można oszacować na 12,5 – 15 tys. ton [Wądrzyk i in., 2025].

Zagospodarowanie wyłoków owocowych pochodzących z krajowej produkcji stanowi istotny kierunek badań w kontekście gospodarki o obiegu zamkniętym. Wykorzystanie tej biomasy jako źródła pektyn, z zastosowaniem nowoczesnych metod ekstrakcji, może przyczynić się do zwiększenia efektywności procesów oraz ograniczenia wpływu środowiskowego przemysłu spożywczego. Uzyskane pektyny mogą znaleźć

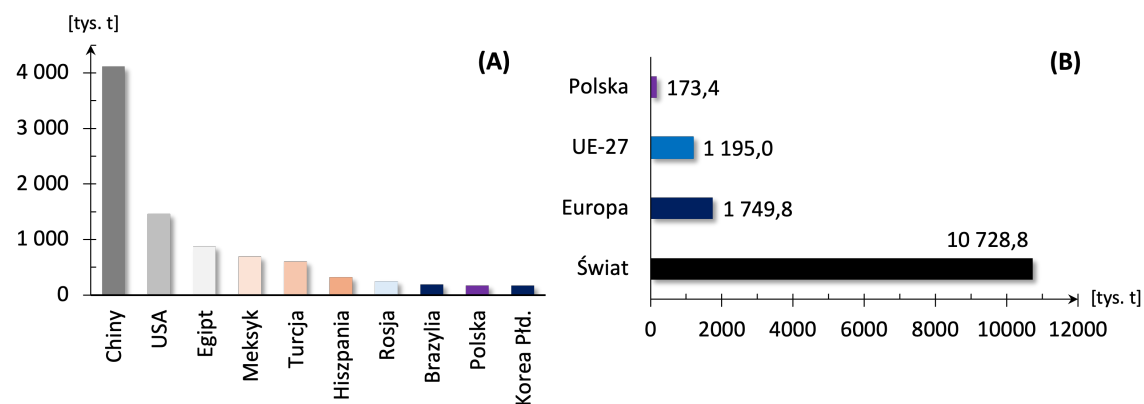
zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym jako środki żelujące, stabilizatory oraz nośniki substancji aktywnych.



Ryc. 9. Produkcja porzeczek w 2024 roku: (A) najwięksi producenci na świecie, (B) produkcja w Polsce na tle produkcji globalnej [FAOSTAT].



Ryc. 10. Produkcja malin w 2024 roku: (A) najwięksi producenci na świecie, (B) produkcja w Polsce na tle produkcji globalnej [FAOSTAT].



Ryc. 11. Produkcja truskawek w 2024 roku: (A) najwięksi producenci na świecie, (B) produkcja w Polsce na tle produkcji globalnej [FAOSTAT].

2. CEL ROZPRAWY

Wykorzystanie naturalnych mieszanin głęboko eutektycznych (NADES) jako medium ekstrakcyjnego, w alternatywie dla konwencjonalnych technologii opartych o zastosowanie kwasów mineralnych, stanowi innowacyjne oraz proekologiczne podejście do procesu izolowania biopolimerów. Idea ta, wpisująca się w zasady zrównoważonego rozwoju i ideę zielonej chemii, umożliwia efektywne przekształcenie zasobów odnawialnych w produkty o wysokiej wartości dodanej.

Głównym celem rozprawy było wyznaczenie korelacji pomiędzy parametrami technologicznymi procesu ekstrakcji, w tym skład i proporcje komponentów NADES, dodatek wody, temperatura oraz czas procesu, a wydajnością i właściwościami fizykochemicznymi pektyn wyodrębnionych z wyłoków z wybranych rodzimych owoców jagodowych. W pracy postawiono następujące hipotezy badawcze:

- I. Wykorzystanie NADES pozwala na wyodrębnienie z wyłoków owocowych koniugatów polifenoli z polisacharydami o charakterze pektyn, z wydajnością porównywalną lub wyższą w stosunku do metod konwencjonalnych.
- II. Zastosowanie NADES o zróżnicowanym składzie umożliwia kontrolowaną modyfikację właściwości fizykochemicznych wyodrębnianych frakcji pektynowych.
- III. Struktura i walory użytkowe pektyn są determinowane zarówno przez rodzaj matrycy roślinnej, jak i specyfikę oddziaływań w układzie rozpuszczalnik-surowiec, co pozwala na otrzymanie bioproduktów o unikalnych cechach funkcjonalnych.

W celu weryfikacji postawionych hipotez przeprowadzono analizę wieloskalową, obejmującą optymalizację parametrów technologicznych procesu ekstrakcji oraz kompleksową charakterystykę otrzymanych produktów z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych, spektroskopowych (FT-IR, NMR), chromatograficznych (GPC/SEC, IEC) oraz mikroskopowych (SEM).

3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.1. Surowce roślinne

3.1.1. Opis i charakterystyka surowców roślinnych

Analiza rynku owoców rodzimych w Polsce umożliwiła wyselekcjonowanie czterech surowców z roślin popularnie uprawianych wielkopowierzchniowo, m.in. na potrzeby przetwórstwa soków. Surowce odpadowe z owoców tych roślin posłużyły jako przedmiot badań w niniejszej rozprawie doktorskiej. Są to: wyłoki z owocu czarnej porzeczki, maliny, truskawki oraz rokitnika.

W celu wstępnej charakterystyki biomasy zastosowanej do badań przeprowadzono ocenę makro- i mikroskopową surowców roślinnych.

3.1.1.1. Czarna porzeczka (*Ribes nigrum* L.)

Czarna porzeczka (*Ribes nigrum* L.) jest krzewem należącym do rodziny *Grossulariaceae* (agrestowate) występującym pierwotnie w północnej i środkowej Europie oraz zachodniej Azji, głównie na obszarach o klimacie umiarkowanym, [Ożarowski, 1982; Ożarowski, 1987; Takata i in., 2005].

Przypuszcza się, że uprawę czarnej porzeczki zapoczątkowano już w XVI wieku [Hilz, 2007]. Najchętniej rośnie na terenach nasłonecznionych, w glebie gliniano-piaszczystej lub gliniastej. Potocznie roślina ta nazywana jest również smrodiną lub smrodynią, ze względu na charakterystyczny zapach spowodowany obecnością gruczołów żywicznych na spodniej stronie liści, pąkach oraz owocach. Kwiaty promieniste o zielonkawopurpurowych płatkach zebrane są w grona wielokwiatowe. Roślina osiąga wysokość 1 – 2 m. Charakteryzuje się dużymi, 3- lub 5-klapowymi liśćmi, w nasadzie uciętymi lub sercowatymi. Jej jagodokształtne owoce mają ciemnofioletową, niemal czarną barwę [Ożarowski, 1987; Woziwoda, 2014].

W Polsce zarejestrowano 11 odmian czarnej porzeczki [COBORU]. Roślina ta stanowi rodzimy takson flory Polski i jest uprawiana na terenie całego kraju. Liczne odmiany tego gatunku występują również w stanie dzikim. Do roku 2014 roślina podlegała ochronie częściowej [Snowarski, 2026].

Tabela 5. Taksonomia botaniczna czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) [Woziwoda, 2014].

Domena	eukarionty
Królestwo	rośliny
Podkrólestwo	rośliny zielone
Nadgromada	rośliny telomowe
Gromada	rośliny naczyniowe
Podgromada	rośliny nasienne
Nadklasa	okrytonasienne
Klasa	Magnoliopsida
Nadrząd	Saxifraganae
Rząd	skalnicowce
Rodzina	Grossulariaceae (agrestowate)
Rodzaj	<i>Ribes</i> (porzeczka)
Gatunek	<i>Ribes nigrum</i> (czarna porzeczka)



Ryc. 12. Czarna porzeczka (*Ribes nigrum* L.) [Lindmann, 1917].

Owoce czarnej porzeczki są chętnie konsumowane w postaci świeżej, jak i szeroko stosowane jako składnik produktów spożywczych. Dzięki swoim walorom smakowym oraz właściwościom prozdrowotnym nazywana jest „polskim superowocem” [KOWR]. W gospodarstwach domowych owoce wykorzystywane są często do sporządzania przetworów (dżemów, marmolad, syropów, galaretek, win, nalewek), natomiast w przemyśle spożywczym głównie do produkcji soków. Powstające jako produkt uboczny wytloki owocowe, bogate w polisacharydy, stanowią cenne źródło składników wspomagających funkcje organizmu [Hilz i in., 2005]. W ostatnich latach prowadzone są badania mające na celu wykorzystanie świeżych wytlóków z owoców czarnej porzeczki jako składnika produktów spożywczych o właściwościach prozdrowotnych [Raczkowska i in., 2024].

Owoce czarnej porzeczki stosowane są w chińskiej medycynie ludowej od ponad tysiąca lat [Takata i in., 2005]. Liście czarnej porzeczki zawierają olejki eteryczne, m.in. sabinen, β -naftol, limonen, geraniol, β -kariofilen, jak też garbniki, kwasy organiczne,

sole mineralne, w tym sole boru i magnezu oraz flawonoidy. Owoce bogate są w kwas askorbinowy, kwas cytrynowy i kwas szczawiowy, antocyjany, pektyny, polifenole, w tym flawonoidy takie jak katechina, olejki eteryczne i substancje zapachowe o działaniu terapeutycznym oraz przeciwzapalnym z grupy monoterpenów. W owocach, obok cukrów prostych, obecne są również witaminy z grupy B (tiamina, ryboflawina, niacyna, kwas pantotenowy i pirydoksyna oraz witamina K, jak też sole mineralne, w tym związki potasu, żelaza, manganu, a także wapń, fosfor, magnez i sód. W skórkach owoców występują nienasycone kwasy tłuszczowe: kwas α -linolowy, kwas linolowy, kwas gamma-linolowy i kwas oleinowy [Ożarowski, 1982; Ożarowski, 1987; USDA; Tian i in., 2023; Pott i in., 2023]. Szacuje się, że czarna porzeczka zawiera 560 mg związków polifenolowych w 100 gramach świeżych owoców [Baranowska i in., 2017].

Pektyny owoców czarnej porzeczki są cenione w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne oraz szerokie spektrum aktywności biologicznej [Bu i in., 2021; Corović i in., 2024]. Główny składnik pektyn, GalA stanowi 45-55% w polisacharydach owoców czarnej porzeczki, w zależności od zastosowanej metody ekstrakcji, oraz cukry neutralne, głównie: Ara, Gal, Rha, Xyl, Man i Glc [Alba i in., 2018; Muñoz-Almagro i in., 2022; Pancierz i in., 2022; Xu i in., 2016a; Xu i in., 2016b]. Pektyny czarnej porzeczki charakteryzują się masą cząsteczkową w zakresie 14 – 116 kDa oraz stopniem estryfikacji 11–68% [Xu i in., 2016a; Xu i in., 2016b; Xu i in., 2018; Alba i in., 2018; Pancierz i in., 2022; Muñoz-Almagro i in., 2022; Inthalaeng i in., 2023]. W przemyśle spożywczym wykorzystywane są jako zagęstnik, stabilizator i środek żelujący [Csanadi i in., 2012]. Wykazują właściwości antyoksydacyjne [Xu i in., 2016a], przeciwnowotworowe, immunostymulujące [Bu i in., 2021] i hipoglikemiczne [Xu i in., 2018].

3.1.1.2. *Malina właściwa (Rubus idaeus L.)*

Malina właściwa (*Rubus idaeus L.*) jest krzewem z rodziny różowatych (Rosaceae) występującą powszechnie w krajach klimatu chłodnego lub umiarkowanego, w Europie i północnej oraz zachodniej Azji. W Polsce uprawiana jest na szeroką skalę. Jako rodzimy takson flory Polski rośnie również dziko na terenie całego kraju, zarówno na obszarach nizinnych, jak i górskich, do 2 000 m n.p.m. [Ożarowski, 1982; Ożarowski, 1987; Baranowska i in., 2015]. Szacuje się, że obecnie na świecie występuje kilkaset odmian maliny właściwej. W Polsce zarejestrowano ich 20 [COBORU].

Pierwsze wzmianki o owocach maliny właściwej pojawiły się już ok. 370 roku p.n.e. w starożytnej Grecji, głównie poprzez działalność Hipokratesa. Dioskorides, grecki lekarz, farmakolog i botanik, żyjący za czasów Nerona w Rzymie (40 – 90 rok n.e.), opisał malinę właściwą jako źródło surowców o właściwościach przeciwzapalnych oraz przeciwbiegunkowych. Uprawę rośliny na większą skalę rozpoczęto najprawdopodobniej w późnym średniowieczu (XV wiek) [Krauze-Baranowska i in., 2014].

Tabela 6. Taksonomia botaniczna maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.) [Woziwoda, 2014].

Domena	eukarionty
Królestwo	rośliny
Podkrólestwo	rośliny zielone
Nadgromada	rośliny telomowe
Gromada	rośliny naczyniowe
Podgromada	rośliny nasienne
Nadklasa	okrytonasienne
Klasa	Magnoliopsida
Nadrząd	różopodobne
Rząd	różowce
Rodzina	Rosaceae (różowate)
Rodzaj	<i>Rubus</i> (jeżyna)
Gatunek	<i>Rubus idaeus</i> (malina właściwa)



Ryc. 13. Malina właściwa (*Rubus idaeus* L.) [Lindmann, 1917].

Krzew, który osiąga maksymalnie 2 m wysokości, charakteryzuje się obłymi pędami, łukowato wygiętymi, w dolnej części pokrytymi kolcami. Ostro piłkowane, 3-, 5- lub 7-listkowe, ogonkowe, wąskie u nasady liście o białofilcowatej spodniej powierzchni. Promieniste, białe kwiaty zebrane są w grona lub baldachogrona. Owoc występuje pod postacią wielokrotnego pestkowca o charakterystycznej czerwonej barwie oraz unikatowym smaku oraz przyjemnych zapachu [Ożarowski, 1987; Woziwoda, 2014]. Preferuje tereny zacienione i wilgotną glebę o lekko kwaśnym odczynie [Baranowska i in., 2017].

Owoce maliny spożywane są na surowo lub wykorzystywane przez przemysł spożywczy głównie do wyrobu soku [Ożarowski, 1987]. Olej z pestek maliny stanowi dobre źródło niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), a oprócz tego witamin, flawonoidów i antyoksydantów. Wykazuje działanie przeciwbakteryjne, przeciwutleniające i przeciwzapalne [Baranowska i in., 2017; Nurzyńska-Wierdak, 2022]. Jako składnik aktywny kosmetyków wpływa na skórę poprzez jej nawilżenie, wygładzenie oraz łagodzenie stanów zapalnych. W medycynie tradycyjnej surowiec stosowany jest w postaci syropu owocowego oraz naparów z suszonych owoców bądź liści. Wykorzystywany w przypadku chorób pochodzenia wirusowego lub bakteryjnego, w nieżycie żołądka i jelit, pomocniczo jako środek przeciwskurczowy [Ożarowski, 1982; Ożarowski, 1987; Baranowska i in., 2015; Baranowska i in., 2017].

Główne związki biologicznie aktywne występujące w owocach to związki fenolowe, w tym: flawonoidy, do których zalicza się antocyjany, flawonole oraz kwasy fenolowe, wśród których dominują kwas elagowy, kwas galusowy, kwas protokatechowy, kwas kawowy, kwas synapinowy, kwas syringowy, kwas cynamonowy, kwas wanilinowy i kwas ferulowy. Szacuje się, że związki fenolowe stanowią około 126–140,6 mg/100g świeżych owoców [Wang i in., 2025]. Wśród makro- i mikroelementów w owocu maliny wymienia się odpowiednio potas, wapń, magnez, cynk, mangan, żelazo i miedź. Wśród około 70 związków aromatycznych wyróżnia się keton malinowy ($C_{10}H_{12}O_2$) o działaniu termogenicznym [Ożarowski, 1982; Ożarowski, 1987; Baranowska i in., 2015; Baranowska i in., 2017; Nurzyńska-Wierdak, 2022; USDA].

Polisacharydy z biomasy owocu maliny pozyskuje się z zastosowaniem metod konwencjonalnych oraz niekonwencjonalnych, wśród których wymienia się m.in. HWE, MAE, UAE, EAE [Bélafi-Bakó i in., 2012; Muñoz-Almagro i in., 2021; Lopes i in., 2025; Tiwari i in., 2015]. Zastosowane metody oraz parametry procesowe determinują właściwości fizykochemiczne i biologiczne końcowego produktu. Udział GaLA może stanowić 13% - 88% polisacharydu, a stopień estryfikacji mieści się w zakresie 3-47%, co wskazuje na jej LM charakter pektyny, definiując mechanizm żelowania [Lopes i in., 2025; Kosmala i in., 2025; Mierczyńska i in., 2017; Zhang i in., 2022; Chen i in., 2020]. Pektyny owocu maliny charakteryzują się masą cząsteczkową w przedziale 4 – 609 kDa [Wu i in., 2022; Muñoz-Almagro i in., 2021; Yu i in., 2015]. Wśród monosacharydów obojętnych w strukturze polisacharydowej wyróżnia się Xyl, Ara, Gal, Rha oraz śladowe ilości Man i Fuc [Kosmala i in., 2025; Chen i in., 2020]. Polisacharydy maliny wykazują

właściwości antyoksydacyjne [Chen i in., 2020], immunomodulujące [Kosmala i in., 2025], przeciwwzapalne [Wu i in., 2020] i przeciwnowotworowe [Lopes i in., 2025]. Zastosowanie błonnika pokarmowego z owoców jagodowych, w tym również malin, do wzbogacania wyrobów piekarniczych prowadzi do zwiększonej produkcji małocząsteczkowych kwasów tłuszczowych (SCFA), co wskazuje na potencjał prebiotyczny produktu [San Mateo i in., 2025]. Pektyny stosowane są również jako zagęstniki [Mierczyńska i in., 2017].

3.1.1.3. Poziomka truskawka (*Fragaria x ananassa* Duchesne)

Poziomka truskawka (*Fragaria x ananassa* Duchesne), potocznie nazywana poziomką ananasową, wielkoowocową lub truskawką, jest mieszańcem dwóch gatunków - poziomki chilijskiej (*Fragaria chiloensis*) i wirginijskiej (*Fragaria virginiana*).

Tabela 7. Taksonomia botaniczna poziomki truskawki (potocznie truskawka) (*Fragaria x ananassa* Duchesne) [Woziwoda, 2014].

Domena	eukarionty
Królestwo	rośliny
Podkrólestwo	rośliny zielone
Nadgromada	rośliny telomowe
Gromada	rośliny naczyniowe
Podgromada	rośliny nasienne
Nadklasa	okrytonasienne
Klasa	Magnoliopsida
Nadrząd	różopodobne
Rząd	różowce
Rodzina	Rosaceae Juss. (różowate)
Rodzaj	<i>Fragaria</i> (poziomka)
Gatunek	<i>Fragaria x ananassa</i> (poziomka ananasowa)



Ryc. 14. Poziomka truskawka (*Fragaria x ananassa* Duchesne) [Lindmann, 1917].

Uważa się, że do naturalnej hybrydyzacji doszło w XVIII wieku. Gatunek został opisany przez francuskiego biologa Antoine Nicolasa Duchesne [Newerli-Guz i in.,

2023]. Krzew z rodziny różowatych (*Rosaceae*) występuje globalnie w klimacie umiarkowanym [Ożarowski, 1982; Ożarowski, 1987]. Bylina osiąga średnio ok. 30 cm. Trójlistkowe liście ogonkowe posiadają piłkowane brzegi. Kwiaty o białej barwie opisywane są jako promieniste. Poprzez zmięśnienie dna kwiatowego tworzy tzw. owoc rzekomy, który charakteryzuje się czerwonym kolorem i licznymi orzeszkami (niełupkami będącymi owocami właściwymi) na powierzchni [Ożarowski, 1987]. Owoc kojarzony jest często z aromatycznym zapachem i przyjemnym smakiem [Ożarowski, 1987]. W Polsce zarejestrowano 37 odmian truskawki [COBORU].

W liściach rośliny stwierdzono obecność garbników pirokatechinowych (ok. 6%), flawonoidów, śladowych ilości składników olejów eterycznych, kwasów organicznych i soli mineralnych [Ożarowski, 1982; Ożarowski, 1987; USDC]. Owoce truskawek stanowią źródło związków fenolowych (225 mg/100g świeżych owoców), wśród których dominują antocyjany w postaci fragaryny, cyjanidyno-3-glukozydu oraz pelargonidyno-3-glukozydu i pelargonidyno-3-rutynozydu [Baranowska i in., 2017; Krauze-Baranowska i in., 2014; Newerli-Guz i in., 2023]. Kolor owoców zależy głównie od obecności antocyjanów, które pod wpływem zmiany pH przyjmują różną barwę [Yuan i in., 2023]. Owoce bogate są w minerały oraz witaminy, głównie witaminę C [Giampieri in., 2014; Miller i in., 2019].

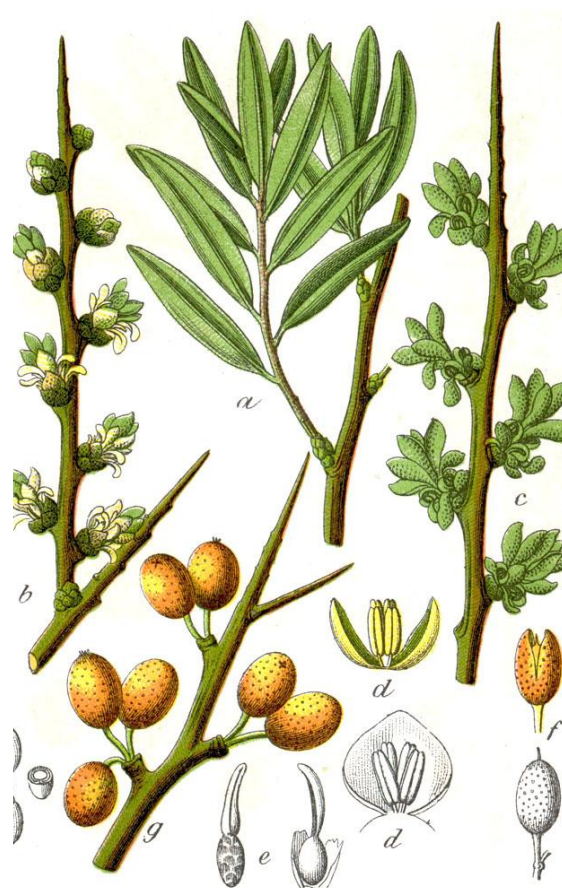
Istotnym komponentem biomasy roślinnej owocu truskawki są pektyny pozyskiwane na drodze ekstrakcji konwencjonalnej i niekonwencjonalnej [Hotchkiss i in., 2024]. Skład pektyn owocu truskawki, obok GalA, obejmuje cukry obojętne: Ara, Gal, Rha, Xyl, a także śladowe ilości Fuc, Man i kwasu glukuronowego (GlcA). Związki bioaktywne truskawki wykazują właściwości antyoksydacyjne [Wang i in., 2025a], prebiotyczne oraz hipocholesterolemiczne [Hotchkiss i in., 2024]. Pektyny truskawki charakteryzują się szerokim zakresem masy cząsteczkowej (65 - 9479 kDa) [Wang i in., 2025a; Hotchkiss i in., 2024; Wang i in., 2025a]. Wykazują dużą zdolność do wiązania wody (WHC) i oleju (OHC), co jest powiązane z ich strukturą chemiczną [Wang i in., 2025a]. Dzięki tym właściwościom znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym jako środki żelujące, emulgatory i zagęstniki. Ponadto, ze względu na ich biokompatybilność i dużą biodegradowalność wykorzystywane są w przemyśle farmaceutycznym i biomedycznym, m.in. jako nośniki w systemach kontrolowanego uwalniania leków [Saez-Aguayo i in., 2025].

3.1.1.4. Rokitnik zwyczajny (*Hippophae rhamnoides* L.)

Rokitnik zwyczajny (*Hippophae rhamnoides* L.) jest ciernistym krzewem z rodziny oliwkowatych (Elaeagnaceae), występującym w stanie naturalnym w północno-zachodniej Europie, na Kaukazie, Syberii, w Indiach, aż po wschodnią Azję [Teng i in., 2024].

Tabela 8. Taksonomia botaniczna rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) [Woziwoda, 2014].

Domena	eukarionty
Królestwo	rośliny
Podkrólestwo	rośliny zielone
Nadgromada	rośliny telomowe
Gromada	rośliny naczyniowe
Podgromada	rośliny nasienne
Nadklasa	okrytonasienne
Klasa	Magnoliopsida
Nadrząd	różopodobne
Rząd	wawrzynkowce
Rodzina	Elaeagnaceae (oliwnikowate)
Rodzaj	<i>Hippophae</i> (rokitnik)
Gatunek	<i>Hippophae rhamnoides</i> L. (rokitnik zwyczajny)



Ryc. 15. Rokitnik zwyczajny (*Hippophae rhamnoides* L.) [Lindmann, 1917].

Rokitnik jest uznany za roślinę pionierską. Posiada małe wymagania glebowe. W Polsce występują dwie odmiany rokitnika, które można spotkać głównie na piaszczystych urwiskach nadmorskich oraz w Pieninach [Ożarowski, 1987; COBORU]. Niekiedy jest też uprawiany w parkach, rezerwatach przyrody lub na terenach prywatnych, zarówno w celach estetycznych, jak i użytkowych. Rokitnik w Polsce zaliczany jest do gatunków objętych częściową ochroną [Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014]. Wykorzystywany w medycynie tradycyjnej i ludowej w Azji, głównie w Mongolii, Tybecie [Sun i in., 2025] oraz w Rosji [Bal i in., 2011]. Na Syberii liście rokitnika i młode, ulistnione gałązki stosowane były

w gospodarstwach domowych jako środek przeciwbiegunkowy oraz jako remedium w chorobach gorączkowych [Ożarowski, 1987].

Rokitnik uprawiany jest dla jego jadalnych owoców i w celu ochrony gleb przed erozją, zwłaszcza na terenach piaszczystych i przemysłowych. Często stosowany jest do rekultywacji gruntów i poprawy jakości dzikich siedlisk [Nawaz i in., 2018; Wei i in., 2019]. Za największego producenta uznawane są Chiny, którym przypisuje się nawet 90% produkcji globalnej [Tkacz i in., 2019; Singh i in., 2024].

Roślina jest niezwykle odporna na stres środowiskowy i charakteryzuje się szybką adaptacją [Mei i in., 2023]. Owoce są spożywane w postaci świeżej lub wykorzystywane w produkcji dżemów, konfitur, soków, nalewek i win. Przetwory owocowe pozostają cennym źródłem dobrze przyswajalnej naturalnej witaminy C [Ożarowski, 1987; Mei i in., 2023]. Owoce rokitnika i ich przetwory, ze względu na obecność substancji biologicznie aktywnych, uznawane są za żywność funkcjonalną. Ponadto zarówno owoce, jak i inne części rośliny znajdują zastosowanie w produktach leczniczych oraz kosmetykach [Dąbrowski i in., 2022; Zompra i in., 2021; Tkacz i in., 2019].

Szacuje się, że owoce rokitnika zawierają około 40-46% polisacharydów [Sun i in., 2025]. Udział związków fenolowych wynosi 29,8 - 38,8 mg GAE/g suchej masy [Wang i in., 2025]. Owoce rokitnika stanowią źródło witamin z grupy B, witaminy K oraz w szczególności witaminy C (50-200 mg). Owoce te są też bogatym źródłem karotenoidów, głównie β -karotenu, β -kryptoksantynu, likopenu i zeaksantynu. Liście rośliny stanowią źródło harmolu - naturalnego heterocyklicznego alkaloidu, zaliczanego do alkaloidów β -karbolinowych, wykazującego działanie antyoksydacyjne oraz GABA-nergiczne [Ożarowski, 1987; USDC; Woszczak i in., 2025; Zompra i in., 2021; Urbaniak i in., 2019; Ciesarová i in., 2020; Wang i in., 2021; Bal i in., 2011]. Z uwagi na silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne i antyoksydacyjne, a także zdolność do stymulacji syntezy kolagenu oraz proliferacji komórek, *Hippophae rhamnoides* znajduje zastosowanie we wspomaganiu procesów gojenia ran, w tym oparzeniowych [Pathak i Mazumder, 2024; Mihalcea i in., 2021]. Polisacharydy obecne w owocach, liściach i nasionach rokitnika posiadają właściwości immunomodulujące, przeciwzapalne, antyoksydacyjne i regulujące mikrobiotę jelitową [Niannian i in., 2026]. Olej z nasion oraz owoców rokitnika zyskuje coraz większą popularność jako środek nutraceutyczny [Krystyjan i in., 2025].

Szacuje się, że ilość pektyn w owocach rokitnika mieści się w przedziale 0,21 – 0,68% świeżej masy [Tkacz i in., 2019]. Wysoki udział GalA sprzyja przewadze domen HG, obok których w strukturze pektyn występują również regiony RG-I, RG-II oraz XG [Farzaliyev i in., 2022]. Pektyny rokitnika zawierają również cukry obojętne, w tym: Rha, Gal Ara, Xyl i Glc, których obecność w polisacharydzie oraz wzajemne proporcje w istotnym stopniu warunkowane są m.in. przez zastosowaną metodę ekstrakcji [Teng i in., 2024]. Pektyny wykazują dużą zmienność, zarówno pod względem stopnia estryfikacji, gdzie są to zarówno LM pektyny (DE<50%) i HM pektyny (DE>50%), jak też masy cząsteczkowej (10 – 6460 kDa) [Teng i in., 2024; Shi i in., 2025; Wang i in., 2025; Wei i in., 2019; Ni i in., 2013]. Do właściwości użytkowych pektyn rokitnika można zaliczyć zdolności żelujące, zagęszczające, emulgujące i kompleksujące (głównie pektyny LM) [Shi i in., 2025; Farzaliyev i in., 2022]. Ponadto, pektyny te wykazują działanie immunomodulujące oraz przeciwnowotworowe [Wang i in., 2015; Wang i in., 2019].

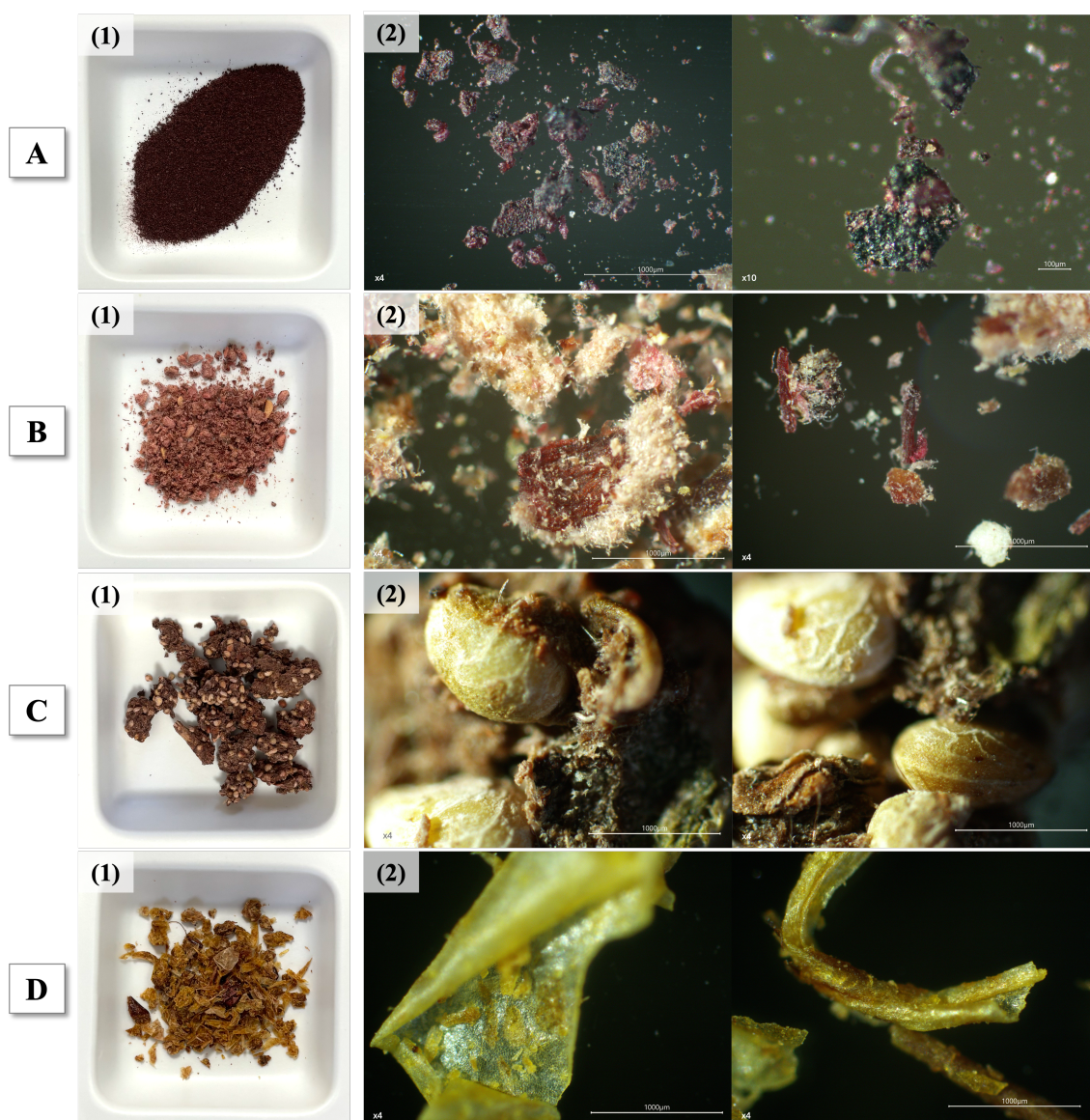
3.1.1.5. *Charakterystyka morfologiczna surowców roślinnych*

W oparciu o analizę wizualną, na podstawie dokumentacji fotograficznej oraz obserwacji materiału z wykorzystaniem mikroskopii optycznej, wykonano wstępną charakterystykę jakościową badanych rodzajów biomasy odpadowej, w postaci suchych rozdrobnionych cząstek, które zostały pozyskane od producentów: firmy Frunutex sp. z o.o. oraz firmy Zdrowsze Życie, jako materiał komercyjnie dostępny.

Wytłoki owoców czarnej porzeczki (Ryc. 16-A1, A2; Tabela 9) występowały w postaci drobnoziarnistych cząstek, tworzących proszek o ciemnofioletowej barwie. Badana próbka była jednorodna, nie stwierdzono obecności większych fragmentów tkanek roślinnych bądź zanieczyszczeń, do których można zaliczyć nieużytkowe części rośliny czy fragmenty tkanek nasiennych. Wielkość cząstek nie przekraczała 1 mm. Wysoki stopień rozdrobnienia materiału warunkował dużą powierzchnię właściwą, korzystną w przypadku kontaktu fazy stałej z medium ekstrakcyjnym, a w konsekwencji mogło warunkować zwiększoną wymianę masy w procesie ekstrakcji.

Wytłoki owoców maliny (Ryc. 16-B1, B2; Tabela 9) charakteryzowały się brudno różową barwą, zwartą, gruboziarnistą strukturą, a także obecnością fragmentów nasion oraz włóknistych elementów ścian komórkowych, co warunkowało większą niejednorodność tego materiału.

Wytłoki owocu truskawki (Ryc. 16-C1, C2; Tabela 9) składały się z dużych, zwartych części z wyraźnie widocznymi fragmentami nasion. Gruboziarnisty materiał miał barwę brunatną z jaśniejszymi akcentami w postaci niełupek. Rozmiary części przekraczały 4 mm, a ich struktura wskazywała na możliwość mniejszej powierzchni kontaktu z rozpuszczalnikiem w procesie ekstrakcji, w porównaniu z wyżej opisywanymi surowcami.



Ryc. 16. Morfologia wytlóków owocowych: A – czarna porzeczka; B – malina; C – truskawka; D – rokitnik, na podstawie dokumentacji fotograficznej (1) oraz obrazów mikroskopowych w powiększeniu 4 – 10x (2).

Wytłoki owoców rokitnika (Ryc. 16-D1, D2; Tabela 9) miały postać żółto-brązowych, miejscami półprzezroczystych płatków o włóknistej strukturze. Pomimo, że

umiarkowany stopień rozdrobnienia mógłby wskazywać na ograniczoną efektywność procesu ekstrakcji, zaobserwowana morfologia cząstek, a mianowicie wydłużona forma o niewielkiej grubości, wyglądała obiecująco.

Tabela 9. Morfologiczna ocena surowców roślinnych użytych do badań.

Cecha	Wytłoki owocowe			
	czarna porzeczka	malina	truskawka	rokitnik
barwa	ciemnofioletowa, brunatno-fioletowa	ciemnoróżowa, czerwono-różowa	bladoczerwona, brunatna	brązowo-żółta,
kształt cząstek	nieregularny, owalny	nieregularny, owalny	nieregularny, agregaty	nieregularny, płatki
stopień rozdrobnienia	bardzo wysoki	umiarkowany	niski	umiarkowany
rozmiar	< 1 mm	< 2,5 mm	> 5 mm	< 4 mm
struktura	jednorodna	niejednorodna	wysoce niejednorodna	niejednorodna
zapach	charakterystyczny	charakterystyczny	charakterystyczny, lekko wyczuwalny	charakterystyczny
elementy nasienne	nieobecne	obecne	obecne	nieobecne

Ocena wizualna surowców roślinnych umożliwiła zaobserwowanie różnic strukturalnych pomiędzy badanymi surowcami roślinnymi, które mogą mieć wpływ na przebieg procesu ekstrakcji pektyn oraz efektywność dalszych etapów łańcucha procesowego w celu ich oczyszczenia. Szczególne znaczenie w tej kwestii zdaje się mieć etap filtracji, który w przypadku drobnoziarnistego, sproszkowanego materiału roślinnego jest utrudniony i może wymagać przeprowadzenia dodatkowych czynności mających na celu skuteczne oddzielenie biomasy od surowego ekstraktu.

3.1.1.6. Analiza ilości wody w surowcach roślinnych

Wytłoki owocowe wykorzystane w badaniach, które pozyskano od dwóch polskich producentów – Frunutex sp. z o.o. i Zdrowsze Życie, posiadały specyfikacje oraz certyfikaty jakości (szczegóły w sekcji 4.3. *Metodologia*). Deklarowany przez producentów udział wody w biomase w przypadku wytlóków z czarnej porzeczki

wynosił poniżej 9,8%, natomiast dla maliny, truskawki i rokitnika był niższy niż 10%. Stopień wilgotności surowca stanowi istotny parametr jakościowy, który wpływa na trwałość biomasy, jej przechowywanie oraz dalsze przetwarzanie. Mała ilość wody skutecznie ogranicza rozwój drobnoustrojów oraz hamuje przebieg stale zachodzących w surowcu procesów biochemicznych, co w rezultacie przekłada się na bezpieczeństwo mikrobiologiczne materiału i jego wysoką jakość [Majerska, 2023].

Ocenę ilości wody w każdym surowcu roślinnym wykonano samodzielnie, w celu zweryfikowania danych przekazanych przez producentów. Parametry suszenia dobrano na podstawie informacji literaturowych [FP VIII, 2008], które wskazywały na konieczność ograniczenia temperatury do maksymalnie 70°C w przypadku surowców bogatych w polisacharydy (m.in. pektyny), głównie ze względu na możliwą ich wrażliwość termiczną. W rezultacie zastosowano niższą temperaturę, która nie przekraczała 65°C.

Tabela 10. Ocena ilości wody w badanych surowcach roślinnych.

Wytłoki owocowe	Ilość wody [% , w/w]	Ilość wody deklarowana przez producenta [% , w/w]
Czarna porzeczka	5,17 ± 1,13	< 9,8
Malina	4,22 ± 0,15	< 10,0
Truskawka	2,22 ± 0,03	< 10,0
Rokitnik	2,09 ± 0,04	< 10,0

* Analizy wykonano trzykrotnie.

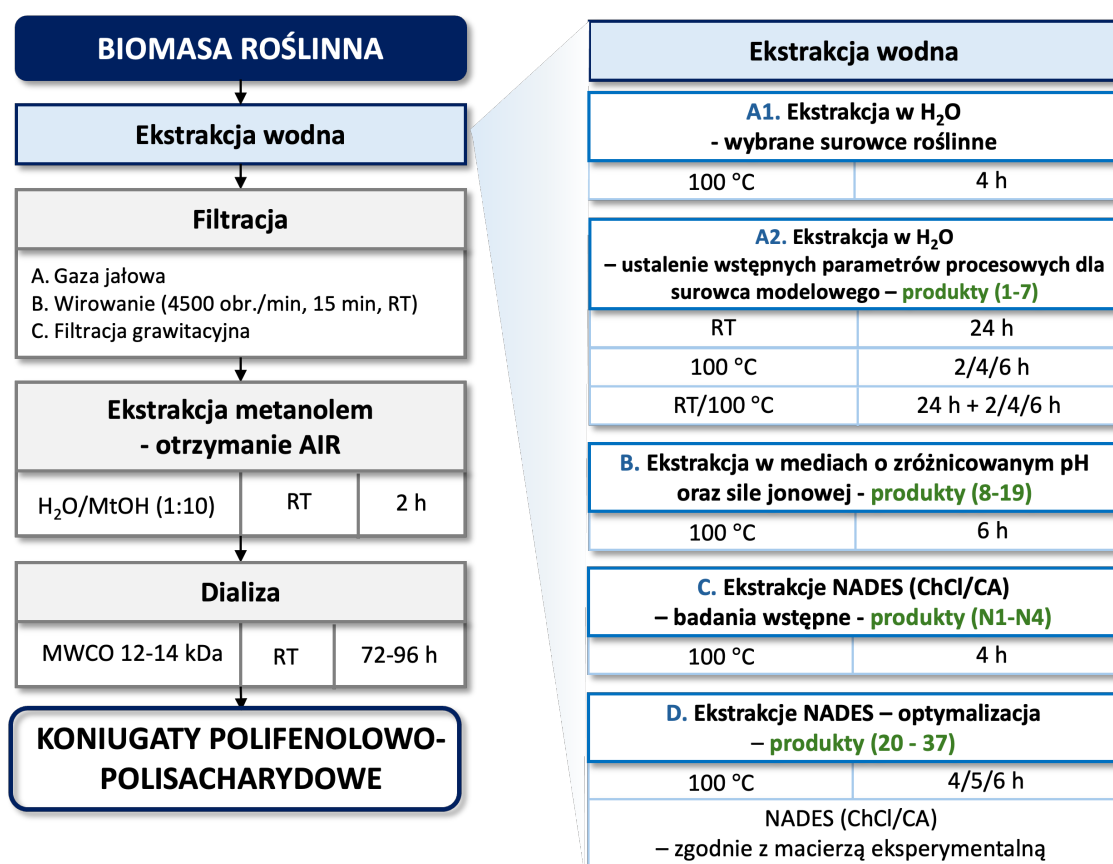
Badane wytłoki owocowe charakteryzowały się bardzo niską wilgotnością (2,09 – 5,17%), przy czym najwyższą wartość tego parametru wykazały wytłoki owoców czarnej porzeczki, a najniższą rokitnika oraz truskawki. Uzyskane wyniki były istotnie niższe od deklarowanych przez producenta, co wskazuje na wysoką jakość surowców oraz ich wysoką trwałość w czasie składowania.

3.2. Proces ekstrakcji

3.2.1. Ustalenie wstępnych warunków procesowych

3.2.1.1. Ekstrakcja polisacharydów w warunkach wodnych

Część ekstrakcyjną rozpoczęto od przeprowadzenia serii ekstrakcji w wodzie, w temperaturze wrzenia układu (HWE), prowadząc proces dla każdego badanego surowca roślinnego. Dane literaturowe wykazywały, że skuteczny proces ekstrakcji pektyn z owoców lub ich wycisków, prowadzony w środowisku wodnym, zależy od wielu czynników, takich jak: temperatura, siła jonowa, pH, stosunek masy surowca do objętości rozpuszczalnika. Jednakże standardowo przyjmuje się, że ekstrakcja pektyn może być prowadzona przez 2-6 h [Hundie i in., 2021; Muñoz-Almagro i in., 2021; Ripoll i in., 2023; Guo i in., 2024].



Ryc. 17. Łańcuch procesowy wyodrębniania pektyn z biomasy roślinnej.

W pierwszym etapie prac dla każdego surowca prowadzono ekstrakcję w wodzie dejonizowanej, w temperaturze 100°C, przez 4 h. Na tym etapie zaobserwowano różnice wizualne w barwie otrzymanych ekstraktów, które odpowiadały barwom surowców, wynikającym głównie z rodzaju i ilości obecnych w nich polifenoli. Wodne ekstrakty z wyłoków owoców: czarnej porzeczki (**eI**), maliny (**eII**), truskawki (**eIII**) i rokitnika (**eIV**) charakteryzowały się odpowiednio: różowo-fioletową, czerwono-różową, czerwonałą oraz pomarańczowo-brunatną barwą (Ryc. 17, A1. Ekstrakcja w H₂O).

Następnie etap oddzielenia stałych cząstek biomasy od fazy ciekłej rozpoczęto od wstępnego przesączenia ekstraktów przez przegrodę w formie jałowej gazy. Uzyskany przesącz zawierał znaczącą ilość mikro-osadu, który uniemożliwiał wykonanie filtracji grawitacyjnej z wykorzystaniem sączka bibułowego. Problem był szczególnie zauważalny w przypadku surowca z czarnej porzeczki, której wyłoki cechowały się największym stopniem rozdrobnienia. W tym przypadku, w celu usunięcia drobnej zawiesiny, która przeszła przez przegrodę filtracyjną, zastosowano wirowanie w celu wytrącenia jej siłą odśrodkową (4500 obr./min, 15 min). Uzyskany supernatant poddano filtracji grawitacyjnej przez bibułę filtracyjną. Jednakże, pomimo podjętych kroków, filtracja grawitacyjna w przypadku ekstraktu (**eIV**) okazała się niewystarczająco skuteczna ze względu na jego dużą gęstość. Konieczne było w przypadku tego ekstraktu zastosowanie filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem (Ryc. 17, Filtracja).

Ekstrakty roślinne (**eI-eIV**) poddano ekstrakcji alkoholowej z wykorzystaniem alkoholu metylowego, po uprzednim ich zagęszczeniu na wyparce rotacyjnej do konsystencji „lejącego się miodu” (Ryc. 17, Ekstrakcja metanolem - otrzymanie AIR). W środowisku wzrastającego stężenia niższego alkoholu substancje o dużej polarności tracą zdolność do bycia rozpuszczalnymi i wytrącają się w tym środowisku w formie zawiesiny lub osadu (ang. *alcohol insoluble residues*, AIR). Takie postępowanie jest szczególnie przydatne do rozdzielania substancji rozpuszczalnych w alkoholu, głównie związków polifenolowych i równoczesnego wytrącania szczególnie tych o charakterze cukrowym, w tym też polisacharydów. Obniżona temperatura tego procesu oraz zredukowana ilość wody w ekstrakcie sprzyjają temu procesowi [Hilz i in., 2005]. W wielu eksperymentach otrzymywania AIR stosuje się alkohol etylowy [Ripoll i in., 2023; Muñoz-Almagro i in., 2021; Jarrín-Chacón i in., 2023]. Zarówno metanol jak i etanol są rozpuszczalnikami całkowicie mieszanymi z wodą, wykazującymi dobrą zdolność do precypitacji substancji o naturze cukrowej. Metanol, pomimo rosnącego

znaczenia rozpuszczalników przyjaznych środowisku, pozostaje powszechnie stosowany w pracach eksperymentalnych z uwagi na jego niską cenę i skuteczne wypieranie wody z matrycy polisacharydowej w procesie wytrącania tych substancji, a ponadto na możliwość szybszego usuwania tego rozpuszczalnika w procesie odparowywania pod zmniejszonym ciśnieniem. Jednakże należy pamiętać, że metanol nie jest akceptowalny do użycia w przypadku, gdy produkt końcowy ma przeznaczenie spożywcze, kosmetyczne lub farmaceutyczne. Wtedy należy zastąpić go etanolem o wysokiej czystości.

W przypadku wszystkich surowych wodnych ekstraktów (**eI-eIV**) pod wpływem metanolu zaobserwowano wytrącanie się osadów, charakteryzujących się kremową barwą, zdecydowanie jaśniejszą niż surowe ekstrakty. Każdorazowo do oddzielenia precypitatu od barwnego metanolowego przesączu stosowano filtrację na bibule, pod zmniejszonym ciśnieniem. Metoda zapewniła możliwość odmycia zebranego osadu dodatkową porcją metanolu. Uzyskane osady miały jednorodną, lekko żelową konsystencję pasty i subtelnie różniły się między sobą barwą. Osad otrzymany z wyłoków z czarnej porzeczki był najciemniejszy.

W celu usunięcia resztek alkoholu otrzymane osady zostały poddane procesowi suszenia gorącym powietrzem, w temperaturze nieprzekraczającej 60°C. Zaobserwowano zauważalne zmniejszenie objętości osadów. Otrzymane suche osady, występujące w postaci nieregularnych agregatów, poddano dalszemu oczyszczaniu metodą dializy wobec wody dejonizowanej, gdzie przegrodę separacyjną stanowiła celuloza (MWCO 12-14 kDa) (Ryc. 17, Dializa). Celem procesu była eliminacja związków małocząsteczkowych, które wytrąciły się z roztworu alkoholowego wraz z polisacharydami, a mianowicie usunięcie: mono- i oligosacharydów, aminokwasów, kwasów organicznych, soli, w tym nieorganicznych [Alba i in., 2018]. Postęp procesu kontrolowano konduktometrycznie, na drodze pomiaru zmieniającej się przewodności elektrycznej roztworu wody w naczyniu, w którym prowadzona była dializa. Proces prowadzono przez co najmniej 72 godziny, przy regularnej wymianie objętości wody dializacyjnej, aby zapewnić właściwą dynamikę procesu. Każdorazowo po zakończeniu dializy makrocząsteczkowa pozostałość w worku dializacyjnym, stanowiąca surowy produkt końcowy, została odparowana do sucha (**I-IV**) i zważona, a rezultat pomiaru posłużył do obliczenia wydajności procesu ekstrakcji wg wzoru:

$$Y [\%] = \frac{m_p}{m_b} \times 100 \quad [1],$$

gdzie:

Y - wydajność,

m_p – masa produktu po ekstrakcji oraz oczyszczeniu na drodze dializy [g],

m_b - masa biomasy roślinnej (wytłoków owocowych) [g].

Największą wydajność procesu z opisanego ciągu procesowego odnotowano dla produktu z wytłoków owocu rokitnika (**IV**) (4,70% wag.), natomiast najniższą dla produktu (**III**) uzyskanego z owocu truskawki (1,14% wag.) (Tabela 11).

3.2.1.2. Charakterystyka chemiczna produktów (I-IV)

Charakterystykę chemiczną produktów (**I–IV**) przeprowadzono z wykorzystaniem analiz spektrofotometrycznych, ukierunkowanych na oznaczenie ilości wybranych grup substancji organicznych, w tym polisacharydów, kwasów uronowych, polifenoli oraz białek.

Całkowitą ilość cukrów określono przy pomocy powszechnie stosowanej metody fenolowo-siarczanowej [Dubois i in., 1956]. Węglowodany w środowisku stężonego kwasu siarkowego ulegają hydrolizie do monosacharydów na skutek rozerwania wiązań glikozydowych i odwodnienia. Powstałe w ten sposób furfurale, a głównie 5-hydroksymetylofurfural mogą wchodzić w reakcję z fenolem, tworząc barwne, żółto-pomarańczowe produkty, których intensywność jest proporcjonalna do stężenia sacharydów w badanej próbce. Stosowaną substancją referencyjną w tej metodzie jest Glc. Metoda ta posiada swoje ograniczenia, szczególnie w przypadku próbek, w których obecna jest istotna ilość kwasów uronowych. Obserwuje się wtedy niedoszacowanie stężenia cukrów całkowitych w próbce [Yue i in., 2022; Li i in., 2007; Zhao i in., 2024]. Wynika to z niepełnej konwersji kwasów uronowych do pochodnych furfurali, która zachodzi znacznie wolniej niż w przypadku cukrów obojętnych, jak też z różnic w zakresie maksymalnej absorpcji na widmie UV-Vis. Dla glukozy $\lambda=490$ nm, natomiast dla kwasu galakturonowego i kwasu glukuronowego $\lambda=483$ nm. Jak wynika z doniesień literaturowych wielu autorów stosuje wskaźnik korygujący pomiar wykonany metodą fenolowo-siarczanową [Yue i in., 2022]. Dlatego też w przypadku produktów stanowiących przedmiot niniejszej rozprawy, które z założenia powinny posiadać

znaczące ilości kwasów uronowych, także zastosowano wskaźnik korygujący równy 2,60, 2,87, 1,57 oraz 2,48 odpowiednio dla produktów z czarnej porzeczki, maliny, truskawki oraz rokitnika (Tabela D1. Dodatek).

Do oceny ilościowej kwasów uronowych zastosowano metodę *m*-hydroksybifenylową [Blumenkrantz i Asboe-Hansen, 1973]. W silnie kwasowym środowisku kwasy uronowe (ang. *uronic acids*, UA) ulegają odwodnieniu i hydrolizie, czego rezultatem jest powstanie reaktywnych pochodnych furfurali. Reagują one z *m*-hydroksybifenylem tworząc związek o różowej barwie, którego ilość można ocenić techniką UV-Vis przy $\lambda=520$ nm, stosując jako substancję wzorcową GalA. Obecność jonów boranowych zwiększa specyficzność reakcji tej reakcji.

Biorąc pod uwagę naturę surowca, czyli pozostałości po owocach jagodowych, należy pamiętać, że zawarte w nich polifenole mogą tworzyć trwałe wiązania chemiczne z trójwymiarową siecią wyodrębnionych polisacharydów. Zjawisko to jest często obserwowane, a jego efektem jest zauważalna barwa otrzymanych polisacharydów. Dlatego też zalecane jest ilościowe oszacowanie polifenoli metodą Folin'a-Ciocalteu [Singleton i Rossi, 1965]. W metodzie tej przeprowadza się reakcję, zachodzącą w środowisku alkalicznym, która oparta jest na utlenianiu związków fenolowych, obecnych w badanej próbce, przy jednoczesnej redukcji soli kwasów fosfomolibdenowego i fosfowolframowego, będących głównymi składnikami odczynnika Folin'a-Ciocalteu. W rezultacie powstaje produkt o charakterystycznej niebieskiej barwie, którego intensywność jest proporcjonalna do całkowitej ilości związków fenolowych. Tak otrzymane roztwory można ocenić ilościowo techniką spektrofotometryczną przy $\lambda=765$ nm, a rezultat najczęściej wyraża się w formie ekwiwalentu kwasu galusowego (GAE), który jest powszechnie używany jako substancja wzorcowa lub procent wagowy.

Ostatnią grupą substancji, które mogą towarzyszyć polisacharydom wydzielanym z wycieków roślinnych, są białka. Do ich oznaczenia zaleca się kilka metod analitycznych, jednak najczęściej wykorzystuje się metodę Lowry'ego [Lowry i in., 1951] ze względu na najmniejszą liczbę możliwych interferencji z innymi składnikami badanego produktu pochodzenia naturalnego. Reakcję przeprowadza się w środowisku o charakterze zasadowym, gdzie zachodzi wiązanie jonów miedzi z obecnym w produkcie białkiem, czego wynikiem jest powstanie fioletowego kompleksu biuretowego. Dodatkowo do układu reakcyjnego odczynnika Folin'a-Ciocalteu powoduje

zmianę barwy produktu na niebieską. Wynika to z redukcji soli przez reszty aminokwasowe tyrozyny i tryptofanu powszechnie obecne w białkach roślinnych. Barwny produkt ocenia się techniką UV-Vis przy $\lambda = 750$ nm. Jako substancja referencyjna zalecana jest albumina wołu.

Dla produktów (I–IV) otrzymano rezultaty wyżej opisanych analiz kolorymetrycznych, które potwierdziły ich dominujący polisacharydowy charakter chemiczny. Udział procentowy sacharydów w badanych produktach mieścił się w zakresie od 79,01% dla (I) do 96,93% dla (II). Jednocześnie udział kwasów uronowych pozostawał ograniczony i wynosił pomiędzy 18,22% a 36,46% (Tabela 11). Uwzględniając ilość UA pozyskanych z 1 g biomasy roślinnej oraz stosunkowo niski średni udział polifenoli oraz białek w badanych produktach, najbardziej obiecującym surowcem okazał się wyłok z owocu rokitnika. Najmniej korzystne rezultaty odnotowano dla produktu z wyłoków z owocu truskawki (III), ponieważ ekstrakcja w wodzie umożliwiła uzyskanie jedynie 2,19 mg UA z 1 g biomasy odpadowej. Produkty (II) oraz (I) wykazały zbliżone wartości pod względem ilości UA (odpowiednio 6,08 oraz 4,59 mg/g). Produkt (I) charakteryzował się najwyższym udziałem związków towarzyszących, czyli białek oraz polifenoli, wynoszących odpowiednio 5,33% oraz 9,32% wag. Wysoki udział polifenoli w owocach czarnej porzeczki znajduje potwierdzenie w literaturze naukowej [Baranowska i in., 2017]. Należy podkreślić, że tak znaczący udział szczególnie związków polifenolowych stanowi wyzwanie technologiczne. Opracowanie efektywnego ciągu procesowego, który zapewniałby w sposób powtarzalny ich możliwie maksymalne usunięcie z produktu końcowego stanowi istotne wyzwanie. Z tego względu zdecydowano, aby wyłok z owocu czarnej porzeczki posłużył jako surowiec modelowy w procesie optymalizacji ekstrakcji.

Podsumowując, przeprowadzenie serii ekstrakcji w wodzie dla czterech różnych surowców odpadowych, a następnie oczyszczenie ich alkoholem i na drodze dializy w wodzie do otrzymania makrocząsteczkowych produktów bogatych w polisacharydy, umożliwiło identyfikację kluczowych aspektów operacji jednostkowych stanowiących podstawę procesu otrzymywania pektyn z wyłoków owocowych. Uzyskano wstępne informacje dotyczące udziału polisacharydów w badanych biomasach odpadowych.

Tabela 11. Wydajność oraz charakterystyka chemiczna polisacharydów otrzymanych z wyłoków wybranych surowców roślinnych – ekstrakcja wodna (WE).

Surowiec roślinny		Warunki ekstrakcji			Y	Polisacharydy		Polifenole	Białka	
		medium ekstrakcyjne	t (h)	T (°C)	(% wag.)	Calkowite*		(% wag.)	(% wag.)	
						UA				
					(% wag.)	w produkcie (% wag.)	w części polisacharydowej (% wag.)			
(I)	cz. porzeczka	H ₂ O	4	100	2,90	79,01 ± 1,91	20,05 ± 0,17	25,37 ± 0,21	9,32 ± 0,05	5,33 ± 0,05
(II)	malina				3,44	96,93 ± 2,07	18,22 ± 1,12	18,80 ± 1,15	1,15 ± 0,08	1,96 ± 0,08
(III)	truskawka				1,14	95,15 ± 2,43	20,22 ± 0,44	21,25 ± 0,46	1,40 ± 0,13	3,25 ± 0,07
(IV)	rokitnik				4,70	92,16 ± 4,19	36,46 ± 2,30	39,56 ± 2,50	2,42 ± 0,20	5,59 ± 0,50

3.2.1.3. *Ustalenie wstępnych parametrów procesowych*

Jak wspomniano wcześniej jako surowiec modelowy do wyznaczenia wstępnych parametrów procesowych, a następnie do przeprowadzenia optymalizacji procesu ekstrakcji, wybrano wytloki z owocu czarnej porzeczki. W tym celu wykonano szereg ekstrakcji w wodzie, przy zmiennych warunkach procesowych:

- 1: prowadząc macerację (MAC) w temperaturze pokojowej (RT), przez 24 h,
- 2: prowadząc ekstrakcję w 100°C (HWE), przez 2 h,
- 3: prowadząc ekstrakcję w 100°C (HWE), przez 4 h,
- 4: prowadząc ekstrakcję w 100°C (HWE), przez 6 h,
- 5: prowadząc macerację w temperaturze pokojowej (RT), przez 24 h, a następnie ekstrakcję w 100°C, przez 2 h (MAC/HWE),
- 6: prowadząc macerację w temperaturze pokojowej (RT), przez 24 h, a następnie ekstrakcję w 100°C, przez 4 h (MAC/HWE),
- 7: prowadząc macerację w temperaturze pokojowej (RT), przez 24 h, a następnie ekstrakcję w 100°C, przez 6 h (MAC/HWE).

Stosunek frakcji stałej (surowca) do medium ekstrakcyjnego wyniósł 1:15 (w/v).

W kolejnym etapie każdy surowy ekstrakt poddano filtracji, wytrącaniu AIR za pomocą metanolu, a następnie dializie w wodzie dejonizowanej. W ten sposób otrzymano produkty (1) – (7), które oceniono ilościowo pod względem wydajności ciągu procesowego, a następnie scharakteryzowano chemicznie (Tabela 12).

Otrzymane produkty nie wykazywały istotnych różnic wizualnych. Produkt (1) otrzymany w wyniku maceracji, pomimo dużej ilości polisacharydów o dużym stężeniu UA, charakteryzował się niską wydajnością (0,15% wag.). Zaobserwowano wzrost wydajności wraz z wydłużeniem czasu prowadzenia ekstrakcji. Poprzedzenie HWE etapem maceracji zwiększało wydajność ekstrakcji w porównaniu do samego HWE, osiągając 4,12% wag. dla produktu (7), w porównaniu do 3,07% wag. dla produktu (4), w przypadku którego pominięto macerację. Udział polisacharydów w dla produktów (1) – (7) pozostawał na zbliżonym poziomie, jednakże zaobserwowano, że produkty, które zostały uzyskane na drodze MAC/HWE cechowały się nieco niższą ilością UA niż te, które nie były poddawane wstępnie maceracji, i nieco większą ilością polifenoli oraz białek.

Podsumowując, poprzedzanie HWE 24-godziną maceracją nie wpływa korzystnie ze względów jakościowych na polisacharydowy produkt końcowy, a ponadto znacząco wydłuża ciąg procesowy.

3.2.1.4. Wpływ zróżnicowanego pH oraz siły jonowej na proces ekstrakcji

Kolejny etap badań wstępnych obejmował ocenę wpływu środowiska ekstrakcji na produkt końcowy, otrzymany ostatecznie po filtracji, wytrącaniu metanolem AIR i dializie w wodzie. Uzyskano następujące produkty, w przypadku których ekstrakcję prowadzono każdorazowo w temp. 100°C, przez 6 h, przy udziale fazy stałej do ciekłej 1:15 (w/v). Zmienną stanowiły wodne roztwory, w których prowadzono proces ekstrakcji. Przygotowano następujące rodzaje mediów ekstrakcyjnych:

- 8:** 5% wodny roztwór chlorku choline (ChCl),
- 9:** 10% wodny roztwór chlorku choline (ChCl),
- 10:** 5% wodny roztwór kwasu cytrynowego (CA),
- 11:** 10% wodny roztwór kwasu cytrynowego (CA),
- 12:** 5% wodny roztwór kwasu szczawiowego (OA),
- 13:** 10% wodny roztwór kwasu szczawiowego (OA),
- 14:** 5% wodny roztwór szczawianu amonu (AO),
- 15:** 5% wodny roztwór kwasu winowego (TA),
- 16:** 10% wodny roztwór kwasu winowego (TA),
- 17:** 5% wodny roztwór winianu sodu (ST),
- 18:** 5% wodny roztwór kwasu askorbinowego (AA),
- 19:** 10% wodny roztwór kwasu askorbinowego (AA).

Chlorek choline (ChCl), kwas cytrynowy (CA), kwas szczawiowy (OA), kwas winowy (TA) oraz kwas askorbinowy (AA) zaliczane są do grupy metabolitów pierwotnych (PRIM), stanowiących potencjalne komponenty układów NADES [Chevé-Kools i in., 2025]. Chlorek choline, czwartorzędowa sól amoniowa, jest powszechnie wykorzystywany jako akceptor wiązań wodorowych (HBA) w układach NADES, natomiast kwasy organiczne, a wśród nich szczególnie kwas cytrynowy, są często stosowane jako donory wiązań wodorowych (HBD) [Pereira i in., 2024; Solcan i in., 2024]. Kwasy organiczne, takie jak kwas askorbinowy (AA), kwas szczawiowy (OA) czy kwas cytrynowy (CA), z sukcesem stosowano do ekstrakcji pektyn, przy czym największą skuteczność przypisuje się CA [Jarrín-Chacón i in., 2023; Ferreira-Lazarte i in., 2026].

Udokumentowano również zastosowanie w tym celu soli amonowej kwasu szczawiowego [Ramli i Asmawati, 2011; Wang i in., 2015]. Zgodnie z danymi przedstawionymi w bazie FDA dotyczącymi bezpieczeństwa substancji i składników spożywczych (GRAS, ang. *generally recognized as safe*) chlorek choliny, kwas cytrynowy, kwas winowy, kwas askorbinowy, winian sodu uznawane są za związki kategorii 1, co jest równoznaczne z wysokim bezpieczeństwem w kontekście zdrowia człowieka i wpływu na środowisko naturalne [FDA].

Każdy z roztworów stanowiących medium ekstrakcyjne zbadano z uwagi na wartość pH i przewodność właściwą (Tabela 13). Zastosowanie wyżej opisanego schematu eksperymentalnego umożliwiło uzyskanie produktów z wydajnością w zakresie od 0,05% wag. dla produktu (13) do 6,07% wag. dla produktu (19).

Charakterystyka chemiczna w połączeniu z analizą właściwości mediów ekstrakcyjnych (Tabela 13) pozwoliły na sformułowanie wniosków dotyczących wpływu pH środowiska ekstrakcyjnego na otrzymane produkty. Zaobserwowano, że typowo kwasowe warunki ekstrakcji, przy pH w przedziale 1,5-2,5, sprzyjały wydajnej ekstrakcji polisacharydów o dużym udziale % UA, przy jednocześnie ograniczonym udziale polifenoli – dotyczy to produktów: (10), (11), (15), (16), (18) i (19). Natomiast zbyt niska wartość pH medium ekstrakcyjnego, poniżej 1, skutkowała istotnym obniżeniem wydajności procesu, a uzyskane produkty charakteryzowały się niskim stężeniem cukrów – produkty (12) i (13). Przypuszczalnie może to wynikać z częściowej hydrolizy prowadzącej do degradacji polisacharydów. Otrzymane rezultaty wskazują natomiast, że łagodniejsze warunki procesu, przy pH w przedziale pH 4,5-5,0, mogą sprzyjać ekstrakcji białek, jak zaobserwowano dla produktów wyodrębnionych przy udziale CHCl_3 – produkty (8) i (9). Odnotowano także, że ekstrakcja polifenoli była bardziej efektywna w warunkach $\text{pH} > 4$.

Umiarkowana i niska przewodność właściwa roztworu wodnego ($\sigma < 75 \text{ mS/cm}$) sprzyjały ekstrakcji polisacharydów, natomiast wysoka przewodność właściwa ($\sigma > 115 \text{ mS/cm}$) istotnie ograniczała wydajność procesu oraz udział polisacharydów w produkcie, jak w przypadku (12) i (13). Należy dodać, że przewodność właściwa środowiska ekstrakcyjnego $\sigma < 20 \text{ mS/cm}$ była charakterystyczna dla roztworów o wartości pH w przedziale 1-2.

Zaobserwowano też, że zastosowanie wodnego roztworu OA wpłynęło negatywnie zarówno na wydajność procesu otrzymywania (13), jak również na ilość polisacharydów

w tym produkcie (31,38% wag.), podczas gdy roztwór ChCl, bez względu na zastosowane stężenie (8, 9) oraz roztwory AA (18, 19) umożliwiły uzyskanie preparatów zawierających ponad 64% polisacharydów. Roztwór CA sprzyjał wzbogaceniu produktów w UA, osiągając odpowiednio 24,64% oraz 22,96% dla produktów (10) i (11), przy jednoczesnym ograniczeniu udziału polifenoli do 6,38% i 7,28%.

Zastosowanie roztworów AO oraz ST umożliwiło otrzymanie produktów bogatych w polisacharydy, odpowiednio dla: (14) - 59,01% i (17) - 56,07%, w tym UA odpowiednio 18,60% i 17,66%, przy jednocześnie wysokiej wydajności (4,57% wag. i 5,05% wag.). Pomimo obiecujących rezultatów, wykorzystanie AO i ST do utworzenia układów NADES praktycznie jest niemożliwe ze względu na budowę chemiczną tych soli. Uniemożliwia ona tworzenie stabilnych wiązań wodorowych, głównie ze względu na zdeprotonowane grupy karboksylowe (brak donora wiązania wodorowego). Można przypuszczać, że w analizowanych układach dominują oddziaływania jonowe. W dostępnej literaturze naukowej brak jest też doniesień dotyczących układów NADES opartych na ChCl oraz solach kwasów dikarboksylowych.

Układy NADES bazujące na ChCl jako HBA oraz OA i AA jako HBD były z powodzeniem stosowane jako plastyfikatory folii skrobiowych [Sousa i in., 2022]. Mieszaninę NADES składającą się z ChCl i OA opisano też jako skuteczną we frakcjonowaniu biomasy lignocelulozowej [Mamilla i in., 2019]. Jednakże Chen i Lahaye (2021) wykazali, że zastosowanie NADES (ChCl/OA) jako układu ekstrakcyjnego prowadzi do obniżenia udziału polisacharydów w produkcie końcowym. Natomiast NADES bazujące na ChCl oraz AA znajdują zastosowanie głównie w ekstrakcji związków polifenolowych z biomasy roślinnej [Mahrous i in., 2025; Janić i in., 2025].

Biorąc pod uwagę dostępną literaturę zdecydowano o przeprowadzeniu optymalizacji procesu ekstrakcji pektyn z wyłoków owocowych przy wykorzystaniu układu NADES bazującego na ChCl oraz CA. Mieszaniny NADES (ChCl/CA) o zróżnicowanych stosunkach molowych komponentów składowych, stosowano z powodzeniem do ekstrakcji polisacharydów z różnych typów biomasy roślinnej [Imran i in., 2026; Shafie i Gan, 2020]. Jednakże wykorzystanie układu NADES (ChCl/CA) w optymalizacji procesu ekstrakcji pektyn z wyłoków czarnej porzeczki nie zostało dotychczas opisane.

Tabela 13. Właściwości mediów ekstrakcyjnych oraz wydajność i charakterystyka chemiczna polisacharydów otrzymanych z wytlóków czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) – ekstrakcja wodna na gorąco o ustalonym pH i sile jonowej.

Nr produktu	Warunki ekstrakcji					Y	Polisacharydy			Polifenole	Białka
	medium ekstrakcyjne					(% wag.)	Calkowite*	UA		(% wag.)	(% wag.)
	roztwór	pH	przewodność właściwa (mS/cm)	t (h)	T (°C)			w produkcie	w cz. polisacharydowej		
							(% wag.)	(% wag.)	(% wag.)		
(8)	5%	ChCl	4,52	48,10		3,22	64,87 ± 1,09	13,41 ± 0,38	20,68 ± 0,59	10,20 ± 0,24	9,35 ± 0,07
(9)	10%	ChCl	4,91	75,20		3,59	68,09 ± 0,62	12,79 ± 0,24	18,78 ± 0,36	10,24 ± 0,54	9,51 ± 0,27
(10)	5%	CA	1,74	9,84		4,07	55,44 ± 2,23	24,64 ± 0,33	44,44 ± 0,59	6,38 ± 0,11	6,25 ± 0,17
(11)	10%	CA	1,59	12,80		3,64	42,78 ± 2,71	22,96 ± 0,21	53,68 ± 0,50	7,28 ± 0,12	7,35 ± 0,12
(12)	5%	OA	0,83	115,20		0,06	42,24 ± 1,79	27,57 ± 0,33	65,28 ± 0,79	0,99 ± 0,02	2,39 ± 0,05
(13)	10%	OA	0,65	143,20		0,05	31,38 ± 0,13	16,63 ± 0,78	52,99 ± 2,47	1,09 ± 0,13	2,78 ± 0,12
(14)	5%	AO	6,23	105,80	6	100	4,57	59,01 ± 2,06	18,60 ± 0,47	31,52 ± 0,80	9,23 ± 0,21
(15)	5%	TA	1,70	13,94		3,73	47,70 ± 2,37	22,83 ± 0,09	47,86 ± 0,19	5,88 ± 0,14	6,93 ± 0,19
(16)	10%	TA	1,50	16,54		4,11	37,19 ± 1,55	21,05 ± 0,45	56,59 ± 1,21	6,03 ± 0,21	9,13 ± 0,10
(17)	5%	ST	8,92	50,70		5,05	56,07 ± 0,93	17,66 ± 0,27	31,50 ± 0,47	7,76 ± 0,05	7,49 ± 0,04
(18)	5%	AA	2,40	3,00		4,62	78,06 ± 3,90	19,00 ± 0,42	24,34 ± 0,54	5,32 ± 0,32	5,65 ± 0,10
(19)	10%	AA	2,24	4,07		6,07	75,42 ± 2,93	17,63 ± 0,21	23,38 ± 0,28	6,82 ± 0,28	7,34 ± 0,13

* Udział polisacharydów w produkcie został przeliczony zgodnie ze wskaźnikiem korekty równym 2,60.

3.2.1.5. *Ekstrakcja z wykorzystaniem wybranych układów NADES*

Dane literaturowe przedstawiają szeroki zakres procedur ekstrakcyjnych opartych na układach NADES, które pomimo spójnych etapów, wykazują istotne rozbieżności, szczególnie na etapie przygotowania medium ekstrakcyjnego. Stosowane są zarówno nierozcieńczone mieszaniny eutektyczne, jak i układy zawierające dodatek wody w różnych proporcjach. Dodatek wody do układu NADES zmienia jego właściwości fizykochemiczne poprzez modyfikację wiązań wodorowych, a także zmniejsza lepkość oraz zmienia przewodność właściwą i polarność układu. Wykazano, że wiele DES charakteryzuje się przewodnością właściwą rzędu ~ 2 mS/cm, przy czym wzrost temperatury lub dodatek wody zwiększa wartość tego parametru [Sahin i in., 2026]. W zależności od ilości wody dodanej do DES może ona zwiększać transport masy z fazy stałej do ciekłej lub prowadzić do zaburzenia struktury eutektycznej, co z kolei może wpływać pozytywnie lub negatywnie na wydajność ekstrakcji [Lu i in., 2022; Alcade i in., 2019]. W związku z tym udział wody w układach NADES stanowi istotny parametr procesowy w optymalizacji procesu ekstrakcji.

Zastosowanie nierozcieńczonych układów NADES może zapewniać zadowalające rezultaty, jednakże wiąże się z istotnymi ograniczeniami technologicznymi. Wysoka lepkość układu skutkuje ograniczonym transportem masy składników bioaktywnych z biomasy do medium ekstrakcyjnego. Dodatkowo taki układ przy próbie podniesienia skali będzie niekorzystny z ekonomicznego punktu widzenia [Wu i in., 2024b]. Dodatek wody modyfikuje charakter oddziaływań międzycząsteczkowych w układzie NADES, a zastosowanie rozcieńczonego układu NADES może stanowić korzystne rozwiązanie z punktu widzenia kinetyki procesu [Aravena i in., 2023].

W celu zweryfikowania przedstawionych założeń, w oparciu o wcześniejsze wyniki oraz dane literaturowe [Shafie i in., 2019; Bermúdez-Oria i in., 2023], przeprowadzono serię ekstrakcji z wykorzystaniem mieszaniny NADES typu ChCl/CA (1:1), przy zróżnicowanym udziale wody, odpowiednio NADES/H₂O - 1:1, 1:2, 1:5 i 1:9 (w/v). Wszystkie roztwory ekstrakcyjne scharakteryzowano pod względem pH oraz przewodności właściwej (Tabela 14). Uzyskane wyniki zestawiono z wydajnością produktów otrzymanych po ekstrakcji, wytrącaniu metanolem i dializie w wodzie oraz z charakterystyką chemiczną otrzymanych produktów: (N1, 1:1), (N2, 1:2), (N3, 1:5) i (N4, 1:9) (Tabela 14). Ekstrakcję przeprowadzono z wykorzystaniem surowca modelowego.

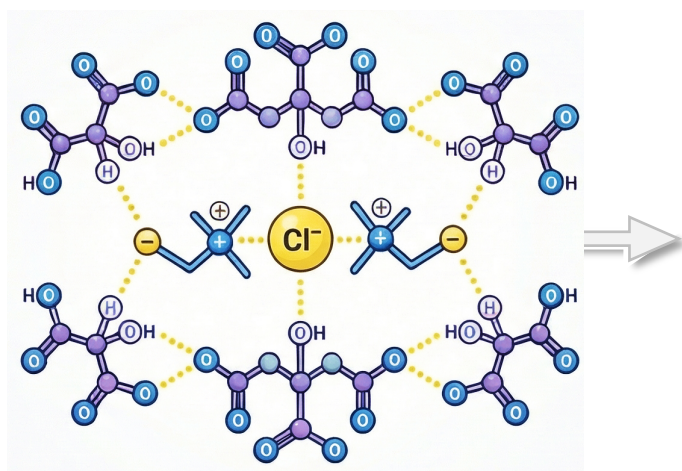
Zaobserwowano, że wraz ze wzrastającym udziałem wody w medium ekstrakcyjnym wzrasta pH, jednakże utrzymuje się z zakresie typowo kwasowym – od 0,84 do 1,73. Przewodność właściwa nie wykazywała analogicznej tendencji. Najniższą wartość odnotowano dla medium NADES/woda w stosunku 1:1 (w/v) (38,6 mS/cm), a najwyższą dla rozcieńczenia 1:2 (w/v) (101,6 mS/cm). Dziesięciokrotne rozcieńczenie NADES spowodowało ponowny spadek wartości tego parametru do $\sigma = 51,3$ mS/cm. Największy zbadany udział wody w NADES (1:9, w/v) zapewnił wydajność produktu (N4) na poziomie 4,73% wag., przy największym udziale polisacharydów (47,24%) oraz jednocześnie najmniejszym polifenoli i białek (odpowiednio 4,94 i 5,19%) w porównaniu z produktami (N1), (N2) i (N3). Ilość UA uzyskana z 1 g wyłoków z czarnej porzeczki była najwyższa i wyniosła 4,83 mg/g surowca. Przeprowadzone badania wskazują, że 10-krotne rozcieńczenie zaproponowanego NADES było najbardziej efektywne w ekstrakcji pektyn, dlatego zastosowano je w kolejnych etapach prac eksperymentalnych.

Istotnym problemem badawczym było także ustalenie, czy charakterystyczne właściwości zaproponowanego NADES pozostają zachowane po rozcieńczeniu go wodą do proporcji 1:9 (w/v), czy też taka modyfikacja prowadzi do całkowitej degradacji charakterystycznych wiązań wodorowych między składnikami NADES. Doniesienia literaturowe wskazują, że woda wpływa na reorganizację struktury oraz właściwości NADES w sposób kontrolowany [Wu i in., 2024b]. Dodatek wody do układu NADES spowodował przesunięcie pasm charakterystycznych dla wiązań O–H i C=O w kierunku niższych wartości liczb falowych, co szczególnie jest zauważalne dla pasma charakterystycznego dla grup karbonylowych przy 1755 cm^{-1} w kierunku 1721 cm^{-1} (Ryc. 19), a co prawdopodobnie jest związane z osłabieniem lub częściową dysocjacją wiązań wodorowych obecnych w mieszaninie eutektycznej oraz zmniejszeniem oddziaływań między grupami karbonyłowymi i hydroksylowymi komponentów NADES [Wu i in., 2024b, Al-Risheq i in., 2021]. Obecność pasma przy $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ sugeruje obecność drgań zginających cząsteczek wody. Można przypuszczać, że wprowadzenie wody prowadzi do reorganizacji sieci molekularnej NADES, co skutkuje zwiększeniem mobilności cząsteczek oraz zmianą polarności rozpuszczalnika. Dodatek wody do układu NADES wpłynął głównie na intensywność oraz położenie pasm absorpcyjnych, natomiast nie na ich występowanie.

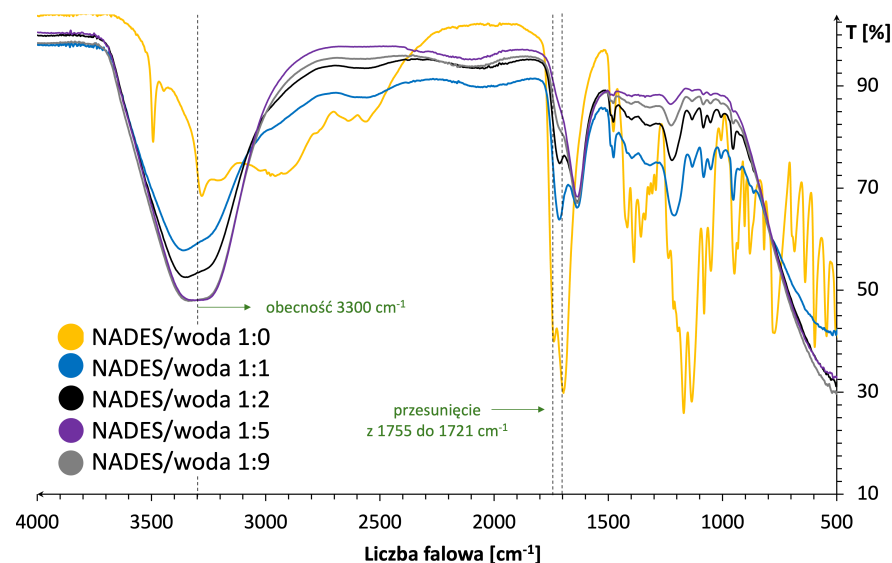
Tabela 14. Właściwości mediów ekstrakcyjnych oraz wydajność i charakterystyka chemiczna polisacharydów otrzymanych z wyłoków czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) przy wykorzystaniu NADES (ChCl/CA 1:1) przy zróżnicowanym udziale wody w układzie.

Nr	Warunki ekstrakcji				t (h)	T (°C)	Y (% wag.)	Polisacharydy		Polifenole (% wag.)	Białka (% wag.)	
	medium ekstrakcyjne							Calkowite* (% wag.)	UA			
	NADES	H ₂ O	pH	przewodność (mS/cm)					w produkcie (% wag.)			w cz. polisacharydowej (% wag.)
	(w/v)											
N1	1	1	0,84	38,6	4	100	0,41	30,22 ± 1,79	26,19 ± 1,52	86,68 ± 5,01	6,77 ± 0,18	5,65 ± 0,06
N2	1	2	1,21	101,6			2,28	37,02 ± 0,41	23,28 ± 0,76	62,87 ± 2,04	7,48 ± 0,23	6,91 ± 0,10
N3	1	5	1,55	72,7			4,26	41,04 ± 4,14	22,44 ± 0,41	54,67 ± 0,99	7,09 ± 0,27	6,05 ± 0,08
N4	1	9	1,73	51,3			4,73	47,24 ± 0,89	21,64 ± 0,66	45,81 ± 1,40	4,94 ± 0,07	5,19 ± 0,12

* Udział polisacharydów w produkcie został przeliczony zgodnie ze wskaźnikiem korekty równym 2,60.



Ryc. 18. Schematyczne przedstawienie interakcji w mieszaninie NADES ChCl/CA [Ali i in., 2023; Sakurai i in., 2024].

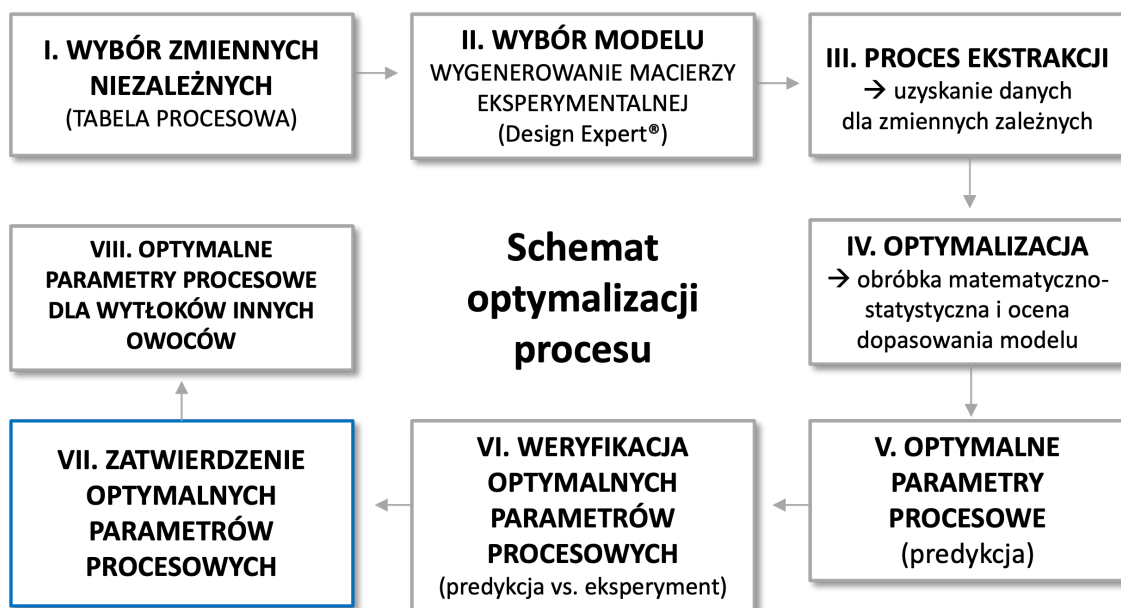


Ryc. 19. Widma ATR-FTIR dla NADES (ChCl/CA 1:1) przy różnym udziale wody.

3.2.2. Optymalizacja parametrów ekstrakcji pektyn w środowisku NADES

Przyjęty schemat postępowania w optymalizacji procesu ekstrakcji pektyn z wyłoków owocu czarnej porzeczki, wybranych w niniejszej pracy jako modelowa biomasa, obejmował dopasowanie odpowiedniego modelu matematycznego, liniowego bądź kwadratowego, do danych eksperymentalnych uzyskanych na podstawie serii eksperymentów przeprowadzonych zgodnie z macierzą eksperymentalną w wybranym do tego celu modelu *I-optimal*.

Otrzymane dane z przeprowadzonej serii eksperymentów poddano walidacji statystycznej, używając analizy wariancji ANOVA, by następnie, po dogłębnej analizie uzyskanych danych predykcyjnych wytypować obszar optymalnych przedziałów liczbowych dla wybranych parametrów procesowych. Parametry te, następnie zweryfikowano eksperymentalnie, przyjęto jako optymalne i zaimplementowano do wyodrębniania pektyn z innych surowców zaprezentowanych w tej pracy.



Ryc. 20. Schemat postępowania przyjęty w czasie prowadzenia optymalizacji procesu ekstrakcji pektyn z wyłoków czarnej porzeczki z wykorzystaniem układów NADES [na podstawie: Bezerra i in., 2008].

3.2.2.1. Optymalizacja procesu ekstrakcji pektyn w modelu *I-optimal*

W oparciu o wyniki wstępnie przeprowadzonych badań, do optymalizacji procesu ekstrakcji pektyn z wyłoków czarnej porzeczki w NADES jako medium ekstrakcyjnym, wybrano trzy zmienne niezależne:

- X_1 : chlorek choliny (ilość wyrażona jako stosunek molowy w mieszaninie NADES),
- X_2 : kwas cytrynowy (ilość wyrażona jako stosunek molowy w mieszaninie NADES),
- X_3 : czas ekstrakcji (h),

które analizowano na trzech kodowanych poziomach, czyli: -1, 0, +1 (Tabela 15).

Tabela 15. Optymalizacja ekstrakcji pektyn z wyłoków czarnej porzeczki z wykorzystaniem układów NADES. Tabela procesowa zmiennych niezależnych i ich poziomów kodowania.

Zmienne niezależne			POZIOMY KODÓW		
			wartość minimalna	wartość centralna	wartość maksymalna
			(-1)	(0)	(+1)
X_1 :	ChCl	(liczba moli w NADES)	1,0	1,5	2,0
X_2 :	CA	(liczba moli w NADES)	1,0	2,0	3,0
X_3 :	t	(h)	4	5	6

Stosunek masowy mieszaniny NADES do wody (1:9, w/w) oraz stosunek suchej masy do medium ekstrakcyjnego (1:15, w/v) ustalono w planie eksperymentalnym jako wartości stałe. Zmienne niezależne przedstawiono jako wartości liczbowe dyskretne. W oparciu o model 3^3 -elementowej macierzy eksperymentalnej, przy zastosowaniu oprogramowania Design Expert®, wygenerowana została seria 18 eksperymentów zgodnie z planem *I-optimal*, różniących się między sobą wartościami zmiennych niezależnych (Tabela 16).

Każdy z 18 ekstraktów poddano następnie temu samemu schematowi oczyszczania, a mianowicie oddzielono ciekłą fazę od stałej pozostałości roślinnej, zateżono otrzymany ekstrakt, a następnie wytrącono AIR za pomocą metanolu. Nierozpuszczalny w alkoholu osad poddano procesowi dializy w wodzie, wyodrębniając w ten sposób makrocząsteczkowe produkty. Każdy z 18 produktów poddano wstępnej charakterystyce chemicznej z wykorzystaniem metod kolorymetrycznych, w celu oznaczenia całkowitej ilości polisacharydów, a w nich ilość kwasów uronowych, szacunkowej ilości polifenoli oraz białek. Obliczono także wydajność tak otrzymanych produktów (Tabela 17).

Tabela 16. Macierz eksperymentalna *I*-optimal zmiennych zależnych oraz eksperymentalnie wyznaczonych wartości zmiennych zależnych dla pektyn z wyłoków owocu czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) wyodrębnionych na drodze ekstrakcji w NADES. Zmienne zależne podano jako średnie z trzech powtórzeń.

L.p.	ZMIENNE NIEZALEŻNE			Nr produktu	ZMIENNE ZALEŻNE			
	X_1 : ChCl (HBA)	X_2 : CA (HBD)	X_3 : czas		Y	Polisacharydy	UA	Polifenole
	(liczba moli)	(liczba moli)	(h)		(% wag.)	(% wag.)	(% wag.)	(% wag.)
1.	1,5 (0)	2 (0)	5 (0)	(20)	4,41	55,28	24,15	7,23
2.	1 (-1)	3 (+1)	6 (+1)	(21)	3,86	49,13	27,97	9,30
3.	2 (+1)	1 (-1)	5 (0)	(22)	4,50	55,56	20,97	7,53
4.	2 (+1)	3 (+1)	5 (0)	(23)	4,09	50,71	23,43	7,13
5.	1 (-1)	2 (0)	5 (0)	(24)	4,31	50,50	26,82	6,53
6.	1,5 (0)	2 (0)	5 (0)	(25)	4,41	55,28	24,15	7,23
7.	1,5 (0)	1 (-1)	4 (-1)	(26)	4,98	55,62	26,82	6,95
8.	1,5 (0)	2 (0)	6 (+1)	(27)	3,92	51,14	27,29	7,98
9.	1 (-1)	1 (-1)	6 (+1)	(28)	4,35	49,96	26,04	7,80
10.	2 (+1)	3 (+1)	5 (0)	(29)	4,09	50,71	23,43	7,13
11.	2 (+1)	1 (-1)	5 (0)	(30)	4,50	55,56	20,97	7,53
12.	2 (+1)	2 (0)	6 (+1)	(31)	4,35	49,96	26,04	7,80
13.	1,5 (0)	3 (+1)	4 (-1)	(32)	4,74	54,53	26,78	7,81
14.	1,5 (0)	2 (0)	5 (0)	(33)	4,41	55,28	24,15	7,23
15.	2 (+1)	2 (0)	4 (-1)	(34)	4,41	58,78	26,90	6,70
16.	2 (+1)	2 (0)	4 (-1)	(35)	4,41	58,77	26,92	6,68
17.	1 (-1)	2 (0)	4 (-1)	(36)	4,20	53,80	25,73	6,39
18.	1,5 (0)	1 (-1)	4 (-1)	(37)	4,98	55,62	26,82	6,95

* Udział polisacharydów w produkcie został przeliczony zgodnie ze wskaźnikiem korekty równym 2,60.

Tabela 17. Właściwości mediów ekstrakcyjnych oraz wydajność i charakterystyka chemiczna polisacharydów otrzymanych z wyłoków czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) – ekstrakcja z wykorzystaniem układów NADES.

L.p.	Nr produktu	Warunki ekstrakcji					Y	Polisacharydy		Polifenole	Białka				
		medium ekstrakcyjne						Calkowite*	UA						
		ChCl	CA	pH	przewodność	t (h)	T (°C)			(% wag.)	(% wag.)	w produkcji (% wag.)	w części polisacharydowej (% wag.)	(% wag.)	(% wag.)
		(liczba moli)													
1.	(20)	1,5	2	1,63	44,4	5	100	4,41	55,28 ± 0,56						
2.	(21)	1	3	1,54	31,8	6		3,86	49,13 ± 3,17	27,97 ± 0,39	56,93 ± 0,79	9,30 ± 0,46	6,05 ± 0,07		
3.	(22)	2	1	1,74	67,4	5		4,50	55,56 ± 2,23	20,97 ± 0,23	37,75 ± 0,41	7,53 ± 0,20	7,52 ± 0,04		
4.	(23)	2	3	1,60	41,9	5		4,09	50,71 ± 2,87	23,43 ± 0,33	46,20 ± 0,64	7,13 ± 0,20	7,40 ± 0,08		
5.	(24)	1	2	1,57	27,8	5		4,31	50,50 ± 1,58	26,82 ± 1,31	53,11 ± 2,60	6,53 ± 0,31	5,31 ± 0,07		
6.	(25)	1,5	2	1,63	44,4	5		4,41	55,28 ± 0,56	24,15 ± 0,45	43,69 ± 0,81	7,23 ± 0,19	7,45 ± 0,06		
7.	(26)	1,5	1	1,66	56,2	4		4,98	55,62 ± 2,19	26,82 ± 0,62	48,21 ± 1,12	6,95 ± 0,14	4,88 ± 0,03		
8.	(27)	1,5	2	1,63	44,4	6		3,92	51,14 ± 0,61	27,29 ± 0,56	53,37 ± 1,10	7,98 ± 0,18	5,71 ± 0,06		
9.	(28)	1	1	1,64	51,6	6		4,35	49,96 ± 1,38	26,04 ± 0,63	52,13 ± 1,26	7,80 ± 0,16	5,90 ± 0,19		
10.	(29)	2	3	1,60	41,9	5		4,09	50,71 ± 2,87	23,43 ± 0,33	46,20 ± 0,64	7,13 ± 0,20	7,40 ± 0,08		
11.	(30)	2	1	1,74	67,4	5		4,50	55,56 ± 2,23	20,97 ± 0,23	37,75 ± 0,41	7,53 ± 0,21	7,52 ± 0,04		
12.	(31)	2	2	1,64	51,6	6		4,35	49,96 ± 1,38	26,04 ± 0,62	52,13 ± 1,26	7,80 ± 0,17	5,90 ± 0,19		
13.	(32)	1,5	3	1,57	37,8	4		4,74	54,53 ± 2,03	26,78 ± 0,67	49,11 ± 1,23	7,81 ± 0,06	5,77 ± 0,04		
14.	(33)	1,5	2	1,63	44,4	5		4,41	55,28 ± 0,56	24,15 ± 0,45	43,69 ± 0,81	7,23 ± 0,19	7,45 ± 0,06		
15.	(34)	2	2	1,64	51,6	4		4,41	58,78 ± 0,90	26,90 ± 0,49	45,79 ± 0,83	6,70 ± 0,18	4,90 ± 0,03		
16.	(35)	2	2	1,64	51,6	4		4,41	58,77 ± 0,91	26,92 ± 0,51	45,81 ± 0,81	6,68 ± 0,17	4,96 ± 0,10		
17.	(36)	1	2	1,57	37,8	4		4,20	53,80 ± 2,49	25,73 ± 0,55	47,82 ± 1,02	6,39 ± 0,32	4,79 ± 0,03		
18.	(37)	1,5	1	1,66	56,2	4		4,98	55,62 ± 2,19	26,82 ± 0,62	48,21 ± 1,12	6,95 ± 0,14	4,88 ± 0,15		

* Udział polisacharydów w produkcie został przeliczony zgodnie ze wskaźnikiem korekty równym 2,60.

Media ekstrakcyjne oparte o układy NADES (ChCl/CA), zastosowane do otrzymania serii produktów (20) - (37), charakteryzowały się kwasowym pH w wąskim zakresie 1,54 – 1,74. Nie zaobserwowano zależności liniowej między pH medium ekstrakcyjnego a wydajnością procesu ekstrakcji, jednakże można zauważyć, że pH w przedziale 1,57 – 1,66 sprzyjało nieco większej wydajności otrzymanych produktów (4,74 - 4,98% wag.) (produkty: 26, 32, 37), natomiast niższe pH mniejszej (3,86 – 4,74% wag.) (produkty: 21, 24, 32, 36).

Polisacharydy stanowiły główną frakcję wszystkich uzyskanych produktów (49,13 - 58,77% wag.), przy czym największą ich ilość odnotowano przy pH ~ 1,65. Udział UA w otrzymanych produktach wynosił od 20,97 do 27,97% wag. Stanowiły one 37,75 – 56,93% wag. w polisacharydach badanych produktów, a wyodrębnianiu ich sprzyjało niższe pH roztworu NADES, co potwierdzają doniesienia literaturowe [Chen i in., 2021; Shafie i in., 2020]. Wraz ze wzrostem przewodności właściwej medium ekstrakcyjnego ilość UA spadała. Największy udział UA (49,11-56,93% wag.) uzyskano przy niższej przewodności układu (27,8-37,8 mS/cm), natomiast najniższy, bo aż 37,75% wag., charakteryzował produkt (30) wyodrębniony z biomasy z zastosowaniem medium NADES o najwyższej przewodności wynoszącej 67,4 mS/cm.

Udział polifenoli w otrzymanych produktach wynosił 6,39 - 9,30% wag. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem pH ilość polifenoli nieznacznie wzrastała (Tabela 17). Natomiast białka stanowiły od 4,79 do 7,52%, a ich udział wzrastał w miarę wydłużania czasu ekstrakcji.

Przewodność medium ekstrakcyjnego oscylowała w przedziale 27,8 - 67,4 mS/cm, co odzwierciedla siłę jonową serii wodnych roztworów mieszanin NADES. Najwyższą wydajność (4,98% wag.) odnotowano dla medium o przewodności właściwej równej 56,2 mS/cm (37, ChCl/CA 1,5:1; 4 h; pH 1,66). Zauważono też, że przewodność przekraczająca 40 mS/cm sprzyjała ekstrakcji polisacharydów bogatych w UA, jednocześnie ograniczając udział polifenoli, choć jednoznaczne zależności nie zostały na tym etapie potwierdzone.

Na tym etapie niemożliwe było stwierdzenie bezpośredniej zależności między czasem prowadzenia ekstrakcji a wydajnością procesów. Maksymalną wydajność procesu uzyskano dla czasu ekstrakcji wynoszącego 4 h. Dalsze wydłużanie procesu nie przynosiło istotnych korzyści, co może mieć znaczenie z punktu widzenia ekonomicznej oceny procesu.

Jak wspomniano wcześniej, model planowania eksperymentu *I*-optimal ma na celu minimalizację średniej wariancji predykcji w przestrzeni eksperymentalnej. To podejście jest szczególnie przydatne, gdy głównym celem analiz jest uzyskanie precyzyjnych predykcji odpowiedzi badanego układu w szerokim zakresie warunków procesowych, a nie wyłącznie efektywna estymacja parametrów procesu [Pawlaczyk-Graja i in., 2019]. W celu przeprowadzenia analizy statystycznej danych liczbowych macierzy eksperymentalnej (Tabela 16) zastosowane zostało następujące ogólne równanie regresji drugiego stopnia:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad [2],$$

gdzie:

- Y_i - przewidywana odpowiedź układu ($i = 4$),
- $X_{i,j}$ - zmienne niezależne ($k = 3$),
- β_0 - wyraz wolny (*intercept*),
- β_i - współczynniki liniowe,
- β_{ii} - współczynniki kwadratowe,
- β_{ij} - współczynniki interakcji dla każdej zmiennej niezależnej,
- składnik losowy [Demir i in., 2024; Xu i in., 2016].

Przeprowadzona analiza wariancji (ANOVA) umożliwiła ilościową ocenę wpływu zmiennych niezależnych na odpowiedzi układu (Tabele od 18 do 21).

W przypadku oceny wpływu zmiennych niezależnych X_1 , X_2 i X_3 na wydajność ciągu procesowego otrzymywania produktów bogatych w pektyny z wyłoków owocu czarnej porzeczki, gdzie główną rolę odgrywał wpływ ekstrakcji na tę zmienną zależną, wpływ ten opisano za pomocą poniższego równania liniowego:

$$Y = 2,4516 + 0,0070 \cdot X_1 - 0,0520 \cdot X_2 - 0,0551 \cdot X_3 \quad [3].$$

Otrzymany model liniowy był istotny statystycznie ($F = 9,55$; $p = 0,0011$), co potwierdza adekwatność przedstawionego powyżej równania regresji, przyjętego do opisu badanego procesu (Tabela 18). Spośród analizowanych czynników istotny wpływ wykazywały zmienne X_2 ($p = 0,0044$) oraz X_3 ($p = 0,0024$). Współczynnik determinacji wyniósł $R^2 = 0,6717$, a skorygowany współczynnik determinacji $\text{adj. } R^2 = 0,6013$, co

wskazuje na fakt, że około 60% zmienności danych można wyjaśnić zaproponowanym modelem matematycznym. Uzyskane wyniki analizy statystycznej umożliwiły wyznaczenie zależności między zmiennymi niezależnymi oraz badanymi zmiennymi zależnymi. Wydajność ekstrakcji dla macierzy eksperymentalnej (Tabela 17), a tym samym produktów (20) – (37), mieściła się w zakresie 3,86 - 4,98% wag. Analiza trójwymiarowych wykresów powierzchni odpowiedzi (Ryc. 21) i wykresów stopnia dopasowania modelu (Ryc. 22) sugerują, że mniejszy udział CA w mieszaninie NADES sprzyjał większej wydajności ciągu procesowego. Wpływ ChCl (X_1) na wydajność nie był istotny statystycznie. Zmienną o największym wpływie na odpowiedź układu był czas prowadzenia procesu ekstrakcji, przy czym wyższej wydajności sprzyjał krótszy czas.

Tabela 18. Analiza wariancji (ANOVA) dla modelu liniowego, opisującego wpływ zmiennych niezależnych na wydajność procesu separacji polisacharydów.

	SS	df	MS	Test F	p
Model	0,0596	3	0,0199	9,55	0,0011
X_1	0,0001	1	0,0001	0,0603	0,8096
X_2	0,0239	1	0,0239	11,49	0,0044
X_3	0,0286	1	0,0286	13,72	0,0024
Składnik resztowy	0,0291	8	0,0036		
Błąd całkowity	0,0000	6	0,0000		
Korelacja całkowita	0,0887	17			

$R^2 = 0,6717$; adj. $R^2 = 0,6013$; SD = 0,046; średnia = 2,09; test adekwatności = 10,1173

Ocenę wpływu zmiennych niezależnych X_1 , X_2 i X_3 na ilość polisacharydów w wyodrębnionych produktach został wyrażony w postaci równania kwadratowego:

$$\begin{aligned} \text{Polisacharydy} = & 0,4452 + 39,7952 \cdot X_1 + 12,9188 \cdot X_2 + 6,9562 \cdot X_3 - \\ & 2,6681 \cdot X_1 X_2 - 3,3064 \cdot X_1 X_3 - 0,6585 \cdot X_2 X_3 - 5,1161 \cdot X_1^2 \\ & - 1,6778 \cdot X_2^2 - 0,3354 \cdot X_3^2 \end{aligned} \quad [4].$$

Analiza wariancji potwierdziła istotność statystyczną zaproponowanego modelu kwadratowego ($p < 0,0001$) (Tabela 19). Najsilniejszy wpływ na zmienną zależną miał czynnik X_3 ($F = 88,56$; $p = 0,0001$), a następnie zmienne X_1 , X_2 , a także ich wyrażenia kwadratowe $X_1 X_2$, $X_1 X_3$, X_1^2 oraz X_2^2 ($p < 0,05$). Współczynnik determinacji R^2 oraz skorygowany R^2 wyniosły odpowiednio 0,9648 i 0,9251, natomiast wartość współczynnika testu adekwatności była równa 16,1493, co zdaje się potwierdzać zgodność modelu z danymi eksperymentalnymi. Wykresy 3D (Ryc. 21) wykazały

względnie wyrównaną odpowiedź układu względem analizowanych zmiennych niezależnych. Podsumowując, zwiększenie udziału molowego ChCl w mieszaninie NADES względem CA sprzyjało intensyfikacji ekstrakcji polisacharydów. Natomiast skrócenie czasu ekstrakcji (X_3) prowadziło do zwiększenia wartości odpowiedzi układu.

Tabela 19. Analiza wariancji (ANOVA) dla modelu kwadratowego, opisującego udział polisacharydów w produktach otrzymanych z wyłoków czarnej porzeczki.

	SS	df	MS	Test F	p
Model	151,69	9	16,85	24,34	< 0,0001
X_1	14,90	1	14,90	21,52	0,0017
X_2	9,48	1	9,48	13,70	0,0060
X_3	61,31	1	61,31	88,56	< 0,0001
X_1X_2	8,56	1	8,56	12,36	0,0079
X_1X_3	14,32	1	14,32	20,69	0,0019
X_2X_3	1,75	1	1,75	2,52	0,1509
X_1^2	6,09	1	6,09	8,79	0,0180
X_2^2	11,70	1	11,70	16,89	0,0034
X_3^2	0,43	1	0,4345	0,6276	0,4511
Składnik resztowy	5,54	2	2,77		
Błąd całkowity	0,0000	6	0,0000		
Korelacja całkowita	157,23	17			

$R^2 = 0,9648$; adj. $R^2 = 0,9251$; SD = 0,83; średnia = 53,68; test adekwatności = 16,1493

Model predykcji ilości kwasów uronowych zaproponowany dla zmiennych niezależnych X_1 , X_2 i X_3 został wyrażony w postaci równania kwadratowego:

$$\begin{aligned} \text{UA} = & 87,8509 + 8,3571 \cdot X_1 - 1,0669 \cdot X_2 - 27,1702 \cdot X_3 + 1,1091 \cdot X_1X_2 - \\ & 1,4407 \cdot X_1X_3 + 0,8488 \cdot X_2X_3 - 1,6303 \cdot X_1^2 - 1,0420 \cdot X_2^2 + \\ & 2,7598 \cdot X_3^2 \end{aligned} \quad [5].$$

Zaproponowany model kwadratowy jest istotny statystycznie ($F = 8,58$; $p = 0,003$) (Tabela 20). Szczególny wpływ na ilość UA wykazywała zmienna X_1 oraz wyrażenie kwadratowe X_3^2 ($p < 0,05$), natomiast pozostałe zmienne i ich interakcje nie były istotne statystycznie. Współczynnik determinacji R^2 wyniósł 0,9061, natomiast skorygowany $R^2 = 0,8005$. Parametr testu adekwatności wyniósł 10,2257, co wskazuje na dobre dopasowanie modelu do danych eksperymentalnych, choć nieco słabsze niż w przypadku zmiennej zależnej ilości polisacharydów.

Analiza powierzchni odpowiedzi wykazała największe wartości odpowiedzi dla wariantów eksperymentalnych, w których ekstrakcja prowadzona była 6 h (Ryc. 21). Wykresy 3D dla pozostałych zmiennych zależnych skorelowanych z wartościami zmiennych niezależnych wskazywały na przewagę 4 h prowadzenia ekstrakcji. Powierzchnia odpowiedzi dla przedstawionego wyżej równania kwadratowego charakteryzowała się stosunkowo równomiernym rozkładem zasymulowanych wartości tej powierzchni. Z tego powodu zrezygnowano z poszukiwania wartości zmiennych niezależnych, które odpowiadałyby maksymalnej możliwej wartości odpowiedzi, na rzecz bardziej zrównoważonych rezultatów. Dla zmiennych X_1 oraz X_2 najbardziej korzystne wydają się być ich wartości pośrednie.

Tabela 20. Analiza wariancji (ANOVA) dla modelu kwadratowego opisującego udział kwasów uronowych w produktach uzyskanych z wycisków owocu czarnej porzeczki.

	SS	df	MS	Test F	p
Model	68,09	9	68,09	8,58	0,0030
X_1	5,17	1	5,17	5,87	0,0417
X_2	3,63	1	3,63	4,12	0,0770
X_3	0,01	1	0,01	0,0125	0,9136
X_1X_2	1,48	1	1,48	1,68	0,2314
X_1X_3	2,72	1	2,72	3,08	0,1171
X_2X_3	2,90	1	2,90	3,29	0,1072
X_1^2	0,62	1	0,62	0,7007	0,4269
X_2^2	4,51	1	4,51	5,12	0,0536
X_3^2	29,43	1	29,43	33,37	0,0004
Składnik resztowy	7,05	2	3,53		
Błąd całkowity	0,00	6	0,00		
Korelacja całkowita	75,15	17			

$R^2 = 0,9061$; adj. $R^2 = 0,8005$; SD = 0,94; średnia = 25,30; test adekwatności = 10,2257

Matematyczny model opisujący zależność polifenoli obecnych w otrzymanych produktach wycisków owocu porzeczki od zmiennych niezależnych X_1 , X_2 i X_3 przedstawiono za pomocą równania kwadratowego:

$$\begin{aligned} \text{Polifenole} = & 5,2508 + 8,0103 \cdot X_1 + 0,3148 \cdot X_2 - 2,5921 \cdot X_3 - 1,0634 \cdot X_1X_2 - \\ & 0,2878 \cdot X_1X_3 - 0,1096 \cdot X_2X_3 - 1,4578 \cdot X_1^2 + 0,5389 \cdot X_2^2 + \\ & 0,3909 \cdot X_3^2 \end{aligned} \quad [6].$$

Analiza wariancji potwierdziła istotność przedstawionego powyżej modelu kwadratowego ($p < 0,0001$) (Tabela 21). Istotny wpływ na odpowiedź układu miał czas ekstrakcji (X_3), dla którego uzyskano najwyższą wartość parametru F (216,42; $p < 0,0001$). Wśród czynników nieistotnych statystycznie należy wymienić ilość moli ChCl w mieszaninie NADES (X_1 , $p = 0,4445$) oraz interakcję zmiennych niezależnych, wyrażonych jako X_2X_3 (liczba moli CA vs. t; $p = 0,1357$). Współczynniki dopasowania ($R^2 = 0,9820$; adj. $R^2 = 0,9618$) potwierdzały bardzo dobry stopień dopasowania zaproponowanego równania.

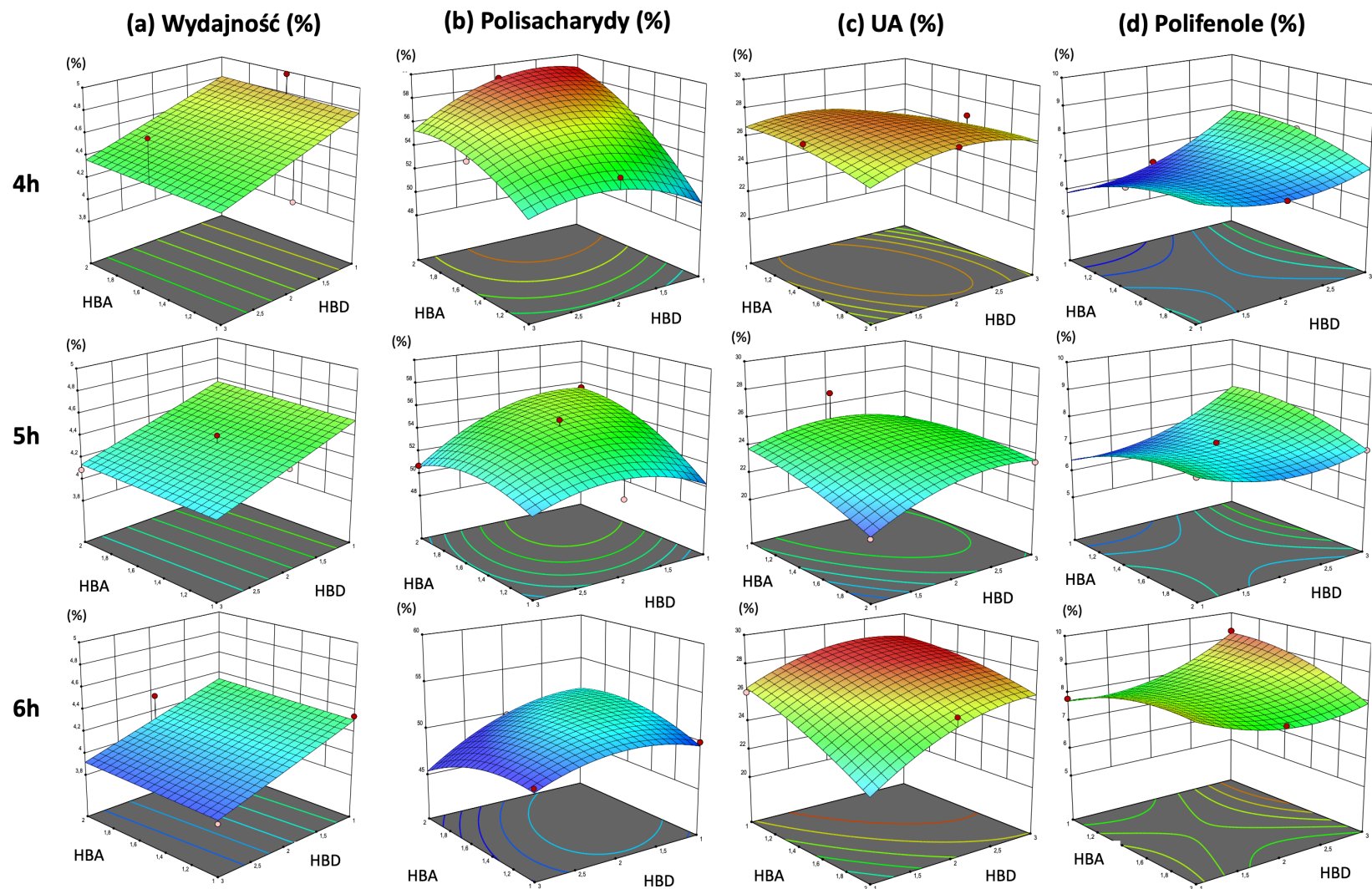
Tabela 21. Analiza wariancji (ANOVA) dla modelu kwadratowego opisującego udział polifenoli w produktach uzyskanych z wyłoków owocu czarnej porzeczki.

	SS	df	MS	Test F	p
Model	7,69	9	0,8542	48,60	< 0,0001
X_1	0,0114	1	0,0114	0,65	0,4445
X_2	0,8617	1	0,8617	49,03	0,0001
X_3	3,80	1	3,80	216,42	< 0,0001
X_1X_2	1,36	1	1,36	77,37	< 0,0001
X_1X_3	0,1085	1	0,1085	6,17	0,0378
X_2X_3	0,0484	1	0,0484	2,75	0,1357
X_1^2	0,4941	1	0,4941	28,11	0,0007
X_2^2	1,21	1	1,21	68,66	< 0,0001
X_3^2	0,5903	1	0,5903	33,59	0,0004
Składnik resztowy	0,1406	2			
Błąd całkowity	0,0000	6	0,0000		
Korelacja całkowita	7,83	17			

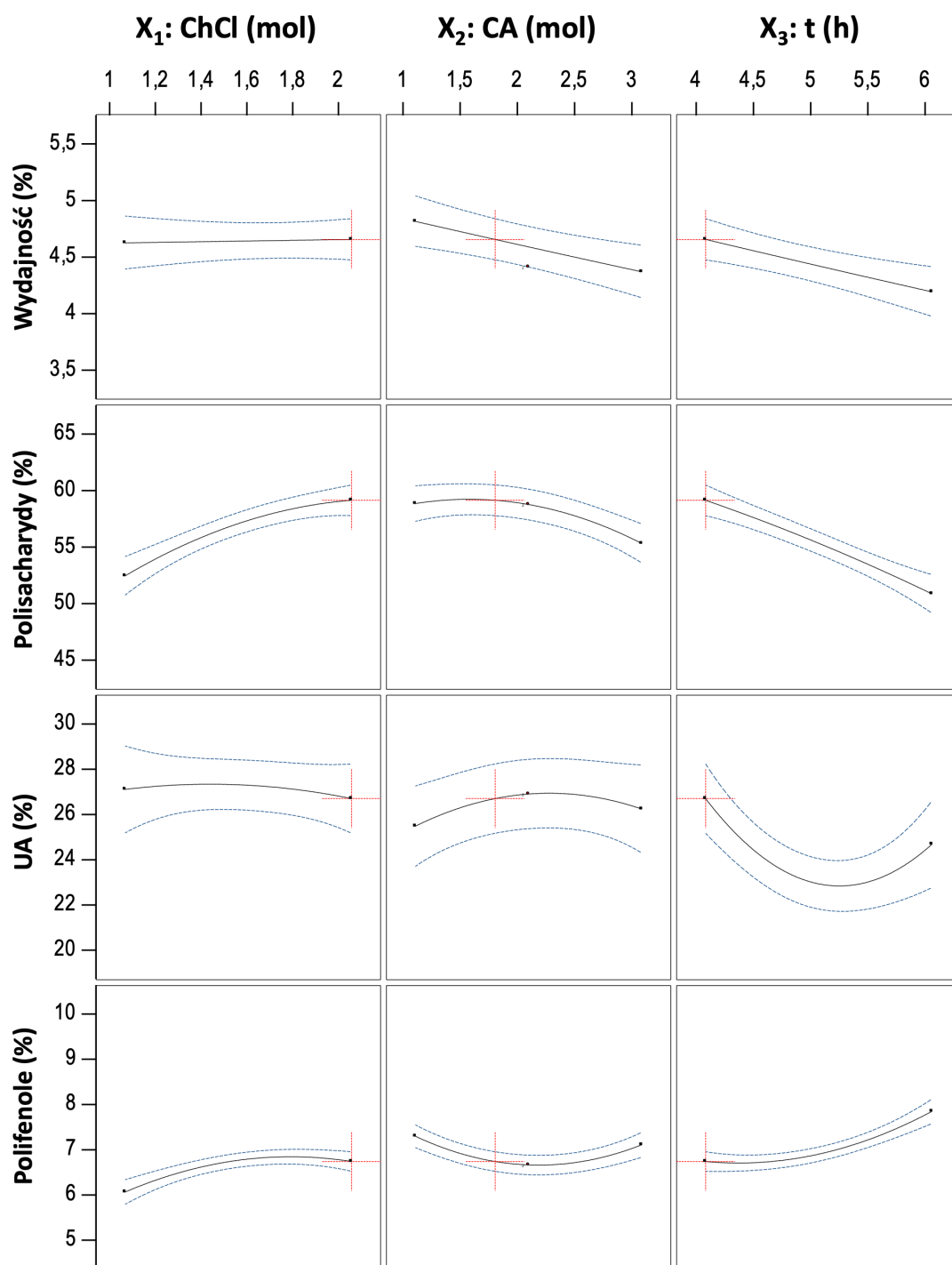
$R^2 = 0,9820$; adj. $R^2 = 0,9618$; SD = 0,13; średnia = 7,33; test adekwatności = 29,4337

Podsumowując, analiza powierzchni odpowiedzi sugeruje, że największe stężenie polifenoli występowało w produktach otrzymanych na drodze ekstrakcji przez 6 h. Jednym z ważnych celów optymalizacji procesu otrzymywania pektyn z odpadów z owoców jagodowych jest zminimalizowanie udziału polifenoli w produkcie pektynowym, dlatego uznano, że krótszy czas ekstrakcji (4 h) jako korzystny.

W dyskusji wyników wielowątkowej analizy ANOVA wybór obszarów uznanych za optymalne ukierunkowano głównie na maksymalizację wydajności procesu ekstrakcji, przy jednoczesnym uzyskaniu produktu o wysokim udziale UA i możliwie największej czystości (Ryc. 21). Na podstawie przyjętych kryteriów, zweryfikowano stopień dopasowania modeli dla badanych odpowiedzi układu (Ryc. 22).



Ryc. 21. Wykresy powierzchni odpowiedzi (RSM) przedstawiające wpływ stosunku molowego ChCl i CA w NADES na: (a) wydajność procesu ekstrakcji, (b) udział polisacharydów w produkcie, (c) udział kwasów uronowych oraz (d) udział polifenoli, w czasie prowadzenia ekstrakcji 4,5 lub 6 h.



Ryc. 22. Analiza stopnia dopasowania modeli eksperymentalnych.

3.2.2.2. Ekonomiczne aspekty czasu prowadzenia ekstrakcji

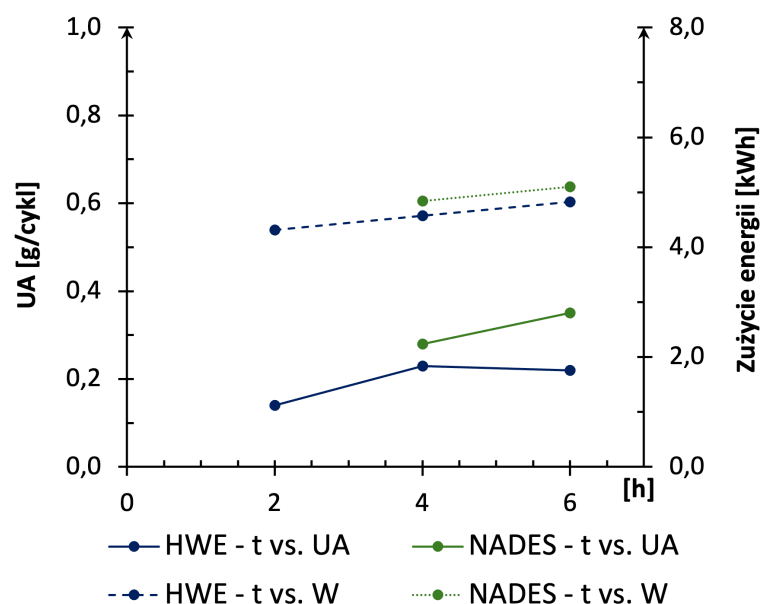
Proces optymalizacji oraz zestawienie dotychczas uzyskanych danych eksperymentalnych wskazują na przewagę ekstrakcji prowadzonej przez 4 h nad 5- i 6-godzinny procesem, co uzasadnia dalsze rozważania w tym temacie. Z punktu widzenia

zastosowań przemysłowych istotne jest uzyskanie produktu z uwzględnieniem kosztów jego wytworzenia. Kluczowe staje się zatem rozstrzygnięcie czy bardziej efektywne, nie tylko technologicznie, ale też ekonomicznie, jest prowadzenie ekstrakcji do momentu osiągnięcia maksymalnej wydajności, kosztem wydłużenia czasu procesu, czy też uzyskanie zrównoważonego rezultatu w krótszym czasie, przy niższym zużyciu energii.

Analizę przeprowadzono na podstawie wyników uzyskanych podczas ekstrakcji wstępnych w wodzie na gorąco (HWE) dla surowca modelowego. Pod uwagę wzięto produkty (2), (3) oraz (4), różniące się między sobą czasem prowadzenia ekstrakcji (2, 4, lub 6 h) (Tabela 11). Dodatkowo uwzględniono wyniki dla wybranych produktów otrzymanych przy użyciu NADES (ChCl/CA 1:1; 4 lub 6 h) – produkty (28) i (34) (Tabela 17). Dane przedstawiające szacunkowe zużycie energii elektrycznej podczas procesu ekstrakcji zostały umieszczone w Dodatku (Tabela D2, Tabela D3).

Zaobserwowano liniową zależność między czasem prowadzonej ekstrakcji a zużyciem energii elektrycznej (Ryc. 23). Dla HWE odnotowano 4,31 - 4,83 kWh zużytej energii. Porównanie serii ekstrakcji prowadzonej w wodzie (2-4) wykazało najbardziej wydajny uzysk UA z biomasy roślinnej w czasie 4 h, co jednocześnie przekłada się na niższe koszty energetyczne procesu. Procedura dla ekstrakcji z zastosowaniem NADES wymagała przeprowadzenia dodatkowego etapu – przygotowania mieszaniny głęboko eutektycznej z wykorzystaniem wyparki rotacyjnej, co skutkowało nieznacznym wzrostem całkowitego zużycia energii. Porównanie ekstrakcji prowadzonej przez 6 h w wodzie oraz w układzie NADES wykazało zbliżone wartości zużycia energii (w granicach błędu pomiarowego), przy czym ilość uzyskanych UA w pojedynczej procedurze ekstrakcji NADES była ok. 1,6-krotnie wyższa. Z ekonomicznego punktu widzenia, bardziej korzystne wydaje się przeprowadzenie dwóch cykli ekstrakcji NADES (6 h), niż trzech cykli HWE (6 h), zarówno pod względem czasu operacji (12 h vs. 18 h), jak również ilości wyodrębnionych UA (~0,71 g/cykl vs. ~0,66 g/cykl) oraz kosztów z tym związanych (14,49 kWh vs. 10,20 kWh).

Ekstrakcja NADES prowadzona przez 6 h umożliwiała uzyskanie produktu o największej ilości UA (0,34 g UA/50 g surowca) przy umiarkowanym zużyciu energii. Należy jednak podkreślić, że wcześniej przeprowadzone analizy kolorymetryczne oraz procedury optymalizacyjne wykazały, że wydłużanie czasu ekstrakcji prowadzi do zwiększonej ko-ekstrakcji składników towarzyszących, jakimi są polifenole i białka, co stanowi efekt niepożądany, niekorzystnie wpływający na czystość produktu.



Ryc. 23. Wpływ czasu ekstrakcji na uzysk kwasów uronowych (UA) z wyłoków owocu czarnej porzeczki oraz zużycie energii w procesie ekstrakcji: ekstrakcja wodna na gorąco (HWE) oraz z zastosowaniem układów NADES (z uwzględnieniem zużycia energii do przygotowania NADES).

Tabela 22. Zestawienie zużycia energii elektrycznej oraz ilości UA w produkcie, w zależności od czasu prowadzenia procesu ekstrakcji dla ekstrakcji w wodzie w podwyższonej temperaturze (HWE) oraz dla ekstrakcji w układzie NADES.

Produkt	Czas	UA w produkcie (50 g surowca roślinnego)	Ilość zużytej energii elektrycznej	Koszt energetyczny procesu*
	(h)	(% wag.)	(kWh)	(zł)
ekstrakcja konwencjonalna w wodzie (HWE)				
(2)	2	0,28	4,31	4,23
(3)	4	0,46	4,57	4,48
(4)	6	0,45	4,83	4,73
ekstrakcja w NADES				
(28)	4	0,57	4,84	4,75
(34)	6	0,70	5,10	5,00

* 1 kWh = 0,98 zł (styczeń 2026)

3.2.2.3. Weryfikacja wyboru optymalnych parametrów procesowych

Analizując otrzymane dane statystyczne sformułowano następujące wnioski częściowe:

- Wydajność ciągu procesowego wyodrębniania produktów bogatych w pektyny z wyłoków owocu czarnej porzeczki, w którym ekstrakcja w roztworze NADES

opartym o ChCl i CA stanowi kluczowy proces jednostkowy, korzystnie rosła przy ograniczeniu udziału ChCl w mieszaninie eutektycznej. Zaobserwowano brak znaczącego wpływu ilości CA na wartość wydajności.

- Ograniczony udział ChCl w mieszaninie NADES przy zwiększonym udziale CA sprzyjały ekstrakcji produktów bogatych w polisacharydy.
- Produkty o wysokim udziale UA są otrzymywane w możliwie krótkim czasie prowadzonej ekstrakcji.
- Niski udział CA oraz pośredni udział ChCl w mieszaninie NADES umożliwiały ograniczenie polifenoli w produktach końcowych.
- Wstępnie analizowane dane dotyczące udziału białek w otrzymanych produktach wskazały na brak korelacji między zmiennymi niezależnymi a ilością tych makromolekuł. Z tego względu w analizie ANOVA pominięto tę zmienną zależną. Nie uwzględniano jej także w analizie RSM.

Na podstawie sformułowanych wniosków oraz analizując najlepszy możliwy stopień dopasowania dla każdego zaproponowanego modelu matematycznego opisującego predykcję każdej zmiennej zależnej (Ryc. 22) przedstawiono trzy modele eksperymentalne procesu ekstrakcji jako optymalne, przy czym dla każdego zaproponowano 4 h jako najbardziej efektywny czas ekstrakcji. Za najbardziej korzystne proporcje składników NADES uznano stosunek molowy ChCl/CA: 1,5:1 (37), 1,5:2 (38) oraz 2:1,5 (39). Produkty (38) i (39) wymagały weryfikacji na drodze eksperymentalnej, ponieważ przypisane do nich zmienne zależne były jedynie efektem predykcji. Natomiast trzeci wybrany model eksperymentalny - (37), okazał się być częścią planu *I*-optimal. Otrzymane dane doświadczalne dla (38) i (39) okazały się być zbliżone do wartości przewidywanych na drodze obliczeń (Tabela 23). Uwzględniając całkowitą ilość polisacharydów (65,50 % wag.) oraz UA w produkcie (28,94% wag.), a także ograniczenie ilości polifenoli (6,08% wag.), parametry zastosowane do uzyskania produktu (38) wykazywały wyższą selektywność procesu ekstrakcji w kierunku polisacharydów, a tym samym mniejszy stopień ko-ekstrakcji związków towarzyszących. Produkt (38) wybrano do dalszych analiz fizyko-chemicznych.

Tabela 23. Charakterystyka chemiczna produktów otrzymanych z wyłoków owoców czarnej porzeczki podczas 4-godzinnej ekstrakcji dla wybranych optymalnych parametrów procesu: (P) – dane uzyskane na drodze predykcji, (E) wartości wyznaczone eksperymentalnie.

Nr produktu	ChCl/CA	Y	Polisacharydy				Polifenole	Białka
			Calkowite*	UA				
				w produkcie	w części polisacharydowej			
(stosunek molowy)	(% wag.)	(% wag.)	(% wag.)	(% wag.)	(% wag.)	(% wag.)		
(37) ^a	1,5:1	(P)	4,79	-	-	-	-	-
		(E)	4,98	55,62 ± 0,90	26,82 ± 0,63	48,21 ± 1,13	6,94 ± 0,14	4,88 ± 0,03
(38)	1,5:2	(P)	4,57	57,10 ± 2,85	27,37 ± 1,37	48,05 ± 2,40	6,86 ± 0,34	-
		(E)	4,29	65,50 ± 2,41	28,94 ± 0,40	44,18 ± 0,61	6,08 ± 0,19	6,30 ± 0,13
(39)	2:1,5	(P)	4,69	59,23 ± 2,96	26,47 ± 1,32	44,65 ± 2,23	6,86 ± 0,34	-
		(E)	4,87	59,14 ± 3,08	27,51 ± 0,63	46,51 ± 1,06	6,77 ± 0,22	7,11 ± 0,14

Wyniki podano jako średnia trzech powtórzeń.

^a Produkt stanowiła element planu eksperymentalnego.

* Udział polisacharydów w produkcie został przeliczony zgodnie ze wskaźnikiem korekty równym 2,60.

3.3. Zastosowanie optymalnych parametrów ekstrakcji pektyn do innych rodzajów biomasy odpadowej

Optymalizacja procesu ekstrakcji pektyn z wyłoków owocu czarnej porzeczki umożliwiła wyznaczenie trzech zestawów parametrów optymalnych, określających stosunek molowy komponentów NADES, co przedstawiono w poprzednim rozdziale. Ze względu na znaczne ilości biomasy odpadowej generowane rokrocznie przez rodzimy przemysł rolno-spożywczy, szczególnie w produkcji soków owocowych z roślin jagodowych, podjęto próbę przeniesienia otrzymanych optymalnych parametrów ekstrakcji na eksperymenty z wykorzystaniem wyłoków z: owocu maliny (**M**), owocu truskawki (**T**) oraz owocu rokitnika (**R**). Zgodnie z doniesieniami literaturowymi przytoczonymi na początku części eksperymentalnej niniejszej pracy wymienione surowce są opisywane jako źródło pektyn. W celu zweryfikowania trzech opracowanych modeli ekstrakcyjnych z zastosowaniem NADES, które zaimplementowano do otrzymania z wymienionych surowców odpadowych produktów bogatych w pektyny, zaplanowano także poddanie każdego z wymienionych rodzajów biomasy: (i) ekstrakcji wodą w podwyższonej temperaturze (HWE) oraz (ii) ekstrakcji w 10% wodnym roztworze kwasu cytrynowego. Każdy otrzymany ekstrakt roślinny poddano analogicznym procesom oczyszczania jak w przypadku ekstraktów z wyłoków owocu czarnej porzeczki, otrzymując serię makrocząsteczkowych produktów (Tabela 24). Zestawienie wydajności oraz cech opisujących wstępnie charakter chemiczny otrzymanych produktów umożliwiło porównanie produktów i ocenę ich potencjału jako surowca do otrzymywania pektyn, w zależności od zastosowanej metody ekstrakcyjnej.

3.3.1. Wyłoki z owocu maliny

Ekstrakcja pektyn z wyłoków z owocu maliny, prowadzona w wodzie (**M_{H2O}**) umożliwiła po oczyszczeniu otrzymanie produktu z wydajnością 3,44% wag. Zastosowanie 10% CA oraz NADES jako mediów ekstrakcyjnych skutkowało wzrostem wydajności (5,47 – 5,64% wag.). Pomimo zbliżonych wartości wydajności dla produktów (**M_{CA}**), (**M1**), (**M2**) i (**M3**), odnotowano różnice w ich składzie chemicznym. Produkt (**M_{H2O}**) charakteryzował się największym udziałem polisacharydów (96,93% wag.), natomiast największe ilości UA odnotowano dla preparatów (**M1**), (**M3**),

a w szczególności dla (**M2**) (36,87% wag. w produkcie). Ekstrakcja prowadzona w trzech wariantach NADES w umiarkowanym stopniu sprzyjała wyodrębnianiu polifenoli i białek wraz z polisacharydami. Ilości zanieczyszczeń polifenolami i białkami wynosiły średnio odpowiednio 5,00 oraz 6,70% wag. Produkt (**M2**) uznano za najlepszy ze względu na satysfakcjonującą wydajność oraz wysoki udział UA (12,08 mg UA/g surowca). Produkt (**M2**) wykorzystano w bardziej zaawansowanych analizach fizykochemicznych.

3.3.2. Wytłoki z owocu truskawki

Wydajność procesu HWE produktu bogatego w pektyny z wytlóków z owocu truskawki była wyraźnie mniejsza (1,14% wag.) niż w przypadku pozostałych zastosowanych mediów ekstrakcyjnych, a uzyskany produkt (**T_{H2O}**) charakteryzował się bardzo dużym udziałem polisacharydów (95,15%). Pomimo, że ekstrakcja prowadzona w roztworze 10% CA wykazała największą wydajność (4,74% wag.), to otrzymany produkt (**T_{CA}**) charakteryzował się najmniejszym udziałem cukrów, w tym UA. Zastosowanie optymalnych układów NADES umożliwiło otrzymanie produktów z wydajnością w przedziale 4,03 – 4,33% wag., a otrzymane preparaty polisacharydowe (**T1**), (**T2**) i (**T3**) cechował zauważalnie duży udział UA (25,12 – 26,57% wag.). Wyniki analiz kolorymetrycznych dla produktów (**T1**), (**T2**) i (**T3**) były zbliżone, a różnice mieściły się w granicach błędu statystycznego. Ze względu na ograniczony udział polifenoli i białek w wymienionych produktach, jak też udział UA oraz wydajność ekstrakcji, za produkt optymalny uznano preparat (**T3**), który wykorzystano w dalszych analizach.

3.3.3. Wytłoki z owocu rokitnika

Produkty otrzymane z wytlóków z owocu rokitnika charakteryzowały się największą wydajnością – ekstrakcja w wodzie osiągnęła 4,70% wag. (**R_{H2O}**), natomiast produkt (**R_{CA}**) otrzymano z efektywnością na poziomie 8,88% wag. Produkty wydzielone przy udziale NADES: (**R1**), (**R2**) i (**R3**), podobnie jak w przypadku produktów otrzymanych z maliny, wykazały zbliżony charakter chemiczny, z udziałem UA w zakresie 34,16 - 34,61% wag. Biorąc pod uwagę różnice wynikające z błędów statystycznych, produkt (**R2**) uznano jako optymalny, dlatego został on wykorzystany w dalszych analizach.

Tabela 24. Wydajność i charakterystyka chemiczna produktów otrzymanych z wyłoków owoców czarnej porzeczki, maliny, truskawki oraz rokitnika – ekstrakcja w wodzie w podwyższonej temperaturze (HWE), w 10% CA oraz ekstrakcja w wybranych optymalnych układach NADES.

SUROWIEC	Produkt	Warunki ekstrakcji			Y (% wag.)	Polisacharydy			Polifenole (% wag.)	Białka (% wag.)	
		medium ekstrakcyjne	t (h)	T (°C)		Całkowite* (% wag.)	UA				
							w produkcie (% wag.)	w części polisacharydowej (% wag.)			
CZARNA PORZECZKA	(4)	HWE	4	100	3,07	79,01 ± 1,91	20,05 ± 0,17	25,37 ± 0,21	9,32 ± 0,05	5,33 ± 0,05	
	(11)	10% CA	6		3,64	42,78 ± 2,71	22,96 ± 0,21	53,68 ± 0,50	7,28 ± 0,12	7,35 ± 0,12	
	(37)	ChCl/CA (1,5:1)			4,98	55,62 ± 0,90	26,82 ± 0,63	48,21 ± 1,13	6,94 ± 0,14	4,88 ± 0,03	
	(38)	ChCl/CA (1,5:2)			4,29	65,50 ± 2,41	28,94 ± 0,40	44,18 ± 0,61	6,08 ± 0,19	6,30 ± 0,13	
	(39)	ChCl/CA (2:1,5)			4,87	59,14 ± 3,08	27,51 ± 0,63	46,51 ± 1,06	6,77 ± 0,22	7,11 ± 0,14	
MALINA	(M _{H2O})	HWE			3,44	96,93 ± 2,07	18,22 ± 1,12	18,80 ± 1,15	1,15 ± 0,08	1,96 ± 0,08	
	(M _{CA})	10% CA			5,64	65,99 ± 1,43	25,82 ± 1,26	39,12 ± 1,91	2,69 ± 0,45	5,07 ± 0,27	
	(M1)	ChCl/CA (1,5:1)			5,64	54,93 ± 3,87	30,78 ± 2,50	56,05 ± 4,55	5,50 ± 0,07	3,06 ± 0,31	
	(M2)	ChCl/CA (1,5:2)			5,62	58,30 ± 1,36	36,87 ± 1,13	63,24 ± 1,93	5,00 ± 0,19	6,70 ± 0,41	
	(M3)	ChCl/CA (2:1,5)			5,47	54,32 ± 0,93	30,35 ± 0,61	55,88 ± 1,13	4,70 ± 0,13	6,63 ± 0,31	
TRUSKAWKA	(T _{H2O})	HWE	4	100	1,14	95,15 ± 2,43	20,22 ± 0,44	21,25 ± 0,46	1,40 ± 0,07	3,25 ± 0,07	
	(T _{CA})	10% CA				4,74	36,95 ± 0,66	17,72 ± 0,55	47,96 ± 1,50	2,89 ± 0,14	8,84 ± 0,56
	(T1)	ChCl/CA (1,5:1)				4,17	46,75 ± 0,60	26,07 ± 0,80	55,76 ± 1,72	8,10 ± 0,41	15,78 ± 0,37
	(T2)	ChCl/CA (1,5:2)				4,03	46,64 ± 1,61	25,12 ± 0,79	53,86 ± 1,70	9,14 ± 0,46	16,05 ± 0,49
	(T3)	ChCl/CA (2:1,5)				4,33	42,43 ± 2,81	26,57 ± 0,57	62,61 ± 1,34	6,95 ± 0,35	15,16 ± 0,43
ROKITNIK	(R _{H2O})	HWE			4,70	92,16 ± 4,19	36,46 ± 2,30	39,56 ± 2,50	2,42 ± 0,12	5,59 ± 0,50	
	(R _{CA})	10% CA			8,88	55,01 ± 1,08	28,84 ± 1,36	52,43 ± 2,47	4,12 ± 0,21	8,55 ± 0,25	
	(R1)	ChCl/CA (1,5:1)			8,33	62,31 ± 2,41	34,23 ± 0,71	54,93 ± 1,15	6,47 ± 0,32	11,73 ± 0,28	
	(R2)	ChCl/CA (1,5:2)			7,75	56,02 ± 1,59	34,61 ± 1,03	61,79 ± 1,84	5,53 ± 0,28	11,92 ± 0,10	
	(R3)	ChCl/CA (2:1,5)			7,95	56,20 ± 2,87	34,16 ± 0,70	60,79 ± 1,25	5,62 ± 0,28	11,89 ± 0,24	

* Udział polisacharydów w produkcie został przeliczony zgodnie ze wskaźnikiem korekty równym 2,60, 2,87, 1,57 oraz 2,48 odpowiednio dla produktów z czarnej porzeczki, maliny, truskawki oraz rokitnika.

Przeprowadzone procesy wyodrębniania produktów bogatych w pektyny metodami opisywanymi w literaturze oraz za pomocą przedstawionych w tej pracy układów NADES, ocenionych jako optymalne, dostarczyły informacji na temat skuteczności NADES oraz potencjału do wyodrębniania pektyn, ukrytego w zbadanych surowcach odpadowych. Wybrane do tych eksperymentów surowce charakteryzowały się odmienną budową komórek roślinnych, która wynika między innymi z różnic w składzie ich ścian komórkowych. Czynniki te w znaczącym stopniu wpływały na wydajność procesu ekstrakcji, niezależnie od zastosowanej metody.

Należy też dodać, że zastosowanie układów NADES w procesie ekstrakcji z biomasy odpadowej owoców jagodowych wpłynęło na wzrost ilości polisacharydów bogatych w UA, co przełożyło się na większy stopień czystości otrzymanych kwasowych polisacharydów [Riyamol and Jeevitha, 2024]. W porównaniu z produktami otrzymanymi na drodze HWE i w 10% CA, zastosowanie NADES jako medium ekstrakcyjnego sprzyjało wyodrębnianiu polifenoli, co przypuszczalnie może prowadzić do tworzenia w ciągu procesowym kompleksów polifenolowo-polisacharydowych.

3.4. Charakterystyka fizyko-chemiczna produktów pektynowych

3.4.1. Analiza produktów roślinnych metodami chromatograficznymi oraz spektroskopowymi

Chromatografia stanowi jedno z najważniejszych narzędzi analitycznych w separacji i w badaniach nad strukturą chemiczną polisacharydów. Metody chromatograficzne wykorzystywane do rozdzielania mieszanin polisacharydów od innych komponentów biomasy, jak również do separacji polisacharydów jako ich niejednorodnych mieszanin w celu otrzymania jednorodnych frakcji, stanowią dużą grupę technik. Warto wymienić te metody, które są stosowane przez badaczy szczególnie chętnie, do których zaliczają się: chromatografia jonowymienna (ang. *Ion Exchange Chromatography*, IEC) i chromatografia podziałowa (ang. *Size Exclusion Chromatography*, SEC lub ang. *Gel Permeation Chromatography*, GPC) – pomocne w otrzymywaniu większych ilości jednorodnych frakcji polisacharydów, grupa metod analitycznych wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), szczególnie metoda oparta o oddziaływania hydrofilowe z fazą stacjonarną w układzie HPLC (HILIC), jak też metoda

anionowymienna (HPAEC-PED/HPAEC-PAD). Szacowanie masy cząsteczkowej polisacharydów przeprowadza się metodą chromatografii wykluczania wielkościowego w układach HPLC-SEC (ang. *High-Performance Size-Exclusion Chromatography*), UHPLC-SEC (ang. *Ultra-High-Performance Size-Exclusion Chromatography*) z detektorem refraktometrycznym. Skład monosacharydów w makromolekule określa się najczęściej metodą chromatografii gazowej z detekcją typu spektrometria mas (ang. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS), poprzedzoną koniecznością derywatyzacji monosacharydów do odpowiednich lotnych pochodnych [Zheng i in., 2023]. Do najważniejszych technik spektroskopowych użytecznych w badaniach struktury chemicznej polisacharydów należy zaliczyć: spektroskopię w podczerwieni (FT-IR) do identyfikacji grup funkcyjnych, szereg technik magnetycznego rezonansu jądrowego (w tym ^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC, COSY), spektrometrię mas (MS, np. MALDI-TOF) [Hong i in., 2021; Yao i in., 2021; Wang i in., 2023].

Dane literaturowe dostarczają licznych informacji dotyczących zalet i ograniczeń poszczególnych technik analitycznych.

3.4.1.1. *Frakcjonowanie produktów na drodze chromatografii jonowymiennej*

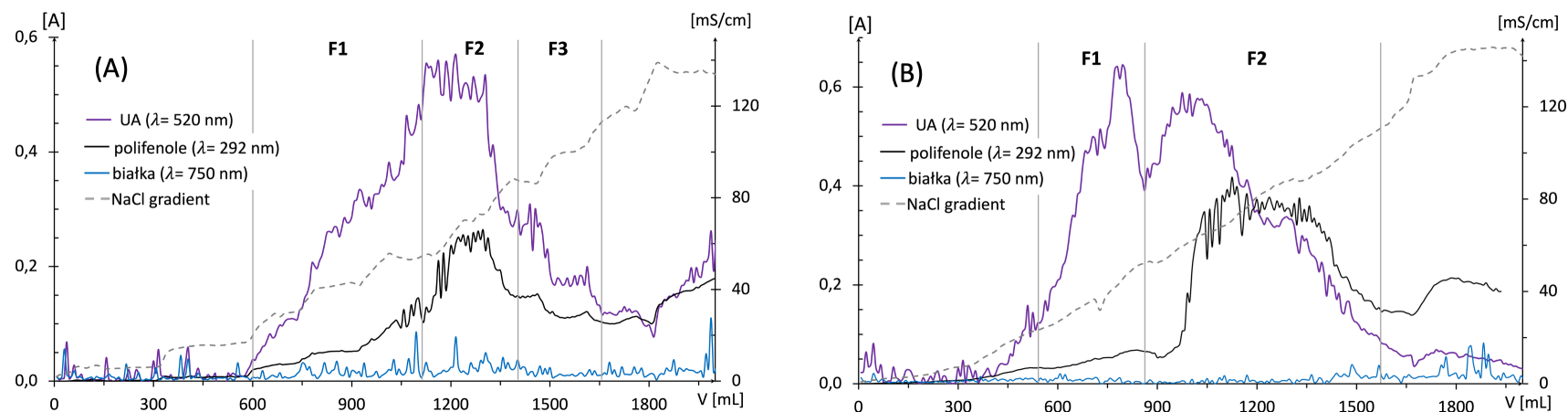
Frakcjonowanie wybranych produktów roślinnych na drodze chromatografii jonowymiennej miało na celu otrzymanie frakcji pektynowych o wysokim stopniu jednorodności. Matrycę złoża jonowymiennego stanowił DEAE-Sephadex, złożone wzbogacone o ligandy dietyloaminoetylowe, nadające w ten sposób fazie stacjonarnej funkcję anionowymienną. Tego typu fazy stacjonarne są popularnie wykorzystywane do rozdzielania polisacharydów bogatych w kwasy uronowe, w tym do pektyn. Trójwymiarowa usieciowana struktura złoża umożliwia też podział badanych molekuł ze względu na ich wielkość i kształt [Zheng i in., 2023]. Detekcję prowadzono przy wykorzystaniu metod kolorymetrycznych: metody *m*-hydroksybifenylowej do oznaczania UA [Blumenkrantz i Asboe-Hansen, 1973] i metody Lowry'ego do oznaczania białek [Lowry i in., 1951]. Profil polifenolowy wyznaczono poprzez pomiar absorbancji próbek przy $\lambda=292$ nm.

Do frakcjonowania wyżej wymienioną metodą wybrano produkty (4), (11) i (38), uzyskane z wyłoków owocu czarnej porzeczki, a z pozostałych surowców produkty uznane za najbogatsze w kwasy uronowe, czyli (M2), (T3) i (R2). Każdy

z wymienionych produktów poddano frakcjonowaniu na złożu DEAE-Sephadex, stosując jako eluent wodę dejonizowaną, a następnie wodny roztwór NaCl o wzrastającym stężeniu soli (od 0,5 do 1,2 M), otrzymując każdorazowo na podstawie pomiarów kolorymetrycznych widma chromatograficzne obrazujące frakcjonowanie polisacharydów zawierających kwasy uronowe i polifenoli. Produkty poddane analizie IEC charakteryzowały się ciemną, intensywną barwą, przy czym ciemnofioletową dla preparatów z wyciągów owocu czarnej porzeczki (**4**, **11** i **38**), bordowo-brązową dla produktu z maliny (**M2**), brązowo-fioletową dla produktu z truskawki (**T3**) oraz ciemnobrązową dla rokitnika (**R2**). Po frakcjonowaniu IEC wszystkie otrzymane frakcje o charakterze pektynowym cechował kremowo-żółty kolor

Analiza IEC produktów (**4**) i (**11**) miał na celu zapewnienie możliwości porównania produktów ekstrahowanych odpowiednio w wodzie i w wodnym roztworze kwasu cytrynowego do produktu (**38**), gdzie środowiskiem ekstrakcji był wodny roztwór NADES (Ryc. 24). Rezultatem frakcjonowania produktu (**4**) były trzy frakcje - (**4-F1**), (**4-F2**), (**4-F3**) wymyte gradientem NaCl oraz dodatkowo frakcja (**4-F0**) otrzymana przez odmycie ze złoża komponentów produktu o charakterze innym niż kwasowy, jak też frakcja (**4-NaOH**), wymyta 0,1 M roztworem NaOH pod koniec procesu chromatograficznego. Produkt (**11**) wykazał bardziej jednorodny charakter, z wyraźnie wyodrębnionymi dwiema frakcjami - (**11-F1**) oraz (**11-F2**), a ponadto, analogicznie jak w przypadku poprzedniego produktu, frakcje (**11-F0**) i (**11-NaOH**). Na podstawie chromatogramów oceniono, że w obu przypadkach frakcje **F1** cechował brak udziału polifenoli i białek, natomiast **F2** wykazywały wysoki udział polifenoli, co może wskazywać na obecność kompleksów polisacharydowo-polifenolowych lub sugerować występowanie silnych oddziaływań elektrostatycznych między polifenolami oraz fazą stacjonarną, wymagających zastosowania wyższej siły jonowej roztworu NaCl w procesie elucji. W przypadku obu produktów ich profile białkowe charakteryzowały się małymi wartościami absorbancji, nie wskazując także widocznych powiązań z pozostałymi profilami. Z tego względu odstąpiono od detekcji profilu białkowego w kolejnych procedurach IEC.

Wszystkie otrzymane frakcje scharakteryzowano pod względem udziału % wag. w produkcie oraz oszacowano w każdej z nich ilość cukrów, UA, polifenoli i białek (Tabela 25). Analizując otrzymane wyniki zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia



Ryc. 24. Chromatografia jonowymienna DEAE produktów roślinnych, otrzymanych z wyłoków owocu czarnej porzeczki: (A) - HWE przez 6 h (4), (B) - ekstrakcja w 10% CA (11), z uwzględnieniem profilu dla kwasów uronowych, polifenoli oraz białek.

Tabela 25. Wydajność oraz charakterystyka chemiczna frakcji uzyskanych w wyniku frakcjonowania IEC produktów roślinnych (4) oraz (11) otrzymanych z wyłoków owoców czarnej porzeczki.

Frakcja		Y (% wag.)	Polisacharydy		Polifenole (% wag.)	Białka (% wag.)
			Całkowite* (% wag.)	UA		
				w produkcie (% wag.)	w części polisacharydowej (% wag.)	
CZARNA PORZECZKA	(4-F0)	6,96	63,71 ± 4,10	2,35 ± 0,30	3,68 ± 0,47	0,64 ± 0,05
	(4-F1)	12,23	51,72 ± 2,05	20,09 ± 0,64	38,84 ± 1,24	1,14 ± 0,06
	(4-F2)	10,51	51,61 ± 2,52	22,38 ± 0,55	43,36 ± 1,06	1,69 ± 0,07
	(4-F3)	7,32	51,42 ± 2,11	14,20 ± 0,55	27,62 ± 1,07	2,05 ± 0,03
	(4-NaOH)	10,06	27,55 ± 0,97	9,62 ± 0,68	34,94 ± 2,48	1,17 ± 0,05
	(11-F0)	4,15	49,25 ± 2,04	0,52 ± 0,16	1,05 ± 0,32	0,59 ± 0,09
	(11-F1)	12,90	41,32 ± 4,38	35,26 ± 1,02	85,31 ± 2,48	0,74 ± 0,06
	(11-F2)	21,96	40,94 ± 4,08	40,58 ± 1,28	99,12 ± 3,13	1,78 ± 0,11
	(11-NaOH)	27,59	31,57 ± 1,43	1,43 ± 1,46	4,54 ± 4,62	1,48 ± 0,14

* Udział polisacharydów w produkcie został przeliczony zgodnie ze wskaźnikiem korekty równym 2,60.

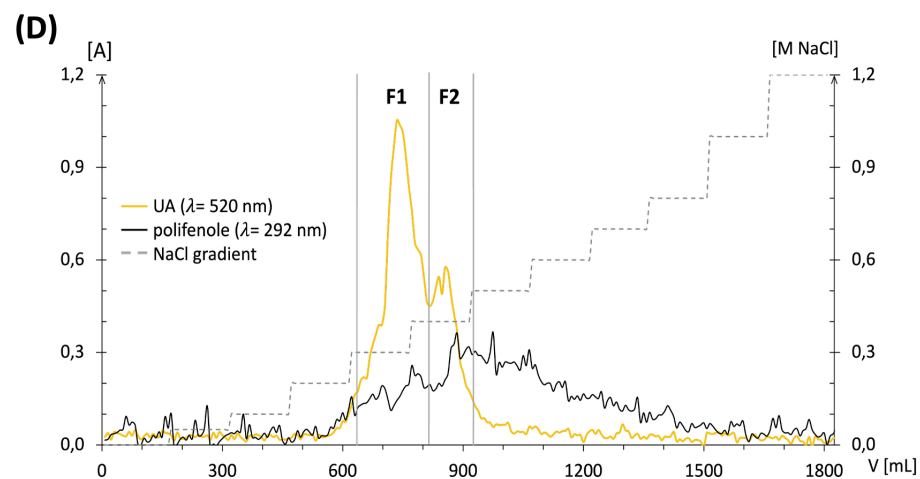
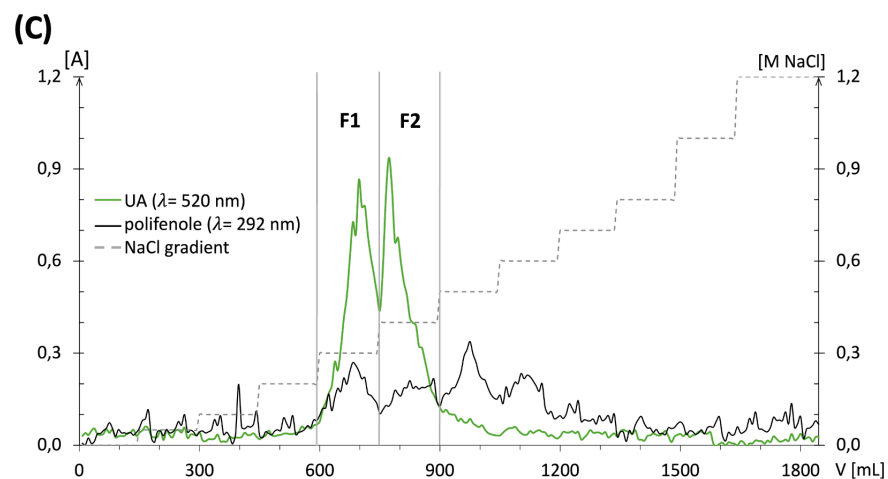
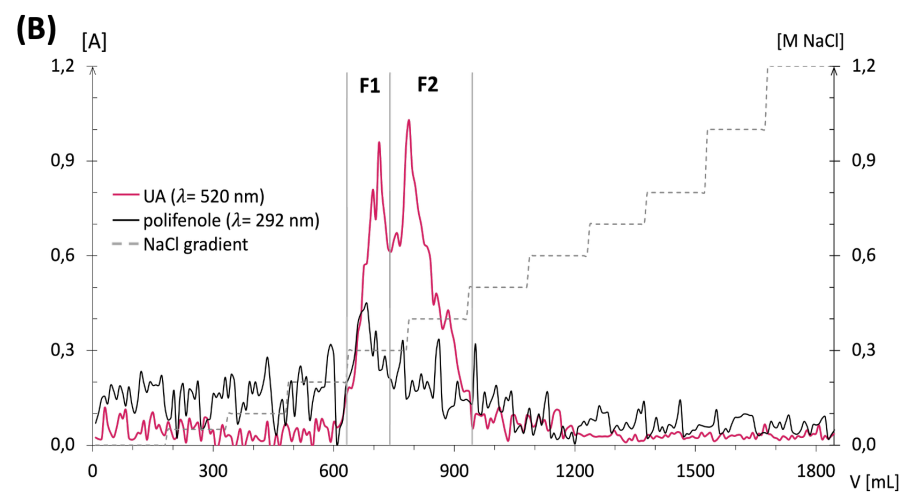
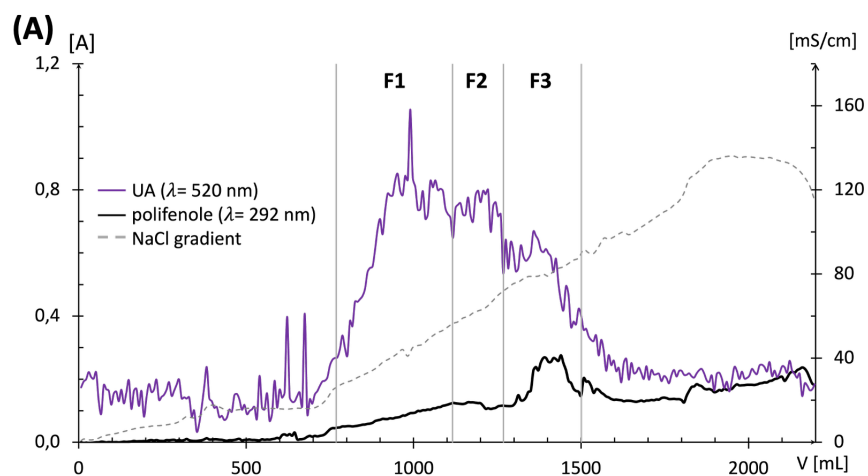
NaCl w eluencie udział polifenoli w wymywanych frakcjach stopniowo wzrastał, co potwierdza fakt, że charakter kwasowy polifenoli zwykle jest większy niż pektyn. Frakcje **(4-F1)**, **(4-F2)** i **(4-F3)** charakteryzowały się wysokim udziałem cukrów, przy czym dla frakcji z produktu uzyskanego na drodze ekstrakcji w środowisku 10% CA udział ten był znacząco większy (~41% wag.) o bardzo dużym udziale UA w częściach cukrowych tych frakcji, bo aż 85-99% wag., przy czym wartość dla **(11-F2)** była największa. Potwierdza to dużą skuteczność środowiska CA w procesie ekstrakcji do wyodrębniania pektyn z biomasy. Należy też zauważyć, że w przypadku obu produktów ich frakcje najbardziej bogate w UA wymyte zostały 0,2-0,4 M roztworem NaCl, co jest znanym i opisywanym w literaturze naukowej zjawiskiem [Wang i in., 2018; Muhidinov i in., 2024]. Natomiast frakcje **F0** w obu przypadkach sugerowały, że składają się w głównej mierze z polisacharydów o charakterze obojętnym.

W następnym kroku przeprowadzono na drodze chromatografii IEC na złożu typu Sephadex-DEAE frakcjonowanie produktów uznanych za najlepsze wśród tych otrzymanych na drodze ekstrakcji w NADES, w 100°C, przez 4 h, w warunkach optymalnych:

- produkt z wycieków owocu czarnej porzeczki w NADES (ChCl/CA; 1,5:2) - **(38)**,
- produkt z wycieków owocu maliny w NADES (ChCl/CA; 1,5:2) - **(M2)**,
- produkt z wycieków owocu truskawki w NADES (ChCl/CA; 2:1,5) - **(T3)**,
- produkt z wycieków owocu rokitnika w NADES (ChCl/CA; 1,5:2) - **(R2)**.

Frakcjonując produkt **(38)** otrzymano trzy frakcje wymyte roztworami NaCl: **(38-F1)**, **(38-F2)** i **(38-F3)**, a profil wyznaczony dla UA sugerował wysoką niejednorodność badanego produktu (Ryc. 25-A). Analizy kolorymetryczne (Tabela 26) wskazały frakcję **(38-F1)** jako dominującą, szczególnie pod względem udziału w całym produkcie. Frakcja ta charakteryzowała się również najwyższym stopniem czystości, ze względu na ograniczony udział polifenoli oraz białek, których wartości wyniosły odpowiednio 0,89% oraz 1,02%.

Profil chromatograficzny UA dla produktu z wycieków owocu maliny **(M2)** charakteryzował się obecnością dwóch wyraźnych pików dla frakcji wyeluowanych przy 0,2-0,4 M NaCl - frakcje **(M2-F1)** i **(M2-F2)**. Obie frakcje cechował niski udział polifenoli (~0,90% wag.) oraz białek (1,70 – 2,40% wag.), przy jednocześnie wysokim udziale UA, osiągającym dla **(M2-F1)** i **(M2-F2)** odpowiednio 35,55% oraz 39,85%,



Ryc. 25. Chromatografia jonowymienna produktów wyodrębnionych z wyłóków owoców: (A) - czarnej porzeczki (**38**), (B) – maliny (**M2**), (C) – truskawki (**T3**), (D) - rokitnika (**R2**), na złożu DEAE-Sephadex, z uwzględnieniem profilu dla kwasów uronowych oraz polifenoli.

Tabela 26. Wydajność oraz charakterystyka chemiczna frakcji uzyskanych w wyniku frakcjonowania IEC produktów roślinnych otrzymanych z wytlóków owoców czarnej porzeczki (**38**), maliny (**M2**), truskawki (**T3**) oraz rokitnika (**R2**) poprzez zastosowanie warunków optymalnych ekstrakcji NADES.

SUROWIEC	Frakcja	Y (% wag.)	Polisacharydy		Polifenole (% wag.)	Białka (% wag.)	
			Calkowite*	UA			
				w produkcji			w części polisacharydowej
CZARNA PORZECZKA	(38-F0)	9,47	40,73 ± 2,47	9,25 ± 0,37	22,71 ± 0,90	1,32 ± 0,07	0,85 ± 0,03
	(38-F1)	13,35	47,27 ± 0,89	28,19 ± 0,45	59,65 ± 0,95	0,89 ± 0,08	1,02 ± 0,03
	(38-F2)	4,72	39,86 ± 2,20	25,72 ± 0,52	64,53 ± 1,31	1,03 ± 0,04	1,19 ± 0,14
	(38-F3)	6,16	38,30 ± 2,10	25,46 ± 0,32	66,48 ± 0,83	1,18 ± 0,04	1,20 ± 0,08
	(38-NaoH)	1,59	24,01 ± 1,55	13,38 ± 0,32	55,72 ± 1,32	0,80 ± 0,05	1,52 ± 0,06
MALINA	(M2-F0)	5,51	81,26 ± 1,54	4,64 ± 0,27	5,70 ± 0,33	1,36 ± 0,02	1,38 ± 0,06
	(M2-F1)	33,15	39,23 ± 0,83	35,55 ± 0,68	90,63 ± 1,72	0,89 ± 0,05	1,70 ± 0,07
	(M2-F2)	36,33	41,13 ± 0,30	39,85 ± 0,40	96,88 ± 0,98	0,90 ± 0,10	2,40 ± 0,12
	(M2-NaOH)	2,02	20,30 ± 0,34	5,15 ± 0,19	25,37 ± 0,95	0,76 ± 0,08	1,08 ± 0,05
TRUSKAWKA	(T3-F0)	5,81	52,76 ± 0,18	7,27 ± 0,20	13,78 ± 0,38	1,80 ± 0,03	2,64 ± 0,05
	(T3-F1)	31,99	47,42 ± 0,46	42,41 ± 0,77	89,44 ± 1,62	2,09 ± 0,27	7,01 ± 0,71
	(T3-F2)	28,30	43,16 ± 0,49	41,15 ± 0,85	95,34 ± 1,98	2,48 ± 0,23	7,54 ± 0,09
	(T3-NaOH)	4,48	8,69 ± 0,34	5,47 ± 0,31	62,94 ± 3,52	0,97 ± 0,05	1,08 ± 0,03
ROKITNIK	(R2-F0)	3,47	90,94 ± 0,26	6,91 ± 0,33	7,60 ± 0,37	2,10 ± 0,08	3,15 ± 0,16
	(R2-F1)	34,90	61,72 ± 3,95	51,35 ± 2,28	83,20 ± 3,70	1,83 ± 0,08	5,10 ± 0,06
	(R2-F2)	21,36	46,08 ± 0,89	46,39 ± 2,56	99,66 ± 5,05	2,64 ± 0,05	7,83 ± 0,09
	(R2-NaOH)	4,08	13,65 ± 1,36	6,55 ± 0,19	47,98 ± 1,43	0,97 ± 0,09	1,17 ± 0,00

* Udział polisacharydów w produkcie został przeliczony zgodnie ze wskaźnikiem korekty równym 2,60, 2,87, 1,57 oraz 2,48 odpowiednio dla produktów z czarnej porzeczki, maliny, truskawki oraz rokitnika.

stanowiąc ~91-97% części cukrowej. Ze względu na wyższy stopień czystości, frakcję (**M2-F1**) uznano za dominującą i przeznaczono do dalszych analiz.

Podział chromatograficzny produktu (**T3**) umożliwił otrzymanie dwóch frakcji - (**T3-F1**) i (**T3-F2**), także otrzymanych za pomocą 0,2-04 M NaCl. W przypadku tego produktu szczególnie wyraźna była korelacja pomiędzy układem profilu polifenolowego a kolejnymi stężeniami NaCl w eluencie. Oba piki odpowiadające za obecność UA pokrywały się z pikami w profilu polifenolowym. Uzyskane frakcje (**T3-F1**) oraz (**T3-F2**) charakteryzowały się wysokim udziałem cukrów, odpowiednio 47,42% oraz 43,16%, a także niskim stężeniem polifenoli i białek. Frakcję (**T3-F1**) uznano za dominującą ze względu na wyższy stopień czystości oraz satysfakcjonującą wydajność procesu.

Profil UA dla produktu z wyciągów owocu rokitnika (**R**) wskazał dominację (**R2-F1**). Profil polifenolowy, przesunięty względem profilu kwasów uronowych ku wyższym wartościom stężenia eluentu, potwierdzał wyższe powinowactwo polifenoli niż UA do fazy stacjonarnej. Brak pokrywających się czasów retencji dla profili UA i polifenoli może wskazywać, że oba składniki w mieszaninie produktu (**R**) raczej nie tworzą kompleksów polifenolowo-polisacharydowych. Należy też dodać, że (**R2-F1**) okazała się mieć największy udział w produkcie, jak też duży udział cukrów (61,72%) we frakcji, a także UA (51,35%), przy jednocześnie małej ilości polifenoli oraz białek.

3.4.1.2. Frakcjonowanie produktów na drodze chromatografii LH-20

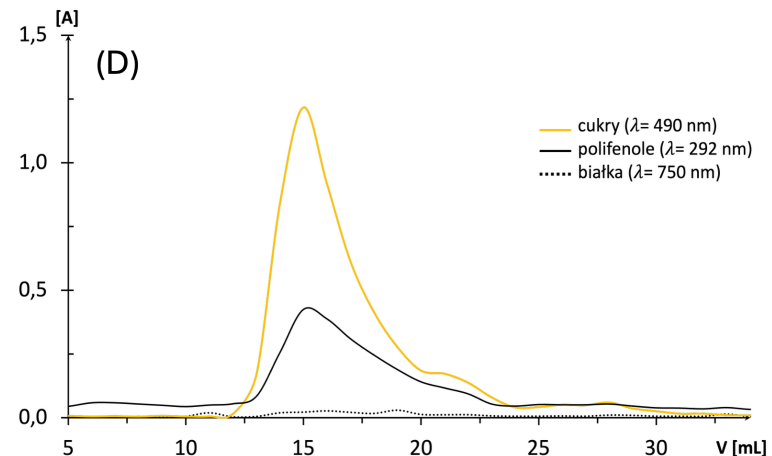
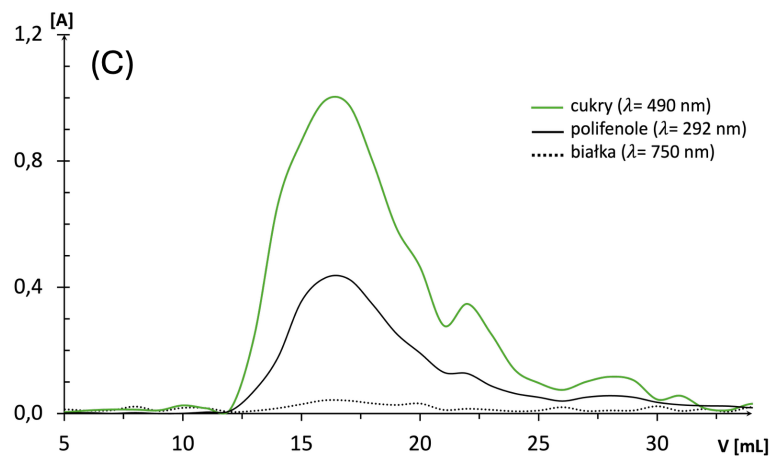
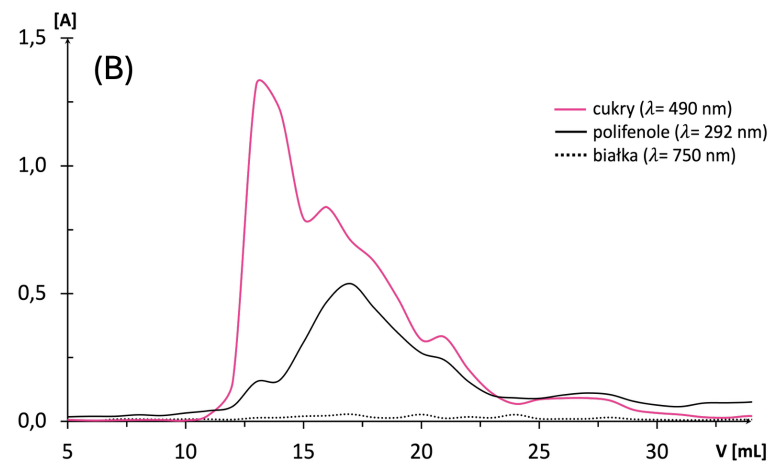
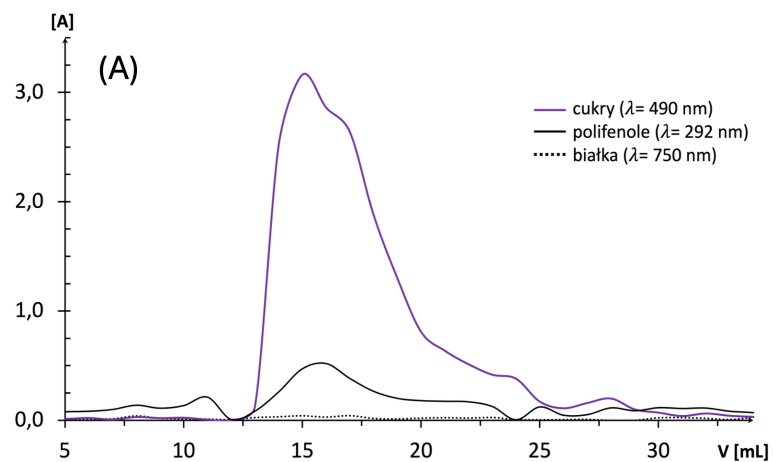
Chromatografia cieczowa na złożu typu Sephadex LH-20 jest metodą separacyjną wykorzystującą różnice w stopniu polarności składników rozdzielanej mieszaniny. Złoże Sephadex LH-20 jest przeznaczone do pracy w układach rozpuszczalników organicznych o różnym stopniu polarności oraz ich mieszaninami z wodą [Suárez i in., 2008]. Wykazuje wysoką selektywność dzięki dwójakiemu charakterowi macierzy - zarówno hydrofilowemu jak i lipofilowemu. Umożliwia pracę w różnorodnych układach rozpuszczalnikowych, w tym woda-alkohol. Metoda rozdziału opiera się o mechanizm wykluczania, charakteryzujący techniki z zakresu chromatografii SEC oraz oddziaływania adsorpcyjne i hydrofobowe wpływające na stopień oraz siłę związania badanych substancji ze złożem [Suárez i in., 2008; Mottaghipisheh i Iriti, 2020; Susanti i in., 2024]. Metoda jest powszechnie wykorzystywana do rozdziału i oczyszczania związków pochodzenia roślinnego oraz ich koniugatów, w tym polifenoli

[Mottaghipisheh i Iriti, 2020; Susanti i in., 2024; Dai i in., 2013a; Janiak i in., 2014], polisacharydów [Zhao i in., 2025] oraz kompleksów polisacharydowo-białkowych [Suárez i in., 2008]. Technika umożliwia uzyskanie pośredniej informacji czy mieszanina składników produktu zawierającego polisacharydy to mieszanina polisacharydów niezwiązanych w żaden sposób z wielkocząsteczkową matrycą polifenolową obecną w produkcie, czy też jest to mieszanina koniugatów polifenolowo-polisacharydowych [Mazurek-Hołys i in., 2025].

Dominujące frakcje (**38-F1**), (**M2-F1**), (**T3-F1**) oraz (**R2-F1**), otrzymane na drodze chromatografii jonowymiennej poddano analizie na złożu Sephadex LH-20 (Ryc. 26). Celem analizy była ocena jednorodności frakcji pektynowych.

Uzyskane chromatogramy wykazały podobieństwa w zakresie dominacji frakcji polisacharydowej w początkowej fazie procesów elucji. Liczba oraz intensywność pików w profilu polisacharydowym odzwierciedla indywidualne właściwości poszczególnych produktów, na co przypuszczalnie miały wpływ ich masy cząsteczkowe, struktura przestrzenna oraz charakter i siła oddziaływań z matrycą żelu. Nakładanie się profili polisacharydowego oraz polifenolowego sugeruje współeluowanie polifenoli z polisacharydami, a umiejscowienie ich maksimum absorpcji przy zbliżonym czasie retencji może sugerować, że są obecne w postaci koniugatów polifenolowo-polisacharydowych, występujących nawet po etapie rozdzielania na drodze IEC. Stanowi to pośrednią informację na temat struktury analizowanych frakcji.

Profile białkowe frakcji (**38-F1**), (**M2-F1**), (**T3-F1**) i (**R2-F1**) charakteryzowały się małymi wartościami absorbancji, co wskazuje na niewielki udział tego komponentu w badanych frakcjach. Biorąc pod uwagę analizy kolorymetryczne produktów, z których zostały wyodrębnione: (**38**), (**M2**), (**T3**) i (**R2**) oraz ich wyżej wymienionych frakcji, można stwierdzić efektywność usuwania białek z produktów w toku IEC.



Ryc. 26. Chromatografia LH-20 pektynowych frakcji dominujących: (A) - (**38-F1**), (B) - (**M2-F1**), (C) - (**T3-F1**) i (D) - (**R2-F1**), otrzymanych w wyniku separacji wybranych produktów na drodze chromatografii jonowymiennej DEAE.

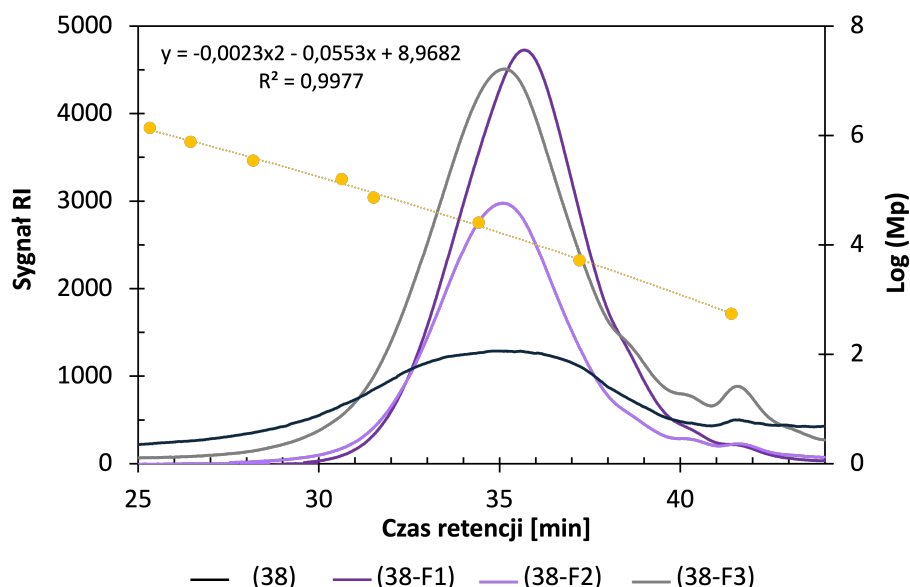
3.4.1.3. Szacowanie masy cząsteczkowej produktów i ich frakcji pektynowych

Wysokosprawna chromatografia cieczowa typu HPLC-SEC (ang. *High Performance Liquid Chromatography - Size Exclusion Chromatography*) stanowi przykład techniki separacji opartej na mechanizmie wykluczania molekularnego, znajdującej zastosowanie w szacowaniu masy cząsteczkowej składników w mieszaninie produktów, szczególnie makromolekuł. Proces separacji składników mieszaniny przebiega według wielkości hydrodynamicznej rozdzielanych cząsteczek oraz ich zdolności do penetracji porów obecnych w złożu chromatograficznym, gdzie struktury o większych rozmiarach przemieszczają się w przestrzeniach między ziarnami złoża z większą prędkością, co pozwala im opuścić kolumnę w pierwszej kolejności, podczas gdy mniejsze przenikają do wnętrza porów, co wydłuża czas retencji [Zheng i in., 2023; Striegel, 2022].

Analizę HPLC-SEC przeprowadzono we współpracy z badaczami z Instytutu Chemii, Słowackiej Akademii Nauk w Bratysławie, na Słowacji. W tym celu użyte zostały kolumny chromatograficzne HEMA-BIO 300 i HEMA-BIO 1000 połączone szeregowo, co umożliwiło zwiększenie zakresu masy cząsteczkowej rozdzielanych substancji do przedziału $1 \times 10^2 - 1 \times 10^6$ g/mol. Przed przygotowaniem roztworu do analizy, produkty pektynowe zostały doprowadzone do pH neutralnego. Ich wyjściowo kwasowe pH mogłoby zaburzać przebieg analizy chromatograficznej, między innymi poprzez niepożądane interakcje z fazą stacjonarną bądź układem detekcji. Co więcej, podniesienie wartości pH do obojętnej sprzyjało zwiększeniu rozpuszczalności analizowanych produktów i ich frakcji. Zastosowany zestaw HPLC był sprzężony z detektorem refraktometrycznym (RI). Analizie HPLC-SEC poddano produkty optymalne (**(38)**), (**(M2)**), (**(T3)**) i (**(R2)**) oraz ich frakcje uzyskane we frakcjonowaniu metodą IEC.

Jak przedstawiono w rezultacie IEC (Ryc. 25A), produkt z wyłoków owocu czarnej porzeczki (**(38)**) wykazywał bardzo duży stopień niejednorodności w porównaniu z produktami pozyskanymi z innych surowców roślinnych. Potwierdza to również analiza HPLC-SEC, gdzie w oparciu o pozorną względną masę cząsteczkową (M_{app}) dla (**(38)**) (Ryc. 27) stwierdzono obecność frakcji zarówno średnio cząsteczkowych ($M_p \approx 15,6 \times 10^3$ g/mol, PDI = 6,87), jak i małowcząsteczkowych ($\sim 0,5$ i $0,23 \times 10^3$ g/mol; PDI w obu przypadkach był zbliżony do 1). Natomiast frakcje pektynowe (**(38-F1)**), (**(38-F2)**) i (**(38-F3)**) charakteryzowały się pozorną względną masą cząsteczkową (M_{app}) w zakresie od $\sim 8,5$ do $11,7 \times 10^3$ g/mol oraz $\sim 0,235$ - $0,478 \times 10^3$ g/mol przy niższych wartościach PDI (2,69–3,53), co sugeruje ich umiarkowaną niejednorodność. Wartości M_w dla frakcji

niskocząsteczkowych w obrębie produktów pektynowych czarnej porzeczki nie różniły się znacząco wartościami ($M_w < 0,5 \times 10^6$ g/mol), natomiast zakres obserwowanych mas cząsteczkowych dla frakcji średnicząsteczkowych wzrastał, szczególnie dla produktu (38) ($\sim 13,8\text{--}62,1 \times 10^3$ g/mol). Frakcje wykazywały zawężenie rozkładu mas cząsteczkowych w porównaniu z produktem (38).



Ryc. 27. Pozorna względna masa cząsteczkowa (M_{app}) dla produktu z wyłoków owocu czarnej porzeczki (38) oraz jego frakcji (38-F1), (38-F2) i (38-F3).

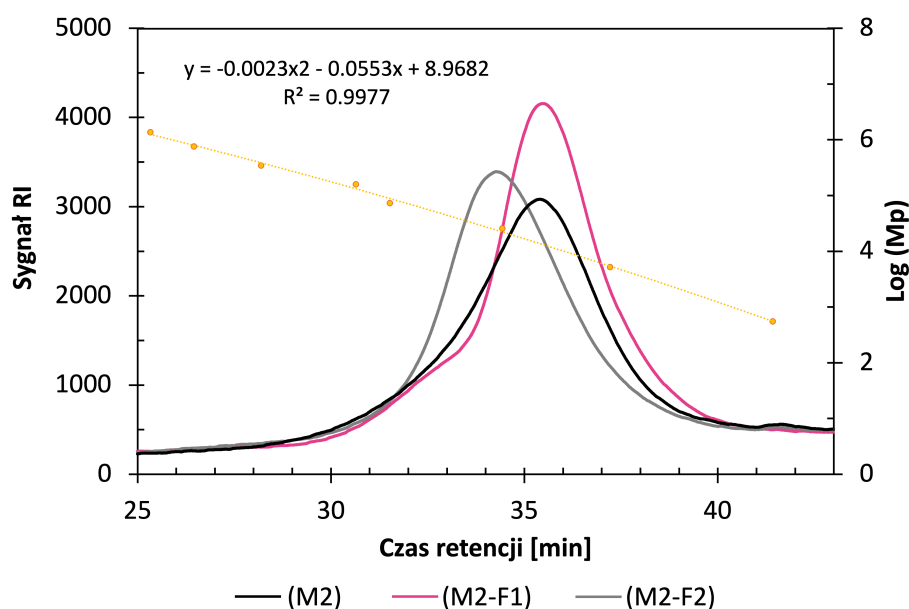
Tabela 27. Charakterystyka mas cząsteczkowych (M_p , M_n , M_w ; g/mol) oraz wskaźnika PDI (M_w/M_n) dla produktu (38) oraz jego frakcji (38-F1), (38-F2) oraz (38-F3).

Produkt	M_p	M_n	M_w	M_w/M_n (PDI)
(38)	15674	9038	62054	6,87
	478	429	459	1,07
	235	208	211	1,01
(38-F1)	8532	5047	13873	2,75
	369	235	253	1,08
(38-F2)	11750	6416	17259	2,69
	267	241	255	1,06
(38-F3)	11247	5574	19674	3,53
	269	212	246	1,16

We frakcji (38-F1) dominowały formy małowcząsteczkowe. Frakcje (38-F2) oraz (38-F3) prezentowały zbliżoną charakterystykę, przy czym frakcję (38-F2) można uznać za bardziej jednorodną. We wszystkich analizowanych próbkach stwierdzono obecność

krótkich łańcuchów polisacharydowych (prawdopodobnie oligomerów, $M_p < 0,5 \times 10^3$ g/mol), co może być efektem degradacji polisacharydów w procesie separacji.

Produkt z wycieków owocu maliny (**M2**) oraz jego frakcje (**M2-F1**) i (**M2-F2**) charakteryzowały się obecnością umiarkowanie niejednorodnych, średniocząsteczkowych frakcji dominujących, których wartości M_{app} występowały w zakresie $\sim 11,5\text{--}32,6 \times 10^3$ g/mol ($PDI \approx 1,18\text{--}2,92$), oraz stosunkowo jednorodnych frakcji małowcząsteczkowych ($M_p < 0,5 \times 10^3$ g/mol). Co ciekawe, frakcja (**M2-F1**) wykazała największe wartości masy cząsteczkowej przy jednocześnie niskiej polidispersyjności ($PDI=1,18$). Co więcej, w przypadku (**M2-F1**) nie zaobserwowano sygnału reprezentującego krótkie łańcuchy polisacharydowe (oligosacharydy, $M_p < 0,5 \times 10^3$ g/mol).

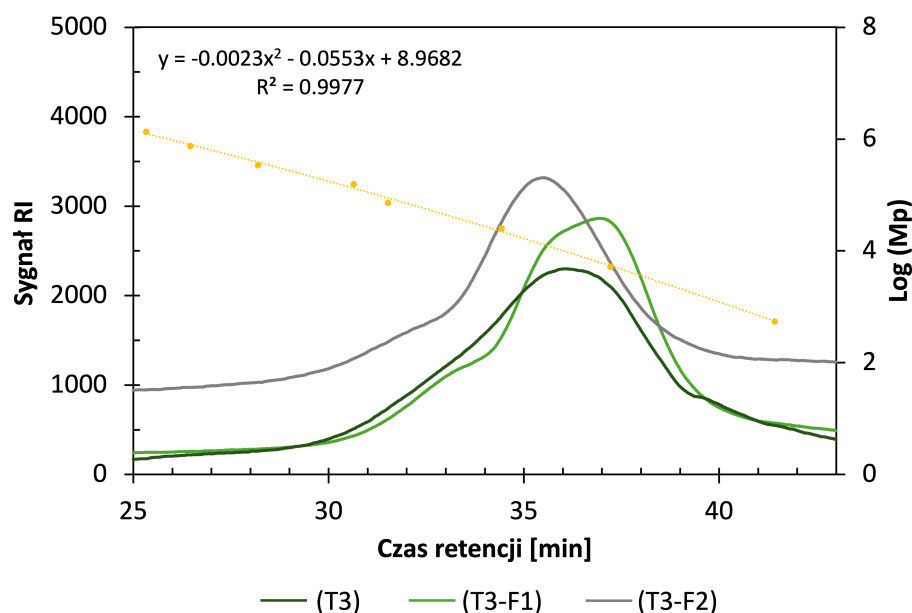


Ryc. 28. Pozorna względna masa cząsteczkowa (M_{app}) dla produktu z wycieków owocu maliny (**M2**) oraz jego frakcji (**M2-F1**) i (**M2-F2**).

Tabela 28. Charakterystyka mas cząsteczkowych (M_p , M_n , M_w ; g/mol) oraz wskaźnika PDI (M_w/M_n) dla produktu (**M2**) oraz jego frakcji (**M2-F1**) i (**M2-F2**).

Produkt	M_p	M_n	M_w	M_w/M_n (PDI)
(M2)	11537	8538	24966	2,92
	454	376	429	1,14
(M2-F1)	32642	52423	62037	1,18
	11133	6834	11325	1,66
(M2-F2)	20106	11048	23670	2,14
	487	433	455	1,05

Produkty otrzymane z wycieków owocu truskawki również charakteryzowały się obecnością dwóch frakcji reprezentujących ich mało- oraz średniocząsteczkowy charakter. Pozorna względna masa cząsteczkowa (M_{app}) produktu (T3) przyjęła wartości w zakresie $\sim 1,5\text{--}39,7 \times 10^3$ g/mol przy $PDI=1,15\text{--}6,49$. M_{app} wyniosła $\sim 8,3 \times 10^3$ g/mol, gdzie $PDI=6,49$, co sugerowało mocno niejednorodną, złożoną mieszaninę małowielkościowych fragmentów polimerowych z prawdopodobną obecnością pojedynczych makrocząsteczek. Szeroki rozkład masy sugeruje również obecność frakcji małowielkościowej ($M_{app} < 0,5 \times 10^3$ g/mol) o bardziej jednorodnej strukturze. Frakcja dominująca (T3-F1) charakteryzowała się obecnością populacji łańcuchów pektynowych w zakresie mas cząsteczkowych $M_{app} \approx 26 \times 10^3$ g/mol oraz $\sim 5,4 \times 10^3$ g/mol. Wartości $PDI \approx 1$ wskazywały na wysoką jednorodność.



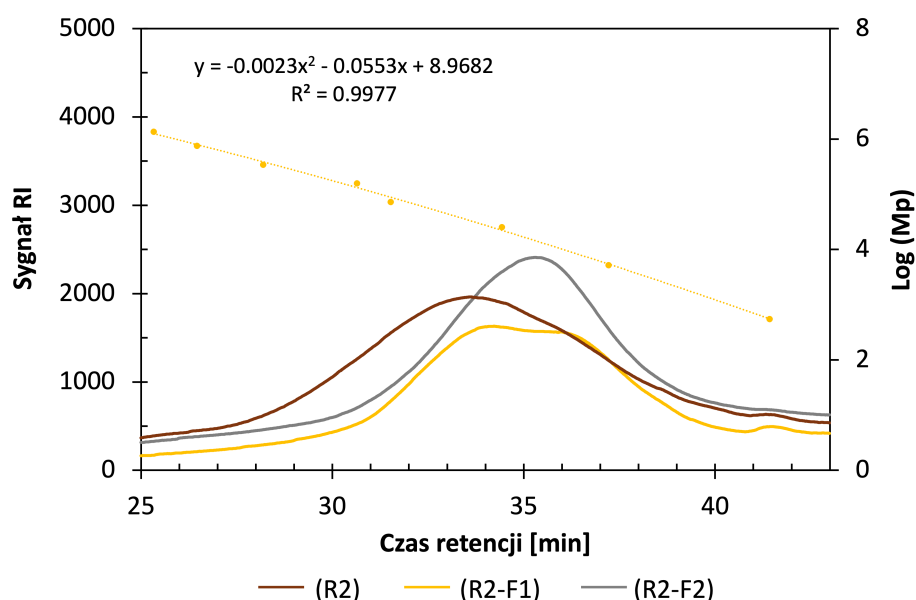
Ryc. 29. Pozorna względna masa cząsteczkowa (M_{app}) dla produktu z wycieków owoców truskawki (T3) oraz jego frakcji (T3-F1) i (T3-F2).

Tabela 29. Charakterystyka masy cząsteczkowej (M_p , M_n , M_w ; g/mol) oraz wskaźnika PDI (M_w/M_n) dla produktu (T3) oraz jego frakcji (T3-F1) i (T3-F2).

Produkt	M_p	M_n	M_w	M_w/M_n (PDI)
(T3)	8298	7572	49199	6,49
	1524	593	829	1,39
(T3-F1)	26049	41199	47525	1,15
	5388	4837	8182	1,69
(T3-F2)	39730	67034	83328	1,24
	11153	7485	12760	1,70

Fracja (T3-F2) charakteryzowała się najwyższym udziałem pektyn średniocząsteczkowych ($M_{app} \approx 39,7 \times 10^3$ g/mol, $M_{app} \approx 11,2 \times 10^3$ g/mol) o relatywnie wysokim stopniu uporządkowania ($PDI \approx 1,2-1,7$), co wskazuje na obecność w tej frakcji cząsteczek o większych masach w porównaniu do (T3) oraz (T3-F1).

Najwyższą różnorodność w rezultatach analiz odnotowano dla produktów otrzymanych z rokitnika. Preparat z wycieków tego owocu (R2) charakteryzował się obecnością trzech populacji pektyn ($M_{app} \approx 2520,4 \times 10^3$ g/mol; $M_{app} \approx 27,4 \times 10^3$ g/mol; $M_{app} \approx 0,5 \times 10^3$ g/mol), przy czym frakcja średniocząsteczkowa cechowała się dużą niejednorodnością ($PDI = 9,29$). Populacja wielkocząsteczkowych pektyn ($M_{app} \approx 2520,4 \times 10^3$ g/mol) była wysoce jednorodna ($PDI = 1,05$), co może sugerować obecność koniugatów polisacharydów z matrycami polifenolowymi.



Ryc. 30. Pozorna względna masa cząsteczkowa (M_{app}) dla produktu z wycieków owoców rokitnika (R2) oraz jego frakcji (R2-F1) i (R2-F2).

Fracje (R2-F1) i (R2-F2), podobnie jak w przypadku wcześniej przedstawionych badanych produktów, charakteryzowały się udziałem średnio- ($M_{app} \approx 21,2 \times 10^3$ g/mol, $M_{app} \approx 11,4 \times 10^3$ g/mol, $M_{app} \approx 12,2 \times 10^3$ g/mol) i małowielkocząsteczkowych pektyn ($M_{app} < 0,7 \times 10^3$ g/mol), przy czym wartości wskaźnika polidispersyjności dla frakcji średniocząsteczkowych były wyższe ($PDI \approx 1,46-3,72$).

Tabela 30. Charakterystyka masy cząsteczkowej (M_p , M_n , M_w ; g/mol) oraz wskaźnika PDI (M_w/M_n) dla produktu (**R2**) oraz jego frakcji (**R2-F1**) i (**R2-F2**).

Produkt	M_p	M_n	M_w	M_w/M_n (PDI)
(R2)	2520389	2598196	2730198	1,05
	27435	10614	98641	9,29
	529	415	459	1,10
(R2-F1)	21261	28433	65639	2,31
	11434	4100	5985	1,46
	519	409	452	1,11
(R2-F2)	12191	8003	29809	3,72
	679	454	484	1,07

Podsumowując, największy rozrzut masy cząsteczkowej spośród badanych produktów stwierdzono dla produktu z wyciągów owocu rokitnika (**R2**). Rozdzielenie go na frakcje (**R2-F1**) i (**R2-F2**) spowodowało uporządkowanie układu oraz istotne zmniejszenie masy cząsteczkowej w obu frakcjach. Frakcjonowanie produktów (**M2**) i (**T3**) na drodze IEC umożliwiło wydzielenie populacji łańcuchów pektynowych o średnich masach M_{app} , które charakteryzowały się wysoką jednorodnością, co odróżniało je od pozostałych analizowanych typów surowców odpadowych. Proces IEC prowadził do eliminacji części małych cząsteczek polisacharydów. Frakcje (**M2-F1**) oraz (**T3-F1**) wykazywały najwyższy stopień jednorodności pod względem molekularnym. Ponadto największe wartości wskaźnika polidispersyjności zaobserwowano dla populacji występujących w produktach optymalnych ($PDI > 2,9$). Analiza HPLC-SEC zdaje się potwierdzać, że separacja produktów optymalnych na ich frakcje na drodze chromatografii jonowymiennej zachodzi nie tylko ze względu na charakter chemiczny tychże produktów, głównie z powodu obecności licznych grup karboksylowych, ale również ze względu na wielkość cząsteczek.

W źródłach literaturowych można odnaleźć bardzo zróżnicowane dane na temat wartości masy cząsteczkowej polisacharydów obecnych w owocu czarnej porzeczki. Autorzy, w zależności od zastosowanego sposobu wyodrębniania, podają różne wartości M_w : $\sim 14,9 \times 10^3$ g/mol, $\sim 14,05 \times 10^3$ g/mol, $\sim 32,6 \times 10^3$ g/mol; $\sim 45,5 \times 10^3$ g/mol ($PDI = 2,9$), a także $\sim 115,8 \times 10^3$ g/mol ($PDI = 4,8$) [Xu i in., 2016a; Xu i in., 2016b; Xu i in., 2018; Alba i in., 2018; Pancerz i in., 2022].

Według Wu i in. (2022), pektyny wyodrębnione z owoców maliny podczas kwasowej ekstrakcji na gorąco charakteryzowały się masą cząsteczkową w zakresie od 65 do

262×10^3 g/mol, podczas gdy ekstrakcja wspomagana enzymatycznie (EAE) dodatkowo sprzyjała ekstrakcji frakcji wielkocząsteczkowych ($122\text{--}11790 \times 10^3$ g/mol). Kwasowa ekstrakcja na gorąco przeprowadzona przez Muñoz-Almagro i in. (2021) skutkowała uzyskaniem niejednorodnego produktu o rozkładzie masy w zakresie $4\text{--}8 \times 10^3$ g/mol oraz $27\text{--}609 \times 10^3$ g/mol. Xu i in. (2019) w ramach HWE otrzymali polisacharydy o masie cząsteczkowej 411×10^3 g/mol. Pektyny malin uzyskane poprzez EAE, następnie oczyszczone na kolumnie Sephadex G-100, wykazywały masę cząsteczkową $\sim 4 \times 10^3$ g/mol [Yu i in., 2015].

W przypadku masy cząsteczkowej polisacharydów owocu truskawki również zaobserwowano duże zróżnicowanie. Polisacharydy natywne o początkowej wartości $M_w \approx 9479 \times 10^3$ g/mol poddano degradacji ultradźwiękami i otrzymano makrocząsteczkowe łańcuchy o $M_w \approx 791 \times 10^3$ g/mol i $M_w \approx 809 \times 10^3$ g/mol [Wang i in., 2025a]. Ekstrakcja HWE umożliwiła otrzymanie polisacharydów o $M_w \approx 249 \times 10^3$ g/mol ($PDI \approx 14$), natomiast HWE wspomagana mikrofalami prowadziła do otrzymania frakcji $M_w \approx 65 \times 10^3$ g/mol ($PDI \approx 3,5$) [Hotchkiss i in., 2024].

W przypadku kolejnego surowca, a mianowicie owoców rokitnika, Wang i in. (2025) w procesie HWE uzyskali małącząsteczkowe polisacharydy o $M_p \approx 45,5 \times 10^3$ g/mol oraz $M_p \approx 11,3 \times 10^3$ g/mol. Z kolei Wei i in. (2019), stosując MAE, otrzymali polisacharydy rokitnika o właściwościach antyoksydacyjnych, charakteryzujące się polidispersyjnym rozkładem masy cząsteczkowej ($M_w \approx 968 \times 10^3$ g/mol, $M_w \approx 177 \times 10^3$ g/mol, $M_w \approx 33 \times 10^3$ g/mol). Ni i in. (2013) wykryli obecność dwóch frakcji pektynowych o $M_w \approx 194 \times 10^3$ g/mol oraz $M_w < 10 \times 10^3$ g/mol. Co więcej, przegląd literaturowy przeprowadzony przez Teng i in. (2024) oraz Shi i in. (2025) potwierdza fakt, że bardzo duże zróżnicowanie masy cząsteczkowej wyodrębnionych polisacharydów z danego surowca wynika z zastosowanego rodzaju ekstrakcji i doboru parametrów procesowych ($1\text{--}6460 \times 10^3$ g/mol).

Zatem masa cząsteczkowa, kompozycja monosacharydowa, struktura polisacharydu oraz jego właściwości funkcjonalne zależą od wielu czynników, począwszy od rodzaju surowca oraz warunków jego uprawy czy dojrzewania, poprzez sposób przechowywania, parametry procesu wstępnego przetwarzania, a skończywszy na zastosowanej metodzie ekstrakcji, w szczególności na doborze odpowiednich parametrów procesowych i metodzie oczyszczania [Rosli i in., 2004; Hotchkiss i in., 2024; Konrade i in., 2023; Li i in., 2024].

3.4.1.4. Analiza FTIR-ATR wybranych produktów i ich frakcji

Do identyfikacji grup funkcyjnych obecnych w wytypowanych do analizy produktach i ich frakcjach wykorzystano technikę spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera FT-IR z wykorzystaniem urządzenia zaopatrzonego w przystawkę ATR (ang. *Attenuated Total Reflection*). Metoda FTIR-ATR jest powszechnie stosowana zarówno do analizy związków organicznych, jak i nieorganicznych, do identyfikacji charakterystycznych wiązań chemicznych, a przystawka ATR zapewnia możliwość analizy materiału bez konieczności przygotowywania w formie tabletki z KBr lub jako roztwór.

Dobrze rozdrobnione próbki poddano analizie ATR-FTIR. Widma spektroskopowe produktów z wycisków owocu czarnej porzeczki (**4**) oraz (**11**) porównano z widmem produktu optymalnego (**38**) oraz jego frakcji (**38-F1**), (**38-F2**) i (**38-F3**) (Ryc. 31). Zestawienie liczb falowych wraz z ich interpretacją przedstawiono w Dodatku (Tabele D4-D7).

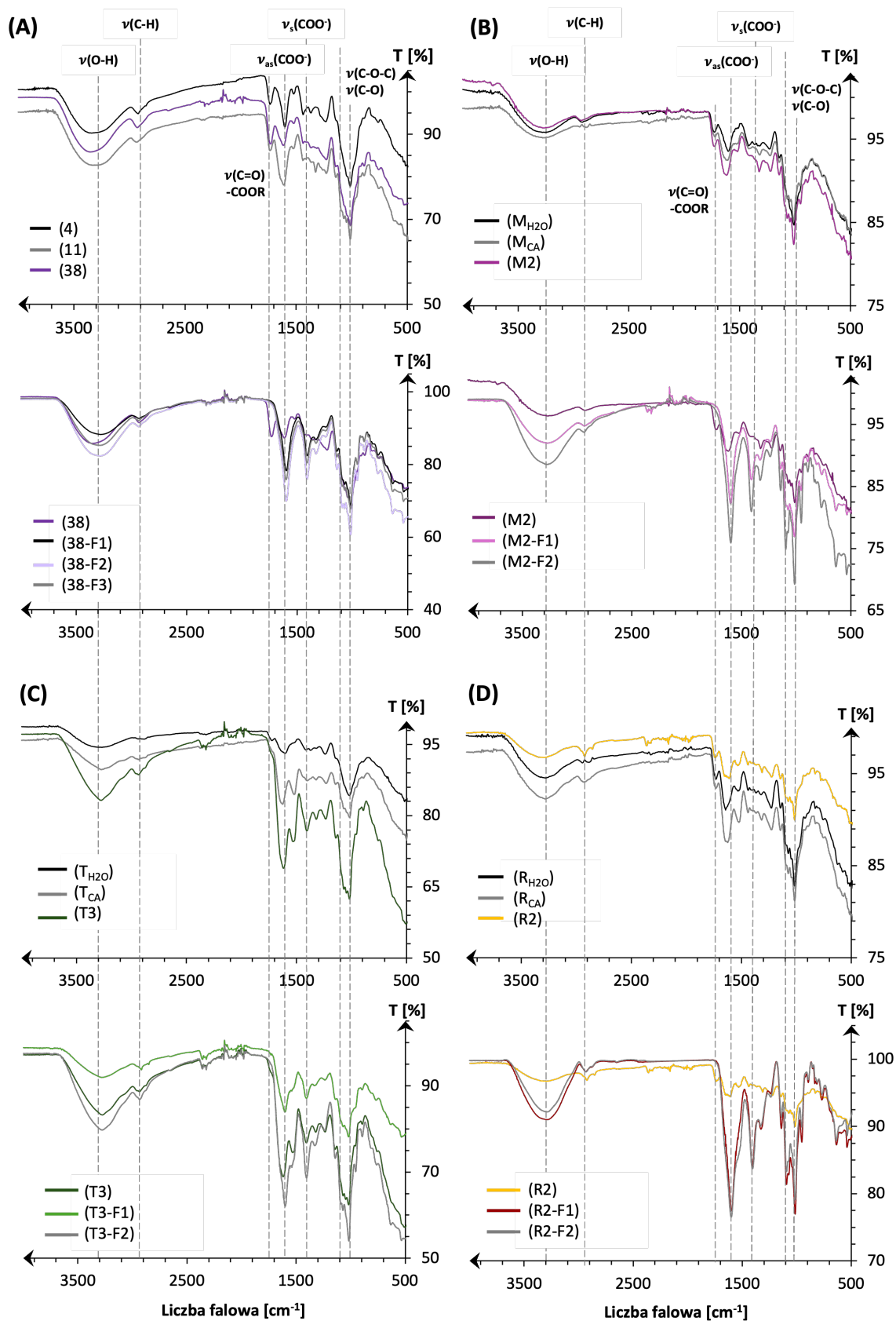
Produkty (**4**), (**11**) i (**38**) wykazały szereg podobieństw, które jednoznacznie potwierdziły polisacharydowy charakter badanych produktów. Szerokie pasmo w zakresie $3500\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ odpowiadało drganiom rozciągającym grup hydroksylowych, pochodzących najprawdopodobniej od sacharydów oraz polifenoli [Simão i in., 2024]. Sygnały przy 2930 oraz 2860 cm^{-1} odzwierciedlały asymetryczne oraz symetryczne drgania rozciągające C–H pochodzące od atomów węgla tworzących z innymi wiązaniami alifatyczne. Wyraźne pasmo w okolicy 1730 cm^{-1} wskazywało na występowanie drań rozciągających C=O grupy karbonylowej, co w przypadku pektyn zazwyczaj odnosi się do obecności form estrowych grup karboksylowych (–COOR). W połączeniu z pasmem o przesunięciu $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, przypisywanym między innymi asymetrycznym drganiom rozciągającym, pochodzącym od reszt –COOH kwasów uronowych [Kyomugasho i in., 2015; Hernandez-Hernandez i in., 2024]. Obszar „fingerprint” znajdujący się w przedziale około $1300\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ potwierdził obecność szeregu możliwych interakcji w obrębie wiązań glikozydowych ($\sim 1141\text{ cm}^{-1}$) oraz pasma pochodzące od pierścieni piranozowych ($\sim 1015\text{ cm}^{-1}$). Sygnały o przesunięciach ~ 860 oraz $\sim 890\text{ cm}^{-1}$ wskazują na obecność wiązań glikozydowych typu α oraz β [Demir i in., 2024; Liu i in., 2021].

Zestawienie widma FTIR produktu optymalnego (**38**) z jego frakcjami wykazało brak pasma przy $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$ na widmach frakcji pektynowych, co może świadczyć

o deestryfikacji reszt karboksylowych UA w procesie separacji IEC. Nie można też wykluczyć, że efekt zaistniał w toku przygotowania roztworu do analizy IEC, w 0,05 M roztworze NaOH. Środowisko alkaliczne sprzyja deestryfikacji pektyn [Cui i in., 2023; Guo i in., 2025]. Stopień estryfikacji (DE) dla produktu **(38)** wyniósł ~53%, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi na temat pektyn czarnej porzeczki uzyskanych na drodze HWE w warunkach niskiego pH [Konrade i in., 2023]. Natomiast w przypadku frakcji **(38-F1)**, **(38-F2)** i **(38-F3)** na widmach zaobserwowano obecność sygnału przy ~1410 cm⁻¹ o dużej intensywności, co świadczy o obecności drgań symetrycznych rozciągających charakterystycznych dla anionu karboksylowego, co może potwierdzać reszty karboksylowe UA w postaci niezestryfikowanej. Sygnał ten wraz z pasmem o przesunięciu przy ~1014 cm⁻¹ opisywane są jako charakterystyczne dla regionów RG oraz HG w pektynach [Liu i in., 2021].

Widma FTIR zarejestrowane dla produktów **(M2)**, **(T3)** i **(R2)** prezentowały pasma charakterystyczne dla polisacharydów o charakterze kwasowym, co potwierdzały pasma o przesunięciach przy ~1730 cm⁻¹ (C=O, estry metylowe), ~1610-1600 cm⁻¹ (COO⁻), ~1440/1410 cm⁻¹ (symetryczne COO⁻), ~1320-1230 cm⁻¹ (wiązania C–O), 1140-1000 cm⁻¹, ~890 oraz ~860 cm⁻¹ (wiązania glikozydowe anomerycznych atomów węgla typu β i α) [Grassino i in., 2018; de Menezes i in., 2025]. Porównanie widm pochodzących od danego produktu i jego frakcji potwierdziło ich wysokie podobieństwo. Ewentualne różnice pomiędzy próbkami miały prawdopodobnie charakter ilościowy i dotyczyły głównie intensywności poszczególnych pasm. Produkty optymalne **(M2)**, **(T3)** i **(R2)** wykazywały szacunkowy stopień estryfikacji w zakresie ~18,5 - 27,5%, natomiast frakcje charakteryzowały się niemal całkowitą deestryfikacją (do ~3% dla frakcji produktów z wyłoków owocu maliny oraz owocu rokitnika) bądź niskim stopniem estryfikacji (do ~7,5% dla frakcji produktu z wyłoków owocu truskawki) (Tabele D4-D7). W odniesieniu do surowca modelowego można zauważyć zróżnicowanie w wartościach DE w zależności od zastosowanej procedury ekstrakcji, co pozostaje zgodne z doniesieniami literaturowymi [Hernandez-Hernandez i in., 2024].

Hipoteza zakładająca deestryfikację polisacharydów w trakcie frakcjonowania na drodze IEC znalazła swoje potwierdzenie również w przypadku produktów **(M2)**, **(T3)** i **(R2)**. Wśród produktów optymalnych z czterech różnych surowców odpadowych oraz ich frakcji pektynowych większość można zaklasyfikować do grupy pektyn niskometoksyłowych (LM < 50%), wyjątek stanowi produkt **(38)** (HM > 50%) [Cui i in.,



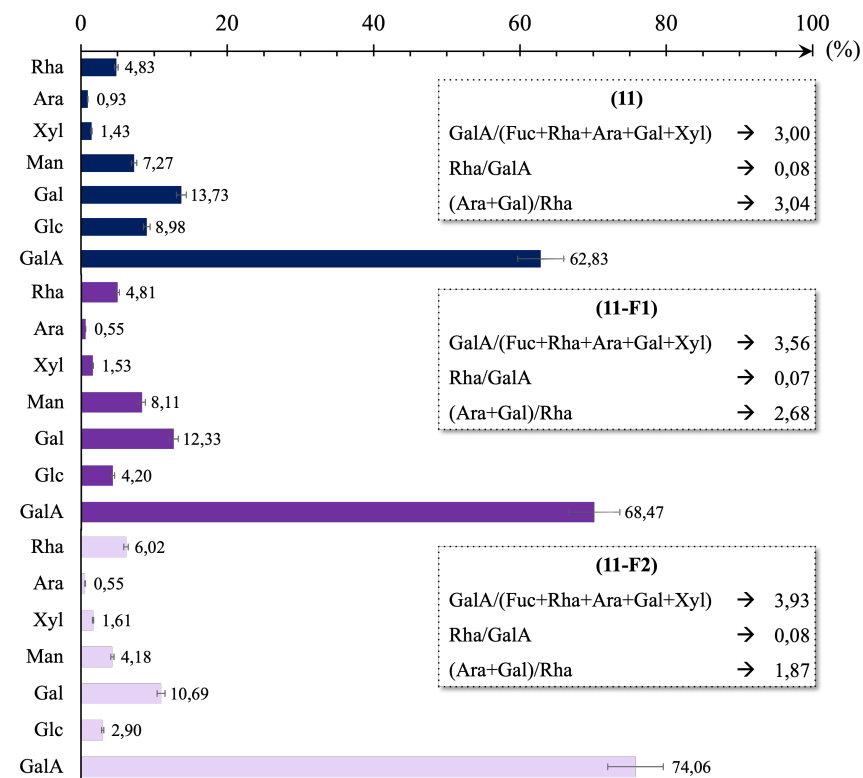
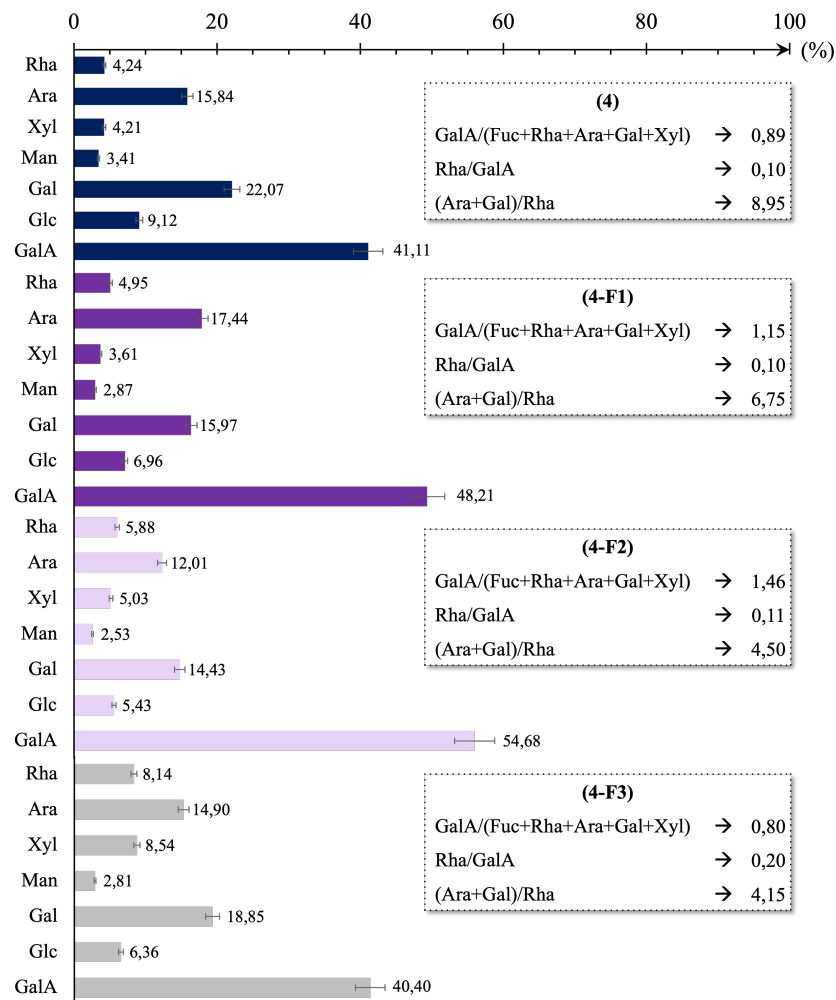
Ryc. 31. Widma FTIR-ATR produktów wyodrębnionych z wyłoków: (A) - owocu czarnej porzeczki, (B) – owocu maliny, (C) - owocu truskawki, (D) - owocu rokitnika.

2023; Konrade i in., 2023]. Wysoki stopień zestryfikowania pektyny znacząco wpływa na jej rozpuszczalność w wodzie, zdolność tworzenia żelu i właściwości sorpcyjne [Hernandez-Hernandez i in., 2024].

3.4.1.5. Charakterystyka polisacharydów metodą GC-MS

Struktura chemiczna pektyn odgrywa kluczową rolę w determinowaniu ich właściwości biologicznych oraz możliwego potencjału aplikacyjnego. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*, GC-MS) umożliwia analizę jakościową i ilościową monomerów w polisacharydach [Guo i in., 2025]. Metoda ta cechuje się wysoką czułością oraz rozdzielczością. Przygotowanie próbki do analizy obejmuje etap hydrolizy polisacharydu na monosacharydy, etap redukcji reszt aldehydowych i derywatyzacji alditoli do postaci lotnych pochodnych, gdzie najczęściej stosuje się reakcję acetylowania obok reakcji tworzenia trifluoropochodnych lub form trimetylosililowych [Zheng i in., 2023]. W niniejszej pracy analizowano przygotowywane wcześniej acetylowe pochodne alditoli zgodnie z procedurą Pettolino i in. (2012).

W pierwszej kolejności badaniom poddano produkty (4) i (11), uzyskane odpowiednio na drodze HWE oraz w 10% roztworze CA, które przeanalizowano pod kątem jakościowym oraz ilościowym obecnych w nich monosacharydów obojętnych, jak również udziału UA w części polisacharydowej tych produktów. Aby oznaczyć rodzaj i ilość UA konieczne było poddanie każdego produktu reakcji redukcji grup -COOH do reszt -OH , a następnie hydrolizie, kolejnej redukcji – tym razem reszt aldehydowych do grup -OH i derywatyzacji do acetylowych pochodnych alditoli. Wynik takiego postępowania, porównany z analogicznym widmem GC-MS tego samego produktu, jednak bez reakcji redukcji grup -COOH kwasów uronowych przed hydrolizą wiązań glikozydowych w części polisacharydowej, dał odpowiedź na pytanie o rodzaj UA obecnych w polisacharydzie oraz umożliwił ich ilościową ocenę. Dodatkowo analogicznym czynnościom poddano frakcje produktów (4) i (11), czyli (4-F1), (4-F2), (4-F3), (11-F1) i (11-F2), otrzymanych na drodze IEC. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach (Ryc. 32) oraz zebrano w Tabeli 31.



Ryc. 32. Analiza składu monosacharydów w produktach (4) i (11) otrzymanych z wyłoków owocu czarnej porzeczki oraz w ich frakcjach otrzymanych na drodze IEC. W tabelach przedstawiono wskaźniki strukturalne dla każdej badanej mieszaniny [Houben i in., 2011].

Dla obu analizowanych produktów (**4**) i (**11**) oraz ich frakcji otrzymano profile monosacharydowe, w których dominujący udział stanowił GalA, odpowiednio 41,1% oraz 62,8%. Należy dodać, że nie wykryto obecności GlcA, co potwierdza pektynowy charakter kwasowych polisacharydów. Ekstrakcja w 10% CA sprzyjała wyodrębnieniu frakcji bogatych w GalA, co pośrednio determinowało otrzymywanie polisacharydów o większej ilości domen HG, charakterystycznych dla pektyn owocowych [Riyamol i in., 2023; Dang i in., 2025]. Sposób przeprowadzonej ekstrakcji miał wpływ na ostateczny skład monosacharydów w produkcie końcowym, a separacja przy zastosowaniu IEC skutecznie prowadziła do otrzymania frakcji pektynowych zawierających nawet 10% więcej GalA niż produkty, z których zostały wydzielone (**4-F2**, **11-F2**). Wśród monosacharydów obojętnych, wchodzących w skład tek otrzymanych pektyn zidentyfikowano Rha, Ara, Xyl, Man, Gal oraz Glc, przy czym dla (**4**) największy udział stanowiły Gal i Ara, natomiast dla (**11**) – Gal, Glc, Man i Rha. W obu produktach nie stwierdzono obecności Fuc oraz Rib, co pozostaje zgodne z kompozycją pektyn owocowych, opisywanych w doniesieniach literaturowych, które wskazują na dominujący udział GalA, Rha, Ara oraz Gal [Cui i in., 2021]. Ryboza, której głównym źródłem są kwasy rybonukleinowe, nie należy do monosacharydów typowych dla pektyn. Obecność fukozy może pośrednio wskazywać na wyższy stopień złożoności pektyny, gdyż jest uznawana za monosacharyd charakterystyczny dla regionów typu RG-II, stanowiących mniej niż 10% całkowitej struktury pektyn w owocach [Drusch i in., 2024; Pang i in., 2024]. Obecność Xyl, Man i Glc w produktach (**4**) i (**11**) jest przypuszczalnie związane ze współekstrakcją i/lub częściową degradacją hemiceluloz (ksylanów, mannanów, glukomannanów, ksyloglukanów), których pozostałości obecne są w tych produktach [Konrade i in., 2023; Mathura i in., 2024]. Glc może być również związana z obecnością fragmentów celulozowych wydzielonych z frakcją pektynową [Milshina i Sautkina, 2025].

Produkt (**4**) otrzymany na drodze HWE, gdzie środowiskiem ekstrakcyjnym była woda dejonizowana, cechował się dużą ilością monosacharydów obojętnych, zwłaszcza Ara (~16%). Niskie pH medium ekstrakcyjnego ($\text{pH} < 2$) w przypadku ekstrakcji produktu (**11**) prawdopodobnie prowadziło do częściowej hydrolizy reszt arabinozowych łańcuchów bocznych pektyn, stąd udział tego monosacharydu był mniejszy w porównaniu do (**4**). W literaturze naukowej można znaleźć wzmianki na temat

wrażliwości wiązań glikozydowych Ara na drastyczne warunki wyodrębniania pektyn [De Laet i in., 2025; Obodo-Ovie i in., 2024].

Zastosowanie wskaźników strukturalnych, opartych o stosunki procentowe poszczególnych monosacharydów obecnych w łańcuchach pektynowych [Houben i in., 2011], umożliwiło lepszą charakterystykę polisacharydów. Zastosowano następujące zależności:

$$\text{stopień liniowości} = \frac{GalA}{Fuc+Rha+Ara+Gal+Xyl} \quad [7];$$

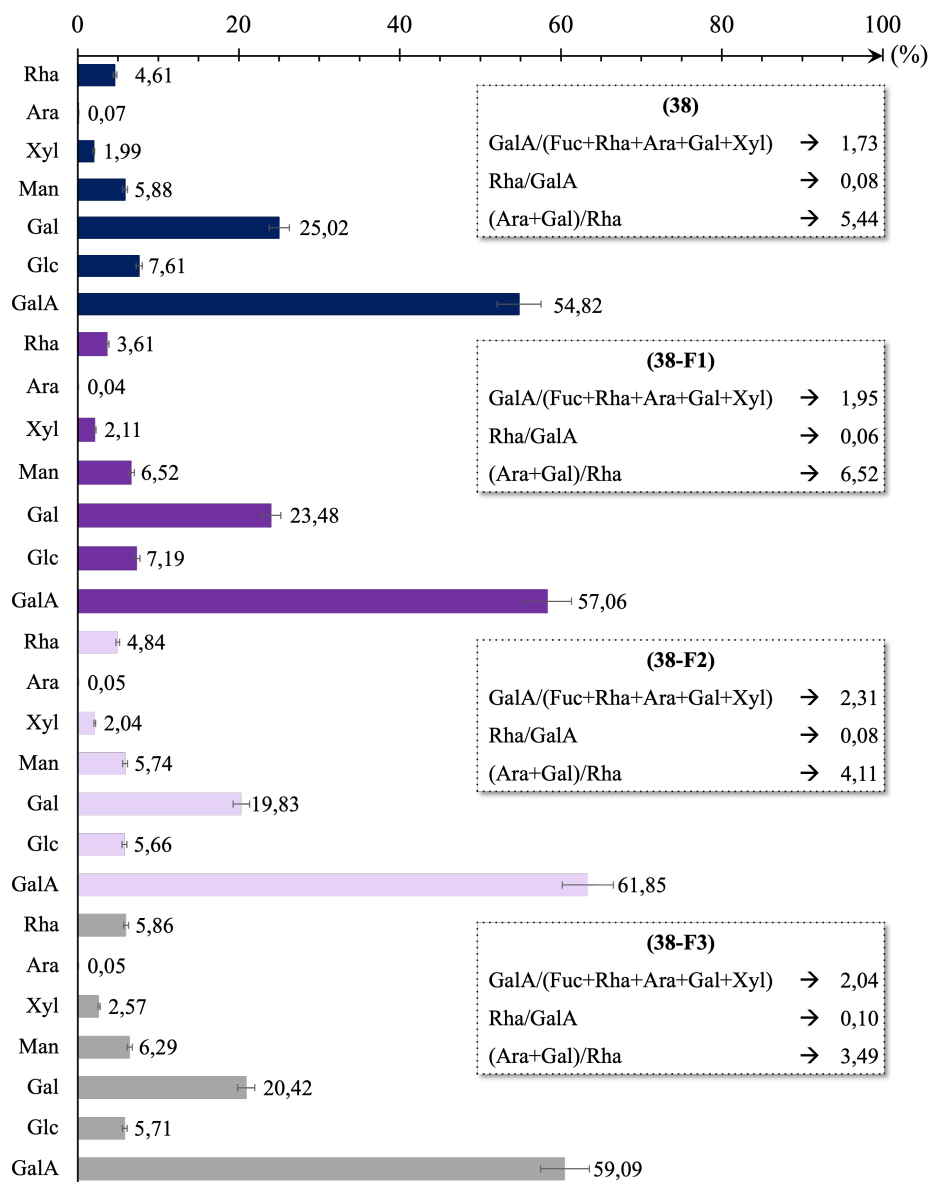
$$\text{udział regionów RG I} = \frac{Rha}{GalA} \quad [8];$$

$$\text{stopień rozgałęzienia} = \frac{Ara+Gal}{Rha} \quad [9].$$

Większy udział cukrów obojętnych w produkcie **(4)** przypuszczalnie wpływał na stopień rozbudowania łańcuchów bocznych w domenie RG (wskaźnik Ara+Gal/Rha ~8,95). Obecność Ara i Gal wskazywała na możliwość występowania w regionie RG-I bocznych łańcuchów arabinanów, galaktanów lub arabinogalaktanów [De Laet i in., 2025; Belkheiri i in., 2021; Wang i in., 2025b]. Rha, będąca wraz z jednostkami GalA częścią łańcucha głównego RG-I, stanowi miejsce przyłączenia łańcuchów bocznych, determinując stopień rozgałęzienia łańcucha głównego pektyny [Hoel i in., 2026]. W przypadku produktu **(11)** kwasowe środowisko ekstrakcyjne sprzyjało uzyskaniu produktu o wyższym udziale regionów HG, przy jednocześnie ograniczonej obecności domen RG-I. Analogiczne zależności zaobserwowano dla produktów otrzymanych w wyniku ekstrakcji wodą: (**M**_{H2O}), (**R**_{H2O}), (**T**_{H2O}) oraz 10% roztworem CA: (**M**_{CA}), (**R**_{CA}), (**T**_{CA}) w przypadku pozostałych surowców odpadowych. Frakcjonowanie produktów **(4)** i **(11)** metodą IEC skutkowało uzyskaniem frakcji o bardziej liniowej organizacji przestrzennej.

Produkt z wytlóków owocu czarnej porzeczki **(38)** oraz jego frakcje **(38-F1)**, **(38-F2)** i **(38-F3)** charakteryzowały się udziałem GalA w przedziale 54,8 - 61,85%. Podobnie jak w przypadku produktu **(11)**, wśród monosacharydów obojętnych w produkcie **(38)** przeważały: Gal, Glc, Man i Rha. Wskaźnik liniowości wykazał na większy udział domen HG we frakcjach niż w produkcie **(38)**. Frakcje **(38-F2)** i **(38-F3)**, w odróżnieniu od **(38-F1)**, charakteryzowały się mniejszym stopniem rozgałęzienia łańcuchów bocznych.

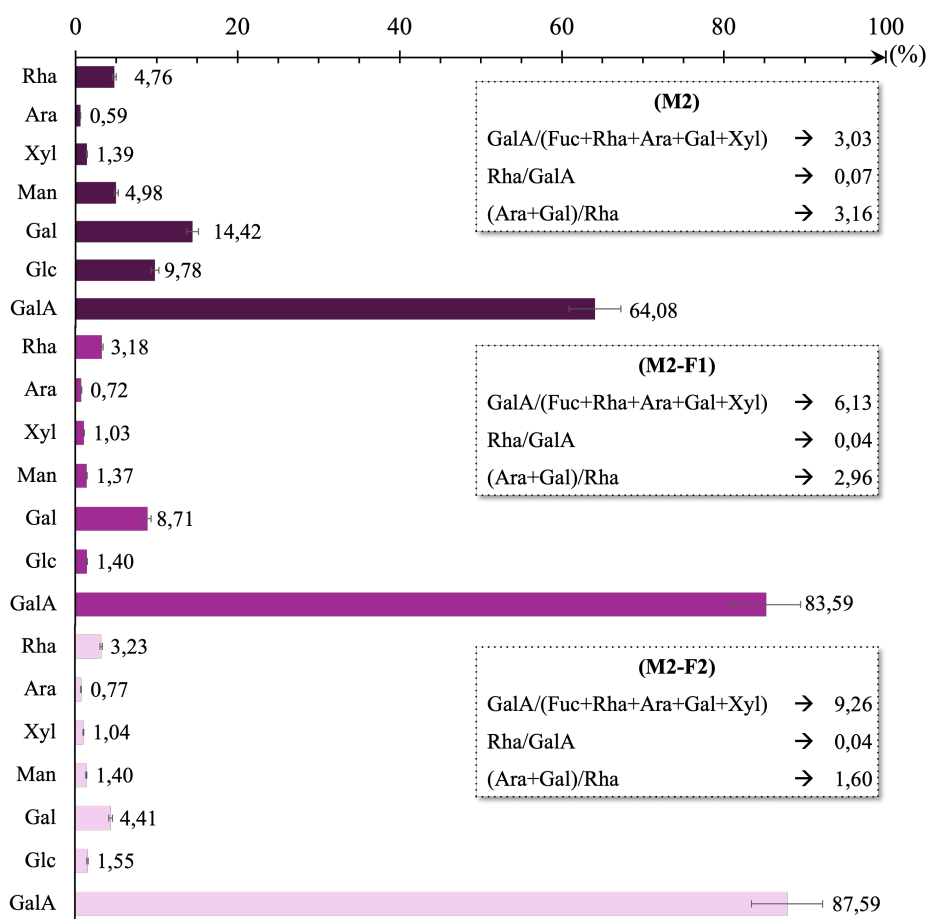
Frakcja **(38-F1)** charakteryzowała się najniższym udziałem RG-I w strukturze pektyny, przy jednocześnie najwyższym stopniu rozgałęzienia obecnych łańcuchów bocznych (Ryc. 33, Tabela 31).



Ryc. 33. Analiza składu monosacharydów w produkcie **(38)** otrzymanym z wyciągów owocu czarnej porzeczki oraz jego frakcji uzyskanych w IEC. W tabelach przedstawiono wskaźniki strukturalne dla każdej badanej mieszaniny [Houben i in., 2011].

Polisacharydy otrzymane z wyciągów owocu maliny z wykorzystaniem NADES **(M2)** oraz frakcje pektynowe tego produktu - **(M2-F1)** i **(M2-F2)** prezentowały wysoki udział GalA (64,1 – 87,6%) (Ryc. 34, Tabela 31). Wskazuje to na dominację domen HG w strukturze wyodrębnionych pektyn, szczególnie w przypadku obu frakcji, co potwierdzają duże wartości wskaźnika liniowości (3,0 – 9,3). Udział Ara oraz Xyl był

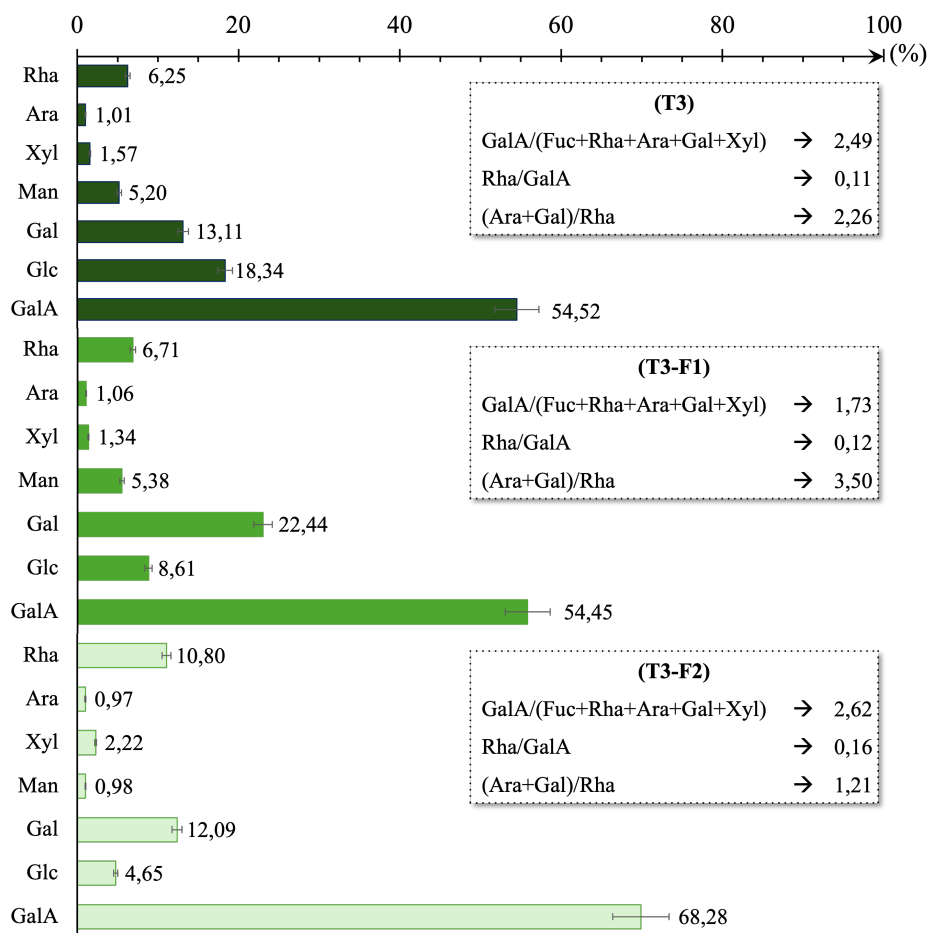
bardzo mały (<1,4%), natomiast ilość Rha nie przekraczała 4,8%. Frakcje charakteryzowały się zbliżonym udziałem RG-I w strukturze, przy czym łańcuchy boczne (**M2-F1**) wykazywały wyższy stopień rozgałęzienia. Doniesienia literaturowe potwierdzają zidentyfikowany dla pektyn z wyciągu owocu maliny skład monosacharydowy z przeważającą większością GalA [Xu i in., 2019; Yu i in., 2015].



Ryc. 34. Analiza składu monosacharydów w produkcie (**M2**) otrzymanym z wyciągów owocu maliny oraz jego frakcji pektynowych wydzielonych w IEC. W tabelach przedstawiono wskaźniki strukturalne dla każdej badanej mieszaniny [Houben i in., 2011].

Produkt (**T3**) wydzielony z wyciągów owocu truskawki oraz jego frakcje (**T3-F1**) i (**T3-F2**) charakteryzowały się również dużą ilością GalA (54,5–68,3%). Wśród monosacharydów obojętnych przeważały głównie Gal, Glc, Rha i Man. Udział Ara i Xyl, podobnie jak w przypadku poprzednich produktów pektynowych, był stosunkowo mały (<2,3%), nie odnotowano jednak podobnych zależności strukturalnych. Produkt natywny (**T3**) oraz frakcja (**T3-F1**) wykazywały zbliżony udział GalA, przy czym preparat wyjściowy wykazywał mniejszy udział regionów RG-I o niższym stopniu rozgałęzienia

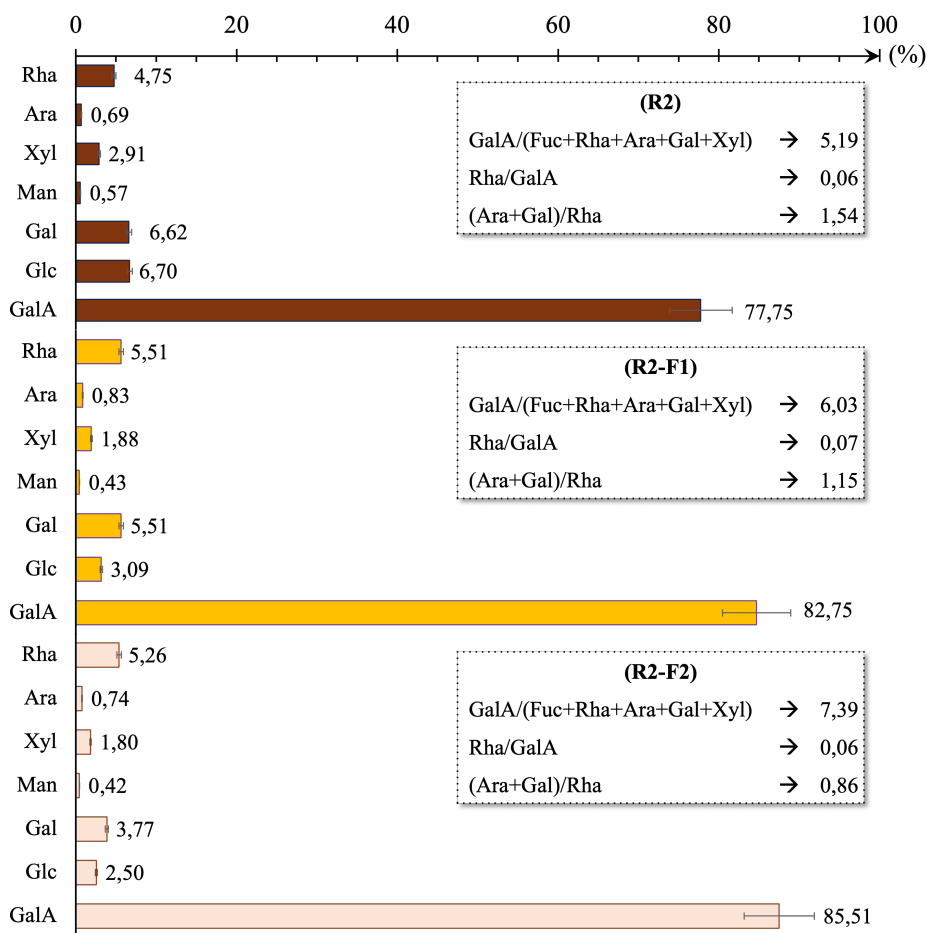
łańcuchów bocznych. Frakcja (**T3-F1**) wyróżniała się na tle innych pektynowych produktów z owocu truskawki wysokim stopniem rozgałęzienia łańcuchów bocznych domen RG-I, choć to frakcja (**T3-F2**) przypuszczalnie miała w swojej strukturze większy udział regionów RG-I, na co wskazywał podwyższony udział Rha (Ryc. 35, Tabela 31). Profil monosacharydowy pektyn truskawki opisywany w literaturze obejmuje: GalA, Man, Rha, Gal, Glc i Ara [Wang i in., 2025a; Saez-Aguayo i in., 2025].



Ryc. 35. Analiza składu monosacharydów w produkcie (**T3**) otrzymanym z wycieków owocu truskawki oraz jego frakcji pektynowych wydzielonych w IEC. W tabelach przedstawiono wskaźniki strukturalne dla każdej badanej mieszaniny [Houben i in., 2011].

Produkt (**R2**) wyodrębniony z wycieków owocu rokitnika oraz jego frakcje pektynowe (**R2-F1**) i (**R2-F2**), analogicznie jak w przypadku pozostałych produktów i ich frakcji, cechowała duża ilość GalA (77,8–85,5%), natomiast w przypadku cukrów obojętnych dominowały: Gal, Glc i Rha. Produkty z rokitnika posiadały tylko nieznaczne ilości Man (<0,5%) i Ara (<1%). Duża ilość GalA determinowała wysokie wartości wskaźnika liniowości, wskazując na znaczny udział domen HG w strukturze

polisacharydowej. Nie wyklucza to jednak obecności regionów RG-I, przy czym największe prawdopodobieństwo wystąpienia licznych rozgałęzień łańcuchów bocznych tej domeny istniało dla produktu **(R2)**. Wyniki sugerują, iż chromatografia jonowymienna skutecznie ograniczała stopień rozgałęzień łańcuchów bocznych, tym samym zwiększając jednorodność frakcji (Ryc. 36, Tabela 31). Dominacja domen HG w strukturze pektyny otrzymanej z rokitnika znajduje potwierdzenie w dostępnych doniesieniach literaturowych [Ni i in., 2013]. Rokitnik stanowi dobre źródło pektyn. Zależnie od zastosowanej metody ekstrakcji cukry obojętne, stanowiące obok GalA pozostałe składniki, obejmują: Gal, Glc, Rha, Xyl, Man i Ara [Teng i in., 2024; Shen i in., 2021; Wei i in., 2019].



Ryc. 36. Analiza składu monosacharydów w produkcie **(R2)** otrzymanym z wycieków owocu rokitnika oraz jego frakcji pektynowych wydzielonych w IEC. W tabelach przedstawiono wskaźniki strukturalne dla każdej badanej mieszaniny [Houben i in., 2011].

Tabela 31. Monosacharydy jako składniki produktów wyekstrahowanych z wyłoków czarnej porzeczki (**38**), maliny (**M2**), truskawki (**T3**), rokitnika (**R2**) i ich frakcji pektynowych. Zestawienie danych liczbowych wraz z wartościami wskaźników strukturalnych.

Monosacharydy (%)	(4)	(4-F1)	(4-F2)	(4-F3)	(11)	(11-F1)	(11-F2)	(38)	(38-F1)	(38-F2)	(38-F3)
Rha	4,24	4,95	5,88	8,14	4,83	4,81	6,02	4,61	3,61	4,84	5,86
Fuc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rib	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ara	15,84	17,44	12,01	14,9	0,93	0,55	0,55	0,07	0,04	0,05	0,05
Xyl	4,21	3,61	5,03	8,54	1,43	1,53	1,61	1,99	2,11	2,04	2,57
Man	3,41	2,87	2,53	2,81	7,27	8,11	4,18	5,88	6,52	5,74	6,29
Gal	22,07	15,97	14,43	18,85	13,73	12,33	10,69	25,02	23,48	19,83	20,42
Glc	9,12	6,96	5,43	6,36	8,98	4,20	2,90	7,61	7,19	5,66	5,71
GalA	41,11	48,21	54,68	40,40	62,83	68,47	74,06	54,82	57,06	61,85	59,09
GalA/(Fuc+Rha+Ara+Gal+Xyl)*	0,89	1,15	1,46	0,80	3,00	3,56	3,93	1,73	1,95	2,31	2,04
Rha/GalA**	0,10	0,10	0,11	0,20	0,08	0,07	0,08	0,08	0,06	0,08	0,10
(Ara+Gal)/Rha***	8,95	6,75	4,50	4,15	3,04	2,68	1,87	5,44	6,52	4,11	3,49

Monosacharydy (%)	(M _{H2O})	(M _{CA})	(M2)	(M2-F1)	(M2-F2)	(T _{H2O})	(T _{CA})	(T3)	(T3-F1)	(T3-F2)	(R _{H2O})	(R _{CA})	(R2)	(R2-F1)	(R2-F2)
Rha	6,56	5,41	4,76	3,18	3,23	10,36	10,10	6,25	6,71	10,80	3,66	6,38	4,75	5,51	5,26
Fuc	-	-	-	-	-	0,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rib	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ara	8,29	-	0,59	0,72	0,77	6,44	1,52	1,01	1,06	0,97	5,24	1,12	0,69	0,83	0,74
Xyl	2,12	1,68	1,39	1,03	1,04	5,36	3,18	1,57	1,34	2,22	4,31	4,02	2,91	1,88	1,80
Man	3,91	6,29	4,98	1,37	1,40	7,14	4,17	5,20	5,38	0,98	1,91	1,13	0,57	0,43	0,42
Gal	38,52	23,94	14,42	8,71	4,41	43,76	40,71	13,11	22,44	12,09	8,24	10,22	6,62	5,51	3,77
Glc	10,89	12,41	9,78	1,40	1,55	16,82	21,52	18,34	8,61	4,65	14,10	11,97	6,70	3,09	2,50
GalA	29,71	50,27	64,08	83,59	87,59	9,56	18,79	54,52	54,45	68,28	62,55	65,15	77,75	82,75	85,51
GalA/(Fuc+Rha+Ara+Gal+Xyl)*	0,54	1,62	3,03	6,13	9,26	0,14	0,34	2,49	1,73	2,62	2,92	3,00	5,19	6,03	7,39
Rha/GalA**	0,22	0,11	0,07	0,04	0,04	1,08	0,54	0,11	0,12	0,16	0,06	0,10	0,06	0,07	0,06
(Ara+Gal)/Rha***	7,14	4,42	3,16	2,96	1,60	4,85	4,18	2,26	3,50	1,21	3,68	1,78	1,54	1,15	0,86

*liniowy charakter pektyny, **udział regionów RG w strukturze pektyny, *** stopień rozgałęzienia regionów RG-I [Houben i in., 2011]

Podsumowując, stwierdzono, że niskie pH układu ekstrakcyjnego skutkowało częściową eliminacją bardziej rozgałęzionych struktur w łańcuchach polisacharydowych wyodrębnionych pektyn, co dotyczy także produktów uzyskanych na drodze ekstrakcji NADES. Frakcjonowanie IEC, oprócz oczyszczenia pektyn z białek i polifenoli, spowodowało zmniejszenie udziału polisacharydów obojętnych. Zaobserwowano także ograniczony udział Xyl w obrębie wszystkich badanych produktów i ich frakcji, przy czym jej udział był najwyższy dla produktów otrzymanych na drodze HWE.

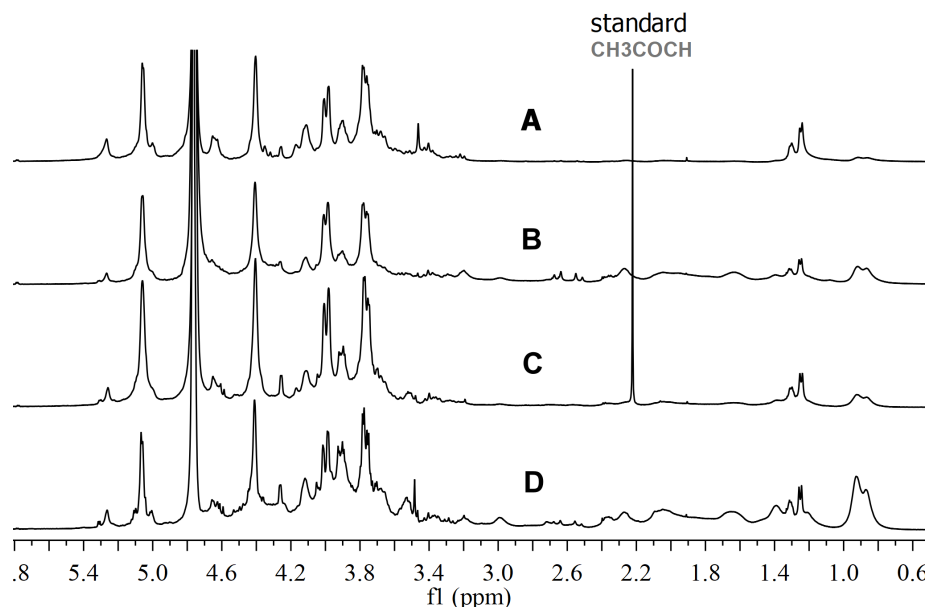
3.4.1.6. Analiza NMR produktów i ich frakcji pektynowych

Dopełnienie analizy strukturalnej uzyskanych produktów pektynowych stanowiły badania techniką magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Widma protonowe dostarczają istotnych informacji na temat struktury badanych związków, jednakże ze względu na wysoki stopień skomplikowania budowy polisacharydów oraz nakładający się sygnał od wody deuterowanej, popularnego rozpuszczalnika do przygotowania próbek, na sygnały protonów od anomerycznych atomów węgla w cząsteczkach cukrowych, są często niewystarczające. Stąd zaistniała potrzeba poszerzenia badań strukturalnych o metody z zakresu dwuwymiarowej heterojądrowej korelacyjnej spektroskopii NMR.

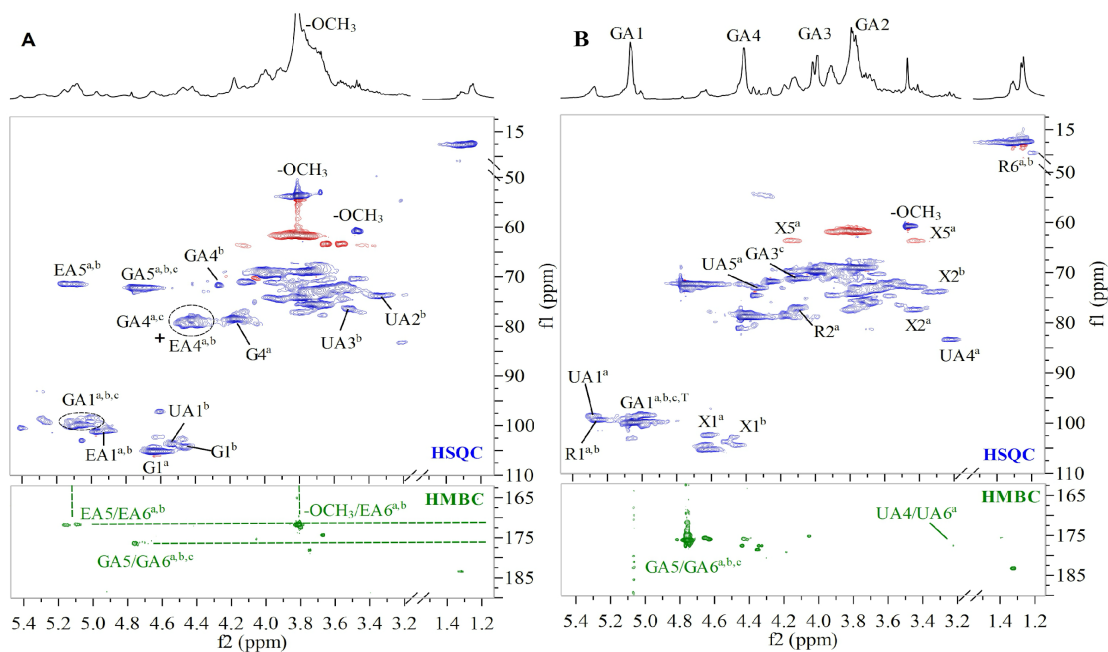
Analizy NMR zostały przeprowadzone w ramach stażu w Instytucie Chemii, Słowackiej Akademii Nauk w Bratysławie, na Słowacji. Widma zostały opracowane przy wsparciu merytorycznym opiekunów naukowych – dr Zuzany Košťálovej oraz dr Petera Capek’a. Analiza widm została przeprowadzona przy użyciu oprogramowania CASPER oraz w oparciu o dane literaturowe [Capek i in., 2025; Li i Rao, 2024; Qiao i in., 2024].

Produkt (**38**) otrzymany w warunkach ekstrakcyjnych w środowisku NADES, uznanych za najbardziej optymalne oraz jego frakcję pektynową (**38-F1**) poddano analizom ^1H NMR, 2D ^1H - ^{13}C HSQC, HSQC-TOCSY oraz HMBC (Ryc. 37 i 38, Tabela 32). Widma analizowanych produktów (**38**) i (**38-F1**) wykazały dominację regionu HG oraz RG-I w strukturach polisacharydowych. Łańcuch główny pektyny zbudowany jest głównie z reszt α -D-GalA (GA^a), przy czym w przypadku produktu (**38**) widma wskazały na zestryfikowaną formę (EA^a , EA^b) części grup karboksylowych GalA. Obecność domeny RG-I zdają się potwierdzać sygnały pochodzące od reszt α -D-GalA (GA^c) połączonych z jednostkami α -D-Rha wiązaniem (1,2)-glikozydowym (R^a). Rozgałęzienia

charakterystyczne dla RG-I możliwe są do zinterpretowania poprzez występowanie na widmach sygnałów pochodzących od reszty (1→2,4)- α -D-Rhap, która najprawdopodobniej stanowiła łącznik dla łańcuchów bocznych zbudowanych z podjednostek β -Gal.



Ryc. 37. Wybrane regiony widm ^1H NMR dla frakcji pektynowych: (A) - czarnej porzeczki (**38-F1**), (B) - rokitnika (**R2-F1**), (C) - maliny (**M2-F1**) oraz (D) - truskawki (**T3-F1**).



Ryc. 38. Wybrane regiony widm ^1H - ^{13}C HSQC (CH, CH_3 – niebieski; CH_2 - czerwony) oraz widm HMBC (zielony) dla: (A) - produktu (**38**), (B) - frakcji pektynowej (**38-F1**).

Oprócz regionów typowych dla pektyn zidentyfikowano sygnały sugerujące obecność 4-*O*-metyloglukuronoksydanu oraz przypuszczalnie frakcji arabinogalaktanu II. Widmo produktu (**38**) prezentowało przesunięcia chemiczne charakterystyczne dla zestryfikowanej formy GalA. Na widmie ^1H NMR również można zauważyć wyraźny sygnał o przesunięciu δ 3,8 ppm, wskazujący na obecność grupy metoksyłowej przy GalA dla produktu (**38**). Widmo frakcji (**38-F1**) nie posiadało tego sygnału, co zdaje się potwierdzać wcześniejsze wnioski wynikające z analizy FT-IR, które wskazywały na deestryfikację frakcji (**38-F1**).

Tabela 32. ^1H - ^{13}C HSQC NMR – zestawienie danych dla widm polisacharydów czarnej porzeczki (**38**) oraz frakcji pektynowej (**38-F1**). Brakujące sygnały nie zostały zidentyfikowane z powodu nakładania się lub bardzo niskiej intensywności.

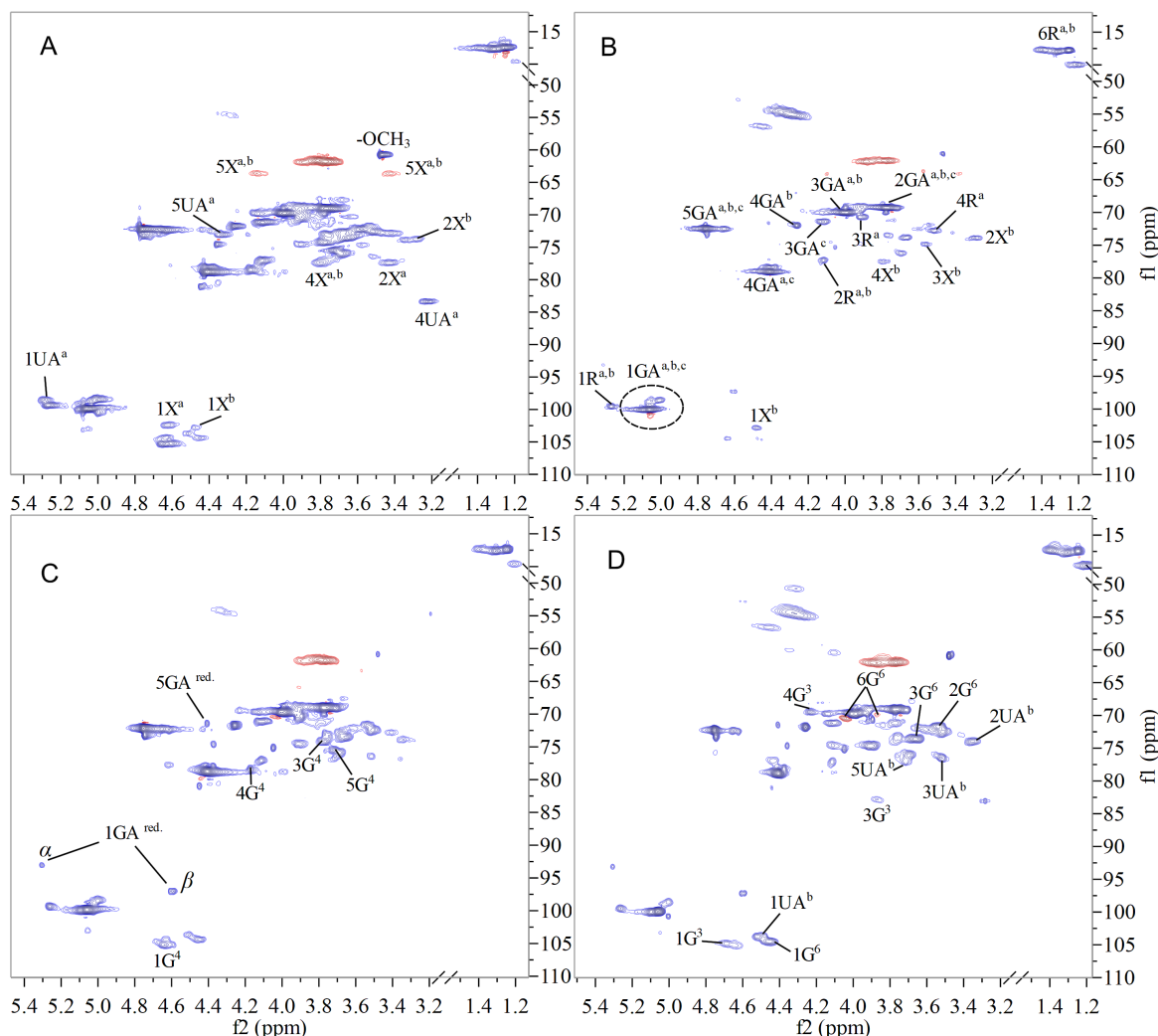
Reszta		Przesunięcia chemiczne (δ , ppm)						^1H - ^{13}C HMBC
		1	2	3	4	5	6	
Reszty cukrowe występujące w produkcie (38) oraz (38-F1)								
GA ^a	→4)- α -D-GalpA-(1→	5,06 99,9	3,77 69,0	3,99 69,8	4,41 78,8	4,76 72,2	176,2	
GA ^b	α -D-GalpA-(1→	5,06 99,9	69,0		4,26 71,7	4,75 73,1		
GA ^c	→4)- α -D-GalpA-(1→2 link to Rhap	5,00 98,5	3,77	4,11 71,1	4,43 78,7	4,64 72,34	176,0	GA ^c H1/R ^a C2
R ^a	→2)- α -D-Rhap-(1→	5,27 99,3	4,11 77,1		3,52 72,8		1,26 17,5	R ^a H1/GA ^c C4
R ^b	→2,4)- α -D-Rhap-(1→				3,67 81,3		1,31 17,7	
G ^a	→4)- β -Galp-(1→	4,64 105,3	3,59	3,77 74,2	4,18 78,5	3,69		G ^a H1/R ^b C4
G ^b	→6)- β -Galp-(1→	4,45 104,4	3,52	3,66		3,91 74,5	4,06 70,3	
UA ^a	α -D-4OMeGlc pA-(1→	5,29 98,5	71,9		3,23 83,4	4,33 73,1	177,6	-OCH ₃ /UA ^b C4
UA ^b	β -Glc pA-(1→	4,51 103,7	3,35 73,9	3,52 76,5			176,6	UA ^a H1/G ^b C6
X ^a	→2,4)- β -Xylp-(1→	4,62 102,4	3,44 77,4		3,80 77,4	3,42-4,14 63,6		X ^a H2/UA ^b C1
X ^b	→2)- β -Xylp-(1→	4,48 102,8	3,29 73,8	3,56 74,9	3,80 77,4	3,38-4,10 64,0		
Reszty cukrowe obecne jedynie w produkcie (38)								
EA ^a	→4)- α -D-6MeGalpA-(1→	4,97 101,3			4,48 79,3	5,16 71,4	171,7	-OCH ₃ /EA ^a C6
EA ^b	→4)- α -D-6MeGalpA-(1→	4,91 101,0				5,09 71,5		-OCH ₃ /EA ^b C6

Porównanie widm ^1H NMR (Ryc. 37) oraz dwuwymiarowych widm ^1H - ^{13}C HSQC NMR dla frakcji (**M2-F1**), (**T3-F1**) i (**R2-F1**) umożliwiło wyciągnięcie ogólnych wniosków na temat ich różnic i podobieństw. Wszystkie widma ^1H NMR sugerowały złożony, polisacharydowy charakter analizowanych próbek, między innymi poprzez wystąpienie charakterystycznego regionu „fingerprint” w przedziale δ 3,0-5,5 ppm, w którego obrębie wyróżnia się grupę sygnałów od protonów anomerycznych atomów węgla podjednostek cukrowych o δ 4,8-5,2 ppm [D’Agostino i in., 2024; Huamani-Palomino i in., 2025]. Obecność Rha potwierdził dublet pików o przesunięciu w zakresie $\sim\delta$ -1,2-1,3 ppm, odpowiadający protonom grupy metylowej $-\text{CH}_3$ form $(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}$ oraz $(1\rightarrow2,4)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}$ (R^a , R^b) [D’Agostino i in., 2024; Kozioł i in., 2022]. Natomiast sygnał przy $\delta \sim 3,9$ ppm przypuszczalnie pochodził od protonów grupy $-\text{CH}_3$ stanowiącej resztę estrową GalA [Kozioł i in., 2022].

Widmo ^1H - ^{13}C HSQC NMR frakcji (**R2-F1**) charakteryzowało się głównie sygnałami o przesunięciach chemicznych odpowiadających regionom wskazującym na obecność struktur typowych dla HG i RG-I, podczas gdy inne reszty cukrowe występowały w minimalnych ilościach. Ponadto zaobserwowano sygnał o przesunięciu pochodzącym od $(1\rightarrow2)\text{-}\beta\text{-Xylp}$ (X^b), który zidentyfikowano jedynie w przypadku frakcji (**R2-F1**). Obecność reszt $(1\rightarrow2,4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}$ (GA^c) połączonych bezpośrednio z resztami Rha (R^a , R^b) sugeruje naprzemienne występowanie regionu HG oraz RG-I [Golovchenko i in., 2022]. Widma HSQC zarejestrowane dla (**M2-F1**), (**T3-F1**) i (**R2-F1**) prezentowały niewielkie ilości GalA występującego w pozycji niekońcowej oraz końcowej łańcucha polisacharydowego (GA^b , GA^{red}) (ang. *reducing galacturonic acid from the non-terminal end*), co sugeruje relatywnie niską masę cząsteczkową analizowanych pektyn. Założenie to zostało potwierdzone techniką HPLC-SEC.

Frakcja pektynowa z czarnej porzeczki (**38-F1**) stanowiła złożoną mieszaninę reszt cukrowych, w przypadku której dodatkowo odnotowano sygnały odpowiadające 4-*O*-metylogalakturnoksydanowi. Pik korelacyjny od grupy metylowej ($\delta \sim 3,47/60,8$ ppm) pochodzącej najprawdopodobniej od $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-6MeGalpA}$ był dobrze widoczny ze względu na wysoką czułość urządzenia NMR. Jednakże obecność galakturonoksydanu została potwierdzona poprzez sygnały odpowiadające Xyl tylko w przypadku frakcji pektynowych (**38-F1**) i (**R2-F1**). Brak pików pochodzących od Ara w analizowanych produktach pektynowych potwierdził wyniki analizy kompozycji monosacharydowych, otrzymane w GC-MS. Analiza chromatograficzna potwierdziła natomiast obecność Ara

w produktach uzyskanych w HWE, czyli w (4), (M_{H2O}), (T_{H2O}), i (R_{H2O}), co sugeruje zjawisko tzw. „wygładzenia” (ang. *smoothing*) głównego łańcucha pektynowego podczas ekstrakcji w NADES, prawdopodobnie z powodu degradacji łańcuchów bocznych bogatych w Ara [Chandel i in., 2020].



Ryc. 39. Wybrane regiony widm ^1H – ^{13}C HSQC NMR (CH, CH_3 – niebieski; CH_2 - czerwony) dla frakcji pektynowej: (A) - czarnej porzeczki (**38-F1**), (B) - rokitnika (**R2-F1**), (C) - maliny (**M2-F1**), (D) - truskawki (**T3-F1**).

Widma ^1H – ^{13}C HSQC zarejestrowane dla frakcji (**M2-F1**) i (**T3-F1**), oprócz przesunięć typowych dla pektyn, posiadały też sygnały korelacyjne wskazujące na obecność łańcucha złożonego (1→3)- β -Galp (G^c) oraz z (1→6)- β -Galp (G^b), zakończonego w pozycji C6 resztą GlcA (UA^b), co sugerowało występowanie niewielkiej frakcji kwasowego galaktanu. Kwasowy galaktan, zbudowany z jednostek 1,3- oraz 1,6-Gal, połączonych z β -GlcA, jest szczególnie zauważalny w przypadku frakcji (**T3-F1**).

Frakcja ta być może stanowiła element arabinogalaktanu II lub kompleksu arabinogalaktan-białko, których cechą charakterystyczną jest obecny na końcu łańcucha polisacharydowego [Ghosh i in., 2023]. Ponadto, w przypadku frakcji (**M2-F1**) piki korelacyjne odpowiadające resztom (1→4)- α -D-GalpA (G^a) połączonym z (1→2,4)- α -D-Rhap (R^b) przypuszczalnie potwierdzają substytucję łańcuchów bocznych galaktanu poprzez wiązania typu (1→4) w obrębie domeny RG-I.

Tabela 33. ^1H - ^{13}C HSQC NMR – zestawienie przesunięć chemicznych reprezentujących wybrane reszty cukrowe obecne w dominujących frakcjach pektynowych (**M2-F1**), (**T3-F1**) oraz (**R2-F1**) [Dou i in., 2025; Wu i in., 2022].

Reszty	Przesunięcia chemiczne (δ , ppm)					
	1	2	3	4	5	6
<i>Reszty cukrowe występujące we frakcjach (M2-F1), (T3-F1) oraz (R2-F1).</i>						
G^a →4)- α -D-GalpA-(1→	5,06	3,77	3,99	4,41	4,76	
	99,9	69,0	69,8	78,8	72,2	176,2
G^b α -D-GalpA-(1→	5,06			4,26	4,75	
	99,9	69,0		71,7	73,1	
G^c →4)- α -D-GalpA-(1→2 link to Rhap →4)- α -D-GalpA	5,00	3,77	4,11	4,43	4,64	
	98,5		71,1	78,7	72,3	176,0
	5,31					
$G^{a\text{red}}$ →4)- β -D-GalpA	93,14				4,40	
	4,60				71,3	
	97,08					
R^a →2)- α -D-Rhap-(1→	5,27	4,11	3,91	3,52		1,26
	99,3	77,1	70,6	72,8	70,3	17,5
R^b →2,4)- α -D-Rhap-(1→		4,11				1,31
		77,1				17,7
<i>Reszty cukrowe występujące jedynie we frakcjach (M2-F1) oraz (T3-F1).</i>						
G^b →6)- β -Galp-(1→	4,45				3,91	4,06
	104,4	3,52	3,66		74,5	70,3
G^c →3)- β -Galp-(1→	4,69		3,86	4,22		
	104,8		82,8	69,5		
U^b β -GlcpA-(1→	4,51	3,35	3,52			
	103,7	73,9	76,5			176,6
<i>Reszty cukrowe występujące jedynie we frakcji (M2-F1).</i>						
G^a →4)- β -Galp-(1→	4,64	3,59	3,77	4,18	3,69	
	105,3		74,2	78,5	75,4	
<i>Reszty cukrowe występujące jedynie we frakcji (R2-F1).</i>						
X^b →2)- β -Xylp-(1→	4,48	3,29	3,56	3,80	3,38-4,10	
	102,8	73,8	74,9	77,4	64,0	

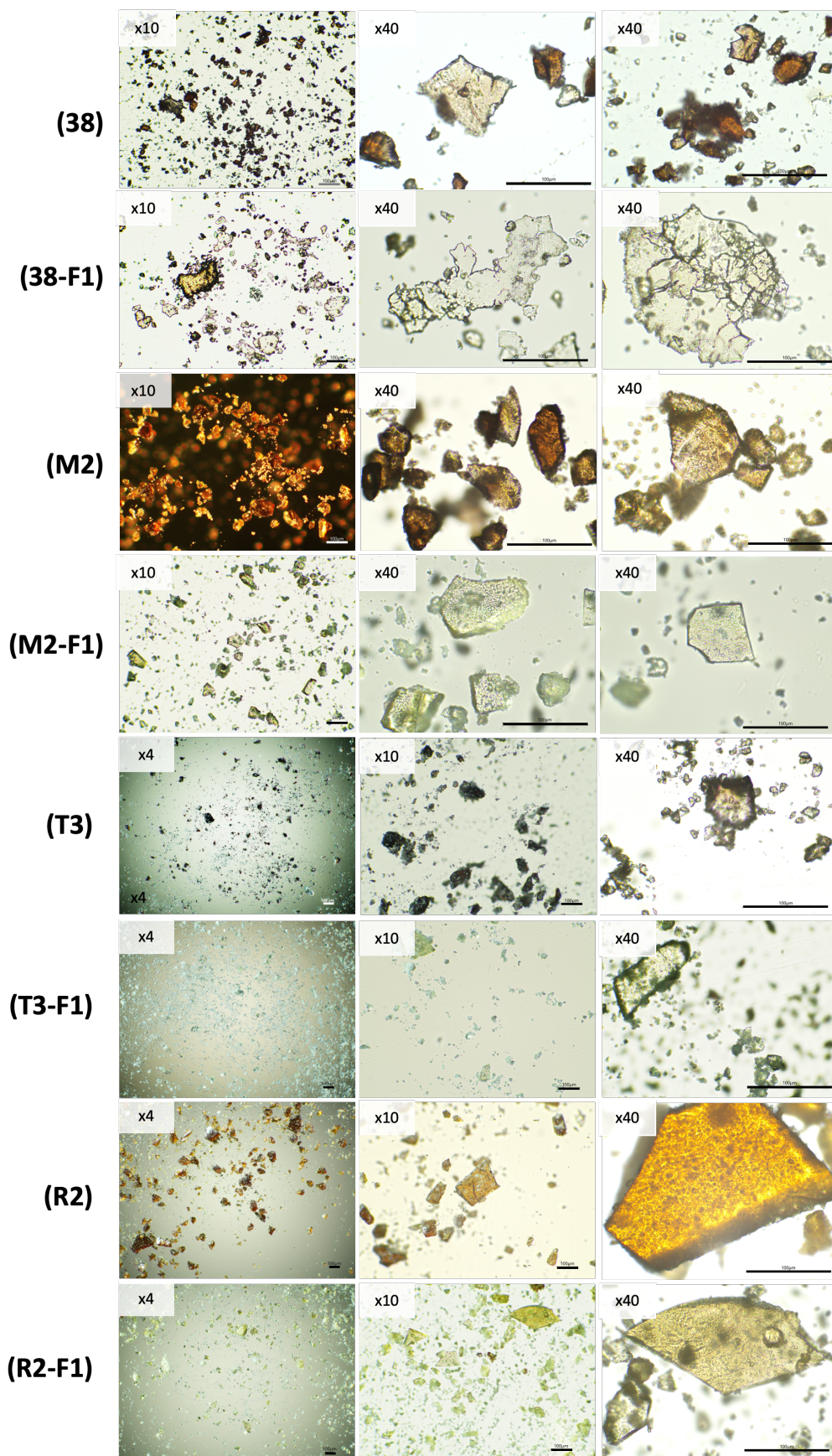
3.4.2. Analiza produktów roślinnych metodami mikroskopowymi

3.4.2.1. *Mikroskopia optyczna*

Mikroskopia optyczna umożliwia ocenę morfologii, stopnia agregacji, kształtu cząstek oraz jednorodności suchych produktów roślinnych. Struktura powierzchni, porowatość oraz stopień fragmentacji zależą od rodzaju surowca, metody ekstrakcji, stopnia i sposobu oczyszczania, a także wykorzystanej metody suszenia [Li i in., 2022; Riyamol i in., 2023]. Wobec tego, mikroskopia stanowi istotne narzędzie uzupełniające informacje strukturalne, uzyskane przy wykorzystaniu innych technik analitycznych.

Produkty **(38)**, **(M2)**, **(T3)** i **(R2)** wykazały znaczną niejednorodność. Amorficzne agregaty cechowały się niską przeziernością optyczną, przez co ich obserwacja z wykorzystaniem światła przechodzącego była utrudniona. Produkty **(38)**, **(M2)**, **(T3)** oraz **(R2)** wymagały zastosowania zewnętrznego źródła światła, które umożliwiło doświetlenie od góry. Ich cząstki były wyraźnie ciemniejsze, o barwie brunatnej lub pomarańczowo-brązowej. Bardziej zwarte, prezentujące raczej ziarnistą strukturę, często o nieregularnej formie i wyraźnych, ostrych krawędziach. Ich intensywne zabarwienie wynikało z obecności naturalnych barwników z grupy polifenoli, co zostało potwierdzone analizami spektrofotometrycznymi.

Fracje **(38-F1)**, **(M2-F1)**, **(T3-F1)** i **(R2-F1)** przyjęły postać nieregularnych, cienkich płatków. Ich obserwacji sprzyjała półprzezroczysta struktura. Wyniki analizy kolorymetrycznej wskazały niższy udział polifenoli w badanych frakcjach pektynowych (< 2,65% wag.), niż w produktach **(38)**, **(M2)**, **(T3)** i **(R2)**, co znajduje potwierdzenie w obrazach mikroskopowych, a mianowicie analizowane frakcje charakteryzowały się jasną, kremowo-żółtą barwą. Badane frakcje prezentowały także znaczną zmienność pod względem kształtu krawędzi – od ostrokrawędzistych w przypadku **(M2-F1)**, przez poszarpane u **(R2-F1)**, po gładkie, lecz wciąż wyraźnie nieregularne dla **(38-F1)**. Obserwacja wykazała również obecność frakcji drobnoziarnistej w produktach. Analiza mikroskopowa wykazała różnice w morfologii pomiędzy produktem optymalnym a jego frakcją uzyskaną w toku IEC. Frakcje **(38-F1)**, **(M2-F1)**, **(T3-F1)** i **(R2-F1)** charakteryzowały się większą elastycznością niż produkty, z których zostały wyodrębnione. Zwiększona sztywność **(38)**, **(M2)**, **(T3)** i **(R2)** może wynikać z ilości polifenoli, które poprzez oddziaływania niekowalencyjne z pektynami mogą wpływać na tworzenie dodatkowych miejsc sieciowania.



Ryc. 40. Morfologia produktów optymalnych **(38)**, **(M2)**, **(T3)** i **(R2)** oraz ich dominujących frakcji pektynowych **(38-F1)**, **(M2-F1)**, **(T3-F1)** i **(R2-F1)**, na podstawie obrazów mikroskopowych w powiększeniu 4–40×.

Zjawisko to zależy od struktury chemicznej komponentów [Hu i in., 2025].

Obserwowane na obrazach mikroskopowych badanych frakcji bezbarwne struktury o wysokim stopniu uporządkowania oraz o morfologii zbliżonej do krystalicznej można przypisać obecności chlorku sodu, stanowiącego pozostałość po procesie frakcjonowania w IEC, pomimo dializy mającej za zadanie usunięcie NaCl z frakcji. Natomiast w przypadku produktów optymalnych może to świadczyć o obecności pozostałości kwasu cytrynowego, stanowiącego komponent NADES. CA może oddziaływać z pektyną poprzez wiązania wodorowe. Biorąc pod uwagę charakter tych oddziaływań, spodziewanym efektem dializy jest całkowita eliminacja kwasu organicznego z produktu. Jednakże obecność CA w produkcie po dializie w wodzie sugeruje występowanie trwalszych oddziaływań chemicznych. Barbosa i in. (2025) wskazali, iż CA jest skutecznym środkiem sieciującym polisacharydy, w tym pektyny, poprzez wiązania estrowe w roztworach o kwasowym pH.

3.4.2.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa sprzężona ze spektroskopią rentgenowską z dyspersją energii (SEM-EDS)

Skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) umożliwia analizę topografii i mikrostruktury powierzchni cząstek [Ali i in., 2023a]. Zastosowanie detektora do badania z wykorzystaniem spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (ang. *Energy Dispersive Spectroscopy*, EDS) umożliwia przeprowadzenie analizy składu pierwiastkowego badanych materiałów. Połączenie tych technik stanowi wartościowe narzędzie analityczne, pozwalające na jednoczesną ocenę wizualną morfologii próbek oraz analizę ich składu chemicznego. Badanie produktów oraz ich frakcji techniką SEM-EDS zostało przeprowadzone przez dr inż. Martę Tsirigotis-Maniecką.

Obserwacja produktu z wyłoków owocu czarnej porzeczki (**38**) oraz jego frakcji (**38-F1**), (**38-F2**) i (**38-F3**) potwierdziła różnice w ich morfologii. Produkt (**38**) charakteryzował się zwartą, zbitą, relatywnie gładką powierzchnią, z widocznymi pęknięciami (Ryc. 41). Pęknięcia te są najprawdopodobniej efektem suszenia próbki w warunkach zmniejszonego ciśnienia. Materiał nie wykazywał widocznej porowatości. Frakcje (**38-F1**), (**38-F2**) i (**38-F3**) cechowała struktura o mniejszej jednorodności niż produkt (**38**). Dodatkowo, frakcja (**38-F1**) prezentowała większy stopień pofałdowania,

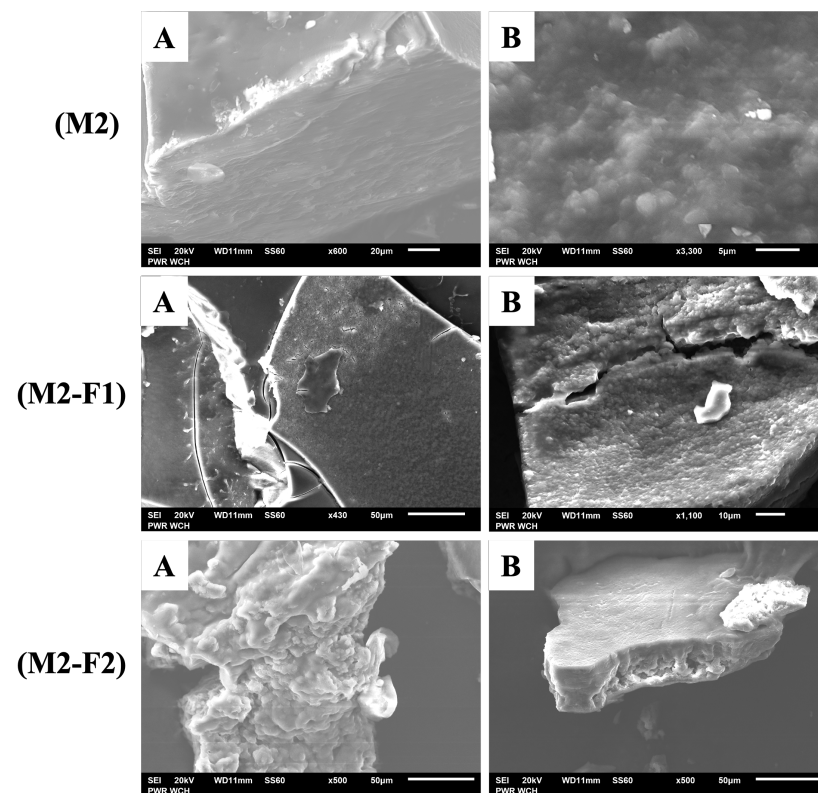
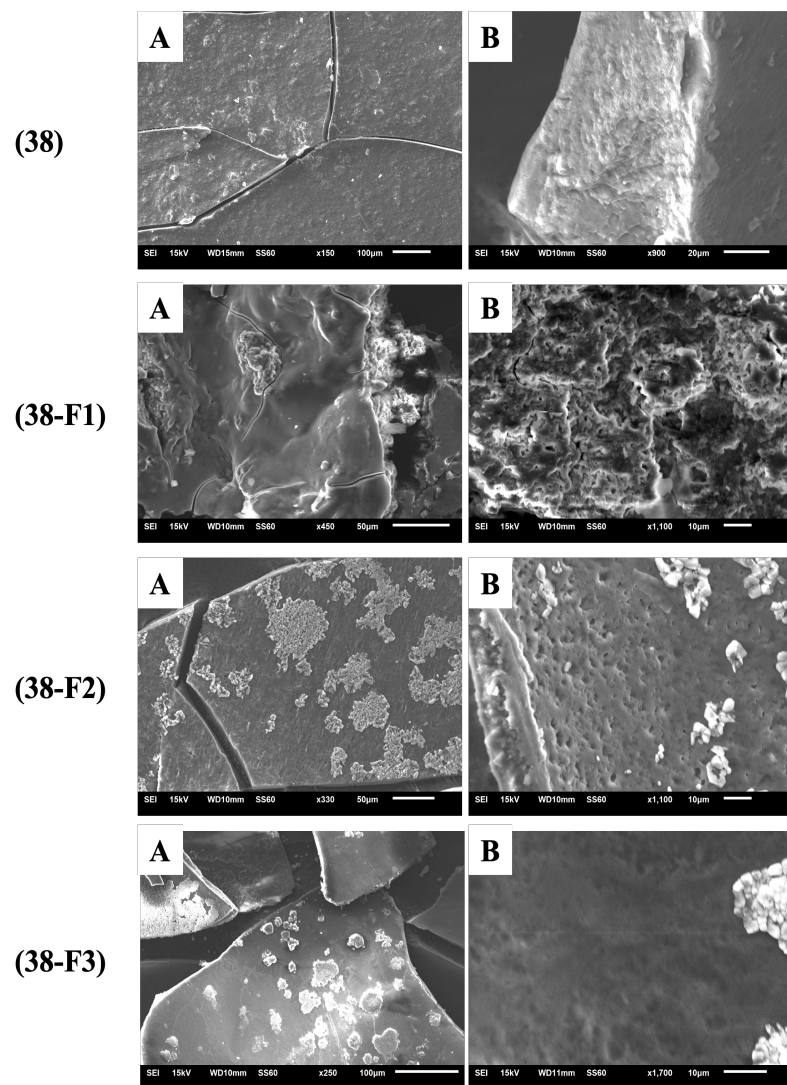
co prawdopodobnie wynikało z większego stopnia rozgałęzienia łańcucha głównego pektyny (rozdział 3.4.1.5).

Morfologia produktu z wyłoków owocu maliny (**M2**) wykazywała podobne zależności od struktury chemicznej, jak w przypadku produktów czarnej porzeczki (Ryc. 42). Produkt (**M2**) charakteryzował się zwartą, warstwową organizacją, z niewielkimi chropowatościami na powierzchni. Frakcja (**M2-F1**) miała formę łusek o ostrych krawędziach, z licznymi nierównościami na powierzchni. W przypadku (**M2-F2**) zaobserwowano rozwarstwienia zauważalne w przekroju produktu oraz nieregularne agregaty na powierzchni.

Analiza SEM dla produktu (**T3**) wykazała zwartą strukturę cząstek o nieregularnej, lecz relatywnie gładkiej powierzchni (Ryc. 43). Przy większym powiększeniu (1 500×) zaobserwowano gęsto upakowane, drobnoziarniste skupiska. Struktura frakcji (**T3-F1**) była wyraźnie niejednorodna, stwierdzono też obecność agregatów i licznych porów. Frakcja (**T3-F2**) miała formę płaskich łusek o zwartej i bardziej uporządkowanej strukturze niż (**T3-F1**), choć na jej powierzchni zaobserwowano niewielką chropowatość.

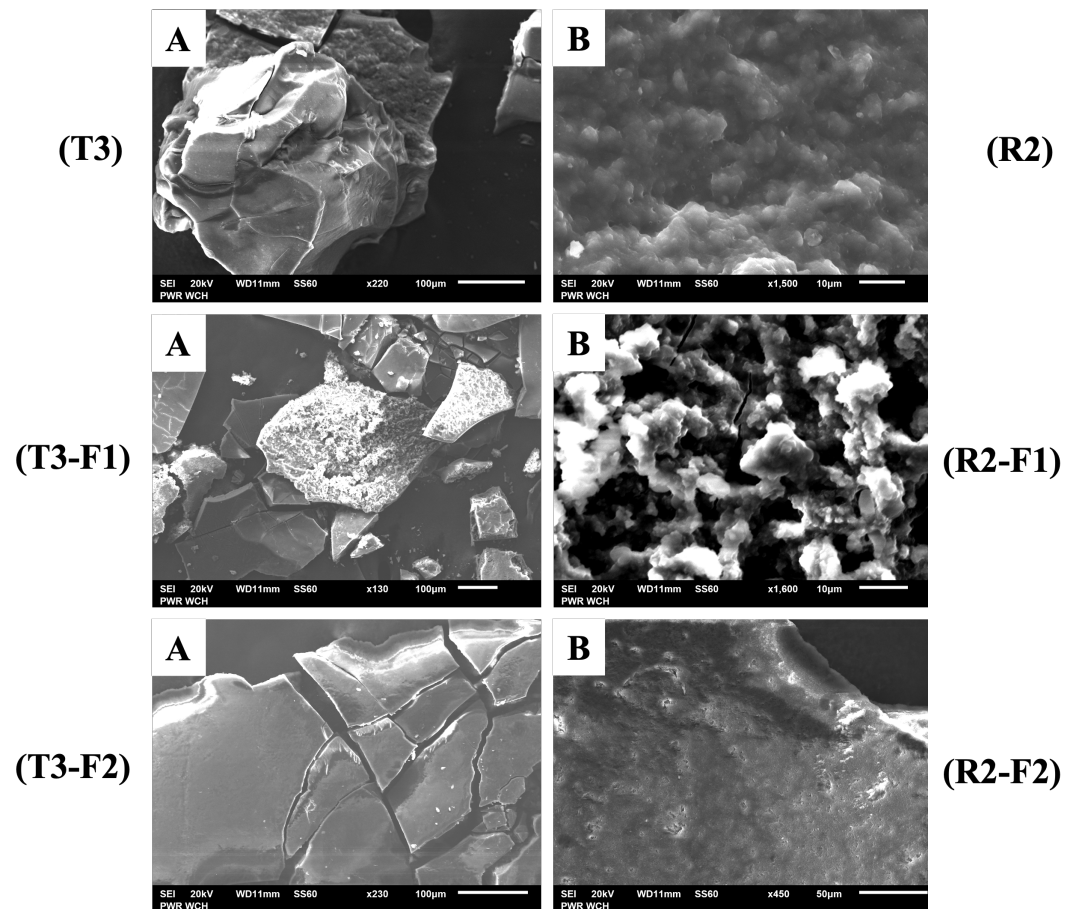
Struktura powierzchni produktów wyodrębnionych z wyłoków owocu rokitnika różniła się od struktury powierzchni produktów uzyskanych z pozostałych surowców (Ryc. 44). Obserwacje przy użyciu SEM wykazały, że zarówno produkt (**R2**) jak i jego frakcje, miały postać płaskich płatków o ostrych krawędziach, zorganizowanych warstwowo. Struktura frakcji (**R2-F1**) była wyraźnie niejednorodna, a jej powierzchnia była nieregularna, natomiast powierzchnia (**R2-F2**) wykazała wysoką jednorodność.

Porównanie morfologii produktów z różnych surowców odpadowych i ich frakcji pozwoliło zaobserwować, że w wyniku procesu frakcjonowania na złożu IEC otrzymano pektyny o odmiennej organizacji strukturalnej. Struktura frakcji eluowanych ze złoża chromatograficznego, przy użyciu roztworu NaCl o wyższym stężeniu (~0,4 M), była bardziej nieregularna z uwagi na obecność licznych porów i agregatów. Z kolei struktura frakcji, które uzyskano przy użyciu soli o niższym stężeniu (~0,3 M) charakteryzowała się większą jednorodnością. Można przypuszczać, że frakcje o mniejszym stopniu kwasowości wynikającym z mniejszego powinowactwa do złoża DEAE prezentują większą zdolność do przybierania uporządkowanej formy.

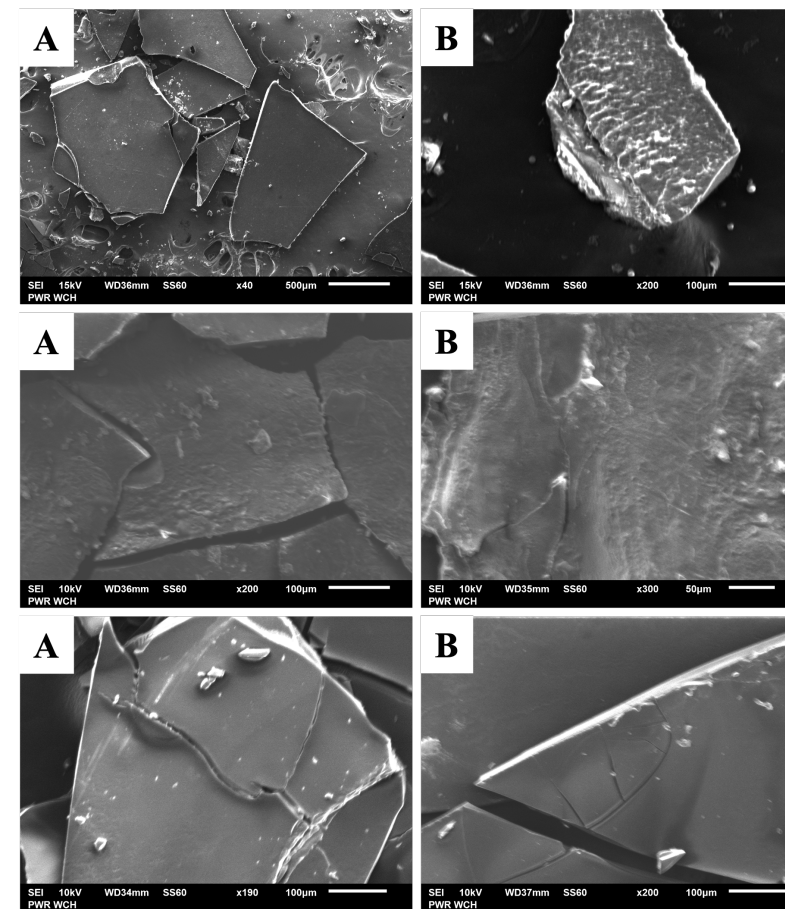


Ryc. 42. Mikrofotografie SEM produktu otrzymanego z wyłoków owocu maliny (**M2**) oraz jego frakcji (**M2-F1**) i (**M2-F2**), uzyskanych na drodze chromatografii jonowymiennej.

← **Ryc. 41.** Mikrofotografie SEM produktu otrzymanego z wyłoków owocu czarnej porzeczki (**38**) oraz jego frakcji (**38-F1**), (**38-F2**) i (**38-F3**), uzyskanych na drodze chromatografii jonowymiennej.



Ryc. 43. Mikrofotografie SEM produktu otrzymanego z wyłoków owocu truskawki (**T3**) oraz jego frakcji (**T3-F1**) i (**T3-F2**), uzyskanych na drodze chromatografii jonowymiennej.



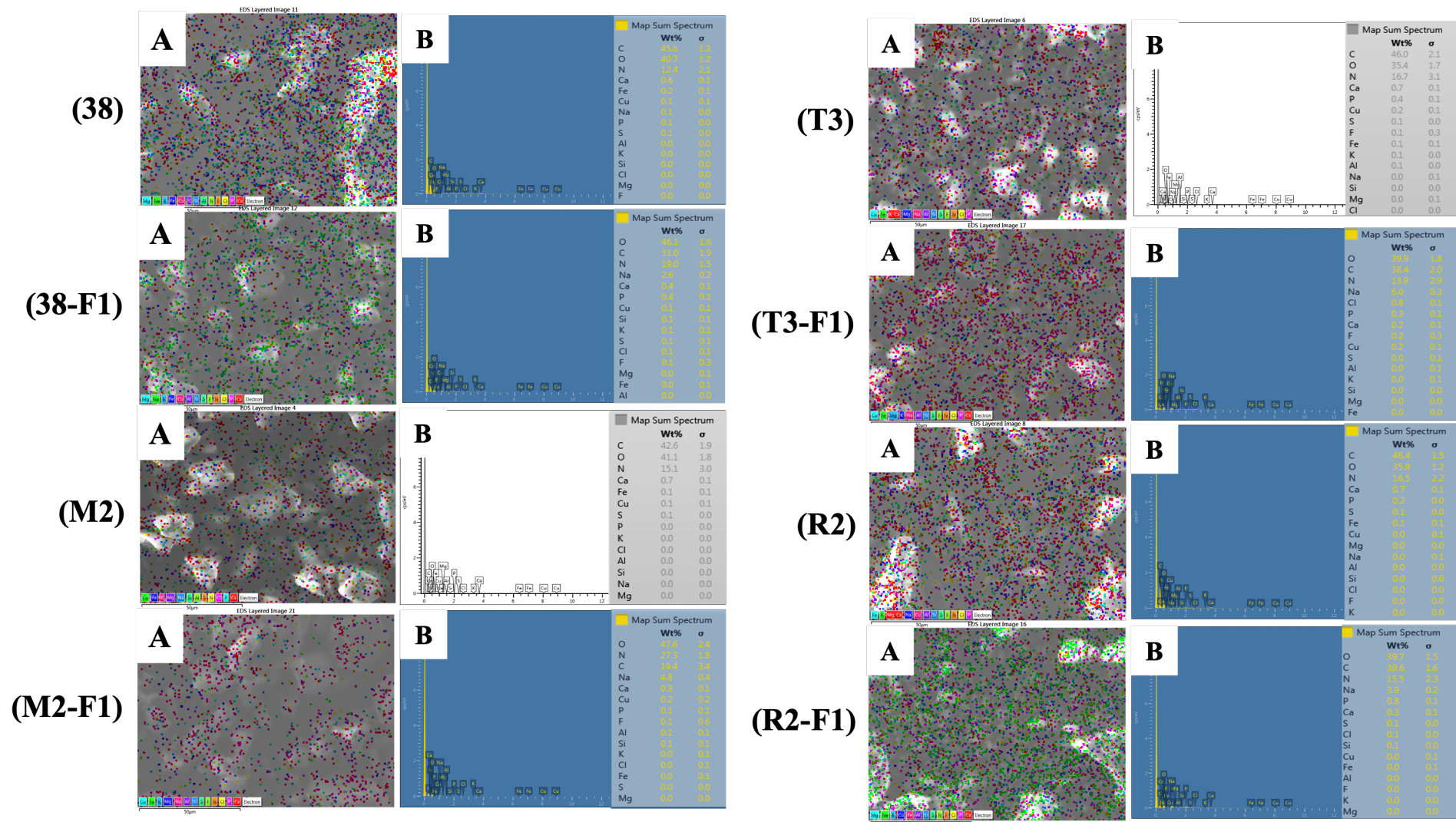
Ryc. 44. Mikrofotografie SEM produktu otrzymanego z wyłoków owocu rokitnika (**R2**) oraz jego frakcji (**R2-F1**) i (**R2-F2**), uzyskanych na drodze chromatografii jonowymiennej.

Pory obserwowane na powierzchni badanych produktów można wiązać z odparowywaniem wody z matrycy polisacharydowej, co w efekcie prowadziło do reorganizacji strukturalnej. Obecność porów obserwowano głównie na powierzchni frakcji, rzadziej w całych produktach. Zjawisko to można tłumaczyć faktem, że w łańcuchach polisacharydowych frakcji pektynowych występują liczne domeny HG, przy jednocześnie niskim stopniu metylowania reszt GalA w porównaniu do całych produktów. Cechy te determinują bardziej hydrofilowy charakter frakcji, co przekłada się na ich wyższą zdolność do retencji wody [Einhorn-Stoll, 2018]. W konsekwencji można przypuszczać, że woda z powierzchni o większym powinowactwie do wody odparowuje wolniej podczas suszenia, a zwiększona lepkość układu polisacharydowego utrudnia zasklepanie powstających zagłębień na powierzchni.

Z kolei organizacja przestrzenna łańcuchów w całych produktach może być determinowana przez oddziaływania elektrostatyczne oraz wiązania wodorowe. W środowisku o odczynie obojętnym grupy karboksylowe reszt GalA występują głównie w formie zdeprotonowanej. Wraz ze wzrostem ich gęstości powierzchniowej nasilają się odpychające oddziaływania elektrostatyczne, co sprzyja przyjmowaniu przez łańcuchy cukrowe bardziej rozwiniętej, zrelaksowanej konformacji. Jednocześnie wiązania wodorowe, wewnątrz- i międzycząsteczkowe, mogą sprzyjać agregacji łańcuchów pektyny. Uzyskane wyniki wskazują, że morfologia pektyn zależy od ich struktury chemicznej, która determinuje zarówno organizację strukturalną łańcuchów polisacharydowych, jak i ich właściwości fizykochemiczne.

Badaniu metodą SEM-EDS poddano produkty **(38)**, **(M2)**, **(T3)** oraz **(R2)** wraz z dominującymi frakcjami **(38-F1)**, **(M2-F1)**, **(T3-F1)** i **(R2-F1)**. Mapowanie EDS umożliwiło identyfikację pierwiastków związanych z matrycą polisacharydową, a także ocenę ich rozmieszczenia oraz lokalnego zagęszczenia na powierzchni próbek.

Skład pierwiastkowy analizowanych produktów i ich frakcji był zdominowany przez węgiel i tlen, co jest charakterystyczne dla związków węglowodanowych. Produkty optymalne wykazywały większe zróżnicowanie zarówno pod względem składu pierwiastkowego, jak i udziału poszczególnych pierwiastków. Produkty **(38)**, **(M2)**, **(T3)**, **(R2)** charakteryzowały się wyższą ilością azotu, wapnia, potasu, fosforu i siarki.



Ryc. 45. Obrazy SEM produktów optymalnych oraz frakcji dominujących wraz z mapowaniem pierwiastkowym (A) oraz widmami EDS (B).

Z kolei **(38-F1)**, **(M2-F1)**, **(T3-F1)** i **(R2-F1)** wykazywały bardziej wyraźny udział sodu i chloru, co może wynikać z niepełnego usunięcia soli po procesie separacji IEC, pomimo zastosowanej dializy w wodzie dejonizowanej. Obecność azotu może wskazywać na pozostałość komponentów białkowych (np. reszt aminokwasowych) lub innych związków azotowych pochodzenia roślinnego. Jony wapnia w strukturze pektyn wynikają ze zdolności kompleksujących grup karboksylowych oraz licznych reszt hydroksylowych pektyn, tworzących kompleksy typu „*egg-box*”. W analizowanych próbkach wykryto również śladowe ilości żelaza, fosforu i miedzi, których obecność może mieć naturę natywną.

4. PODSUMOWANIE

Celem rozprawy była optymalizacja procesu ekstrakcji pektyn z wyłoków wybranych rodzimych owoców jagodowych z wykorzystaniem naturalnych mieszanin głęboko eutektycznych (NADES) oraz charakterystyka otrzymanych produktów i ich frakcji pektynowych z zastosowaniem szeregu metod analitycznych.

Badania rozpoczęłam od wyboru biomasy odpadowej stanowiącej źródło pektyn o wysokim potencjale. Przegląd literatury oraz analiza danych statystycznych umożliwiły wybór wyłoków owoców czarnej porzeczki jako surowca modelowego oraz wyłoków maliny, truskawki i rokitnika jako surowców alternatywnych.

Ekstrakcje wstępne w wodzie (HWE; 100°C, 4 h) potwierdziły wybór wyłoków czarnej porzeczki jako głównego przedmiotu badań, głównie ze względu na wysoki udział cukrów oraz UA, co zostało zbadane przy pomocy analiz kolorymetrycznych. Produkt był bogaty w polifenole, co stanowiło istotne wyzwanie technologiczne.

W kolejnym etapie przeprowadziłam badania mające na celu określenie parametrów wstępnych procesu ekstrakcji pektyn z surowca modelowego w wodzie, z uwzględnieniem czasu ekstrakcji jako zmiennego parametru oraz zastosowania maceracji jako etapu wstępnego. W rezultacie otrzymano produkty z różną wydajnością, zróżnicowane pod względem kompozycji chemicznej, spośród których za najbardziej obiecujący uznano produkt (4) (100°C, 4h, bez maceracji). Wyznaczone parametry wykorzystano w kolejnym etapie badań.

Kolejny etap badań obejmował przeprowadzenie ekstrakcji z zastosowaniem mediów o zróżnicowanym pH oraz sile jonowej, bazując na odczynnikach chemicznych charakteryzujących się obniżonym oddziaływaniu środowiskowym. Sformułowano ogólne wnioski na temat pH środowiska ekstrakcyjnego oraz przewodnictwa jonowego środowiska ekstrakcyjnego, sprzyjających ekstrakcji polisacharydów z wysoką efektywnością oraz wysokim udziałem kwasów uronowych. Na tej podstawie, a także w oparciu o doniesienia literaturowe, zdecydowano o wykorzystaniu ChCl oraz CA jako komponentów mieszaniny NADES. Wstępne ekstrakcje NADES (ChCl/CA, stosunek molowy 1:1) umożliwiły ekstrakcję polisacharydów bogatych w UA z wysoką wydajnością. Istotnym elementem eksperymentu była również ocena wpływu dodatku wody do układu NADES podczas przygotowania medium ekstrakcyjnego. Ze względu na wysoką lepkość układu NADES częściowe rozcieńczenie mieszaniny wodą uznano za rozwiązanie korzystne technologicznie. Charakterystyka chemiczna, przeprowadzona

z wykorzystaniem metod kolorymetrycznych, wskazała preferowany stosunek masowy NADES/woda równy 1:9.

Kolejny etap obejmował optymalizację procesu ekstrakcji pektyn z wycieków owoców czarnej porzeczki z wykorzystaniem układu NADES ChCl/CA (NADES/woda 1:9). Proces optymalizacji zrealizowano w oparciu o metodologię RSM przy wykorzystaniu planu eksperymentalnego *I*-optimal. Jako zmienne niezależne przyjęto liczbę moli ChCl oraz CA w mieszaninie NADES (X_1 , X_2), a także czas ekstrakcji (X_3). Zmienne odpowiedzi obejmowały wydajność procesu oraz udział cukrów, kwasów uronowych i związków polifenolowych w uzyskanych produktach. Analiza statystyczna oraz ocena stopnia dopasowania modelu umożliwiły predykcję parametrów optymalnych, których weryfikacja eksperymentalna doprowadziła do uzyskania produktów optymalnych (37, 38, 39). Spośród nich produkt (38) (ChCl/CA 1,5:2; 100°C, 4 h) wskazano jako dominujący.

Na dalszym etapie badań skoncentrowano się na ekstrakcji polisacharydów z wycieków owoców maliny, truskawki oraz rokitnika. W każdym przypadku przeprowadzono ekstrakcję z wykorzystaniem jako medium ekstrakcyjnego: wody, 10% roztworu kwasu cytrynowego oraz układów NADES (100°C, 4 h) wyznaczonych na etapie optymalizacji. Analiza chemiczna wykazała przewagę produktów uzyskanych na drodze ekstrakcji NADES, szczególnie pod względem ilości UA. Na tej podstawie wytypowano produkty optymalne wśród badanych biomas odpadowych: malina (M2), truskawka (T3) oraz rokitnik (R2).

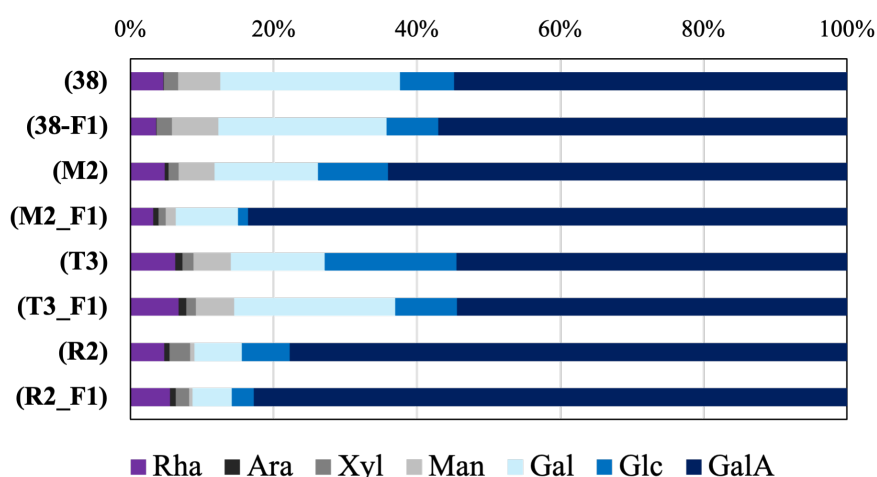
Produkty kontrolne czarnej porzeczki (4) i (11) oraz optymalne (38), (M2), (T3) i (R2) oczyszczono na drodze chromatografii jonowymiennej. Uzyskane frakcje przeanalizowano pod kątem kompozycji chemicznej z wykorzystaniem metod kolorymetrycznych, które wykazały eliminację części składników towarzyszących, takich jak polifenole oraz białka. Na tej podstawie dokonano wyboru dominujących frakcji pektynowych (38-F1), (M2-F1), (T3-F1) i (R2-F1) dla każdego z produktów optymalnych (38), (M2), (T3) i (R2).

Dominujące frakcje poddano dodatkowej analizie pod kątem jednorodności z wykorzystaniem chromatografii żelowej na złożu Sephadex LH-20. Analiza wykazała obecność frakcji polisacharydowych oraz polifenolowych o częściowo nakładających się sygnałach, co może wskazywać na występowanie kompleksów polifenolowo-polisacharydowych. Odnotowano śladowy udział białek, co przypuszczalnie było

efektem oczyszczania na drodze IEC. Jednocześnie odnotowano pewien stopień niejednorodności, szczególnie w przypadku frakcji pektynowej czarnej porzeczki (**38-F1**) oraz rokitnika (**R2-F1**).

Produkty optymalne (**38**), (**M2**), (**T3**) i (**R2**) wraz z odpowiadającymi im frakcjami pektynowymi poddano analizie HPLC-SEC, która wykazała obecność frakcji o małej i średniej masie cząsteczkowej. Stwierdzono istotny udział frakcji o niskiej i średniej masie cząsteczkowej, co może wynikać z warunków ekstrakcji z zastosowaniem NADES. Frakcje wykazywały większą jednorodność w porównaniu z produktami wyjściowymi. Jednocześnie produkty otrzymane z wyłoków z owoców czarnej porzeczki oraz rokitnika wykazały wyższy stopień niejednorodności w zestawieniu z pozostałymi preparatami.

Chromatografia GC-MS umożliwiła określenie składu monosacharydowego badanych produktów oraz weryfikację udziału kwasów uronowych, w szczególności kwasu galakturonowego. Otrzymane profile monosacharydowe były typowe dla pektyn i wykazywały istotny udział GalA, przy jednoczesnym zróżnicowaniu udziału pozostałych komponentów w zależności od rodzaju surowca.



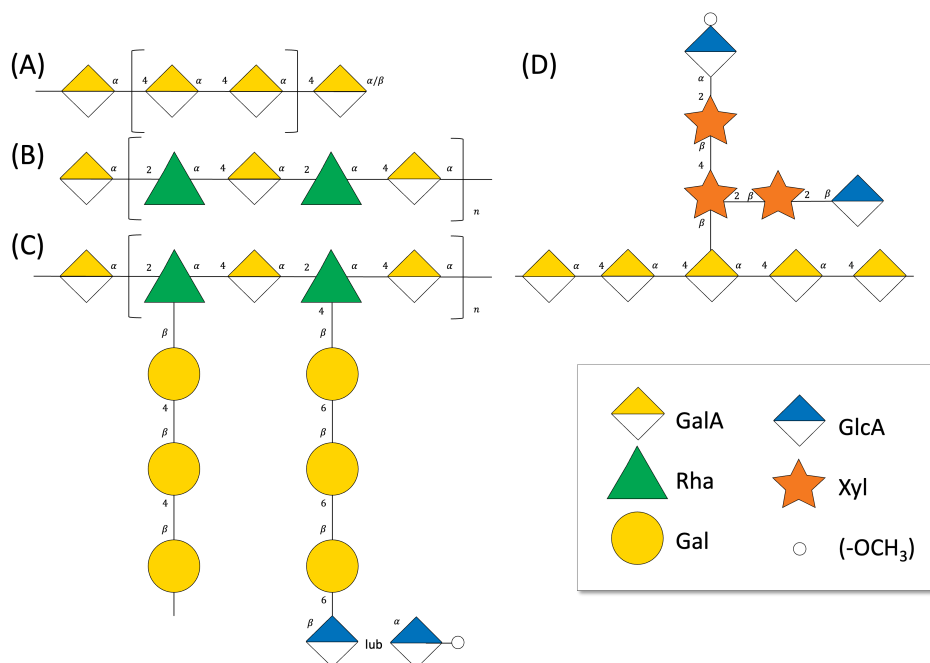
Ryc. 46. Kompozycja monosacharydowa produktów (**38**), (**M2**), (**T3**) i (**R2**) oraz frakcji (**38-F1**), (**M2-F1**), (**T3-F1**) i (**R2-F1**).

Preparaty o wyższym udziale GalA wykazywały większy stopień liniowości, co można wiązać z dominacją domen HG w obrębie łańcucha polisacharydowego. Z kolei frakcje wzbogacone w cukry neutralne (Gal, Glc, Rha, Ara) przypuszczalnie charakteryzowały się większym udziałem regionów RG-I, o zróżnicowanym stopniu rozgałęzienia łańcuchów bocznych w zależności od surowca oraz ilości cukrów neutralnych. Najwyższy stopień złożoności strukturalnej prezentowały preparaty otrzymane z wyłoków owoców czarnej porzeczki.

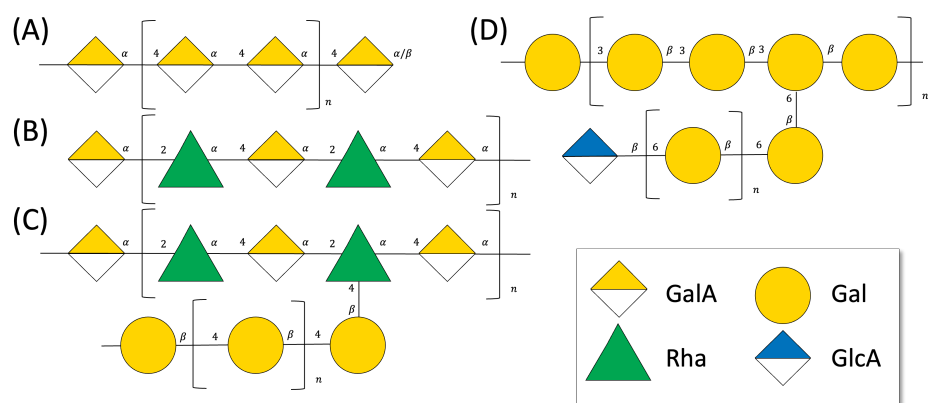
Kontynuację badań strukturalnych stanowiła technika ATR-FTIR. Uzyskane widma prezentowały istotne podobieństwa, a ich ogólny przebieg był charakterystyczny dla pektyn. Analiza wykazała wyraźne obniżenie stopnia estryfikacji DE po frakcjonowaniu produktów optymalnych na drodze chromatografii jonowymiennej. Spośród badanych próbek jedynie produkt **(38)** można było zaklasyfikować jako pektynę wysokometoksyłową (HM, DE > 50%). Frakcje charakteryzowały się uproszczonym profilem, co może być związane z ich wyższą jednorodnością strukturalną.

Analiza widm NMR wykazała różnice pomiędzy produktem optymalnym **(38)** a jego frakcją **(38-F1)**. Proces frakcjonowania prowadził do oczyszczenia produktu wyjściowego, czemu towarzyszyło uproszczenie struktury i obniżenie stopnia estryfikacji frakcji, co potwierdzono na podstawie widm NMR.

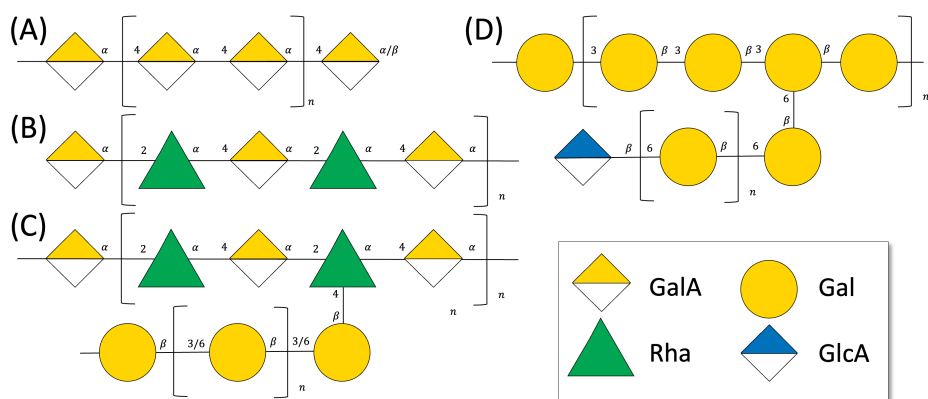
Na podstawie analiz GC-MS oraz NMR zaproponowano struktury dominujących frakcji pektynowych uzyskanych z badanych wyłoków owocowych. Wykazano obecność charakterystycznych domen homogalakuronianu (HG) oraz ramnogalakuronianu I (RG-I), różniących się stopniem rozgałęzienia oraz udziałem cukrów neutralnych w zależności od rodzaju surowca. Najbardziej złożoną strukturą charakteryzowała się frakcja uzyskana z wyłoków owocu czarnej porzeczki. Wyniki wskazują również na obecność fragmentów arabinogalaktanowych oraz struktur zawierających reszty ksylozy i kwasu glukuronowego.



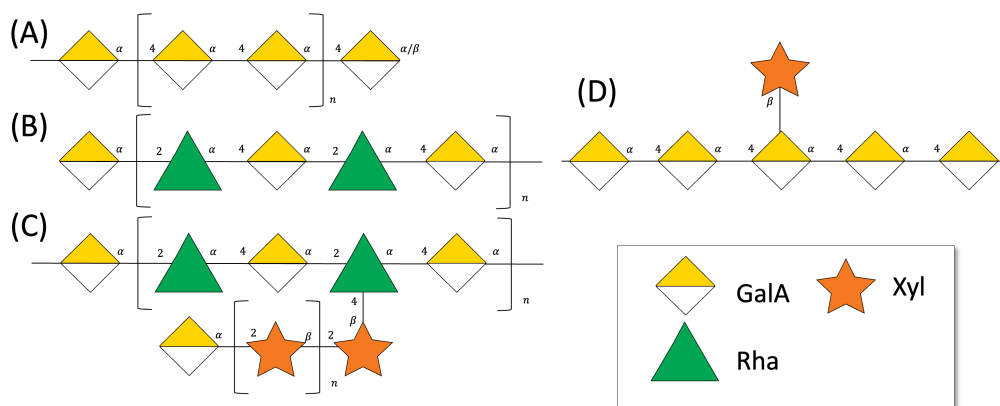
Ryc. 47. Propozycja struktury frakcji pektynowej **(38-F1)** otrzymanej z wyłoków owocu czarnej porzeczki.



Ryc. 48. Propozycja struktury frakcji pektynowej (**M2-F1**) otrzymanej z wyłoków owocu maliny.



Ryc. 49. Propozycja struktury frakcji pektynowej (**T3-F1**) otrzymanej z wyłoków owocu truskawki.



Ryc. 50. Propozycja struktury frakcji pektynowej (**R2-F1**) otrzymanej z wyłoków owocu rokitnika.

Analiza mikroskopowa SEM-EDS wykazała zależność pomiędzy morfologią produktów pektynowych a składem chemicznym oraz obecnością składników nieorganicznych. Uzyskane wyniki wskazują na zmiany organizacji strukturalnej frakcji

po oczyszczaniu metodą IEC. Identyfikacja azotu może wskazywać na obecność resztkowych struktur białkowych lub innych związków azotowych pochodzenia roślinnego.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wyłoki z owoców czarnej porzeczki, maliny, truskawki oraz rokitnika stanowią cenne źródło pektyn. Ekstrakcja z zastosowaniem naturalnych mieszanin głęboko eutektycznych (NADES), prowadzona w zoptymalizowanych warunkach procesowych, umożliwiła efektywną ekstrakcję pektyn z badanych biomas odpadowych. Analiza wieloskalowa, wykorzystująca metody spektrofotometryczne, spektroskopowe, chromatograficzne oraz mikroskopowe, umożliwiła przeprowadzenie kompleksowej charakterystyki kompozycji chemicznej oraz strukturalnej uzyskanych pektyn. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad właściwościami, strukturą oraz potencjałem aplikacyjnym wyekstrahowanych frakcji pektynowych pochodzenia owocowego.

Uzupełnieniem wykonanych badań byłoby przeprowadzenie optymalizacji ekstrakcji pektyn z wyłoków owocowych niezależnie dla każdego z dodatkowo analizowanych surowców. Krok ten umożliwiłby uzyskanie pełnego obrazu na temat ekstrakcji pektyn z wykorzystaniem układu NADES (ChCl/CA) oraz metodologii RSM z zastosowaniem planu *I*-optimal.

Potwierdzenie struktury uzyskanych pektyn wymaga przeprowadzenia rozszerzonych analiz strukturalnych NMR zarówno dla produktów natywnych, jak i frakcji uzyskanych z wyłoków owoców maliny, truskawki oraz rokitnika. Cenne rozwinięcie badań strukturalnych stanowiłaby metoda Hakomoriego, umożliwiająca określenie typu wiązań glikozydowych obecnych w glikanach, co dostarczyłoby dodatkowych informacji oraz umożliwiło pogłębienie interpretacji struktury badanych preparatów [Pettolino i in., 2012]. Istotnym uzupełnieniem badań byłaby również charakterystyka właściwości reologicznych, obejmująca lepkość, zdolność do żelowania, zdolność do wiązania wody oraz ocenę zachowania pseudoplastycznego.

Uzyskane wyniki wskazują, że układy NADES stanowią perspektywiczne medium ekstrakcyjne do izolacji pektyn z biomasy odpadowej pochodzenia owocowego oraz mogą znaleźć zastosowanie w projektowaniu bardziej zrównoważonych procesów ekstrakcyjnych.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Aparatura

- demineralizator Hydrolab HLP 300sp (Polska)
- system odparowywania próżniowego RapidVap Labconco (USA)
- czytnik mikropłytek SPECTROstar Nano, BMG Labtech (Niemcy)
- spektrofotometr Cecil CE 2021, Cecil Instruments (Wielka Brytania)
- spektrometr FTIR - IRSpirit wyposażony w przystawkę ATR, Shimadzu (Japonia)
- spektrometr FTIR - Nicolet iS50 FTIR wyposażony w detektor DTGS, Thermo Fisher Scientific (USA)
- spektrometr NMR – AVANCE III HD 400 MHz z sondą Prodigy, Bruker (USA)
- chromatograf gazowy – Trace GC Ultra sprzężony ze spektrometrem mas ITQ 700 z detektorem pułapki jonowej kwadropolowej, Thermo Scientific (USA)
- chromatograf Agilent 1260 Infinity GPC/SEC wyposażony w detektory DAD i RI, Agilent Technologies (USA)
- soczewkowy mikroskop skaningowy JSM-6601LV, JEOL (Japonia)
- mikroskopu optyczny Achios X Observer (Niemcy), wyposażony w kamerę cyfrową CMEX-18 PRO oraz oprogramowanie Image Focus Alpha

5.2. Materiały i odczynniki

Surowiec roślinny

Wytłoki owocowe z czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) w postaci suchego, sypkiego, ciemnofioletowego proszku o swoistym, charakterystycznym zapachu, zakupiono na lokalnym rynku – firma zielarska Zdrowsze Życie, MAC IT Czwojdrak Edyta (Miejska Górka, Polska). Pozyskano 3 kg surowca roślinnego, pakowanego w opakowania o masie 1 kg. Wyniki badań fizykochemicznych przedstawionych w specyfikacji zakupionego produktu, wykazują udział wody na poziomie niższym niż 12%, przy czym dane z uzyskanego od producenta certyfikatu wskazują na 9,8%.

Wytłoki owocowe z malin (*Rubus idaeus* L.), truskawek (*Fragaria x ananasa* Duchesne) oraz rokitnika (*Hippophae rhamnoides*) uzyskano w ramach współpracy z Firmą Frunutex Sp. z o.o. (Lublin, Polska). Surowiec roślinny dostarczono w papierowych opakowaniach o masie 4 kg. Specyfikacja produktów wskazuje na ilość wody poniżej 10%, wielkość cząstek mniejszą niż 5 mm. Producenci deklarują, że wytłoki po tłoczeniu soku umieszczane są w chłodni, a następnie suszone przy użyciu suszarni półkowej (komorowej) w temperaturze 55°C przez 12 h. Następnie wytłoki zostały poddane procesowi separacji mechanicznej przy użyciu zygzaka oraz sit.

Firma Frunutex Sp. z o.o. posiada certyfikat dla podmiotu ekologicznego w UE potwierdzony przez upoważniony organ kontrolny (EKO GWARANCJA PTRE), co zostało przeze mnie zweryfikowane za pośrednictwem IMSOC (ang. Information Management System for Official Controls, Zintegrowany System Zarządzania dla Kontroli Urzędowych).

Producenci wybranych surowców roślinnych deklarują, że zostały one wyprodukowane bez GMO.

Materiały

- złożo jonowymienne DEAE-Sephadex - Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska)
- złożo jonowymienne DEAE-Sephadex A50 – Cytiva, Danaher Corporation (Marlborough, Massachusetts, USA), zakup za pośrednictwem Merck (Darmstadt, Niemcy)
- złożo chromatograficzne Sephadex LH-20, lipofilowe – Sigma (Lublin, Polska)
- złożo jonowymienne, silny kationit, Dowex® 50WX8, hydrogen form – Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska)
- worek dializacyjny celulozowy, Spectra Por, MW 12-14 kDa, ROTH (Karlsruhe, Niemcy)
- worek dializacyjny celulozowy, Spectra Por, MW 12400 Da, ROTH (Karlsruhe, Niemcy)

- kolumna kapilarna RTX[®]-2330, Restek (Bellefonte, Pensylwania, USA)
- kolumna kapilarna HEMA-BIO 300 oraz HEMA-BIO 1000, 8 mm × 250 mm (Tessek, Czechy)
- uniwersalne papierki wskaźnikowe (pH 1-14)

Odczynniki

- chlorek choliny ($\geq 98\%$), Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska)
- kwas cytrynowy monohydrat, P.P.H. STANLAB (Lublin, Polska)
- kwas L(+)-askorbinowy cz.d.a., POCH (Gliwice, Polska)
- kwas szczawiowy cz.d.a., Odczynniki Chemiczne, Lubelskie Przedsiębiorstwo Przemysłowo-Handlowe, L.P.P.H. „OCH” (Lublin, Polska)
- szczawian amonu monohydrat, cz.d.a., PPH Polskie Odczynniki Chemiczne, POCH (Gliwice, Polska)
- Kwas winowy cz., Chempur (Piekary Śląskie, Polska)
- winian sodu 2hydrat cz., PPH Polskie Odczynniki Chemiczne, POCH (Gliwice, Polska)
- glukoza bezwodna cz.d.a., P.P.H. STANLAB (Lublin, Polska)
- fenol cz.d.a., Chempur (Piekary Śląskie, Polska)
- kwas siarkowy stężony, $>95\%$, POCH (Warszawa, Polska)
- di-sodu tetraboran 10 hydrat cz.d.a., ACS ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$), POCH (Warszawa, Polska)
- *m*-hydroksydifenol 85% (HDP), Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska)
- wodorotlenek sodu mikrogranulki cz.d.a., POCH (Warszawa, Polska)
- kwas galakturonowy monohydrat (GalA), $>97\%$, Fluka (Charlotte, North Carolina, USA)
- odczynnik Folin-Ciocalteu, cz.d.a., Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska)
- kwas galusowy monohydrat, Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska)
- węglan sodu bezwodny, POCH (Warszawa, Polska)
- siarczan (II) miedzi (VI) CuSO_4 , Chempur (Piekary Śląskie, Polska)
- Bovine Serum Albumin (BSA), Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska)
- HCl stężony, P.P.H. STANLAB (Lublin, Polska)
- chlorek sodu NaCl, POCH (Warszawa, Polska)
- metanol, P.P.H. STANLAB (Lublin, Polska)
- imidazol $>99\%$, Merck (Darmstadt, Niemcy)
- borowodorek sodu NaBH_4 , $>98\%$, Fluka (Charlotte, North Carolina, USA)
- kwas octowy lodowaty, r-r 99,5% cz.d.a., POCH (Warszawa, Polska)
- MES bufor, MES hydrat min. 99.5%, SIGMA
- CDI, karbodiimid – N-Cyclohexyl-N’-(2-morpholinoethyl)carbodiimide methyl-p-toluensulfonate 95%, Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska)
- kwas trifluorooctowy TFA, 99,5% for biochemistry, POCH (Warszawa, Polska)
- woda amoniakalna r-r 25% NH_4OH , P.P.H. STANLAB (Lublin, Poland)
- bezwodnik kwasu octowego cz.d.a., POCH (Warszawa, Polska)
- pirydyna cz.d.a., POCH (Warszawa, Polska)
- chlorek metylenu cz.d.a., dichlorometan, Chempur (Piekary Śląskie, Polska)
- siarczan sodu bezwodny cz.d.a., Eurochem BGD Sp. z o.o. (Tarnów, Polska)
- D_2O $>99\%$, Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska)
- aceton techniczny, Idalia (Radom, Polska)
- dekstrany – HPLC/SEC: 0,5; 5,2; 25,5; 72,7; 158,1; 344,8; 759,4 i 1360,0 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ (American Polymer Standard Corporation, Mentor, OH, USA)
- dekstrany – GPC: 1, 5, 50, 150, 200, 670 kDa (Sigma-Aldrich, Warszawa, Polska)
- monosacharydy: ramnoza (Rha), fukoza (Fuc), ryboza (Rib), arabinoza (Ara), ksyloza (Xyl), mannoza (Man), galaktoza (Gal), glukoza (Glc) – Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska)

5.3. Metody

Określenie ilości wody w surowcu roślinnym

Ocenę stopnia wilgotności surowców roślinnych przeprowadzono bazując na danych literaturowych [FP VIII, 2008]. Naważkę biomasy (5 g) suszono w uprzednio zważonej szalce Petriego przez 2 godziny w temperaturze ok. 65°C. Po tym czasie, naczynie z surowcem przykrywano pokrywką w celu ograniczenia kontaktu próbki z wilgocią atmosferyczną oraz wszelkimi zanieczyszczeniami na czas studzenia szkła. Po ochłodzeniu szalki do temperatury pokojowej przystępowano do pomiaru masy. Suszenie kontynuowano do stałej masy (różnica pomiędzy kolejnymi pomiarami nie wynosiła więcej niż 0,005 g).

Oznaczenie wykonano dla wyłoków owocowych czarnej porzeczki, maliny, truskawki oraz rokitnika, w trzech powtórzeniach dla każdego rodzaju surowca, zgodnie ze wzorem:

$$W(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad [10],$$

gdzie:

W (%) – zawartość wody w materiale roślinnym;

m_0 – masa suchej szalki Petriego wraz z pokrywką (g);

m_1 – masa suchej szalki Petriego wraz z pokrywką oraz materiałem roślinnym przed rozpoczęciem procesu suszenia (g);

m_2 – masa suchej szalki Petriego wraz z pokrywką oraz materiałem roślinnym po wysuszeniu do stałej masy (g).

Wyniki końcowe przedstawiono jako średnią z trzech oznaczeń wraz z odchyleniem standardowym (g) oraz udział wody w próbce wyrażoną w procentach masowych.

Ocena wizualna surowca roślinnego pod mikroskopem optycznym

Obserwacje surowców roślinnych przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopu optycznego Achios X Observer (Zeiss, Niemcy) wyposażonym w kamerę cyfrową CMEX-18 PRO wraz z oprogramowaniem Image Focus Alpha. Niewielką ilość suchego materiału roślinnego przeniesiono na szkiełko podstawowe i z wykorzystaniem dodatkowego źródła światła w postaci lampy laboratoryjnej, poddano ocenie wizualnej przy zastosowaniu powiększenia 4 - 10x.

Procedura ekstrakcji polisacharydów z biomasy roślinnej w środowisku wodnym (ekstrakcja w wodzie)

Ekstrakcje wstępne przeprowadzono dla wyłoków owocowych z czarnej porzeczki, maliny, truskawki oraz rokitnika. Naważkę surowca roślinnego (50 g) ekstrahowano 750 ml wody dejonizowanej (1:15 w/v). Ekstrakcję ciała stałego – ciecz prowadzono w 100°C pod chłodnicą zwrotną przez 4 h. Uzyskane ekstrakty (**eI** – **eIV**) oddzielono od fazy stałej poprzez filtrację przez gazę opatrunkową, następnie odwirowano (4500 obr./min), a otrzymany supernatant poddawano filtracji grawitacyjnej. Ekstrakty zagęszczono do ok. 150 ml, a następnie wytrącono makromolekuły nierozpuszczalne w alkoholu (AIR) poprzez zalanie 2 000 ml schłodzonego do ok. 3°C metanolu i pozostawienie na 2 h w temperaturze pokojowej (RT) przy ciągłym mieszaniu. Osad oddzielono od metanolowego przesączu metodą filtracji ciśnieniowej przy wykorzystaniu lejku Buchnera, a następnie wysuszono go w piecu (~ 60°C). Suchy produkt ponownie rozpuszczono w 50 ml wody dejonizowanej, a następnie poddano dializie w celu usunięcia związków małocząsteczkowych. Wykorzystano w tym celu membranę dializacyjną Spectra/Por® (MWCO: 12-14 kDa, Spectrum Labs). Dializę kontrolowano poprzez pomiar przewodności właściwej wody dejonizowanej, a proces zakończono w momencie uzyskania wartości równej do wartości wyjściowej (72 – 96 h). Oczyszczony produkt roślinny odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem z wykorzystaniem urządzenia RapidVap (Labconco, USA). W rezultacie otrzymano produkty polisacharydowe z wyłoków czarnej porzeczki (**I**), maliny (**II**), truskawki (**III**) oraz rokitnika (**IV**).

Procedura ekstrakcji polisacharydów z wyłoków czarnej porzeczki w środowisku wodnym (ekstrakcja w wodzie) – ustalenie wstępnych parametrów procesowych

Ekstrakcję w wodzie prowadzono metodą maceracji (**1**) oraz ekstrakcji na gorąco (HWE), przy zmiennym czasie trwania procesu (**2-7**). Każdorazowo odważono 50 g wyłoku czarnej porzeczki, które

zalewano 750 ml wody dejonizowanej (1:15 w/v). Macerację **(1)** (MAC) prowadzono przez 24 h w temperaturze pokojowej (RT), natomiast HWE w temperaturze 100°C przez 2, 4 i 6 h **(2-4)**, pod chłodnicą zwrotną. Dodatkowo oceniono wpływ wstępnego etapu maceracji na przebieg ekstrakcji HWE **(5-7)** (MAC/HWE).

Ekstrakty schłodzono do temperatury otoczenia, a następnie oddzielono od fazy stałej poprzez przesączenie przez gazę opatrunkową, wirowanie (4500 obr./min) oraz filtrację grawitacyjną. Objętość ekstraktu zredukowano (ok. 150 ml) i poddano wytrącaniu metanolem (AIR) przez 2 h w RT, przy ciągłym mieszaniu. Wytrącony osad oddzielono metodą filtracji próżniowej, wysuszono ($T = 60^{\circ}\text{C}$), a następnie rozpuszczono w wodzie dejonizowanej w celu przeprowadzenia oczyszczania na drodze dializy wobec wody dejonizowanej. Roztwory przeniesiono do worka dializacyjnego (membrana Spectra/Por®, MWCO 12-14 kDa), a proces prowadzono przez 72 – 96 h, kontrolując przewodność wody dializacyjnej. Po zakończeniu procesu, próbki odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem.

Procedura ekstrakcji polisacharydów z biomasy roślinnej w wodnych mediach ekstrakcyjnych o zróżnicowanym pH i sile jonowej

Za media ekstrakcyjne o zróżnicowanym pH i sile jonowej posłużyły roztwory wodne chlorku choliney w stężeniach 5% **(8)** oraz 10% **(9)** (ChCl), a także wybranych kwasów organicznych oraz ich soli: 5% **(10)** i 10% **(11)** r-r kwasu cytrynowego (CA), 5% **(12)** i 10% **(13)** r-r kwasu szczawowego (OA), 5% r-r szczawiany amonu **(14)** (AO), 5% **(15)** i 10% **(16)** r-r kwasu winowego (TA), 5% r-r winianu sodu **(17)** (ST), 5% **(18)** i 10% **(19)** r-r kwasu askorbinowego (AA). Wytłoki czarnej porzeczki (50 g) umieszczano w wybranym medium ekstrakcyjnym oraz poddawano ekstrakcji pod chłodnicą zwrotną przez 6 h. Etapy filtracji, zagęszczania roztworu, wytrącania alkoholem (AIR), dializy oraz końcowego suszenia przeprowadzono analogicznie do wcześniej opisanej procedury.

Procedura ekstrakcji polisacharydów z biomasy roślinnej z wykorzystaniem NADES

Ekstrakcję pektyn z wytłoków czarnej porzeczki rozpoczęto od przygotowania naturalnych mieszanin głęboko eutektycznych (NADES). Do kolb okrągłodennych odważono składniki w odpowiednich stosunkach molowych (ChCl/CA). Składniki mieszano wstępnie szklaną bagietką, a następnie stosowano wyparkę rotacyjną do dokładnego stopienia obu odczynników (70°C , 120 rpm, max. 30 min). Po uzyskaniu bezbarwnej, jednorodnej cieczy o wysokiej lepkości, do mieszaniny wprowadzono wodę dejonizowaną w stosunku masowym 1:9 (NADES/woda; w/w), uzyskując końcową objętość medium równą 750 ml. Otrzymany NADES przenoszono do kolby okrągłodennej zawierającej wytłoki owocowe (50 g). Dalsze etapy procesu prowadzono analogicznie do procedury opisanej we wcześniejszym akapicie.

Przygotowanie membrany dializacyjnej

Membranę przycięto do długości ok. 15 cm. Polimer umieszczono w naczyniu z wodą dejonizowaną z dodatkiem EDTA, wykazującym właściwości chelatujące wobec dwuwartościowych jonów metali, a następnie podniesiono temperaturę układu do ok. 60°C i utrzymywano ją przez ok. 10 min, regularnie mieszając przy użyciu plastikowej łyżki. Membranę płukano trzykrotnie w świeżych porcjach wody ogrzanej do 60°C (po 5 min). Po końcowym przepłukaniu membranę przechowywano w lodówce w wodzie dejonizowanej z dodatkiem metanolu. Proces miał na celu oczyszczenie celulozowej membrany dializacyjnej ze środków konserwujących stosowanych przez producenta, a tym samym usprawnienie samego procesu dializy.

Przygotowanie roztworów preparatów roślinnych

Roztwory próbek roślinnych przygotowywano poprzez rozpuszczenie odważki w wodzie dejonizowanej do zadanego stężenia końcowego. Próbkę mieszano przez ok. 12 h, okresowo podnosząc temperaturę układu i kontrolując jej wartość. W przypadku niepełnego rozpuszczenia stosowano dodatkowy czynnik fizyczny, jakim były ultradźwięki (3 cykle po 2 min).

Metody spektrofotometryczne w zakresie światła widzialnego i ultrafioletu (UV-Vis) – metody kolorymetryczne

Metoda fenolowo-siarczanowa – oznaczenie cukrów całkowitych [Dubois i in., 1956]

Krzywa wzorcowa

Krzywą wzorcową wykonano przy użyciu jako wzorca roztworu glukozy ($C=1$ mg/ml). W probówkach umieszczano kolejno 0 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 40 μ l, 80 μ l oraz 160 μ l roztworu glukozy, a następnie dopełniano wodą dejonizowaną do 1 ml. Probówki dokładnie mieszano, dodawano 2 krople fenolu (o stężeniu $C=9$ g/ml) oraz 2,5 ml stężonego kwasu siarkowego (VI), ponownie mieszano i inkubowano przez 20 min w RT. Pomiar absorpcji wykonywano przy długości fali $\lambda=490$ nm. Wykreślona krzywa wzorcowa posłużyła do wyznaczenia równania, które po uśrednieniu wykonanych powtórzeń, przyjęło postać $y=0,0118x$ ($R^2=0,9987$).

Próbka

Pomiar dla próbek roślinnych rozpoczynano od przygotowania roztworu o stężeniu 10 mg/ml, który następnie umieszczano w probówce (25 μ l) wraz z wodą dejonizowaną (975 μ l). Po dokładnym wymieszaniu dodawano 2 krople fenolu oraz 2,5 ml stężonego kwasu siarkowego (VI), ponownie mieszano i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 20 min. Pomiar absorpcji wykonywano przy długości fali $\lambda=490$ nm. Kontrolę stanowiła woda (975 μ l) wraz z roztworem próbki (25 μ l) oraz stężony kwas siarkowy (VI), nie dodawano do układu fenolu. Do obliczenia stężenia cukrów (μ g/ml) wykorzystano współczynnik a pozyskany z krzywej wzorcowej ($C=Abs/a$). Udział procentowy cukrów całkowitych obliczono na podstawie proporcji, przyjmując, że stężenie 250 μ g/ml odpowiada 100%. Analizę każdego z badanych produktów wykonywano w minimum 3 powtórzeniach. Do obliczeń wprowadzono wskaźnik korekty, wyznaczony niezależnie dla każdego surowca roślinnego.

Metoda *m*-hydroksybifenylowa – oznaczenie kwasów uronowych [Blumenkrantz i Asboe-Hansen, 1973]

Krzywa wzorcowa

Substancję wzorcową stanowił 1 mM roztwór kwasu galakturonowego (GalA). Krzywą kalibracyjną wykonano poprzez przygotowanie szeregu roztworów substancji wzorcowej o kolejnych stężeniach: 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48 μ g/ml. Do każdej probówki dodawano 3 ml 0,0125 M roztworu boraksu w stężonym H_2SO_4 , mieszano, chłodzono w łaźni lodowej, a następnie inkubowano przez 5 min w 100°C. Po ponownym schłodzeniu dodawano 50 μ l roztworu *m*-hydroksybifenylu (0,15% roztwór HDP w 0,5% NaOH), mieszano i inkubowano przez 30 min w RT. Pomiar absorpcji wykonywano przy długości fali $\lambda=520$ nm. Wykres zależności absorpcji od stężenia kwasów uronowych przedstawiono w postaci krzywej wzorcowej, która po uśrednieniu przyjęła równanie $y=0,0122x$ ($R^2=0,9999$).

Próbka

Wodne roztwory preparatów roślinnych w stężeniu 1 mg/ml posłużyły do przygotowania dwóch rozcieńczeń każdego z badanych produktów – 80 μ g/ml (A) oraz 120 μ g/ml (B, kontrola). Każdorazowo objętość w probówce była równa 500 μ l. Do każdej probówki dodawano 3 ml roztworu boraksu, mieszano, chłodzono w łaźni lodowej i inkubowano w 100°C przez 5 min. W kolejnym kroku próbki chłodzono, dodawano 50 μ l roztworu *m*-HDP (próbki A, B), przy czym w przypadku próbki kontrolnej stosowano 0,5% wodny roztwór NaOH. Zawartość próbek po wymieszaniu inkubowano przez 30 min w RT. Pomiar absorpcji wykonywano przy długości fali $\lambda=520$ nm. Stężenie kwasów uronowych (μ g/ml) obliczono z wykorzystaniem współczynnika a wyznaczonego z krzywej wzorcowej ($C=Abs/a$). Procentowy udział UA określono na podstawie proporcji, przyjmując, że stężenie 80 μ g/ml (próbki A) lub 120 μ g/ml (próbki B) odpowiada 100%. Wyniki dla próbek A i B uśredniono. Analizę każdego z badanych produktów wykonywano w co najmniej 3 powtórzeniach.

Metoda zmodyfikowana stosowana do analizy eluatów IEC

Kolejne eluaty uzyskane na drodze chromatografii jonowymiennej zostały przeniesione do próbek (50 μ l) oraz 4-krotnie rozcieńczone wodą dejonizowaną. Do każdej probówki dodawano 1,2 ml 0,0125 M roztworu boraksu w stężonym H_2SO_4 , mieszano, chłodzono w łaźni lodowej, a następnie inkubowano przez

5 min w 100°C. W kolejnym kroku próbki ponownie chłodzono, dodawano 20 µl roztworu *m*-hydroksybifenylu (0,15% roztwór HDP w 0,5% NaOH), dokładnie mieszano i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 30 min. Pomiary absorbancji wykonywano przy długości fali $\lambda=520$ nm.

Metoda Folin-Ciocalteu – oznaczenie związków polifenolowych [Singleton i Rossi, 1965]

Krzywa wzorcowa

Substancję wzorcową stanowił roztwór kwasu galusowego w metanolu oraz wodzie ($C = 5$ mg/ml). Stosując roztwór wyjściowy przygotowano szereg roztworów do krzywej kalibracyjnej, której stężenia były równe odpowiednio 0, 50, 100, 150, 250 oraz 500 µg/ml. Następnie do probówek przeniesiono po 20 µl wykonanych rozcieńczeń kwasu galusowego, dodano 1,58 ml wody dejonizowanej oraz 100 µl odczynnika Folin'a – Ciocalteu. Probówki wymieszano i pozostawiono z temperaturze pokojowej na 5 min. Po tym czasie, do każdej probówki wprowadzono po 300 µl 25% wodnego roztworu węgla sodu. Probówki wymieszano i inkubowano w 40°C przez 30 minut. Pomiary absorbancji wykonywano przy długości fali $\lambda=765$ nm. Wykres zależności absorbancji od stężenia polifenoli opisuje krzywa wzorcowa, która po uśrednieniu przyjęła postać $y=0,001x$ ($R^2=0,9982$).

Próbka

Stężenie roztworów wodnych preparatów roślinnych było równe 1 mg/ml. Do probówek przeniesiono po 20 µl badanej próbki, dodano 1,58 ml wody dejonizowanej oraz 100 µl odczynnika Folin'a – Ciocalteu. Probówki wymieszano i pozostawiono z temperaturze pokojowej na 5 min. Następnie, do każdej probówki wprowadzono po 300 µl roztworu węgla sodu, wymieszano i przeprowadzono inkubację w 40°C przez 30 minut. Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda=765$ nm. Kontrolę stanowiła próbka zawierająca badany preparat roślinny, natomiast odczynnik Folin'a – Ciocalteu został zastąpiony wodą dejonizowaną. Ilość polifenoli wyrażono jako procent wagowy. Analizę każdego z badanych produktów wykonywano w co najmniej 3 powtórzeniach.

Metoda Lowry'ego – oznaczenie białek [Lowry i in., 1951]

roztwór A – wodny roztwór 0,05% $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ w 2% Na_2CO_3 w 0,1 M NaOH

roztwór B – wodny roztwór 0,1% CuSO_4

roztwór C – 45 ml roztworu A + 5 ml roztworu B, przygotowany bezpośrednio przed analizą

roztwór D - odczynnik Folina-Ciocalteu/woda - 1:1,6 (v/v)

roztwór E - albumina surowicy bydlęcej, $C=100$ µg/ml

Krzywa wzorcowa

Ilość białka w próbkach roślinnych wyznaczono na podstawie krzywej kalibracyjnej, do której sporządzenia wykorzystano roztwory BSA o kolejnych stężeniach: 0, 2, 4, 6, 8, 10 µg/ml. Do przygotowania stężeń BSA wykorzystano odczynnik C. Probki dokładnie wymieszano i pozostawiono na 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie do każdej probówki dodano 500 µl odczynnika D, dokładnie wymieszano i inkubowano przez 30 min. Pomiary absorbancji wykonywano przy długości fali $\lambda=750$ nm. Wykres zależności absorbancji od stężenia białek opisuje wzór krzywej wzorcowej, która po uśrednieniu przyjęła postać $y=0,0179x$ ($R^2=0,9995$).

Próbka

Do 5 ml roztworu C dodano 100 µl badanego preparatu roślinnego o stężeniu 1 mg/ml. Probki dokładnie wymieszano i pozostawiono na 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 500 µl odczynnika D, przy czym w kontroli zastąpiono reagent wodą dejonizowaną. Probka kontrolna zawierała preparat roślinny. Inkubację prowadzono przez 30 min w temperaturze pokojowej. Pomiary absorbancji wykonywano przy długości fali $\lambda=750$ nm. Udział procentowy białek obliczono na podstawie proporcji, przyjmując, że stężenie 100 µg/ml odpowiada 100%. Analizę każdego z badanych produktów wykonywano w minimum 3 powtórzeniach.

Metoda zmodyfikowana stosowana do analizy eluatów IEC

Analizę przeprowadzono na mikropłytkę 96-dołkowej zgodnie z opisaną procedurą, stosując objętości zredukowane 20-krotnie.

Optimalizacja procesu ekstrakcji

Optymalizację ekstrakcji pektyn z wyłoków czarnej porzeczki z wykorzystaniem NADES przeprowadzono z zastosowaniem metodologii planowania eksperymentów (ang. *Design of Experiment*, DoE) oraz analizy powierzchni odpowiedzi (ang. *Response Surface Methodology*, RSM). Zastosowano plan I-optimal obejmujący trzy czynniki numeryczne: (X_1) liczba moli chlorku choliny w NADES, (X_2) liczba moli kwasu cytrynowego w NADES oraz (X_3) czas trwania procesu ekstrakcji. Każdą ze zmiennych niezależnych analizowano na trzech poziomach (X_1 : 1-2; X_2 : 1-3; X_3 : 4-6 h). Wygenerowany plan obejmował 18 eksperymentów, których wyniki oceniono względem czterech odpowiedzi układu. Dla każdego przypadku dopasowano model powierzchni odpowiedzi i przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA). Przydatność oraz stopień dopasowania modeli oceniono na podstawie istotności statystycznej modelu (p), współczynnika determinacji R^2 , skorygowanego R^2 (adj. R^2) oraz wartości wskaźnika testu adekwatności. Optymalizację przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Design® Expert (wersja 13.0.5.0, Stat-Ease Inc., USA).

Frakcjonowanie na drodze chromatografii jonowymiennej (ang. Ion Exchange Chromatography, IEC)

Chromatografię jonowymienną przeprowadzono przy użyciu żelu DEAE-Sephadex (Sigma-Aldrich) oraz DEAE-Sephadex A50 (Cytiva).

Przygotowanie złoża:

- DEAE-Sephadex (Sigma-Aldrich): suche złoże (ok. 15 g) umieszczono w wodzie dejonizowanej na 1 h w RT, mieszając okresowo szklaną bagietką. Żel kondycjonowano kolejno 0,1 M roztworem HCl (30 min, RT) oraz 0,1 M NaOH (30 min, RT, okresowe mieszanie). Po każdym etapie żel odmywano poprzez kolejne wymiany porcji rozpuszczalnika (woda dejonizowana), do momentu uzyskania odczynu obojętnego.
- DEAE-Sephadex A50 (Cytiva): suche złoże (ok. 15 g) umieszczono w 0,2 M roztworze NaCl w celu spęcznienia przez 48 h w RT, mieszając okresowo szklaną bagietką. Następnie odmyto nadmiar soli poprzez 3-krotne przemycie wodą dejonizowaną. Żel przechowywano w lodówce z dodatkiem alkoholu etylowego jako środka bakteriostatycznego.

Kolumnę chromatograficzną (5 cm x 50 cm) wypełniono złożem do wysokości ok. 35 cm, uprzednio umieszczając na jej dnie sączonej filtracyjny oraz ok. 1 cm warstwę waty. Roztwór produktu roślinnego przygotowywano poprzez rozpuszczenie ok. 500 mg preparatu w roztworze NaOH o stężeniu 0,05 M, uzyskując ostateczne stężenie preparatu równe 10 mg/ml. Roztwór nanoszono na złoże stopniowo. Wstępną elucję wykonano przy użyciu 1500 ml wody dejonizowanej (F0). Następnie zastosowano wodne roztwory NaCl o kolejnych stężeniach: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7; 0,8; 1,0 i 1,2 M (po 150 ml każdy). W ostatnim etapie kolumnę przemywano 500 ml roztworu NaOH o stężeniu 0,1 M. Eluat zbierano w probówkach po 7,5 ml z wykorzystaniem kolektora frakcji (Gilson FC 203B). Prędkość przepływu podczas etapu sorpcji wynosiła około 0,5 ml/min, natomiast w trakcie elucji gradientowej stopniowo zwiększano ją do 2,5 ml/min.

Opracowano profile związków polifenolowych (pomiar absorpcji przy 288 nm) oraz kwasów uronowych (metoda *m*-hydroksybifenylowa zmodyfikowana na potrzeby IEC) przy użyciu czytnika mikroplamki SPECTROstar Nano (BMG Labtech). Na ich podstawie wyodrębniono kolejne frakcje F1, F2 itp. Frakcja 0 (F0), uzyskana bezpośrednio po załadowaniu produktu na kolumnę, oraz końcowa frakcja (F NaOH) zobojętniono 0,1 M roztworem HCl, a następnie zagęszczono. Następnie wszystkie frakcje poddano dializie w celu usunięcia NaCl, stosując membranę Spectra/Por® o granicy odcięcia cząsteczek (MWCO) 12–14 kDa (Spectrum Labs). Po zakończeniu procesu frakcje odparowano do sucha oraz przeprowadzono ich charakterystykę chemiczną z wykorzystaniem metod kolorymetrycznych (oznaczenie cukrów całkowitych, kwasów uronowych, związków polifenolowych oraz białek).

Chromatografia kolumnowa LH-20

Jednorodność wybranych frakcji produktów roślinnych oceniano z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej wypełnionej żelem Sephadex LH-20 (13 mm × 30 cm), stosując mieszaninę CH₃OH/H₂O (1:3, v/v) jako eluent. Złoże przygotowano przez odważenie 10 g suchego materiału oraz pozostawienie go do pęcznienia w wodzie dejonizowanej w temperaturze pokojowej przez ok. 2 h,

mieszając okresowo szklaną bagietką. Następnie kolumnę wypełniono złożem i przemywano trzema objętościami docelowego eluentu. Próbkę roślinną dokładnie rozpuszczono w wodzie dejonizowanej (15 mg próbki w 500 μ l H₂O) i przefiltrowano przez filtr strzykawkowy (0,45 μ m) w celu usunięcia cząstek stałych. Eluaty zbierano w probówkach po 1 ml przy użyciu kolektora frakcji Gilson FC 203B, przy przepływie 1 ml/min. Uzyskane frakcje poddano analizie spektrofotometrycznej w celu oznaczenia cukrów (metoda fenolowo-siarczanowa), związków polifenolowych (pomiar przy λ = 288 nm) oraz białek (metoda Lowry'ego).

Chromatografia podziałowa HPLC-SEC (ang. High-Performance Size-Exclusion Chromatography)

Preparaty roślinne (ok. 5 mg) rozpuszczono w 500 μ l 0,1 M roztworu NaNO₃ przy wykorzystaniu mieszadła magnetycznego z możliwością podgrzewania. Bezpośrednio przed analizą próbki przefiltrowano na filtrze strzykawkowym (45 μ m). Analizę metodą wysokosprawnej chromatografii wykluczania (GPC/SEC) przeprowadziłam przy użyciu systemu Agilent 1260 Infinity GPC/SEC (Agilent Technologies, USA) wyposażonego w detektory DAD i RI. Zastosowano dwie kolumny chromatograficzne HEMA-BIO 300 i HEMA-BIO 1000 (8 $\times$ 250 mm, Tessek, Czechy), połączone szeregowo. Fazę ruchomą stanowił roztwór 0,1 M NaNO₃. Do kalibracji użyto zestawu dekstranów (American Polymer Standard Corporation, Mentor, OH, USA) o masach cząsteczkowych 0,5; 5,2; 25,5; 72,7; 158,1; 344,8; 759,4 i 1360,0 kg·mol⁻¹ (wzór krzywej wzorcowej: $y = -0,0023x^2 - 0,0553x + 8,9682$; $R^2 = 0,9977$). Do analizy uzyskanych danych zastosowano dedykowane oprogramowanie Cirrus GPC/SEC 3.4.1. Procedura została przeprowadzona we współpracy z zaprzyjaźnionym ośrodkiem naukowym – Instytutu Chemii Słowackiej Akademii Nauk, Bratysława, Słowacja.

Spektroskopia ATR-FTIR

Widma FTIR-ATR zarejestrowano przy użyciu spektrometru Nicolet iS50 FTIR (Thermo Fisher Scientific, USA) wyposażonego w detektor DTGS i sterowanego za pomocą oprogramowania Omnic 9.0 (Thermo Scientific). Zakres widm wynosił 4000 do 400 cm⁻¹ przy rozdzielczości 4 cm⁻¹, dla każdej próbki wykonując 128 skanów. Do pomiarów próbek w stanie stałym zastosowano przystawkę Smart Orbit ATR z kryształem diamentowym. Analizy wykonano w Instytucie Chemii Słowackiej Akademii Nauk, Bratysława, Słowacja. Pomiary wybranych próbek (preparaty uzyskane na drodze ekstrakcji w wodzie oraz kwasie cytrynowym z wyłoków owoców maliny, truskawki oraz rokitnika) zostały wykonane na urządzeniu IRSpirit (Shimadzu) z przystawką ATR, przy zachowaniu niezmiennych wartości parametrów pomiarowych.

Uzyskane widma wykorzystano do oznaczenia stopnia estryfikacji (DE) pektyn, w oparciu o zależność między stosunkiem intensywności pasma przy ok. 1740 cm⁻¹, odpowiadającemu estryfikowanym grupom karbonylowym, a sumą intensywności pasm przy 1740 cm⁻¹ i 1600 cm⁻¹, przypisywanym odpowiednio grupom estrowym oraz anionom karboksylowym [Kiomugasho i in., 2015].

Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas GC-MS – analiza acetylowanych alditolowych pochodnych cukrów

Analiza preparatów roślinnych

Ilość kwasów uronowych (UA) oraz skład monosacharydowy wybranych produktów oraz ich frakcji analizowano zgodnie z protokołem Pettolino i in. (2012).

Procedurę podwójnej redukcji, umożliwiającą oznaczenie kwasów uronowych, rozpoczęto od odważenia do próbki Schott'a z teflonową zakrętką ok. 5 mg próbki, którą poddano reakcji z 800 μ l karbodiimidu o stężeniu 500 mg/ml, buforem MES (400 μ l; 0,2 M) i wodą (2 ml), w 30 °C przez 3 h. Dodano 2 ml 4 M r-ru imidazolu, a następnie, podczas inkubacji w lodzie, stopniowo wprowadzano 4 ml NaBH₄ (70 mg/ml). Reagent wymagał dodawania kroplami ze względu na gwałtowny charakter reakcji redukcji grup karboksylowych do hydroksylowych. próbki inkubowano przez noc w RT. Po zakończeniu redukcji próbki zakwaszono poprzez dodanie 2 ml lodowatego kwasu octowego w celu usunięcia nadmiaru NaBH₄. Następnie poddano je dializie wobec wody dejonizowanej (MWCO 12400 Da) i odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Ostatecznie próbki przemyto 3-krotnie metanolem w celu usunięcia resztek wilgoci oraz związków boranowych.

Drugi etap przygotowania próbek obejmował procedurę umożliwiającą określenie składu monosacharydowego badanych preparatów. Na tym etapie wykorzystano zarówno osady uzyskane w wyniku działań opisanych w poprzednim paragrafie, jak i nowe naważki produktów (~5 mg). Każda z próbek została poddana hydrolizie w 2,5 M TFA w 121°C przez 5 h. Po odwirowaniu supernatant odparowano pod ciśnieniem do sucha, przemywając na koniec kilkukrotnie metanolem. Redukcję przeprowadzono przy wykorzystaniu 100 µl 1 M NaBH₄ przygotowanego w 2 M roztworze NH₄OH oraz 100 µl 2 M NH₄OH (inkubacja w 40°C przez 90 min). Nadmiar reduktora usunięto za pomocą kationitu Dowex® 50WX8, który następnie oddzielono poprzez filtrację grawitacyjną. Próbkę odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, na koniec przemywając kilkukrotnie metanolem. W ostatnim etapie uzyskane osady przekształcono do formy lotnej poprzez poddanie ich acetylacji bezwodnikiem octowym w obecności pirydyny. Otrzymane pochodne ekstrahowano dichlorometanem (DCM), a frakcję organiczną oczyszczano poprzez wymianę porcji wody. Frakcję organiczną wysuszono z wykorzystaniem środka suszącego (bezwodny Na₂SO₄) w celu usunięcia resztkowej wody. Środek oddzielono poprzez zastosowanie filtracji grawitacyjnej, a przesącz odparowano pod ciśnieniem do sucha, kilkukrotnie przepłukując metanolem, nie przekraczając 40°C. Uzyskane osady rozpuszczano bezpośrednio przed analizą w 1 ml DCM.

Analizę GC-MS przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Trace GC Ultra, sprzężonego ze spektrometrem mas ITQ 700 z detektorem pułapki jonowej kwadropolowej, na kolumnie RTX®-2330 (0,25 mm × 30 m). Na kolumnę wprowadzano 1 µl próbki w trybie *splitless*. Gazem nośnym był hel (przepływ 1 ml/min). Temperatura dozownika i pieca chromatograficznego wynosiła 240°C, a program temperaturowy przewidywał wzrost z 170 do 240°C z szybkością 2–3°C/min, z końcowym utrzymaniem temperatury 240°C przez 10 min. Dane analizowano z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania Xcalibur (Thermo Scientific). Porównanie chromatogramów uzyskanych dla próbek poddanych pojedynczej i podwójnej redukcji oraz wynikająca z nich różnica w intensywności sygnału odpowiadającego Gal stanowiły podstawę do wyznaczenia udziału GalA.

Przygotowanie monosacharydów wzorcowych - analiza acetylowanych alditolowych pochodnych

Do próbki Schotta odważono po ok. 2 mg monosacharydów wzorcowych: ramnoza (Rha), fukoza (Fuc), ryboza (Rib), arabinoza (Ara), ksyloza (Xyl), mannoza (Man), galaktoza (Gal), glukoza (Glc). Monosacharydy przekształcono do lotnych pochodnych alditolowych poprzez redukcję z wykorzystaniem NaBH₄ w środowisku NH₄OH, a następnie acetylację bezwodnikiem octowym w obecności pirydyny, zgodnie z procedurą stosowaną do analizy preparatów roślinnych. Kolejne etapy przygotowania próbki prowadzono analogicznie do opisanych wcześniej. Wysuszone próbki rozpuszczano w 1 ml DCM i analizowano zgodnie z przedstawioną powyżej metodą. Uzyskane czasy retencji (ang. *retention time*) stanowiły odniesienie do identyfikacji pików obserwowanych na chromatogramach próbek roślinnych. Analiza widm masowych umożliwiła dodatkową weryfikację identyfikacji monosacharydów.

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego NMR

Preparat roślinny (~10 mg) dokładnie rozpuszczano w 1000 µl D₂O poprzez pozostawienie na mieszkadle magnetycznym z opcją grzania przez ok. 6 h. Następnie roztwór przenoszono do szklanej próbki NMR o średnicy 3 mm. Widma NMR ¹H oraz dwuwymiarowe widma korelacyjne ¹H-¹³C HSQC, HSQC-TOCSY i HMBC o wysokiej rozdzielczości zarejestrowano przy użyciu spektrometru Bruker AVANCE III HD 400 MHz wyposażonego w sondę Prodigy. Przesunięcia chemiczne odniesiono do sygnałów acetonu (2,22/31,07 ppm). Pomiary wykonano w temperaturze 298 K (25°C). Procedura została przeprowadzona we współpracy z naukowcami z zaprzyjaźnionego ośrodka naukowego – Słowackiej Akademii Nauk, Bratysława, Słowacja. Analiza oraz interpretacja wyników są wynikiem pracy dr Zuzany Košťálová.

Ocena wizualna produktów roślinnych pod mikroskopem optycznym

Obserwację produktów optymalnych (38), (M2), (T3) oraz (R2), a także frakcji pektynowych (38-F1), (M2-F1), (T3-F1) oraz (R2-F1) przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopu optycznego Achios X Observer (Zeiss, Niemcy) wyposażonym w kamerę cyfrową CMEX-18 PRO wraz z oprogramowaniem

Image Focus Alpha. Preparaty poddane obserwacji rozdrobiono w moździerz agatowym. Niewielką ilość suchego materiału roślinnego przeniesiono na szkiełko podstawowe, a następnie przeprowadzono ocenę wizualną przy powiększeniu 4 – 40x, wykorzystując zarówno światło przechodzące, jak i dodatkowe oświetlenie zewnętrzne w postaci lampy laboratoryjnej.

Skaningowy mikroskopia elektronowa ze Spektrometrią Rentgenowskiej Dyspersji Energii (SEM-EDS)

Próbki roślinne w stanie stałym, uprzednio rozdrobione w moździerz agatowym, naniesiono na dwustronną taśmę węglową. Morfologię próbek analizowano przy użyciu mikroskopu skaningowego JSM-6601LV (JEOL, Tokio, Japonia), przy napięciu przyspieszającym 15 kV, w wysokiej próżni, w odległości roboczej 10–11 mm od źródła jonów. Urządzenie zostało wyposażone w przystawkę do badania materiałów z wykorzystaniem spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (Oxford Aztec Energy, Oxford, UK). Dane mikroskopowe wykorzystane w rozprawie doktorskiej zostały zebrane przez Panią dr inż. Martę Tsirigotis-Maniecką.

6. LITERATURA

- Abbott, A.P., Capper, G., Davies, D.I., Rasheed, R.K., Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.*, 70-71.
- Adhav, V.A., Saikrishnan, K. (2023). The Realm of Unconventional Noncovalent Interactions in Proteins: Their Significance in Structure and Function. *ACS Omega*, 8, 22268–22284. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00205>.
- Al-Risheq, D.I.M., Nasser, M.S., Qiblawey, H., Ba-Abbad, M.M., Benamor, A., Hussein, I.A. (2021). Destabilization of stable bentonite colloidal suspension using choline chloride based deep eutectic solvent: Optimization study. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101885. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101885>.
- Alba, K., MacNaughtan, W., Laws, A.P., Foster, T.J., Campbell, G.M., Kontogiorgos, V. (2018). Fractionation and characterisation of dietary fibre from blackcurrant pomace. *Food hydrocolloids*, 81, 398-408, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.023>.
- Alcade, R., Gutiérrez, A., Atilhan, M., Aparicio, S. (2019). An experimental and theoretical investigation of the physicochemical properties on choline chloride – Lactic acid based natural deep eutectic solvent (NADES). *Journal of Molecular Liquids*, 290, 110916; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.110916>.
- Ali, A., Zhang, N., Santos, R.M. (2023a). Mineral Characterization Using Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review of the Fundamentals, Advancements, and Research Directions. *Applied Sciences*, 13, 12600. DOI: <https://doi.org/10.3390/app132312600>.
- Ali, M.A., Kaum, A., Uddin, S.N., Uddin, J., Olawuyi, O., Campbell, A.D., Saint-Louis, C.J., Halim, M.A. (2023). Elucidating the Structure, Dynamics, and Interaction of a Choline Chloride and Citric Acid Based Eutectic System by Spectroscopic and Molecular Modeling Investigations. *ACS Omega*, 8, 38243–38251. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04570>.
- Alreshidi, M.A., Yadav, K.K., Gunasekaran, Sh., Gacem, A., Sambandam, P., Subbiah, G., Bhutto, J.K., Palanivel, S., Fallatah, A.M., El-Khair, M.A.A., Almalawi, J.F., Alam, M.W., Perumal, T., Annadurai, S. (2025). A review on the evolution of ionic liquids: Sustainable synthesis, applications, and future prospects. *Materials Today Sustainability*, 31, 101160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2025.101160>.
- Aravena, P., Cea-Klapp, E., Gajardo-Parra, N.F., Held, Ch., Garrido, J.M., Canales, R.I. (2023). Effect of water and hydrogen bond acceptor on the density and viscosity of glycol-based eutectic solvents, *Journal of Molecular Liquids*, 289, 122856. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122856>.
- Arumuganainar, D.G., Ramesh, D.L., Pandurangan, P., Sunkar, S., Abraham, S., Samrot, A.V., Sainandhini, R., Thirumurugan, A., Moovendhan, M. (2025). Sustainable pectin extraction: Navigating industrial challenges and opportunities with fruit by-products – A review. *Process Biochemistry*, 154, 234-245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.04.025>.
- Assifaoui, A. (2025). Exploring Pectin: From Extraction Challenges to Pharmaceutical Applications. *Natural Built Social Environment Health*, 1(4), 121-158. DOI: <https://doi.org/10.63095/NBSEH.25.010299>.
- Azzouzi, H., Elhajji, L., Achchoub, M., Salmaoui, S., Ammadi, A., Harrak, H., Touzani, R., Noutfia, Y., Elfazazi, K. (2023). Moroccan Citrus clementina Peels: Optimization of Pectin Extraction and Determination of Chemical and Functional Properties. *Plants*, 12, 3417. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12193417>.
- Bai, Y., Zhang, X.-F., Wu, Y., Liu, H., Yao, J. (2024). Deep eutectic solvent-based eutectogels consisting of ZnCl₂ and lignin for quasi-solid-state supercapacitors. *Journal of Materials Chemistry A*, 12, 28307. DOI: 10.1039/d4ta04960h
- Bal, L.M., Meda, V., Naik, S.N., Satya, S. (2011). Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals. *Food Research International*, 44, 1718-1727. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.002>.
- Balan, V., Mihai, C.T., Cojocaru, F.D., Uritu, C.M., Dodi, G., Botezat, D., Gardikiotis, I. (2019). Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials*, 12, 2884. DOI: [doi:10.3390/ma12182884](https://doi.org/10.3390/ma12182884).
- Bao, X., Wang, W., Song, S., Wei, Ch., Li, Y., Sun, Y., Jiang, J. (2024). Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Hippophae rhamnoides* L. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18, 688-697. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02193-z>.
- Baranowska, A., Mystkowska, I., Zarzecka, K., Gugala, M. (2017). Cenne owoce maliny właściwej (*Fructus Rubi idaei*). *Herbalism*, 1,3, 70-79. (dostęp online: <https://apcz.umk.pl/HERB/article/view/35709/30024>).

- Baranowska, A., Radwańska, K., Zarzecka, K., Gugala, M., Mystkowska, I. (2015). Właściwości prozdrowotne owoców maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.). Probl Hig Epidemiol, 96, 2, 406-409. (dostęp online: <http://phie.pl/pdf/phe-2015/phe-2015-2-406.pdf>).
- Barbosa, J.R., Gonçalves, M.A., da Silva Martins, L.H., de Fátima Henriques Lourenço, L. (2025). Citric Acid Cross-Linked Gelatin/Pectin Coatings Increase Shelf Life of Ripe Grapes. Coatings, 15, 129. DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings15020129>.
- Barrera-Chamorro, L., Fernandez-Prior, A., Rivero-Pino, F., Montserrat-de la Paz, S. (2025). A comprehensive review on the functionality and biological relevance of pectin and the use in the food industry. Carbohydrate Polymers, 348, 122794. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122794>.
- Bélafi-Bakó, K., Cserjési, P., Beszédes, S., Csanádi, Z., Hodúr, C. (2012). Berry Pectins: Microwave-Assisted Extraction and Rheological Properties, Food Bioprocess Technol, 5, 1100-1105. DOI: DOI 10.1007/s11947-011-0592-9.
- Belkheiri, A., Forouhar, A., Ursu, A.V., Dubessay, P., Pierre, G., Delattre, C., Djelveh, G., Abdelkafi, S., Hamdami, N., Michaud, P. (2021). Extraction, Characterization, and Applications of Pectins from Plant By-Products. Applied Sciences, 11,6596. DOI: <https://doi.org/10.3390/app11146596>.
- Bermúdez-Oria, A., Fernández-Prior, A., Castejón, M.L., Rodríguez-Gutiérrez, G., Fernández-Bolaños, J. (2023). Extraction of polyphenols associated with pectin from olive waste (alperujo) with choline chloride. Food Chemistry, 419, 136073; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136073>.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76, 965-977. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. Analytical Biochemistry, 54(2), 484-489, DOI: 10.1016/0003-2697(73)90377-1.
- Bodunwa, O.K., Adewole, A.I. (2022). A- and D-optimal Designs In Real Life Data Using Imperialist Comparative Algorithm. Ghana J.Sci. 63, 2, 12-20. DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/gjs.v63i.2>.
- Box, G.E.P., Wilson, K.B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. Journal of the Royal Statistical Society, 13, 1. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x>.
- Bu, X., Xu, Y., Zhao, M., Li, D., Zou, J., Wang, L., Bai, J., Yang, Y. (2021). Simultaneous extraction of polysaccharides and polyphenols from blackcurrant fruits: Comparison between response surface methodology and artificial neural networks. Industrial Crops and Products, 170; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113682>.
- Canteri-Schemin, M.H., Fertonami, H.C.R., Waszczynskyj, N., Wosiacki, G. (2005). Extraction of Pectin from Apple Pomace. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48, 2, 259-266. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000200013>.
- Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., Fang, Y. (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. Carbohydrate Polymers, 242,116389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116389>.
- Capek, P., Uhliariková, I., Košťálová, Z. (2025). Fractionation of the antioxidant (poly)phenol-polysaccharide-protein complex extracted with ammonia from wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruits: structural features of the fractions obtained. Carbohydrate Research. 550, 109403; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2025.109403>.
- Chaitanya, M.V.N.L., Alhasso, B., Alkhazali, W.H., bishoyi, A.K., Oweis, R., Jyothi, S.R., Kalia, R., Maharana, L., Chauhan, A.S., Sameer, H.N., Yaseen, A., Athab, Z.H., Adil, M., Narmani, A., Farhood, B. (2026). Recent Progressions in Applications of Bioactive Polysaccharides in Food and Health Sciences: A Comprehensive Review. Food Science & Nutrition, 14:e71482. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.71482>.
- Chan, S.Y., Choo, W.S., Young, D.J., Loh, X.J. (2017). Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. Carbohydrate Polymers, 161, 118-139. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.033>.
- Chandel, V., Biswas, D., Roy, S., Vaidya, D., Verma, A., Gupta, A. (2022). Current Advancements in Pectin: Extraction, Properties and Multifunctional Applications. Foods, 11, 2683. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11172683>.
- Chandrasekar, Ch.M., Carullo, D., Saitta, F., Krishnamachari, H., Bellesia, T., Nespoli, L., Caneva, E., Baschieri, C., Signorelli, M., Barbiroli, A.G., Fessas, D., Farris, S., Romano, D. (2024). Valorization of citrus peel industrial wastes for facile extraction of extractives, pectin, and cellulose nanocrystals through ultrasonication: An in-depth investigation, Carbohydrate Polymers, 344, 122539. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122539>.

- Chavda, D., Dutta, D., Patel, K.N., Rathod, A.K., Kulig, W., Manna, M. (2024). Revealing the key structural features promoting the helical conformation in algal polysaccharide carrageenan in solution. *Carbohydrate Polymers*, 331, 121901. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.121901>.
- Chen, M., Lahaye, M. (2021). Natural deep eutectic solvents pretreatment as an aid for pectin extraction from apple pomace. *Food Hydrocolloids*, 115, 106601. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106601>.
- Chen, M., Wang, H., Wu, X., Zhou, Y., Zhang, Q., Liu, Y., Li, J., Qin, W. (2025). Deep eutectic solvent-assisted aqueous extraction of pectin and essential oil from *Citrus reticulata* peel: Physicochemical characteristics and emulsifying properties. *Food Chemistry*, 495, 146432. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146432>.
- Chen, S., Xiao, L., Li, S., Meng, T., Wang, L., Zhang, W. (2022). The effect of sonication-synergistic natural deep eutectic solvents on extraction yield, structural and physicochemical properties of pectins extracted from mango peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 86, 106045. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106045>.
- Chen, Y., Wang, Y., Xu, L., Jia, Y., Xue, Z., Zhang, M., Phisalaphong, M., Chen, H. (2020). Ultrasound-assisted modified pectin from unripe fruit pomace of raspberry (*Rubus chingii* Hu): Structural characterization and antioxidant activities. *LWT*, 134, 110007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110007>.
- Chev  -Kools, E., Choi, Y.H., Roullier, C., Ruprich-Robert, G., Grougnet, R., Chapeland-Leclerc, F., Hollmann, F. (2025). Natural deep eutectic solvents (NaDES): green solvents for pharmaceutical applications and beyond. *Green Chemistry*, 27, 8360. DOI: <https://doi.org/10.1039/D4GC06386D>.
- Cho, E.H., Jung, H.T., Lee, B.H., Kim, H.S., Rhee, J.K., Yoo, S.H. (2019). Green process development for apple-peel pectin production by organic acid extraction. *Carbohydrate Polymers*, 204, 97-103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.086>.
- Choi, Y.H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I.W.C.E., Witkamp, G-J., Verpoorte, R. (2011). Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiology*, 156, 1701-1705.
- Ciesarov  , Z., Murkovic, M., Cejpek, K., Kreps, F., Tobolkov  , B., Kopl  k, R., Belajov  , E., Kukurov  , K., Da  sko, L., Panovsk  , Z., Revenco, D., Bur  ov  , Z. (2020). Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review. *Food Research International*, 133, 109170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109170>.
- COBORU. Centralny O  rodek Badania Odmian Ro  lin Uprawnionych, link: https://www.coboru.gov.pl/pl/kr/kr_odm?kodgatunku=MAJ (dost  p: 18.02.2026).
- Coetzer, R., Haines, L.M. (2017). The construction of D- and I-optimal designs for mixture experiments with linear constraints on the components. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 171, 112-124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.10.007>.
- Corovi  , M., Ivankovi  , A.P., Milivojevi  , A., Veljkovi  , M., Simovi  , M., López-Revenga, P., Montilla, A., Moreno, F.J., Bezbradica, D. (2024). Valorisation of Blackcurrant Pomace by Extraction of Pectin-Rich Fractions: Structural Characterization and Evaluation as Multifunctional Cosmetic Ingredient. *Polymers*, 16, 2779. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym16192779>.
- Csanadi, Z., Cserjesi, P., Nemestothy, N., Belafi-Bak  , K. (2012). Characterization of pectins from press residues of berries by FT-IR spectroscopy. *Acta Alimentaria*, 41, 1, 94-99. DOI: DOI: 10.1556/AAlim.41.2012.1.11.
- Cui, J., Zhai, Ch., Feng, L., Han, Y., Du, H., Xiao, H., Zheng, J. (2021). Pectins from fruits: Relationships between extraction methods, structural characteristics, and functional properties, *Trends in Food Science & Technology*, 110, 39-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.077>.
- Cui, Y., Chen, J., Zhang, Sh. (2023). The effect of degree of esterification of pectin on the interaction between pectin and wheat gluten protein. *Food Hydrocolloids*, 136, 108272. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108272>.
- D'Agostino, S., Cecchi, L., Khatib, M., Domizio, P., Zoccatelli, G., Civa, V., Mainente, F., Breschi, C., Ugolini, T., Meneguzzo, F., Zabini, F., Tagliavento, L., Mulinacci, N., Zanoni, B. (2024). 1H-NMR, HPSEC-RID, and HPAEC-PAD Characterization of Polysaccharides Extracted by Hydrodynamic Cavitation from Apple and Pomegranate By-Products for Their Valorization: A Focus on Pectin. *Processes*, 12, 2113. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr12102113>.
- D  browski, G., Czaplicki, S., Szustak, M., Cicho  nska, E., Gendaszewska-Darmach, E., Konopka, I. (2022). Composition of flesh lipids and oleosome yield optimization of selected sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars grown in Poland. *Food Chemistry*, 369, 130921. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130921>.

- Dai, Y., Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766,61-68. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.
- Dai, Y., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013). Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry*, 85, 6272-6278. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac400432p>.
- Dang, G., Li, J., Yin, Ch., Wang, W., Zhang, K., Zhong, R., Chen, L., Zhang, H., Schroyen, M. (2025). Deciphering Pectin: A Comprehensive Overview of Its Origins, Processing, and Promising Utility. *ACS Omega*, 10, 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c01843>.
- De Laet, E., Bernaerts, T., Morren, L., Vanmarcke, H., Van Loey, A.M. (2025). The Use of Different Cell Wall Degrading Enzymes for Pectin Extraction from Carrot Pomace, in Comparison to and in Combination with an Acid Extraction. *Foods*, 14, 435. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods14030435>.
- De Menezes, C.S.V., Sousa, A.C.C., Silva, L.M.A., Rodrigues, T.H.S., Brito, E.S, Ricardo, N.M.P.S. (2025). Extraction of cell wall pectins and hemicellulose from agro-industrial wastes: A sustainable alternative source. *Carbohydrate Polymers*, 347, 122769. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122769>.
- Demir, A.E., Mendy M. (2024). Microwave-assisted high-pressure CO₂-water extraction of pectin from baobab fruit (*Adansonia digitata* L): Effects on yield and characterization. *Microchemical Journal*, 207, 112250, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112250>.
- Diener, M., Adamcik, J., Sánchez-Ferrer, A., Jaedig, F., Schefer, L., Mezzenga, F. (2019). Primary, Secondary, Tertiary and Quaternary Structure Levels in Linear Polysaccharides: From Random Coil, to Single Helix to Supramolecular Assembly. *Biomacromolecules*, 20 1731-1739. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00087>.
- Dou, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Zhang, W., Duan, Q., Huang, Q., Zhang, B., Niu, H., Wang, L., & Zeng, S. (2025). Pectin-type polysaccharides from raspberry (*Rubus idaeus* L.): structure characterization and activity against DSS-induced colitis. *Carbohydrate Polymers*, 364, 123710. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123710>.
- Drusch, S., Eichhorn, M., Heinert, S., Weissbrodt, J., Morales-Medina, R. (2024). Review on the impact of the molecular structure of pectin on the associative phase separation with proteins. *Food Hydrocolloids*, 156, 110289. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110289>.
- Du, B., Nie, Sh., Peng, F., Yang, Y., Xu, B. (2022). A narrative review on conformational structure characterization of natural polysaccharides. *Food Frontiers*, 3, 631-64-. DOI: <https://doi.org/10.1002/fft2.150>.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-55. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Einhorn-Stoll, U. (2018). Pectin-water interactions in foods: From powder to gel. *Food Hydrocolloids*, 78, 109-119. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.029>.
- Ejaz, A., Waliat, S., Afzaal, M., Saeed, F., Ahman, A., Din, A., Ateeq, H., Asghar, A., Shah, Y.A., Rafi, A., Khan, M.R. (2023). Biological activities, therapeutic potential, and pharmacological aspects of blackcurrants (*Ribes nigrum* L): A comprehensive review. *Food Science & Nutrition*, 11:5799–5817. DOI: 10.1002/fsn3.3592.
- Elgharbawy, A.A.M., Hayyan, A., Hayyan, M., Mirghani, M.E.S., Salleh, H.M., Rashid, Sh.N., Ngoh, G.Ch., Liew, Sh.Q., Nor, M.R.M., bin Mohd Yusoff, M.Y.Z. Alias, Y. (2019). Natural Deep Eutectic Solvent-Assisted Pectin Extraction from Pomelo Peel Using Sonoreactor: Experimental Optimization Approach. *Processes*, 7, 416. DOI: [doi:10.3390/pr7070416](https://doi.org/10.3390/pr7070416).
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data> (dostęp: 10.02.2026)
- Farzaliyev, E.B., Golubev, V.N., Hafizov, G.K. (2022). Structure and properties of pectin substances of wild sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) growing in Azerbaijan, *BIO Web of Conferences*, 42, 01928. DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20224201028>.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration (FDA), SCOGS database– selected Committee on GRAS (Generally Recognized as safe) Substances; <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-substances-scogs-database>. (dostęp: 20.02.2026)
- Ferreira-Lazarte, A., Méndez-Albiñana, P., Villamiel, M. (2026). From waste to resource: a comparative study of pectin extraction methods for enhanced structural and functional properties. *European Food Research and Technology*, 252, 152. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-026-05075-y>.
- Fittolani, G., Seeberger, P.H., Delbianco, M. (2020). Helical polysaccharides. *Peptide Science*, 112:e24124. DOI: <https://doi.org/10.1002/pep2.24124>.

- FP. Farmakopea Polska VIII, Urząd rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa 2008, tom I.
- Freitas, C.M.P., Coimbra, J.S.R., Souza, V.G.L., Sousa, R.C.S. (2021). Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review. *Coatings*, 11, 922. DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings11080922>.
- Freitas, D.S., Ribeiro, A., Cavaco-Paulo, A., Silva, C. (2025). The Versatility of NADES Across Applications. *Molecules*, 30, 3862. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules30193862>.
- Fu, Y-L., Shi, L. (2024). Methods of study on conformation of polysaccharides from natural products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263, 130275. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130275>.
- Ghosh, K., Takahashi, D., & Kotake, T. (2023). Plant type II arabinogalactan: Structural features and modification to increase functionality. *Carbohydrate Research*, 529, 108828. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108828>.
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Battino, M. (2014). Strawberry and Human Health: Effects beyond Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 3867–3876. DOI: [dx.doi.org/10.1021/jf405455n](https://doi.org/10.1021/jf405455n).
- Golovchenko, V. V., Khlopin, V. A., Patova, O. A., Feltsinger, L. S., Bilan, M. I., Dmitrenok, A. S., & Shashkov, A. S. (2022). Pectin from leaves of birch (*Betula pendula* Roth.): Results of NMR experiments and hypothesis of the RG-I structure. *Carbohydrate Polymers*, 284, 119186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119186>.
- Grassino, A.N., Barba, F.J., Brnčić, M., Lorenzo, J.M., Lucini, L., Brnčić, S.Z. (2018). Analytical tools used for the identification and quantification of pectin extracted from plant food matrices, wastes and by-products: A review. *Food Chemistry*, 266, 47-55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.105>.
- Gu, J., Lin, L., Zhao, M. (2023). Demonstration of feasibility and effectiveness of deep eutectic solvent-water system extraction of RG-I type pectin from wolfberry based on target polysaccharide, solvent and their interactions. *Food Hydrocolloids*, 114, 109027. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109027>.
- Guo, H., Li, D., Miao, B., Feng, K., Chen, G., Gan, R., Kang, Z., Gao, H. (2025). Mild ultrasound-assisted alkali de-esterification modified pectins: Characterization and structure–activity relationships in immunomodulatory effects. *Ultrasonics Sonochemistry*, 112, 107215. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.107215>.
- Guo, R., Fan, R., Hu, J., Zhang, X., Han, L., Wang, M., He, C. (2024). Valorization of apple pomace: Structural and rheological characterization of low-Methoxyl Pectins extracted with green agents of citric acid/sodium citrate. *Food Chemistry*, X, 24, 102010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.102010>.
- Guolin, H., Jeffrey, S., Kai, Z., Xiaolan, G. (2012). Application of Ionic Liquids in the Microwave-Assisted Extraction of Pectin from Lemon Peels. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 302059. DOI: 10.1155/2012/302059.
- Gurev, A., Cesko, T., Dragancea, V., Ghendov-Mosanu, A., Pinte, A., Sturza, R. (2023). Ultrasound- and Microwave-Assisted Extraction of Pectin from Apple Pomace and Its Effect on the Quality of Fruit Bars. *Foods*, 12, 2773. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12142773>.
- GUS. Główny Urząd Statystyczny, Bank Danych Lokalnych. Rolnictwo. <https://bdl.stat.gov.pl/bdl/dane/podgrup/temat> (dostęp: 14.02.2026)
- Hadidi, M., Tarahi, M., McClemens, D.J., Aghababaei, F. (2025). Unlocking the potential of deep eutectic solvents for sustainable pectin extraction. *Carbohydrate Polymers*, 362, 123683. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123683>.
- Haque, A.H.M., Kabir, A., Ratemi, E., Elzagheid, M., Appu, S.P., Ghani, S.S., Sarief, A. (2025). Greener Pectin Extraction Techniques: Applications and Challenges. *Separations*, 12, 65. DOI: <https://doi.org/10.3390/separations12030065>.
- Hernandez-Hernandez, O., Ferreira-Lazarte, A., Tiwari, B., Villamiel, M. (2024). Update of high-intensity ultrasound applications for the extraction of pectin from agri-food by-products. *Trends in Analytical Chemistry*, 175, 117728. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117728>.
- Hilz, H. (2007). Characterisation of cell wall polysaccharides in bilberries and black currants. General introduction - PhD thesis Wageningen University, Netherlands.
- Hilz, H., Bakx, E.J., Schols, H.A., Voragen, A.G.J. (2005). Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries – characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate Polymers*, 59(4): 477-488. DOI: 10.1016/j.carbpol.2004.11.002.
- Hoel, H., de Carvalho, M.M., Fu, Y.P., Chan, E., Hamre, A.G., Sørnes, K., Petkowicz, C., Wangensteen, H., Inngjerdengen, K.T. (2026). Comprehensive structural characterization of pectin, arabinan and

- galactan from *Gentiana purpurea* L. roots and their immunostimulatory effects. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 14, 101117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2026.101117>.
- Hong, T., Yin, J.-Y., Nie, Sh.-P., Xie, M.-Y. (2021). Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective. *Food Chemistry*: X, 12, 100168. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100168>.
- Hosseini, S., Parastouei, K., Khodaiyan, F. (2020). Simultaneous extraction optimization and characterization of pectin and phenolics from sour cherry pomace. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 911-921. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.241>.
- Hotchkiss, A.T., Chaou, H.K., Strahan, G.D., Nunez, A., Harron, A., Simon, S., White, A.K., Dieng, S., heuberger, E.R., Black, I., Yadav, M.P., Welchhoff, M.A., Hirsch, J. (2024). Structural characterization of strawberry pomace. *Heliyon*, 10, e29787. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29787>.
- Houben, K., Jolie, R.P., Fraeye, I., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. (2011). Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 346, DOI: 10.1016/j.carres.2011.04.014.
- Hu, L., Wang, Ch., Bai, Y., Khalifa, I., Liang, X., Zhang, H., Jia, Y. (2025). Pectin–polyphenol interactions: a system with enhanced functionalities and bioavailabilities. *Food Chemistry*, 495, 146634. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146634>.
- Huamani-Palomino, R.G., Ramos, P., Oliveira, G., Kock, F.V.C., Venancio T., Cordova, B.M. (2025). Structural elucidation of pectin extracted from cocoa pod husk (*Theobroma Cacao* L.): Evaluation of the degree of esterification using FT-IR and ¹H NMR. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15, 2047-2061. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04082-3>.
- Huang, J., Guo, X., Xu, T., Fan, L., Zhou, X., Wu, Sh. (2019). Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products. *Journal of Chromatography A*, 1598, 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.046>.
- Huang, J., Liao, J., Qi, J., Jiang, W., Yang, X. (2021). Structural and physicochemical properties of pectin-rich dietary fiber prepared from citrus peel. *Food hydrocolloids*, 110, 106140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106140>.
- Hundie, K.B., Akuma, D.A. (2021). Extraction and Characterization of Pectin from Lemon Waste for Commercial Applications. *JOTCSA*, 8(4): 1111-1120. DOI: <https://doi.org/10.18596/jotcsa.901973>.
- Imran, M., Weng, Ch-H., Wolde, G.S., Chen, Y-Ch., Wu, Y-J., Huang, Sh-M., Lin, Y-T. (2026). Ultrasound-Assisted Deep Eutectic Solvent-Based Extraction of Polysaccharides from Okra: Optimization by Response Surface Methodology and Artificial Neural Network Modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 124, 107715. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2025.107715>.
- Iñiguez-Moreno, M., Pizaña-Aranda, J.J.P., Ramírez-Gamboa, D., Ramírez-Herrera, C.A., Araújo, R.G., Flores-Contreras, E.A., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldivar, R., Melchor-Martínez, E.M. (2024). Enhancing pectin extraction from orange peel through citric acid-assisted optimization based on a dual response. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263, 130230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130230>.
- Janiak, M., Slavova-Kazakova, A., Kancheva, V., Amarowicz, R. (2014). Sephadex LH-20 column chromatography of the hydrolysed lignan macromolecule of flaxseed. *Bulgarian Chemical Communications*, 46(3), 640-644.
- Janić, M., Zdolšek, N., Marinković, J., Lazarević-Pašti, T., Momić, T., Brković, S., Šobot, A.V., Filipović Tričković, J. (2025). Sustainable green extraction of selected polyphenols from *Salvia officinalis* L. with choline chloride-based NADES: Phytochemical screening and bioactivity. *Journal of Molecular Liquids*, 434, 127995. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.127995>.
- Jarrín-Chacón, J.P., Núñez-Pérez, J., del Carmen Espín-Valladares, R., Manosalvas-Quiroz, L.A., Rodríguez-Cabrera, H.M., Pais-Chanfrau, J.M. (2023). Pectin Extraction from Residues of the Cocoa Fruit (*Theobroma cacao* L.) by Different Organic Acids: A Comparative Study. *Foods*, 12, 590. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12030590>.
- Jeliński, T., Cysewski, P. (2022). Quantification of Caffeine Interactions in Choline Chloride Natural Deep Eutectic Solvents: Solubility Measurements and COSMO-RS-DARE Interpretation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23,7832. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23147832>.
- Kacurakova, M., Wilson, R.H. (2009). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 44, 291-303. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00245-9).
- Khuri, A.I., Mukhopadhyay, S. (2010). Response Surface Methodology. *Advanced Review*, 2, 128-149. DOI: <https://doi.org/10.1002/wics.73>.

- Kong, X., Zhang, J., Tang, H., Liu, H., Jia, X., Yin, L., Zhu, Q., Guo, Q. (2026). Pectin-polyphenol interactions: A comprehensive review of interaction mechanism, characterization and synergistic effect in functionality and bioactivity integrating with AI perspectives. *Food Hydrocolloids*, 179, 112751. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2026.112751>.
- Konrade, D., Gaidukovs, S., Vilapalana, F., Sivan, P. (2023). Pectin from Fruit- and Berry-Juice Production by-Products: Determination of Physicochemical, Antioxidant and Rheological Properties. *Foods*, 12, 1615. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12081615>.
- KOWR. Krajowy Ośrodek Wsparcia Rolnictwa, Wydział Analiz i Strategii – „Czarna porzeczka – polski superowoc”, Warszawa 2021.
- Kozioł, A., Środa-Pomianek, K., Górniak, A., Wikiera, A., Cyprych, K., Malik, M. (2022). Structural Determination of Pectins by Spectroscopy Methods. *Coatings*, 12, 546. DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings12040546>.
- Krauze-Baranowska, M., Majdan, M., Kula, M. (2014). Owoce maliny właściwej i maliny zachodniej źródłem substancji biologicznie aktywnych. *Postępy Fitoterapii*, 1, 32-39. (dostęp online: https://www.postepyfitoterapii.pl/wp-content/uploads/2014/11/pf_2014_032-039.pdf)
- Krystyjan, M., Majka, P., Sobolewska-Zielińska, J., Turek, K., Michalski, O., Khachatryan, K., Khachatryan, G. (2025). Enrichment of Apple-Plum Fruit Mousse with Vitamin D3 and Sea Buckthorn Oil Using Pectin-Based Encapsulation: A Study of Physicochemical and Sensory Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 11480. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms262311480>.
- Kumar, R., Meghwanshi, G.K., Marcino, D., Ullah, S.F., Bulone, V., Toffolatti, S.L., Srivastava, V. (2023). Sequence, structure and functionality of pectin methylesterases and their use in sustainable carbohydrate bioproducts: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 244, 125385. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125385>.
- Kyomugasho, C., Christiaens, S., Shpigelman, A., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. (2015). FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. *Food Chemistry*, 176, 82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.033>.
- Le, S.Ch., Nguyen, N., Dong, T.B., Le, M.T. (2023). Industrial Symbiosis Applied to Vietnam Coal Mining Industry to Promote the Circular Economic Model towards Sustainable Development Goals. *Inżynieria Mineralna*, 1(2):52. DOI: <http://doi.org/10.29227/IM-2023-02-12>.
- Li, F., Rao, G. (2024). Characterization of a pectin in fig fruit: Structure and anti-inflammatory activity. *Carbohydrate Research*, 544, 109226. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109226>.
- Li, J., Kisara, K., Danielsson, S., Lindström, M.E., Gellerstedt, G. (2007). An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 342, 1442-1449; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.03.031>.
- Li, L., Wang, B., Liu, J. (2022). Effect of drying methods on the characterisation of pectin extracted from dried hawthorn fruit. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16, 3670-3681. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01485-0>.
- Li, Q., Dou, Z., Duan, Q., Chen, Ch., Liu, R., Jiang, Y., Yang, B., Fu, X. (2024). A comparison study on structure-function relationship of polysaccharides obtained from sea buckthorn berries using different methods: antioxidant and bile acid-binding capacity. *Food Science and Human Wellness*, 13, 494-505. DOI: <http://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250043>.
- Li, X., Yao, X. (2026). Recent progress of ionic liquid-based ionic conductors for ionotronic applications. *npj Soft Matter*, 2, 1. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44431-025-00013-6>.
- Li, Z., Zhou, B., Zheng, T., Zhao, Ch., Gao, Y., Wu, W., Fan, Y., Wang, X., Qiu, M., Fan, J. (2023). Structural Characteristics, Rheological Properties, and Antioxidant and Anti-Glycosylation Activities of Pectin Polysaccharides from Arabica Coffee Husks. *Foods*, 12, 423. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12020423>.
- Liang, J., Li, H., Han, M., Gao, Z. (2025). Polysaccharide-polyphenol interactions: a comprehensive review from food processing to digestion and metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 65, 18, 3459-3475. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2368055>.
- Liew, Sh.Q., Hgoh, G.Ch., Yusoff, R., Teoh, W.H. (2018). Acid and Deep Eutectic Solvent (DES) extraction of pectin from pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.001/>.
- Lin, X., Liu, Y., Wang, R., Dai, J., Wang, L., Zhang, J. (2024). Extraction of pectins from renewable grapefruit (*Citrus paradisi*) peels using deep eutectic solvents and analysis of their structural and physicochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127785. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127785>.

- Lindman, C.A.M., Billeder af Nordens Flora ved A. mentz og C.H.Ostenfeld, II. Kopenhaga 1917-1923. <https://ia600300.us.archive.org/21/items/billederafnorden02ment/billederafnorden02ment.pdf> (dostęp: 13.02.2026)
- Liu, X., Renard, C.M.G.C., Bureau, S., Le Bourvellec, C. (2021). Revisiting the contribution of ATR-FTIR spectroscopy to characterize plant cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 262, 117935. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117935>.
- Lopes, P., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Petronilho, S., Passos, C.P. (2025). The road for red raspberry seeds valorization: A comprehensive review on the chemical composition, extraction techniques, bioactivity and applications. *Food Chemistry*, 486, 144658. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144658>.
- Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Lu, W., Liu, Sh. (2022). Choline chloride-based deep eutectic solvents (Ch-DESs) as promising green solvents for phenolic compounds extraction from bioresources: state-of-the-art, prospects, and challenges. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12:2949-2962; DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00753-7>.
- Luque-Uria, A., González, F.P., Navarro-Villoslada, F., Benito-Peña, E. (2025). Natural Deep Eutectic Solvents as a Green Alternative for Extracting Contaminants from Food Samples: A Review. *Journal of Analysis and Testing*, 9, 548- 574. <https://doi.org/10.1007/s41664-025-00383-w>.
- Macias-Frotto, B., Rostro-Alanis, M., Escobedo-Avellaneda, Z., Welti-Chanes, J. (2025). Conventional and Innovative Methods for Pectin Extraction from Agro-industrial By-products. *Food Engineering Reviews*, 17, 161-188. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12393-024-09390-6>.
- Mahrous, R.S.R., Fattah, B.A., Rahman, Y.A., Sallam, Sh.M., Shawky, E. (2025). Green and Efficient Extraction of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Isoflavones Using Natural Deep Eutectic Solvents-Based Ultrasound-Assisted Extraction. *Food and Bioprocess Technology*, 18, 10419-10433. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-025-04031-0>.
- Majerska, J. (2023). Kształtowanie właściwości fizyko-chemicznych produktów odpadowych przemysłu owocowo-warzywnego w procesie suszenia. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.
- Mamilla, J.L.K., Novak, U., Grilc, M., Likozar, B. (2019). Natural deep eutectic solvents (DES) for fractionation of waste lignocellulosic biomass and its cascade conversion to value-added bio-based chemicals. *Biomass and Bioenergy*, 120, 417-425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.002>.
- Marić, M., Grassino, A.N., Zhu, Z., Barba, F.J., Brncić, M., Brncić, S.R. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwave-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 28-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.022>.
- Mathura, S.R., Landazuri, A.C., Mathura, F., Sosa, A.G.A., Orejuela-Escobar, L.M. (2024). Hemicelluloses from bioresidues and their applications in the food industry– towards an advanced bioeconomy and a sustainable global value chain of chemicals and materials. *Sustainable Food Technology*, 2, 1183. DOI: 10.1039/d4fb00035h.
- May, C.D. (1990). Industrial Pectins: Sources, Production and Applications. *Carbohydrate Polymers*, 12, 79-99. DOI: [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90105-2](https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90105-2).
- Mazurek-Holys, A., Górka, E., Tsirigotis-Maniecka, M., Bleha, R., Synytsya, A., Pawlaczyk-Graja, I. (2026). Evaluation of I-optimal and Box-Behnken designs for green extraction of pectins using NADES from carrot pomace. *Carbohydrate Polymers*, 373, 124581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.124581>.
- Mazurek-Holys, A., Górka, E., Tsirigotis-Maniecka, M., Zoumpantioti, M., Bleha, R., Pawlaczyk-Graja, I. (2025). Eco-Friendly Recovery of Homogalacturonan-Rich Pectin from Flaxseed Cake via NADES Extraction. *Polymers*, 18(18), 2532. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym17182532>.
- Mei, D., Ma, X., Fu, F., Cao, F. (2023). Research Status and Development Prospects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Resources in China. *Forests*, 14,2461. DOI: <https://doi.org/10.3390/f14122461>.
- Meng, Y., Yao, M., Xu, X. (2026). Chain conformation characterization of polysaccharides: Current strategies, challenges, and emerging technologies. *Glycoscience & Therapy*, 2, 100045. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.glycos.2026.100045>.
- Mihalcea, L., Aprodu, I., Dumitraşcu, L., Cucolea, E.I., Dănilă, G.-M., Enachi, E., Barbu, V., Constantin, O.E., Grigore-Gurgu, L., Stănciuc, N. (2021). Whey Proteins Isolate-Based Biopolymeric

- Combinations to Microencapsulate Supercritical Fluid Extracted Oleoresins from Sea Buckthorn Pomace. *Pharmaceuticals*, 14, 1217. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph14121217>.
- Miller, K., Feucht, W., Schmidt, M. (2019). Bioactive Compounds of Strawberry and Blueberry and Their Potential Health Effects Based on Human Intervention Studies: A Brief Overview. *Nutrients*, 11, 1510. DOI: [doi:10.3390/nu11071510](https://doi.org/10.3390/nu11071510).
- Milshina, P., Sautkina, O. (2025). Polysaccharides tightly retained by cellulose in collenchyma and xyloglucan-depleted parenchyma cell walls. *International Journal of Biological Macromolecules*, 333, 148787. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.148787>.
- Minzanova, S.T., mironov, V.F., Arkhipova, D.M., Khabibullina, A.V., Mironova, L.G., Zakirova, Y.M., Milyukov, V.A. (2018). Biological Activity and Pharmacological Application of Pectic Polysaccharides: A Review. *Polymers*, 10, 1407. DOI: [10.3390/polym10121407](https://doi.org/10.3390/polym10121407).
- Monton, Ch., Charoenchai, L., Suksaeree, J., Songsak, T. (2025). Optimizing Cannabis Sample Preparation to Reduce Chloroform Usage: A Comparison of I-Optimal, D-Optimal, and A-Optimal Designs. *Journal of Separation Science*, 48, e70278. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.70278>.
- Morais, E.S., da Costa Lopes, A.M., Freire, M.G., Freire, C.S.R., Coutinho, J.A.P., Silvestre, A.J.D. (2020). Use of Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Polysaccharides Dissolution and Extraction Processes towards Sustainable Biomass Valorization. *Molecules*, 25, 3652. DOI: [10.3390/molecules25163652](https://doi.org/10.3390/molecules25163652).
- Mottaghipisheh, J., Iriti, M. (2020). Sephadex® LH-20, Isolation, and Purification of Flavonoids from Plant Species: A Comprehensive Review. *Molecules*, 25, 4146. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25184146>.
- MRiRW. Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Owoce. <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/owoce> (dostęp: 12.10.2026)
- Muhidinov, Z.K., Nasriddinov, A.S., Strahan, G.D., Jonmurodov, A.S., Bobokalonov, J.T., Ashurov, A.I., Zumratov, A.H., Chau, H.K., Hotchkiss, A.T., Liu, L.Sh. (2024). Structural analyses of apricot pectin polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 279, 135544. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135544>.
- Muñoz-Almagro, N., Ruiz-Torralba, A., Méndez-Albiñana, P., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B., Moreno, R., Villamiel, M., Montilla, A. (2021). Berry fruits as source of pectin: Conventional and non-conventional extraction techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 962-974. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.016>.
- Nawaz, M.A., Krutovsky, K.V., Mueller, M., Gailing, O., Khan, A.A., Buerkert, A., Wiehle, M. (2018). Morphological and Genetic Diversity of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) in the Karakoram Mountains of Northern Pakistan. *Diversity*, 10(3), 76. DOI: <https://doi.org/10.3390/d10030076>.
- Nayak, A., Shah, A., Bhatt, S., Bhushan, B., Kumar, A., Gaur, R., Tyagi, I. (2026). Ultrasound and microwave assisted extraction of bioactives from food wastes: An overview on their comparative analysis towards commercialization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 124, 107712. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2025.107712>.
- Newerli-Guz, J., Śmiechowska, M., Drzewiecka, A., Tylingo, R. (2023). Bioactive Ingredients with Health-Promoting Properties of Strawberry Fruit (*Fragaria x ananasa* Duchesne). *Molecules*, 28, 2711. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28062711>.
- Ni, W., Gao, T., Wang, H., Du, Y., Li, J., Li, C., Wei, L., Bi, H. (2013). Anti-fatigue activity of polysaccharides from the fruits of four Tibetan plateau indigenous medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 529-535. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.055>.
- Niannian, S., Xiaopinga, Z., Abuduwaili, A., Mansur, S., Yuxin, Y., Bo, Y., Meili, N., Boxuan, Y., Rozi, P., Waili, A., Yili, A. (2026). Structural identification and immunomodulatory activities in vitro and in vivo of a pectic polysaccharide from the leaves of *Hippophae rhamnoides* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 336, 149341. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.149341>.
- Norfarhana, A.S., Ilyas, R.A., Ngadi, N., Othman, M.H.D., misenan, M.S.M., Norrahim, M.N.F. (2024). Revolutionizing lignocellulosic biomass: A review of harnessing the power of ionic liquids for sustainable utilization and extraction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 256, 128256. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128256>.
- Nurcholis, W., Septiawati, I.Z., Najmi, L., Sutandy, F.A., Febrian, L., Fitriyanti, G.C., Ramdhani, A.F., Zahra, A., Aisyah, S.I., Ambarsari, L., Hindaningrum, I.F., Artika, I.M. (2024). Optimization of Flavonoid Extraction and Antioxidant Capacity from *Acanthus ilicifolius* Using Microwave-Assisted Extraction and I-Optimal Response Surface Methodology. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 8(12), 9470-9475. DOI: <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v8i12.18>.
- Nurzyńska-Wierdak, R. (2022). Malina właściwa (*Rubus idaeus* L.) – owocodajna roślina o działaniu prozdrowotnym. *Annales Horticulturae*, 31, 1, 37-48. DOI: [dx.doi.org/10.24326/ah.2022.1.3](https://doi.org/10.24326/ah.2022.1.3).

- Obodo-Ovie, O., Alyassin, M., Smith, A.M., Morris, G.A. (2024). The Effect of Different Extraction Conditions on the Physicochemical Properties of Novel High Methoxyl Pectin-like Polysaccharides from Green Bell Pepper (GBP). *Macromol*, 4, 420-436. DOI: <https://doi.org/10.3390/macromol4020024>.
- Obodo-Ovie, O., Alyassin, M., Smith, A.M., Morris, G.A. (2025). Evaluation of Chemical and Functional Properties of Pectin-like Polymers Extracted from Tomato Using Conventional Acid Extraction. *Macromol*, 5,46. DOI: <https://doi.org/10.3390/macromol5040046>.
- Obomighie, I., Prentice, I.J., Lewin-Jones, P., Bachtiger, F., Ramsey, N., Kishi-Itakura, Ch., Goldberg, M.W., Hawkins, T.J., Sprittles, J.E., Knight, H., Sosso, G.C. (2025). Understanding pectin cross-linking in plant cell walls. *Communications biology*, 8, 72. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07495-0>.
- Olasupo, A., Corbin, D.R., Shiflett, M.B. (2026). Applications of ionic Liquids: Fate, Prospects, and Perspectives, *Cleaner Materials*, 19, 100379. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clema.2026.100379>.
- Ożarowski A. (red.). (1982). *Ziołolecznictwo. Poradnik dla lekarzy*, Wydanie III, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa
- Ożarowski A., Jaroniewski W. (1987). *Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie*, Warszawa, Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych
- Pancerz, M., Kruk, J., Łukasiewicz, M., Witek, M., Kucharek, M., Jaschik, J., Ptaszek, A. (2021). Red currant pectin: The physicochemical characteristic of pectin solutions in dilute and semi dilute regimes. *Food Hydrocolloids*, 113, 106420. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106420>.
- Pancerz, M., Kruk, J., Witek, M., Ptaszek, A. (2022). The effect of biopolymer-water interaction on relaxation phenomena in blackcurrant pectin solution. *Food Chemistry*, 383, 132600, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132600>.
- Pandeirada, C.O., Boulous, S., Nystrom, L. (2025). Oxidized polysaccharides: A review on structural insights using MS-based approaches. *Carbohydrate Polymers*, 367, 123946. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123946>.
- Pang, Y., Peng, Z., Ding, K. (2024). An in-depth review: Unraveling the extraction, structure, bio-functionalities, target molecules, and applications of pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 343, 122457. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122457>.
- Pathak, D., Mazumder, A. (2024). A critical overview of challenging roles of medicinal plants in improvement of wound healing technology. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32, 379-419. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40199-023-00502-x>.
- Pawlaczyk-Graja, I., Balicki, S., Wilk, K.A. (2019). Effect of various extraction methods on the structure of polyphenolic-polysaccharide conjugates from *Fragaria vesca* L. leaf. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 664-674; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.013>.
- Pereira, D.T., Méndez-Albiñana, P., Mendiola, J.A., Villamiel, M., Cifuentes, A., Martínez, J., Ibáñez. E. (2024). An eco-friendly extraction method to obtain pectin from passion fruit rinds (*Passiflora edulis* sp.) using subcritical water and pressurized natural deep eutectic solvents. *Carbohydrate Polymers*, 326, 121578; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121578>.
- Pereira, I.L.G., Ziulkoski, A.L., Zepon, K.M., Kanis, L.A., Schrekker, H.S. (2026). Ionic Liquids in Pharmaceuticals: A Scoping Review of Formulation Strategies. *ACS Omega*, 11, 260-303. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c08558>.
- Pettolino, F.A., Walsh, Ch., Fincher, G.B., Bacic, A. (2012). Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols*, 7, 9, 1590-1607. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.081>.
- Pińkowska, H., Złocińska, A. (2014). Pektyny – występowanie, budowa chemiczna i właściwości. *Widomości chemiczne*, 68, 7-8, 683-700. PL ISSN 0043-5104.
- Pott, D.M., Duran-Soria, S., Allwood, J.W., Pont, S., Gordon, S.L., Jennings, N., Austin, C., Stewart, D., Brennan, R.M., Masny, A., Sonsteby, A., Kruger, E., Jarret, D., Vallarino, J.G., Usadel, B., Osorio, S. (2023). Dissecting the impact of environment, season and genotype on blackcurrant fruit quality traits. *Food Chemistry*, 402, 134360. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134360>.
- Qiao, Y., Shen, Y., Jiang, H., Li, D., Li, B. (2024). Structural characterization, antioxidant and antibacterial activity of three pectin polysaccharides from blueberry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 262, 129707. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129707>.
- Rackowska, E., Wojdyło, A., Nowicka, P. (2024). The use of blackcurrant pomace and erythritol to optimise the functional properties of shortbread cookies. *Scientific Reports*, 14: 3788. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54461-7>.
- Rai, P., Mishra, B., Jayakrishnan, U., Mukherjee, A., Moulik, S., Roy, S., Kumari, A. (2025). Ultrasonic cavitation assisted deep eutectic solvent extraction of pectin from waste sweet lime peel: Statistical optimization and energetic analysis. *Industrial Crops & Products*, 228, 120895. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.120895>.

- Ramli, N., Asmawati. (2011). Effect of ammonium oxalate and acetic acid at several extraction time and pH on some physicochemical properties of pectin from cocoa husks (*Theobroma cacao*). African Journal of Food Science, 5(15), 790-798. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJFS11.107>.
- Ramm, K. (2025). Symbiozy przemysłowe. Kierunek Wod-Kan, 1. (dostęp online: 12.02.2026) https://www.e-bmp.pl/Resources/magazyn/1_2025_kierunek_wodkan_portal.pdf
- Reichembach, L.H., Oliveira Petkowicz, C.L. (2022). New findings on acid-extractable pectins from soy hull. Carbohydrate Polymers, 294, 110831. DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.119831.
- Ren, T., Fan, X., Wu, Q., Wu, Y., Sun, X., Tong, H. (2025). Structural insights and therapeutic potential of plant-based pectin as novel therapeutic for type 2 diabetes mellitus: A review. International Journal of Biological Macromolecules, 307, 141876. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.141876>.
- Ren, Y., Bai, Y., Zhang, Z., Cai, W., Del Rio Flores, A. (2019). The Preparation and Structure Analysis Methods of Natural Polysaccharides of Plants and Fungi: A Review of Recent Development. Molecules, 24, 3122. DOI: [doi:10.3390/molecules24173122](https://doi.org/10.3390/molecules24173122).
- Ren, Z., Yang, Y., Xu, Y., Li, X., Yu, Z. (2012). Optimization of Ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from blackcurrant using RSM. Advanced Materials Research, 550-553, 1821-1825, <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.550-553.1821>.
- Ripoll, C.S.S., Hincapié-Llanos, G.A. (2023). Evaluation of sources and methods of pectin extraction from fruit and Vegetable wastes: A Systematic Literature Review (SLR). Food bioscience, 51, 102278. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102278>.
- Riyamol, Chengaiyan, J.G., Rana, S.S., Ahmad, F., Haque, Sh., Capanoglu, E. (2023). Recent Advances in the Extraction of Pectin from Various Sources and Industrial Applications. ACS Omega, 8, 46309-46324. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04010>.
- Riyamol, Jeevitha, G.C. (2024). Microwave and ultrasound-assisted natural deep eutectic solvents-based extraction of pectin from onion peel wastes. CyTA - Journal of Food, 22(1), 2311215. DOI: <https://doi.org/10.1080/19476337.2024.2311215>.
- Roshni, A., Tivana, Sh.Sh., Taharat, S.F., Islam, N. (2026). Microwave and ultrasound assisted synergistic extraction of aromatics from food and agro-waste using DES and NADES. Applied Food Research, 6, 101893. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2026.101893>.
- Rosli, H.G., Civello, P.M, Martinez, G.A. (2004). Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. Plant Physiology and Biochemistry, 42, 823-831. DOI: [doi:10.1016/j.plaphy.2004.10.002](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.10.002).
- Roy, S., Priyadarshi, R., Łopusiewicz, Ł., Biswas, D., Chandel, V., Rhim, J. (2023). Recent progress in pectin extraction, characterization, and pectin-based films for active food packaging applications: A review. International Journal of Biological Macromolecules, 239, 124248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124248>.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin. Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej, 2014, poz. 1409.
- Saez-Aguayo, S., Sanhueza, D., Fuenzalida, P., Covarrubias, M.P., Handford, M., Herrera, R., Moya-León, M.A. (2025). Back to the Wastes: The Potential of Agri-Food Residues for Extracting Valuable Plant Cell Wall Polysaccharides. International Journal of Molecular Sciences, 26,4942. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26104942>.
- Sahin, S., Kurtulbas, E., Toprakci, i., Anwar, F., Khan, R., Cigeroglu, Z., Yardimci, A.I., Torun, M., Torun, F.B., Falsafi, S.R. (2026). Deep Eutectic Solvents for Sustainable Extraction of Bioactive Compounds from Biomass: Mechanistic Insights and Scale-Up Challenges. Molecules, 31, 880. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules31050880>.
- Sakurai, Y.C.N., Pires, I.V., Ferreira, N.R., Moreira, S.G.C., da Silva, L.H.M., da Cruz Rodrigues, A.M. (2024). Preparation and Characterization of Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs): Application in the Extraction of Phenolic Compounds from Araza Pulp (*Eugenia stipitata*). Foods, 13, 1983. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13131983>.
- San Mateo, M., Núñez-Gómez, V., Ferrando, A.B., Gonzales-Barrio, R., Sanchez-Martínez, L., Baenas, N., Periago, M.J. (2025). Nutritionally enhanced oat-based cookies through the sustainable valorisation of berry surpluses. Applied Food Research, 5, 101495. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101495>.
- Saravanan, R., Jeevitha, G.C. (2024). Sustainable Approach for Utilization of Mango Peel Wastes for Pectin Extraction by Natural Deep Eutectic Solvents. Journal of Food Processing and Preservation, 1, 4540390. DOI: <https://doi.org/10.1155/2024/4540390>.
- Satija, P., Chambyal, A., Singh, G., Ritvik, Singh, G., Devi, S., Singh, J. (2024). Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Manufacture, Characteristics, and Their Significance as Designer Solvents. Chemistry Select, 9,e202401212. DOI: <https://doi.org/10.1002/slct.202401212>.

- Saydam, D.D., Sürmeli, I.A., Dalgıç, A.C. (2026). Economic and process optimization of industrial-scale pectin manufacturing from fruit by-products in a circular production model. *Food and Bioproducts Processing*, 157, 159-175. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2026.03.008>.
- Schefer, L., Adameik, J., Diener, M., Mezzenga, R. (2015). Supramolecular chiral self-assembly and supercoiling behavior of carrageenans at varying salt conditions. *Nanoscale*, 7, 16182–16188. DOI: 10.1039/c5nr04525h.
- Shafie, M.H., Gan, Ch-Y. (2020). Could choline chloride-citric acid monohydrate molar ratio in deep eutectic solvent affect structural, functional and antioxidant properties of pectin? *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 835-843. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.013>.
- Shafie, M.H., Yusof, R., Gan, C. (2019). Deep eutectic solvents (DES) mediated extraction of pectin from Averrhoa bilimbi: Optimization and characterization studies. *Carbohydrate Polymers*, 216, 303-311; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.007>.
- Shahmohammadi, A., McAuley, K.B. (2019). Sequential Model-Based A-Optimal Design of Experiments When the Fisher Information Matrix Is Noninvertible. *Ind. Eng. Chem. Res.* 58, 1244–1261. DOI: 10.1021/acs.iecr.8b03047.
- Shen, Ch., Wang, T., Guo, F., Sun, K., Wang, B., Wang, J., Zhang, Z., Zhang, X., Zhao, Y., Chen, Y. (2021). Structural characterization and intestinal protection activity of polysaccharides from Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *Carbohydrate Polymers*, 274, 118648. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118648>.
- Shi, Sh., Wu, R., Han, Z., Sun, Y., Li, P., Ren, F., Shang, N. (2025). Prospects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) polysaccharides: preparation, structural characterization, and bioactivities diversity. *Food Science and Human Wellness*, 14, 9250001. DOI: <http://doi.org/10.26599/FSHW.2024.9250001>.
- Siemińska-Kuczer, A., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2022). Recent advances in interactions between polyphenols and plant cell wall polysaccharides as studied using an adsorption technique. *Food Chemistry*, 373, 131487. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131487>.
- Simão, R.S., Moraes, J.O., Zhang L., Schröder, A., Carciofi, B.A.M., Schutyser, M.A.I., Laurindo, J.B. (2024). Biopolymers to overcome challenges in açai pulp drying: Processing and powder quality evaluation. *Powder Technology*, 435, 119424. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2024.119424>.
- Singh, B., Oberoi, S., Kaur, A. (2024). Phenolic compounds in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and their health-promoting activities: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 59, 6642–6658. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.17143>.
- Singleton, V. L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Smith, E.L., Abbott, A.P., Ryder, K.S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESS) and Their Applications, *Chemical reviews*, 114, 11060-11082. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- Snowarski, M. Atlas roślin Polski. Strona internetowa, <https://www.atlas-roslin.pl/index.html> (dostęp online: 11.02.2026)
- Solcan, M.B., Vlase, A.M., Marc, G., Muntean, D., Casian, T., Nadăş, G.C., Novac, C.S., Popa, D.S., Vlase, L. (2024). Antimicrobial Effectiveness of Ribes nigrum L. Leaf Extracts Prepared in Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs). *Antibiotics*, 13, 1118; DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13121118>.
- Sousa, A.S.B., Lima, R.P., Silva, M.C.A., Moreira, D.N., Pintado, M.M.E., Silva, S.M. (2022). Natural deep eutectic solvent of choline chloride with oxalic or ascorbic acids as efficient starch-based film plasticizers. *Polymer*, 259, 125314. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2022.125314>.
- Striegel, A.M. (2022). Size-Exclusion Chromatography: A Twenty-First Century Perspective. *Chromatographia*, 85, 307-313. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10337-022-04143-1>.
- Struck, S., Plaza, M., Turner, Ch., Rohm, H. (2016). Berry pomace– a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. Review. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 1305-1318. DOI: doi:10.1111/ijfs.13112.
- Suárez, N., Massaldi, H., Fragus, L.F., Ferreira, F. (2008). Improved conjugation and purification strategies for the preparation of protein–polysaccharide conjugates. *Journal of Chromatography A*, 1213, 169-175. DOI: doi:10.1016/j.chroma.2008.10.030.
- Sun, J., Hu, Y., Wang, L., Lv, D., Chen, G. (2025a). Structural characteristics, biological activities, and rheological properties of polysaccharides from different cultivars of strawberry collected in China. *International Journal of Biological Macromolecules*, 320, 146030. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146030>.
- Sun, Y., Ni, W., Wang, D., Ren, J., Zhao, D., Yu, Sh., Liu, Sh., Zhang, Sh., Wang, S., Wang, W., Liu, M. (2025). A galacturonan from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berry modulates

- dyslipidemia by promoting hepatic lipolysis and mitochondrial oxidation. *Carbohydrate Polymers*, 363, 123708. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123708>.
- Susanti, I., Pratiwi, R., Rosandi, Y., Hasanah, A.N. (2024). Separation Methods of Phenolic Compounds from Plant Extract as Antioxidant Agents Candidate. *Plants*, 13, 965. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13070965>.
- Takata, R., Yamamoto, R., Yanai, T., Konno, T., Okubo, T. (2005). Immunostimulatory Effects of a Polysaccharide-Rich Substance with Antitumor Activity Isolated from Black Currant (*Ribes nigrum* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69 (11), 2042–2050. DOI: 10.1271/bbb.69.2042.
- Teleman, A., Tenkanen, M., Jacobs, A., Dahlman, O. (2002). Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech. *Carbohydrate Research*, 337, 373-377. DOI: 10.1016/S0008-6215(01)00327-5.
- Teng, H., He, Z., Hong, Ch., Xie, S., Zha, X. (2024). Extraction, purification, structural characterization and pharmacological activities of polysaccharides from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 324, 117809. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.117809>.
- Thamer, I., Kumaravel, V. (2026). Natural deep eutectic solvents for bio-based industrial applications: Properties and sustainable extraction with biomedical features, *Industrial Crops & Products*, 244, 123159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2026.123159>.
- Tian, Y., Karhu, S., Virtanen, M., Linderborg, K.M., Yang, B., Laaksonen, O. (2023). Variation of chemical and sensory profiles of blackcurrant (*Ribes nigrum*) juices produced from different cultivars of European origins. *LWT – Food Science and Technology*, 173, 114353. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114353>.
- Tien, N.N.T., Le, N.L., Khoi, T.T., Richel, A. (2022). Optimization of microwave-- ultrasound-- assisted extraction (MUAE) of pectin from dragon fruit peels using natural deep eutectic solvents (NADES). *Journal of Food Processing and Preservation*, 46:e16117. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.16117>.
- Tiwari, B.K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>.
- Tkacz, K., Wojdyło, A., Turkiewicz P.I., Bobak, Ł., Nowicka, P. (2019). Anti-Oxidant and Anti-Enzymatic Activities of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Fruits Modulated by Chemical Components. *Antioxidant*, 8, 618. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox8120618>.
- Torres-Gallo, R., Andrade-Pizarro, R., Salcedo, J., Chavez-Salazar, A., Castellanos-Galeano, F.J. (2025). Optimization of ultrasound-assisted extraction of mango cotyledon starch: Physicochemical, structural, thermal and functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 285, 138239. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138239>.
- Tsirigotis-Maniecka, M., Górska, E., Mazurek-Holys, A., Pawlaczyk-Graja, I. (2024). Unlocking the Potential of Food Waste: A Review of Multifunctional Pectins. *Polymers*, 16, 2670. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym16182670>.
- Urbaniak, S., Kaźmierczak-Barańska, J., Karwowski, B.T. (2019). Rokitnik zwyczajny (*Hippophaë rhamnoides* L.) jako skarbnica witaminy C. *Postępy Biochemii*, 63, 3. DOI: https://doi.org/10.18388/pb.2019_271.
- USDA – Dr. Duke’s Phytochemical and Ethnobotanical Databases, U.S. Department of Agriculture, Baza Składników Bioaktywnych, <https://phytochem.nal.usda.gov> (dostęp: 12.02.2026).
- Vargas, C.G., Ponce, N.M.A., Stortz, C.A., Fissore, A.N., Bonelli, P., Gonzales, C.M.O., Gerschenson, L.N. (2025). Pectin obtention from agroindustrial wastes of *Malus domestica* using green solvents (citric acid and natural deep eutectic solvents). Chemical, thermal, and rheological characterization. *Frontiers in Chemistry*, 12, 1504582. DOI: 10.3389/fchem.2024.1504582.
- Ventura, S.P.M., e Silva, F.A., Quental, M.V., Mondal, D., Freire, M.G., Coutinho, J.A.P. (2017). Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chemical Reviews*, 117, 6984–7052. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00550.
- Voragen, A.G.J., Coenen, G.J., Verhoef, R.P., Schols, H.A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem*, 20, 263-275. DOI: 10.1007/s11224-009-9442-z.
- Wądrzyk, M., Plata, M., Korzeniowski, Ł., Janus, R., Lewandowski, M. (2025). Towards sustainable valorization of blackcurrant pomace: Investigation of hot-water extraction combined with hydrothermal liquefaction. *Renewable Energy*, 240, 122117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.122117>.
- Waldbauer, K., McKinnon, R., Kopp, B. (2017). Apple Pomace as Potential Source of Natural Active Compounds. *Planta Med.*, ISSN 0032-0943. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0043-111898>.
- Wang, D.X., Li, H., Li, B., Ma, R., Zhang, N., Zhang, X., Jiao, L., Wu, W. (2018). Systematic fractionation and immunoenhancement of water-soluble polysaccharides isolated from fruit of *Morus alba* L.

- International Journal of Biological Macromolecules, 116, 1056-1063. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.106>.
- Wang, F., Yang, J., Yang, X., Li, X., Zhang, X., Pan, Z., Li, Ch. (2025c). Pectins extracted from cranberry pomace: A study in physicochemical, structural, functional properties and the application in peach preservation. Food Chemistry: X 32, 103282. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.103282>.
- Wang, J., Zhao, J., Nie, Sh., Xie, M., Li, Sh. (2023). MALDI mass spectrometry in food carbohydrates analysis: A review of recent researches. Food Chemistry, 399, 133968. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133968>.
- Wang, K., Xu, Z., Liao, X. (2021). Bioactive compounds, health benefits and functional food products of sea buckthorn: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 62(24), 6761-6782. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1905605>.
- Wang, L., Zhao, Y., Liu, J., Zhu, L., Wei, Y., Cheng, k., Xu, Y. (2025a). Preparation, Characterization and Bioactivities of Strawberry Polysaccharides. Foods, 14, 1117. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods14071117>.
- Wang, Q., Xu, J., Cheng, H., Chen, Sh., Ye, X., Chen, J. (2025b). Galactan side chains dominate thermal aggregation of RGI-Rich pectin during drying resulting poor solubility. Carbohydrate Polymers, 370, 124416. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.124416>.
- Wang, R., Chang, Y., Tan, Z., Li, F. (2016). Applications of choline amino acid ionic liquid in extraction and separation of flavonoids and pectin from ponkan peels. Separation Science and Technology, 51, 7, 1093-1102. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01496395.2016.1143006>.
- Wang, X., Chen, Q., Lu, X. (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. Food Hydrocolloids, 38, 129-137. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.003>.
- Wang, X., Chen, Y., Han, Y., Li, Sh., Li, H., Liu, Y., Lei, W., Liu, G., Gao, Z. (2025). Release, digestion and fermentation properties of polyphenols bound to sea buckthorn polysaccharides: Mechanistic explorations from integrated in vitro and in vivo studies. Carbohydrate Polymers, 368, 124228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.124228>.
- Wang, Y., Huang, J., Li, Y., Xiong, K., Wang, Y., Li, F., Liu, M., Wu, Z., Tu, Y., Peng, L. (2015). Ammonium oxalate-extractable uronic acids positively affect biomass enzymatic digestibility by reducing lignocellulose crystallinity in *Miscanthus*. Bioresource Technology, 196, 391-389. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.099>.
- Wei, E., Yang, R., Zhao, H., Wang, P., Zhao, S., Zhai, W., Zhang, Y., Zhou, H. (2019). Microwave-assisted extraction releases the antioxidant polysaccharides from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. International Journal of Biological Macromolecules, 123, 280-290. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.074>.
- Witek-Krowiak, A., Chojnacka, K., Podstawczyk, D., Dawiec, A., Bubala, K. (2014). Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption proces. Bioresource Technology, 160, 150-160. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.021>.
- Woszczak, L., Khachatryan, G., Khachatryan, K., Witczak, M., Lenart-Boroń, A., Stankiewicz, K., Dworak, K., Adamczyk, G., Pawłowska, A., Kapusta, I., Krzan, M., Godlewska, M., Krystijan, M. (2025). Synthesis and Investigation of Physicochemical and Microbial Properties of Composites Containing Encapsulated Propolis and Sea Buckthorn Oil in Pectin Matrix. International Journal of Molecular Sciences, 26, 8664. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26178664>.
- Woziwoda, B. (2014). Leśne rośliny o jadalnych owocach – przegląd botaniczny. Studia i Materiały Centrum Edukacji Przyrodniczo-Leśnej, 16, 1(38). Identyfikator YADDA: bwm.eta1.element.agro-c976153b-fbf9-4f5a-9dab-52354095d2ff.
- Wu, D.-T., Geng, J-L., li, J., Deng, W., Zhang, Y., Hu, Y-Ch., Zou, L., Xia, Y., Zhuang, Q-G., Liu, H-Y., Gan, R.Y. (2024a). Efficient extraction of pectic polysaccharides from thinned unripe kiwifruits by deep eutectic solvent-based methods: Chemical structures and bioactivities. Food Chemistry: X, 21, 101083. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101083>.
- Wu, D., Chen, Sh., Ye, X., Zheng, X., Ahmadi, Sh., Hu, W., Yu, Ch., Cheng, H., Linhardt, R.J., Chen, J. (2022). Enzyme-extracted raspberry pectin exhibits a high-branched structure and enhanced anti-inflammatory properties than hot acid-extracted pectin. Food Chemistry, 383, 132387. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132387>.
- Wu, K., Zhang, H., Lou, X., Wu, X., Wang, Y., Zhao, K., Du, X., Xia, X. (2024b). Analysis of NADES and its water tailoring effects constructed from inulin and L-proline based on structure, physicochemical and antifreeze properties. International Journal of Biological Macromolecules, 277, 134049. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134049>.

- Wu, Y., Zhang, X.-F., Bai, Y., Yu, M., Yao, J. (2024). Cellulose-reinforced highly stretchable and adhesive eutectogels as efficient sensors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 265, 131115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131115>.
- Xiang, T., Yang, R., Li, L., Lin, H., Kai, G. (2024). Research progress and application of pectin: A review. *Journal of Food Science*, 89, 6985-7007. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17438>.
- Xu, Y., Cai, F., Yu, Z., Zhang, L., Li, X., Yang, Yu., Liu, G. (2016a). Optimization of pressurised water extraction of polysaccharides from blackcurrant and its antioxidant activity. *Food Chemistry*, 194, 650-658; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.061>.
- Xu, Y., Liu, G., Yi, Z., Song, X., Li, X., Yang, Y., Wang, L., Liu, L., Dai, J. (2016b). Purification, characterization and antiglycation activity of a novel polysaccharide from black currant. *Food Chemistry*, 199, 694-701. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.078>.
- Xu, Y., Liu, N., Fu, X., Wang, L., Yang, Y., Ren, Y., Liu, J., Wang, L. (2019). Structural characteristics, biological, rheological and thermal properties of the polysaccharide and the degraded polysaccharide from raspberry fruits. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, pp. 109-118. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.180>.
- Xu, Y., Niu, X., Liu, N., et al. (2018). Characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruits. *Food Chemistry*, 243, 26-35; DOI: [10.1016/j.foodchem.2017.09.107](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.107).
- Xu, Y., Zhang, L., Yang, Y., Song, X., Yu, Z. (2015). Optimization of ultrasound-assisted compound enzymatic extraction and characterization of polysaccharides from blackcurrant. *Carbohydrate Polymers*, 117, 895-902. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.032>.
- Yang, Y., Lei, Z., Zhao, M., Wu, C., Wang, L., Xu, Y. (2020). Microwave-assisted extraction of an acidic polysaccharide from *Ribes nigrum* L.: Structural characteristics and biological activities. *Industrial Crops and Products*, 147; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112249>.
- Yang, Y., Sun, J., Qin, Sh., Diao, T., Bai, J., Li, Y. (2024a). Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of polysaccharides from *Hippophae rhamnoides* L.: Modeling, characterization and hypoglycemic activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127626. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127626>.
- Yang, Y., Zou, J., Li, M., Yun, Y., Li, J., Bai, J. (2024). Extraction and characterization of polysaccharides from blackcurrant fruits and its inhibitory effects on acetylcholinesterase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 262, 130047; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130047>.
- Yao, H.-Y.-Y., Wang, J.-Q., Yin, J.-Y., Nie, Sh.-P., Xie, M.-Y. (2021). A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: Progress, challenge and perspective. *Food Research International*, 143, 110290. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110290>.
- Yolmeh, M., Jafari, S.M. (2017). Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food Bioprocess Technology*, 10, 413-433. DOI: [10.1007/s11947-016-1855-2](https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2).
- Yu, Z., Liu, L., Xu, Y., Wang, L., Teng, X., Li, X., Dai, J. (2015). Characterization and biological activities of a novel polysaccharide isolated from raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruits. *Carbohydrate Polymers*, 132, 180-186. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.068>.
- Yuan, Y., Tian, Y., Gao, Sh., Zhang, X., Gao, X., He, J. (2023). Effects of environmental factors and fermentation on red raspberry anthocyanins stability. *LWT*, 173, 114252. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114252>.
- Yue, F., Zhang, J., Xu, J., Niu, T., Lü, X., Liu, M. (2022). Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content by phenol-sulfuric acid method. *Frontiers in Nutrition*, 9, 963318; DOI: [10.3389/fnut.2022.963318](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.963318).
- Zaid, R.M., mishra, P., Wahid, Z.A., Sakinah, A.M.M. (2019). Hylocereus polyrhizus peel's high-methoxyl pectin: A potential source of hypolipidemic agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 361-467. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.143>.
- Zdanowicz, M., Wilpiszewska, K., Szychaj, T. (2018). Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review. *Carbohydrate polymers*, 200, 361-380. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.078>.
- Zdunek, A., Pieczywek, P.M., Cybulska, J. (2021). The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 20, 1101-1117. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12689>.
- Zhang, L., Vlach, J., Black, I.M., Archer-Hartman, S., Heiss, Ch., Azadi, P., Urbanowicz, B.R. (2025a). The pectin puzzle: Decoding the fine structure of rhamnogalacturonan-I (RG-I) in *Arabidopsis thaliana* uncovers new pectin features. *Carbohydrate Polymers*, 368, 124161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.124161>.
- Zhang, S., Wu, J., Zheng, J., Pang, Y., Zhai, J., Pan, X., Lao, F. (2025). Deep eutectic solvents/water systems in different pH for extracting pectin from mango peel: Analysis of physicochemical and

- structural properties. Food Hydrocolloids, 168, 111578. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111578>.
- Zhang, W., Cheng, Sh., Zhai, X., Sun, J., Hu, X., Pei, H., Chen, G. (2020). Green and Efficient Extraction of Polysaccharides from *Poria cocos* F.A. Wolf by Deep Eutectic Solvent. Natural Product Communications, 15(2), 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X1990070>.
- Zhang, W., Xu, S., Gao, M., Peng, S., Chen, L., Lao, F., Liao, X., Wu, j. (2022). Profiling the water soluble pectin in clear red raspberry (*Rubus idaeus* L. cv. Heritage) juice: Impact of high hydrostatic pressure and high-temperature short-time processing on the pectin properties, Food hydrocolloids, 125, 107439. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107439>.
- Zhao, L., Peng, Y., Huang, J., Liu, N., Zou, X., Li, J., Fan, Y., Li, P., Tang, L., Wang, j., Zeng, Y., Wu, Y., Zhu, G. (2025). Structural characterization of polysaccharides from *Polygonatum Sibiricum* and effect on alleviating hyperlipidemia in egg yolk emulsion-induced mice. International Journal of Biological Macromolecules, 296, 139808. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139808>.
- Zhao, M., Kuang, F., Zhang, Y., Lv, G. (2024). Effects of Hydrolysis Condition and Detection Method on the Monosaccharide Composition Analysis of Polysaccharides from Natural Sources. Separations, 11, 2; DOI: <https://doi.org/10.3390/separations11010002>.
- Zhao, T., Yang, M., Ma, L., Liu, X., Ding, Q., Chai, G., Lu, Y., Wei, H., Zhang, Sh., Ding, Ch. (2023). Structural Modification and Biological Activity of Polysaccharides. Molecules, 28, 5416. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28145416>.
- Zheng, Y., Yan, J., Cao, C., Liu, Y., Yu, D., Liang, X. (2023). Application of chromatography in purification and structural analysis of natural polysaccharides: A review. Journal of Separation Science, 46: 2300368. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202300368>.
- Zie, M., Jacquet, N., Karamoko, G., Alabi, T., Richel, A., Karoui, R., Blecker, Ch. (2025). Characterization of a novel natural protein-polysaccharide complex from cashew apple bagasse and its functional implications. Food Chemistry, 464, 141861. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141861>.
- Zompra, A.A., Chasapi, S.A., Karagkouni, E.C., Karamouzi, E., Panopoulos, P., Spyroulias, G.A. (2021). Metabolite and Bioactive Compounds Profiling of Meteora Sea Buckthorn Berries through High-Resolution NMR Analysis. Metabolites, 11, 822. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo11120822>.

7. DODATEK

Tabela D1. Wyjściowe wyniki kolorymetrii cukrów całkowitych (C0) oraz skorygowane wartości końcowe (C1).

Produkt	Cukry (% wag.) (wyjściowe) C0	± SD	Cukry (% wag.) przeliczone	± SD	P1/P2
(1)	64,7	2,2	85,9	2,9	2,60/1,96
(2)	55,1	1,3	73,1	1,7	
(3)	59,6	1,4	79,0	1,9	
(4)	54,5	2,3	72,3	3,1	
(5)	63,7	1,3	84,5	1,7	
(6)	59,5	0,9	79,0	1,2	
(7)	56,5	3,5	75,0	4,6	
(8)	48,9	0,8	64,9	1,1	
(9)	51,3	0,5	68,1	0,6	
(10)	41,8	1,7	55,4	2,2	
(11)	32,3	2,0	42,8	2,7	
(12)	31,8	1,4	42,2	1,8	
(13)	23,7	0,1	31,4	0,1	
(14)	44,5	1,6	59,0	2,1	
(15)	36,0	1,8	47,7	2,4	
(16)	28,0	1,2	37,2	1,6	
(17)	42,3	0,7	56,1	0,9	
(18)	58,8	2,9	78,1	3,9	
(19)	56,9	2,2	75,4	2,9	
(20)	41,7	0,4	55,3	0,6	
(21)	37,0	2,4	49,1	3,2	
(22)	41,9	1,7	55,6	2,2	
(23)	38,2	2,2	50,7	2,9	
(24)	38,1	1,2	50,5	1,6	
(25)	41,7	0,4	55,3	0,6	
(26)	41,9	1,7	55,6	2,2	
(27)	38,6	0,5	51,1	0,6	
(28)	37,7	1,0	50,0	1,4	
(29)	38,2	2,2	50,7	2,9	
(30)	41,9	1,7	55,6	2,2	
(31)	37,7	1,0	50,0	1,4	
(32)	41,1	1,5	54,5	2,0	
(33)	41,7	0,4	55,3	0,6	
(34)	44,3	0,7	58,8	0,9	
(35)	44,3	0,7	58,8	0,9	
(36)	40,6	1,9	53,8	2,5	
(37)	41,9	0,7	55,6	0,9	
(28)	49,4	1,8	65,5	2,4	
(39)	44,6	2,3	59,1	3,1	
(4-F0)	48,0	3,1	63,7	4,1	
(4-F1)	39,0	1,5	51,7	2,1	
(4-F2)	38,9	1,9	51,6	2,5	
(4-F3)	38,8	1,6	51,4	2,1	
(4-NaoH)	20,8	0,7	27,5	1,0	
(11-F0)	37,1	1,5	49,2	2,0	
(11-F1)	31,2	3,3	41,3	4,4	
(11-F2)	30,9	3,1	40,9	4,1	
(11-NaoH)	23,8	1,1	31,6	1,4	
(38-F0)	30,7	1,9	40,7	2,5	
(38-F1)	35,6	0,7	47,3	0,9	
(38-F2)	30,0	1,7	39,9	2,2	
(38-F3)	28,9	1,6	38,3	2,1	

CZARNA PORZECZKA

(38-NaOH)	18,1	1,2	24,0	1,6	
N1	22,8	1,4	30,2	1,8	
N2	27,9	0,3	37,0	0,4	
N3	30,9	3,1	41,0	4,1	
N4	35,6	0,7	47,2	0,9	
(M _{H2O})	58,1	1,2	96,9	2,1	2,87/1,72
(M _{CA})	39,5	0,9	66,0	1,4	
(M1)	32,9	2,3	54,9	3,9	
(M2)	34,9	0,8	58,3	1,4	
(M3)	32,6	0,6	54,3	0,9	
(M2-F0)	48,7	0,9	81,3	1,5	
(M2-F1)	23,5	0,5	39,2	0,8	
(M2-F2)	24,7	0,2	41,1	0,3	
(M2-NaOH)	12,2	0,2	20,3	0,3	
(T _{H2O})	60,6	1,5	95,2	2,4	1,57/-
(T _{CA})	23,5	0,4	36,9	0,7	
(T1)	29,8	0,4	46,7	0,6	
(T2)	29,7	1,0	46,6	1,6	
(T3)	27,0	1,8	42,4	2,8	
(T3-F0)	33,6	0,1	52,8	0,2	
(T3-F1)	30,2	0,3	47,4	0,5	
(T3-F2)	27,5	0,3	43,2	0,5	
(T3-NaOH)	5,5	0,2	8,7	0,3	
(R _{H2O})	37,2	1,7	92,2	4,2	2,48/-
(R _{CA})	22,2	0,4	55,0	1,1	
(R1)	25,1	1,0	62,3	2,4	
(R2)	22,6	0,6	56,0	1,6	
(R3)	22,7	1,2	56,2	2,9	
(R2-F0)	45,5	0,1	90,9	0,3	
(R2-F1)	24,9	1,6	61,7	3,9	
(R2-F2)	18,6	0,4	46,1	0,9	
(R2-NaOH)	5,5	0,5	13,7	1,4	

Założenie stanowiące podstawę obliczeń obejmowało sumę procentowych wartości kolorymetrii, charakteryzujących białka, polifenole oraz cukry całkowite, wynoszącą mniej niż 100%

Biorąc to pod uwagę oszacowano dla każdego z produktów nową wartość prezentującą udział cukrów w próbce (C1) (100% - polifenole (%) – białka (%) = C1). Dla każdego z produktów uzyskano przelicznik korekcyjny poprzez stosunek cukrów C1 do wartości wyjściowej cukrów oznaczonej kolorymetrycznie (C0). Wyznaczone przeliczniki, otrzymane dla preparatów roślinnych jednego surowca, posłużyły do uzyskania przelicznika właściwego (P1). Wartości kwasów uronowych jako cukrów kwasowych, mieściły się w zakresie wartości cukrów całkowitych C1. W przypadkach, gdy suma oznaczonych składników (C1 + polifenole + białka) przekraczała 100%, zastosowano dodatkowy przelicznik (P2), umożliwiający proporcjonalne przeskalowanie wszystkich analizowanych komponentów.

Zastosowane podejście umożliwiło zachowanie wzajemnych proporcji składników między próbkami, co pozwoliło na ich porównywanie w obrębie badanego surowca. Kolorymetria miała na celu pogłówną ocenę kompozycji komponentów produktów.

Tabela D2. Szacunkowe koszty zużycia energii elektrycznej w procesie ekstrakcji pektyn z wyłoków owocowych (50 g) w czasie: (A) - ekstrakcja wodna na gorąco, (B) - ekstrakcja NADES.

Proces jednostkowy A		Ekstrakcja 2-godzinna		Ekstrakcja 4-godzinna		Ekstrakcja 6-godzinna	
		t (h)	W (kWh)	t (h)	W (kWh)	t (h)	W (kWh)
1	ekstrakcja płaszcz grzejny	2,00	0,257	4,00	0,515	6,00	0,772
2	wirowanie wirówka	0,25	0,041	0,25	0,041	0,25	0,041
3	zateżanie wyparka rotacyjna	4,00	0,150	4,00	0,150	4,00	0,150
	łaźnia wodna	4,00	1,620	4,00	1,620	4,00	1,620
	pompa membranowa	4,00	0,400	4,00	0,400	4,00	0,400
4	AIR pompa membranowa	1,00	0,100	1,00	0,100	1,00	0,100
	mieszadło magnetyczne	2,00	0,002	2,00	0,002	2,00	0,002
5	dializa mieszadło magnetyczne	96,00	0,115	96,00	0,115	96,00	0,115
6	suszenie wyparka rotacyjna	3,00	0,113	3,00	0,113	3,00	0,113
	łaźnia wodna	3,00	1,215	3,00	1,215	3,00	1,215
	pompa membranowa	3,00	0,300	3,00	0,300	3,00	0,300
Suma			4,31		4,57		4,83
Szacunkowy koszt energetyczny procesu (zł)			4,23		4,48		4,73

Proces jednostkowy B			Ekstrakcja 4-godzinna		Ekstrakcja 6-godzinna	
			t (h)	W (kWh)	t (h)	W (kWh)
1	przygotowanie NADES	wyparka rotacyjna	0,50	0,019	0,50	0,019
		łaźnia wodna	0,50	0,203	0,50	0,203
		pompa membranowa	0,50	0,050	0,50	0,050
2	ekstrakcja	płaszcz grzejny	4,00	0,515	6,00	0,772
3	wirowanie	wirówka	0,25	0,041	0,25	0,041
4	zateżanie	wyparka rotacyjna	4,00	0,150	4,00	0,150
		łaźnia wodna	4,00	1,620	4,00	1,620
		pompa membranowa	4,00	0,400	4,00	0,400
5	wytrawianie	pompa membranowa	1,00	0,100	1,00	0,100
		mieszadło magnetyczne	2,00	0,002	2,00	0,002
6	dializa	mieszadło magnetyczne	96,00	0,115	96,00	0,115
7	suszenie	wyparka rotacyjna	3,00	0,113	3,00	0,113
		łaźnia wodna	3,00	1,215	3,00	1,215
		pompa membranowa	3,00	0,300	3,00	0,300
Suma				4,84		5,10
Szacunkowy koszt energetyczny procesu (zł)				4,75		5,00

* 1 kWh = 0,98 zł

Tabela D3. Parametry pracy urządzeń przyjęte do oszacowania zużycia energii w procesie ekstrakcji.

Urządzenie	Moc znamionowa (W)	Warunki pracy	Moc przyjęta do obliczeń (W)
wyparka rotacyjna	75	135 rpm; obciążenie ~50%	37,5
łaźnia wodna	1350	~55 °C; obciążenie ~30%	405,0
pompa membranowa	100	100%	100,0
plaszcz grzejny	450	obciążenie ~30%	128,7
wirówka	660	4 500 rpm, obciążenie ~25%	165,0
mieszadło magnetyczne	4	obciążenie ~30%	1,2

Zużycie energii elektrycznej oszacowano na podstawie mocy znamionowej urządzeń oraz przyjętych wartości mocy roboczej w oparciu o warunki prowadzenia procesu. Wykonane obliczenia mają charakter szacunkowy.

Tabela D4. Pasma FT-IR charakterystyczne dla polisacharydów – zestawienie liczb falowych dla produktów otrzymanych z wyłoków owoców czarnej porzeczki: (4), (11), (38), (38-F1), (38-F2) i (38-F3) (Liu i in., 2021; Huamani-Palomino i in., 2025; Pawlaczyk-Graja i in., 2019; Reichembach i in., 2022; Simão i in., 2024; Xu i in., 2016a; Kyomugasho i in., 2015).

Interpretacja pasma		Liczba falowa (cm ⁻¹)	(4)	(11)	(38)	(38-F1)	(38-F2)	(38-F3)
1.	O-H rozciągające	3500-3200	3379	3359	3354	3316	3317	3315
2.	C-H rozciągające, asymetryczne	2960-2900	2917	2917	2927	2929	2930	2929
3.	C-H rozciągające, symetryczne (gr. -CH ₃ , -CH ₂ -)	2890-2830	2849	-	-	2864	2864	2861
4.	C-H rozciągające, aldehydowe	2850-2600	2657	2653	2645	2649	2644	2648
5.	C=O rozciągające (gr. karbonylowa, estrowa, niesprężony keton)	1740-1680	1734	1736	1734	-	-	-
6.	C=O rozciągające (gr. karbonylowa, asymetryczne drania COO ⁻ w kwasach uronowych i ich solach, drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego)	1610-1590	1605	1603	1612	1597	1597	1597
7.	drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego - pochodne kw. ferulowego związane z pektyną (G>S)	1530-1505	1519	1521	1523	-	-	-
8.	drgania asymetryczne rozciągające estrów metylowych (pektyny)	1440	1439	1437	1438	-	-	-
9.	drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego połączone z deformacjami w płaszczyźnie wiązań C-H oraz symetryczne drgania rozciągające COO ⁻ w UA i ich solach	1430-1400	1422	1415	1420	1408	1409	1410
10.	alifatyczne drgania rozciągające C-H w grupach -CH ₃ (z wyłączeniem grup metoksyliowych OMe), drgania O-H fenoli oraz deformacje wiązań C-H w pierścieniu sacharydowym	1370-1365	1370	1370	1368	-	-	-
11.	drgania deformacyjne (zginające) grup O-H w pierścieniu piranozowym pektyn	1330-1320	-	1333	1331	1330	1329	1330
12.	asymetryczne drgania rozciągające C-O w gr. estrowych (pektyny)	1240, 1230	1241	1239	1230	1240	1241	1242
13.	drgania wiązań glikozydowych (O-C-O) w pektynach	1141	1140	1143	1144	1141	1141	1141
14.	drgania rozciągające -C-O-C-, C-O, C-C w pierścieniu pektyn	1100-1090	1089	1091	1094	1089	1093	1092
15.	-C-O-H- rozciągające w jednostkach sacharydowych, C-C rozciągające w pierścieniu sacharydowym (charakterystyczne dla galaktanu oraz ramnogalaktanu)	~1070	1071	1070	1069	1070	1072	1070
16.	deformacje w płaszczyźnie wiązań C-H w pierścieniu aromatycznym (G>C), deformacje C-O oraz drgania wiązań C-C w pierścieniu sacharydowym	1050-1000	1044/ 1015	1046/ 1018	1042/ 1013	1016	1016	1016
17.	drgania deformacyjne (zginające) O-H w kw. karboksylowych (pektyny)	950-910	923	924	923	956	955	955
18.	drgania deformacyjne wiązań β-glikozydowych	~890	891	887	889	893	894	894
19.	drgania deformacyjne wiązań α-glikozydowych	~860	-	-	-	856	856	856
20.	drgania deformacyjne poza płaszczyznę C-H w pozycjach 2 i 5 pierścienia aromatycznego	805-760	762	764	760	769	772	773
Stopień estryfikacji (%) (ang. <i>degree of esterification</i> , DE) [Kyomugasho i in., 2015]			~31,8	~45,9	~53,1	~2,3	~1,7	~3,2

(G): jednostki guajakolowe; (C): jednostki katecholowe; (S): jednostki syringylowe

Tabela D5. Pasma FT-IR charakterystyczne dla polisacharydów – zestawienie liczb falowych dla produktów otrzymanych z wyłoków owoców maliny: (M_{H2O}), (M_{CA}), (M2), (M2-F1), (M2-F2) (Liu i in., 2021; Huamani-Palomino i in., 2025; Pawlaczyk-Graja i in., 2019; Reichembach i in., 2022; Simão i in., 2024; Xu i in., 2016a; Kyomugasho i in., 2015).

Interpretacja pasma		Liczba falowa (cm ⁻¹)	(M _{H2O})	(M _{CA})	(M2)	(M2-F1)	(M2-F2)
1.	O-H rozciągające	3500-3200	3279	3260	3355	3303	3293
2.	C-H rozciągające, asymetryczne	2960-2900	2919	2946	2925	2934	2936
3.	C-H rozciągające, symetryczne (gr. -CH ₃ , -CH ₂ -)	2890-2830	-	2884	2853	2876	2876
4.	C-H rozciągające, aldehydowe	2850-2600	-	-	-	-	-
5.	C=O rozciągające (gr. karbonylowa, estrowa, niesprężony keton)	1740-1680	1726	1723	1731	-	-
6.	C=O rozciągające (gr. karbonylowa, asymetryczne drania COO ⁻ w kwasach uronowych i ich solach, drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego)	1610-1590	1605	1625	1612	1597	1597
7.	drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego - pochodne kw. ferulowego związane z pektyną (G>S)	1530-1505	-	1517	1536	-	-
8.	drgania asymetryczne rozciągające estrów metylowych (pektyny)	1440	-	-	1441	-	-
9.	drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego połączone z deformacjami w płaszczyźnie wiązań C-H oraz symetryczne drgania rozciągające COO ⁻ w UA i ich solach	1430-1400	1418	1419	1413	1408	1408
10.	alifatyczne drgania rozciągające C-H w grupach -CH ₃ (z wyłączeniem grup metoksyłowych OMe), drgania O-H fenoli oraz deformacje wiązań C-H w pierścieniu sacharydowym	1370-1365	1367	-	1367	-	-
11.	drgania deformacyjne (zginające) grup O-H w pierścieniu piranozowym pektyn	1330-1320	1337	1321	1325	1328	1327
12.	asymetryczne drgania rozciągające C-O w gr. estrowych (pektyny)	1240, 1230	1233	1227	1230	1237	1236
13.	drgania wiązań glikozydowych (O-C-O) w pektynach	1141	1144	1143	1143	1142	1141
14.	drgania rozciągające -C-O-C-, C-O, C-C w pierścieniu pektyn	1100-1090	-	1099	1100	1093	1094
15.	-C-O-H- rozciągające w jednostkach sacharydowych, C-C rozciągające w pierścieniu sacharydowym (charakterystyczne dla galaktanu oraz ramnogalaktanu)	~1070	1075	1072	1069	1073	1073
16.	deformacje w płaszczyźnie wiązań C-H w pierścieniu aromatycznym (G>C), deformacje C-O oraz drgania wiązań C-C w pierścieniu sacharydowym	1050-1000	1011	1047/1013	1046/1012	1016	1014
17.	drgania deformacyjne (zginające) O-H w kw. karboksylowych (pektyny)	950-910	-	955	953	954	953
18.	drgania deformacyjne wiązań β-glikozydowych	~890	896	891	888	893	893
19.	drgania deformacyjne wiązań α-glikozydowych	~860	-	830	-	854	855
20.	drgania deformacyjne poza płaszczyzną C-H w pozycjach 2 i 5 pierścienia aromatycznego	805-760	756	746	756	768	771
Stopień estryfikacji (%) (ang. <i>degree of esterification</i> , DE) [Kyomugasho i in., 2015]			~38,9	~38,0	~18,5	~1,0	~1,6

(G): jednostki guajakolowe; (C): jednostki katecholowe; (S): jednostki syringylowe

Tabela D6. Pasma FT-IR charakterystyczne dla polisacharydów – zestawienie liczb falowych dla produktów otrzymanych z wyłoków owoców truskawki: (T_{H2O}), (T_{CA}), (T3), (T3-F1), (T3-F2) (Liu i in., 2021; Huamani-Palomino i in., 2025; Pawlaczyk-Graja i in., 2019; Reichembach i in., 2022; Simão i in., 2024; Xu i in., 2016a; Kyomugasho i in., 2015).

Interpretacja pasma		Liczba falowa (cm ⁻¹)	(T _{H2O})	(T _{CA})	(T3)	(T3-F1)	(T3-F2)
1.	O-H rozciągające	3500-3200	3269	3276	3291	3284	3289
2.	C-H rozciągające, asymetryczne	2960-2900	2939	2935	2931	2930	2933
3.	C-H rozciągające, symetryczne (gr. -CH ₃ , -CH ₂ -)	2890-2830	2887	2878	2880	2876	2876
4.	C-H rozciągające, aldehydowe	2850-2600	-	-	2640	-	2652
5.	C=O rozciągające (gr. karbonylowa, estrowa, niesprężony keton)	1740-1680	1723	1725	1727	-	-
6.	C=O rozciągające (gr. karbonylowa, asymetryczne drania COO ⁻ w kwasach uronowych i ich solach, drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego)	1610-1590	1606	1625	1621	1602	1600
7.	drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego - pochodne kw. ferulowego związane z pektyną (G>S)	1530-1505	-	1521	1520	-	-
8.	drgania asymetryczne rozciągające estrów metylowych (pektyny)	1440	-	1439	1441	-	-
9.	drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego połączone z deformacjami w płaszczyźnie wiązań C-H oraz symetryczne drgania rozciągające COO ⁻ w UA i ich solach	1430-1400	1417	1402	1409	1406	1405
10.	alifatyczne drgania rozciągające C-H w grupach -CH ₃ (z wyłączeniem grup metoksyłowych OMe), drgania O-H fenoli oraz deformacje wiązań C-H w pierścieniu sacharydowym	1370-1365	1374	-	-	-	-
11.	drgania deformacyjne (zginające) grup O-H w pierścieniu piranozowym pektyn	1330-1320	1322	1323	1322	1329	1327
12.	asymetryczne drgania rozciągające C-O w gr. estrowych (pektyny)	1240, 1230	1241	1230	1227	1239	1238
13.	drgania wiązań glikozydowych (O-C-O) w pektynach	1141	1444	1144	1144	1140	1142
14.	drgania rozciągające -C-O-C-, C-O, C-C w pierścieniu pektyn	1100-1090	-	-	-	1097	1093
15.	-C-O-H- rozciągające w jednostkach sacharydowych, C-C rozciągające w pierścieniu sacharydowym (charakterystyczne dla galaktanu oraz ramnogalaktanu)	~1070	1071	1069	1068	1070	1072
16.	deformacje w płaszczyźnie wiązań C-H w pierścieniu aromatycznym (G>C), deformacje C-O oraz drgania wiązań C-C w pierścieniu sacharydowym	1050-1000	1021	1017	1015	1018	1016
17.	drgania deformacyjne (zginające) O-H w kw. karboksylowych (pektyny)	950-910	-	959	956	957	954
18.	drgania deformacyjne wiązań β-glikozydowych	~890	893	892	893	894	894
19.	drgania deformacyjne wiązań α-glikozydowych	~860	-	-	-	856	856
20.	drgania deformacyjne poza płaszczyzną C-H w pozycjach 2 i 5 pierścienia aromatycznego	805-760	-	-	759	771	768
Stopień estryfikacji (%) (ang. <i>degree of esterification</i> , DE) [Kyomugasho i in., 2015]			~37,4	~25,1	~19,6	~5,7	~7,3

(G): jednostki guajakolowe; (C): jednostki katecholowe; (S): jednostki syringylowe

Tabela D7. Pasma FT-IR charakterystyczne dla polisacharydów – zestawienie liczb falowych dla produktów otrzymanych z wyłoków owoców rokitnika (R_{H_2O}), (R_{CA}), (R_2), (R_2 -F1), (R_2 -F2) (Liu i in., 2021; Huamani-Palomino i in., 2025; Pawlaczyk-Graja i in., 2019; Reichembach i in., 2022; Simão i in., 2024; Xu i in., 2016a; Kyomugasho i in., 2015).

	Interpretacja pasma	Liczba falowa (cm^{-1})	(R_{H_2O})	(R_{CA})	(R_2)	(R_2 -F1)	(R_2 -F2)
1.	O-H rozciągające	3500-3200	3279	3283	3299	3296	3292
2.	C-H rozciągające, asymetryczne	2960-2900	2944	2932	2930	2932	2932
3.	C-H rozciągające, symetryczne (gr. $-CH_3$, $-CH_2-$)	2890-2830	2882	-	2879	-	-
4.	C-H rozciągające, aldehydowe	2850-2600	-	-	-	2650	2652
5.	C=O rozciągające (gr. karbonylowa, estrowa, niesprężony keton)	1740-1680	1730	1730	1738	-	-
6.	C=O rozciągające (gr. karbonylowa, asymetryczne drania COO^- w kwasach uronowych i ich solach, drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego)	1610-1590	1643	1642	1614	1599	1599
7.	drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego - pochodne kw. ferulowego związane z pektyną (G>S)	1530-1505	1529	1521	1538	-	-
8.	drgania asymetryczne rozciągające estrów metylowych (pektyny)	1440	1437	1439	1439	-	-
9.	drgania szkieletowe pierścienia aromatycznego połączone z deformacjami w płaszczyźnie wiązań C-H oraz symetryczne drgania rozciągające COO^- w UA i ich solach	1430-1400	1401	-	1403	1407	1406
10.	alifatyczne drgania rozciągające C-H w grupach $-CH_3$ (z wyłączeniem grup metoksyłowych OMe), drgania O-H fenoli oraz deformacje wiązań C-H w pierścieniu sacharydowym	1370-1365	1367	1366	1369	-	-
11.	drgania deformacyjne (zginające) grup O-H w pierścieniu piranozowym pektyn	1330-1320	1320	1315	1325	1326	1328
12.	asymetryczne drgania rozciągające C-O w gr. estrowych (pektyny)	1240, 1230	1227	1225	1233	1237	1239
13.	drgania wiązań glikozydowych (O-C-O) w pektynach	1141	1143	1145	1143	1141	1141
14.	drgania rozciągające -C-O-C-, C-O, C-C w pierścieniu pektyn	1100-1090	1099	1099	1095	1094	1094
15.	-C-O-H- rozciągające w jednostkach sacharydowych, C-C rozciągające w pierścieniu sacharydowym (charakterystyczne dla galaktanu oraz ramnogalaktanu)	~1070	1073	1073	1074	1073	1073
16.	deformacje w płaszczyźnie wiązań C-H w pierścieniu aromatycznym (G>C), deformacje C-O oraz drgania wiązań C-C w pierścieniu sacharydowym	1050-1000	1045/1015	1045/1015	1045/1015	1015	1014
17.	drgania deformacyjne (zginające) O-H w kw. karboksylowych (pektyny)	950-910	920	922	915	953	954
18.	drgania deformacyjne wiązań β -glikozydowych	~890	887	X	893	894	893
19.	drgania deformacyjne wiązań α -glikozydowych	~860	-	-	852	854	854
20.	drgania deformacyjne poza płaszczyzną C-H w pozycjach 2 i 5 pierścienia aromatycznego	805-760	756	652	761	770	760
Stopień estryfikacji (%) (ang. <i>degree of esterification</i> , DE) [Kyomugasho i in., 2015]			~38,0	~	~27,8	~1,6	~2,8

(G): jednostki guajakolowe; (C): jednostki katecholowe; (S): jednostki syringylowe

SPIS TABEL I RYCIN

- Ryc. 1.** Porównanie organizacji strukturalnej białek oraz polisacharydów [na podstawie: Diener i in., 2019; Du i in., 2022; Fu i in., 2024].
- Ryc. 2.** Struktura wybranych polisacharydów naturalnych: (A) homoglukany (polimery glukozy o zróżnicowanych typach wiązań glikozydowych) oraz (B) pektyny zbudowane z różnych monosacharydów połączonych wiązaniami glikozydowymi typu α i β [na podstawie: Zheng i in., 2023].
- Ryc. 3.** Struktura homogalakuronianu oraz mechanizmy jego sieciowania podczas żelowania pektyn [Obomighie i in., 2025].
- Ryc. 4.** Klasyfikacja mieszanin głęboko eutektycznych [Luque-Uria i in., 2025].
- Ryc. 5.** Parametry wpływające na proces ekstrakcji z zastosowaniem NADES [na podstawie: Sahin i in., 2026].
- Ryc. 6.** Planowanie eksperymentu (DoE) – schematyczne rozmieszczenie punktów eksperymentalnych w przestrzeni 3D dla wybranych planów eksperymentalnych metodologii powierzchni odpowiedzi (RSM), obrazujące główne różnice między tymi modelami [Witek-Krowiak i in., 2014; Yolmeh i Jafari, 2017].
- Ryc. 7.** Średnia roczna produkcja owoców (A) oraz owoców jagodowych (B) w Polsce w latach 2021–2024 [GUS].
- Ryc. 8.** Diagram Sankeya przedstawiający główne kierunki wykorzystania zbiorów owoców w Polsce na przykładzie porzeczki [na podstawie: Wądrzyk i in., 2025] (narzędzie online: sankeyart.com).
- Ryc. 9.** Produkcja porzeczek w 2024 roku: (A) najwięksi producenci na świecie, (B) produkcja w Polsce na tle produkcji globalnej [FAOSTAT].
- Ryc. 10.** Produkcja malin w 2024 roku: (A) najwięksi producenci na świecie, (B) produkcja w Polsce na tle produkcji globalnej [FAOSTAT].
- Ryc. 11.** Produkcja truskawek w 2024 roku: (A) najwięksi producenci na świecie, (B) produkcja w Polsce na tle produkcji globalnej [FAOSTAT].
- Ryc. 12.** Czarna porzeczka (*Ribes nigrum* L.) [Lindmann, 1917].
- Ryc. 13.** Malina właściwa (*Rubus idaeus* L.) [Lindmann, 1917].
- Ryc. 14.** Poziomka truskawka (*Fragaria x ananassa* Duchesne) [Lindmann, 1917].
- Ryc. 15.** Rokitnik zwyczajny (*Hippophae rhamnoides* L.) [Lindmann, 1917].
- Ryc. 16.** Morfologia wyłoków owocowych: A – czarna porzeczka; B – malina; C – truskawka; D – rokitnik, na podstawie dokumentacji fotograficznej (1) oraz obrazów mikroskopowych w powiększeniu 4 – 10x (2).
- Ryc. 17.** Łańcuch procesowy wyodrębniania pektyn z biomasy roślinnej.
- Ryc. 18.** Schematyczne przedstawienie interakcji w mieszaninie NADES ChCl/CA [Ali i in., 2023; Sakurai i in., 2024].
- Ryc. 19.** Widma ATR-FTIR dla NADES (ChCl/CA 1:1) przy różnym udziale wody.
- Ryc. 20.** Schemat postępowania przyjęty w czasie prowadzenia optymalizacji procesu ekstrakcji pektyn z wyłoków czarnej porzeczki z wykorzystaniem układów NADES [Bezerra i in., 2008].
- Ryc. 21.** Wykresy powierzchni odpowiedzi (RSM) przedstawiające wpływ stosunku molowego ChCl i CA w NADES na: (a) wydajność procesu ekstrakcji, (b) udział polisacharydów w produkcie, (c) udział kwasów uronowych oraz (d) udział polifenoli, w czasie prowadzenia ekstrakcji 4,5 lub 6 h.
- Ryc. 22.** Analiza stopnia dopasowania modeli eksperymentalnych.
- Ryc. 23.** Wpływ czasu ekstrakcji na uzysk kwasów uronowych (UA) z wyłoków owocu czarnej porzeczki oraz zużycie energii w procesie ekstrakcji: ekstrakcja wodna na gorąco (HWE) oraz z zastosowaniem układów NADES (z uwzględnieniem zużycia energii do przygotowania NADES).
- Ryc. 24.** Chromatografia jonowymienna DEAE produktów roślinnych, otrzymanych z wyłoków owocu czarnej porzeczki: (A) - HWE przez 6 h (4), (B) - ekstrakcja w 10% CA (11), z uwzględnieniem profilu dla kwasów uronowych, polifenoli oraz białek.
- Ryc. 25.** Chromatografia jonowymienna produktów wyodrębnionych z wyłoków owoców: (A) - czarnej porzeczki (38), (B) – maliny (M2), (C) – truskawki (T3), (D) - rokitnika (T2), na złożu DEAE-Sephadex, z uwzględnieniem profilu dla kwasów uronowych oraz polifenoli
- Ryc. 26.** Chromatografia LH-20 pektynowych frakcji dominujących: (A) - (38-F1), (B) - (M2-F1), (C) - (T3-F1) i (D) - (R2-F1), otrzymanych w wyniku separacji wybranych produktów na drodze chromatografii jonowymiennej DEAE.
- Ryc. 27.** Pozorna względna masa cząsteczkowa (Mapp) dla produktu z wyłoków owocu czarnej porzeczki (38) oraz jego frakcji (38-F1), (38-F2) i (38-F3).
- Ryc. 28.** Pozorna względna masa cząsteczkowa (Mapp) dla produktu z wyłoków owocu maliny (M2) oraz jego frakcji (M2-F1) i (M2-F2).

- Ryc. 29.** Pozorna względna masa cząsteczkowa (Mapp) dla produktu z wycieków owoców truskawki (T3) oraz jego frakcji (T3-F1) i (T3-F2).
- Ryc. 30.** Pozorna względna masa cząsteczkowa (Mapp) dla produktu z wycieków owoców rokitnika (R2) oraz jego frakcji (R2-F1) i (R2-F2).
- Ryc. 31.** Widma FTIR-ATR produktów wyodrębnionych z wycieków: (A) - owocu czarnej porzeczki, (B) – owocu maliny, (C) - owocu truskawki, (D) - owocu rokitnika.
- Ryc. 32.** Analiza składu monosacharydów w produktach (4) i (11) otrzymanych z wycieków owocu czarnej porzeczki oraz w ich frakcjach otrzymanych na drodze IEC. W tabelach przedstawiono wskaźniki strukturalne dla każdej badanej mieszaniny [Houben i in., 2011].
- Ryc. 33.** Analiza składu monosacharydów w produkcie (38) otrzymanym z wycieków owocu czarnej porzeczki oraz jego frakcji uzyskanych w IEC. W tabelach przedstawiono wskaźniki strukturalne dla każdej badanej mieszaniny [Houben i in., 2011].
- Ryc. 34.** Analiza składu monosacharydów w produkcie (M2) otrzymanym z wycieków owocu maliny oraz jego frakcji pektynowych wydzielonych w IEC. W tabelach przedstawiono wskaźniki strukturalne dla każdej badanej mieszaniny [Houben i in., 2011].
- Ryc. 35.** Analiza składu monosacharydów w produkcie (T3) otrzymanym z wycieków owocu truskawki oraz jego frakcji pektynowych wydzielonych w IEC. W tabelach przedstawiono wskaźniki strukturalne dla każdej badanej mieszaniny [Houben i in., 2011].
- Ryc. 36.** Analiza składu monosacharydów w produkcie (R2) otrzymanym z wycieków owocu rokitnika oraz jego frakcji pektynowych wydzielonych w IEC. W tabelach przedstawiono wskaźniki strukturalne dla każdej badanej mieszaniny [Houben i in., 2011].
- Ryc. 37.** Wybrane regiony widm ^1H NMR dla frakcji pektynowych: (A) - czarnej porzeczki (38-F1), (B) - rokitnika (R2-F1), (C) - maliny (M2-F1) oraz (D) - truskawki (T3-F1).
- Ryc. 38.** Wybrane regiony widm ^1H – ^{13}C HSQC (CH, CH₃ – niebieski; CH₂ - czerwony) oraz widm HMBC (zielony) dla: (A) - produktu (38), (B) - frakcji pektynowej (38-F1).
- Ryc. 39.** Wybrane regiony widm ^1H – ^{13}C HSQC NMR (CH, CH₃ – niebieski; CH₂ - czerwony) dla frakcji pektynowej: (A) - czarnej porzeczki (38-F1), (B) - rokitnika (R2-F1), (C) - maliny (M2-F1), (D) - truskawki (T3-F1).
- Ryc. 40.** Morfologia produktów optymalnych (38), (M2), (T3) i (R2) oraz ich dominujących frakcji pektynowych (38-F1), (M2-F1), (T3-F1) i (R2-F1), na podstawie obrazów mikroskopowych w powiększeniu 4–40×.
- Ryc. 41.** Mikrofotografie SEM produktu otrzymanego z wycieków owocu czarnej porzeczki (38) oraz jego frakcji (38-F1), (38-F2) i (38-F3), uzyskanych na drodze chromatografii jonowymiennej.
- Ryc. 42.** Mikrofotografie SEM produktu otrzymanego z wycieków owocu maliny (M2) oraz jego frakcji (M2-F1) i (M2-F2), uzyskanych na drodze chromatografii jonowymiennej.
- Ryc. 43.** Mikrofotografie SEM produktu otrzymanego z wycieków owocu truskawki (T3) oraz jego frakcji (T3-F1) i (T3-F2), uzyskanych na drodze chromatografii jonowymiennej.
- Ryc. 44.** Mikrofotografie SEM produktu otrzymanego z wycieków owocu rokitnika (R2) oraz jego frakcji (R2-F1) i (R2-F2), uzyskanych na drodze chromatografii jonowymiennej.
- Ryc. 45.** Obrazy SEM produktów optymalnych oraz frakcji dominujących wraz z mapowaniem pierwiastkowym (A) oraz widmami EDS (B).
- Ryc. 46.** Kompozycja monosacharydowa produktów (38), (M2), (T3) i (R2) oraz frakcji (38-F1), (M2-F1), (T3-F1) i (R2-F1).
- Ryc. 47.** Propozycja struktury frakcji pektynowej (38-F1) otrzymanej z wycieków owocu czarnej porzeczki.
- Ryc. 48.** Propozycja struktury frakcji pektynowej (M2-F1) otrzymanej z wycieków owocu maliny.
- Ryc. 49.** Propozycja struktury frakcji pektynowej (T3-F1) otrzymanej z wycieków owocu truskawki.
- Ryc. 50.** Propozycja struktury frakcji pektynowej (R2-F1) otrzymanej z wycieków owocu rokitnika.

- Tabela 1.** Konwencjonalne metody ekstrakcji pektyn z biomasy owocowej rodzimych owoców jadalnych.
- Tabela 2.** Przykładowe donory (HBA) oraz akceptory (HBD) wiązania wodorowego w mieszaninach eutektycznych do przetwarzania polisacharydów [Dai i in., 2013; Smith i in., 2014; Zdanowicz i in., 2018; Huang i in., 2019; Satija i in., 2024].
- Tabela 3.** Przykładowe układy HBA-HBD w rozpuszczalnikach NADES stosowanych do przetwarzania polisacharydów [Dai i in., 2013; Smith i in., 2014; Zdanowicz i in., 2018; Huang i in., 2019; Satija i in., 2024; Hadidi i in., 2025; Sahin i in., 2026].
- Tabela 4.** Alternatywne metody ekstrakcji pektyn z biomasy owoców rodzimych.
- Tabela 5.** Taksonomia botaniczna czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) [Woziwoda, 2014].
- Tabela 6.** Taksonomia botaniczna maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.) [Woziwoda, 2014].
- Tabela 7.** Taksonomia botaniczna poziomki truskawki (potocznie truskawka) (*Fragaria x ananassa* Duchesne) [Woziwoda, 2014].
- Tabela 8.** Taksonomia botaniczna rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) [Woziwoda, 2014].
- Tabela 9.** Morfologiczna ocena surowców roślinnych użytych do badań.
- Tabela 10.** Ocena ilości wody w badanych surowcach roślinnych.
- Tabela 11.** Wydajność oraz charakterystyka chemiczna polisacharydów otrzymanych z wycieków wybranych surowców roślinnych – ekstrakcja wodna (WE).
- Tabela 12.** Wydajność oraz charakterystyka chemiczna polisacharydów otrzymanych z wycieków czarnej porzeczki – ekstrakcja wodna (WE).
- Tabela 13.** Właściwości mediów ekstrakcyjnych oraz wydajność i charakterystyka chemiczna polisacharydów otrzymanych z wycieków czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) – ekstrakcja wodna na gorąco o ustalonym pH i sile jonowej.
- Tabela 14.** Właściwości mediów ekstrakcyjnych oraz wydajność i charakterystyka chemiczna polisacharydów otrzymanych z wycieków czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) przy wykorzystaniu NADES (ChCl/CA 1:1) przy zróżnicowanym udziale wody w układzie.
- Tabela 15.** Zakres zmiennych niezależnych i ich poziomy kodowania – optymalizacja procesu ekstrakcji pektyn z wycieków czarnej porzeczki z wykorzystaniem układów NADES.
- Tabela 16.** Macierz eksperymentalna I-optimal zmiennych zależnych oraz eksperymentalnie wyznaczonych wartości zmiennych zależnych dla pektyn z wycieków owocu czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) wyodrębnionych na drodze ekstrakcji w NADES. Zmienne zależne podano jako średnie z trzech powtórzeń.
- Tabela 17.** Właściwości mediów ekstrakcyjnych oraz wydajność i charakterystyka chemiczna polisacharydów otrzymanych z wycieków czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) – ekstrakcja z wykorzystaniem układów NADES.
- Tabela 18.** Analiza wariancji (ANOVA) dla modelu liniowego, opisującego wpływ zmiennych niezależnych na wydajność procesu separacji polisacharydów.
- Tabela 19.** Analiza wariancji (ANOVA) dla modelu kwadratowego, opisującego udział polisacharydów w produktach otrzymanych z wycieków czarnej porzeczki.
- Tabela 20.** Analiza wariancji (ANOVA) dla modelu kwadratowego opisującego udział kwasów uronowych w produktach uzyskanych z wycieków owocu czarnej porzeczki.
- Tabela 21.** Analiza wariancji (ANOVA) dla modelu kwadratowego opisującego udział polifenoli w produktach uzyskanych z wycieków owocu czarnej porzeczki.
- Tabela 22.** Charakterystyka chemiczna produktów otrzymanych z wycieków owoców czarnej porzeczki podczas 4-godzinnej ekstrakcji dla wybranych optymalnych parametrów procesu: (P) – dane uzyskane na drodze predykcji, (E) wartości wyznaczone eksperymentalnie.
- Tabela 23.** Zestawienie zużycia energii elektrycznej oraz ilości UA w produkcie, w zależności od czasu prowadzenia procesu ekstrakcji dla ekstrakcji w wodzie w podwyższonej temperaturze (HWE) oraz dla ekstrakcji w układzie NADES.
- Tabela 24.** Wydajność i charakterystyka chemiczna produktów otrzymanych z wycieków owoców czarnej porzeczki, maliny, truskawki oraz rokitnika – ekstrakcja w wodzie w podwyższonej temperaturze (HWE), w 10% CA oraz ekstrakcja w wybranych optymalnych układach NADES.
- Tabela 25.** Wydajność oraz charakterystyka chemiczna frakcji uzyskanych w wyniku frakcjonowania IEC produktów roślinnych (4) oraz (11) otrzymanych z wycieków owoców czarnej porzeczki.
- Tabela 26.** Wydajność oraz charakterystyka chemiczna frakcji uzyskanych w wyniku frakcjonowania IEC produktów roślinnych otrzymanych z wycieków owoców czarnej porzeczki (38), maliny (M2), truskawki (T3) oraz rokitnika (R2) poprzez zastosowanie warunków optymalnych ekstrakcji NADES.
- Tabela 27.** Charakterystyka mas cząsteczkowych (Mp, Mn, Mw; g/mol) oraz wskaźnika PDI (Mw/Mn) produktu (38) oraz jego frakcji (38-F1), (38-F2) oraz (38-F3).
- Tabela 28.** Charakterystyka mas cząsteczkowych (Mp, Mn, Mw; g/mol) oraz wskaźnika PDI (Mw/Mn) dla produktu (M2) oraz jego frakcji (M2-F1) i (M2-F2).

- Tabela 29.** Charakterystyka masy cząsteczkowej (M_p , M_n , M_w) oraz wskaźnika PDI (M_w/M_n) dla produktu (T3) oraz jego frakcji (T3-F1) i (T3-F2).
- Tabela 30.** Charakterystyka masy cząsteczkowej (M_p , M_n , M_w ; g/mol) oraz wskaźnika PDI (M_w/M_n) dla produktu (R2) oraz jego frakcji (R2-F1) i (R2-F2).
- Tabela 31.** Monosacharydy jako składniki produktów wyekstrahowanych z wycieków czarnej porzeczki (38), maliny (M2), truskawki (T3), rokitnika (R2) i ich frakcji pektynowych. Zestawienie danych liczbowych wraz z wartościami wskaźników strukturalnych.
- Tabela 32.** 1H - ^{13}C HSQC NMR – zestawienie danych dla widm polisacharydów czarnej porzeczki (38) oraz frakcji pektynowej (38-F1). Brakujące sygnały nie zostały zidentyfikowane z powodu nakładania się lub bardzo niskiej intensywności.
- Tabela 33.** 1H - ^{13}C HSQC NMR – zestawienie przesunięć chemicznych reprezentujących wybrane reszty cukrowe obecne w dominujących frakcjach pektynowych (M2-F1), (T3-F1) oraz (R2-F1) [Dou i in., 2025; Wu i in., 2022].
- Tabela D1.** Wyjściowe wyniki kolorymetrii cukrów całkowitych (C0) oraz skorygowane wartości końcowe (C1).
- Tabela D2.** Szacunkowe koszty zużycia energii elektrycznej w procesie ekstrakcji pektyn z wycieków owocowych (50 g) w czasie: (A) ekstrakcja wodna na gorąco, (B) ekstrakcja NADES.
- Tabela D3.** Parametry pracy urządzeń przyjęte do oszacowania zużycia energii w procesie ekstrakcji.
- Tabela D4.** Pasma FT-IR charakterystyczne dla polisacharydów – zestawienie liczb falowych dla produktów otrzymanych z wycieków owoców czarnej porzeczki: (4), (11), (38), (38-F1), (38-F2) i (38-F3) (Liu i in., 2021; Huamani-Palomino i in., 2025; Pawlaczyk-Graja i in., 2019; Reichembach i in., 2022; Simão i in., 2024; Xu i in., 2016a; Kyomugasho i in., 2015).
- Tabela D5.** Pasma FT-IR charakterystyczne dla polisacharydów – zestawienie liczb falowych dla produktów otrzymanych z wycieków owoców maliny: (M_{H_2O}), (M_{CA}), (M2), (M2-F1), (M2-F2) (Liu i in., 2021; Huamani-Palomino i in., 2025; Pawlaczyk-Graja i in., 2019; Reichembach i in., 2022; Simão i in., 2024; Xu i in., 2016a; Kyomugasho i in., 2015).
- Tabela D6.** Pasma FT-IR charakterystyczne dla polisacharydów – zestawienie liczb falowych dla produktów otrzymanych z wycieków owoców truskawki: (T_{H_2O}), (T_{CA}), (T3), (T3-F1), (T3-F2) (Liu i in., 2021; Huamani-Palomino i in., 2025; Pawlaczyk-Graja i in., 2019; Reichembach i in., 2022; Simão i in., 2024; Xu i in., 2016a; Kyomugasho i in., 2015).
- Tabela D7.** Pasma FT-IR charakterystyczne dla polisacharydów – zestawienie liczb falowych dla produktów otrzymanych z wycieków owoców rokitnika (R_{H_2O}), (R_{CA}), (R2), (R2-F1), (R2-F2) (Liu i in., 2021; Huamani-Palomino i in., 2025; Pawlaczyk-Graja i in., 2019; Reichembach i in., 2022; Simão i in., 2024; Xu i in., 2016a; Kyomugasho i in., 2015).

8. DOROBK NAUKOWY

PUBLIKACJE NAUKOWE				
L.p.	Czasopismo	Autorzy	Tytuł publikacji	Punkty MEiN
1.	Carbohydrate Polymers	A. Mazurek-Hołos, E. Górski, M. Tsirigotis-Maniecka, R. Bleha, A. Synytsya, I. Pawlaczyk-Graja	Evaluation of I-Optimal and Box–Behnken Designs for Green Extraction of Pectins Using NADES from Carrot Pomace	140
2.	Polymers	A. Mazurek-Hołos, E. Górski, M. Tsirigotis-Maniecka, M. Zoumpanioti, R. Bleha, I. Pawlaczyk-Graja	Eco-Friendly Recovery of Homogalacturonan-Rich pectin from Flaxseed cake via NADES extraction	100
3.	Polymers	M. Tsirigotis-Maniecka, E. Górski, A. Mazurek-Hołos., I. Pawlaczyk-Graja	Unlocking the potential of food waste: A review of multifunctional pectins	100
Referaty konferencyjne				
L.p.	Konferencja	Autorzy	Tytuł publikacji	
4.	The 18th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, 9-11 November 2022, Prague, Czech Republic: proceedings/eds. Radmila Řápková [i in.]. Prague; Czech Chemical Society, cop. 2022. s. 68-71. ISSN 2336-6796	E. Górski, A. Mazurek-Hołos, I. Pawlaczyk-Graja	Natural deep eutectic solvents in pectins extraction from black currant pomace	
5.	The 18th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, 9-11 November 2022, Prague, Czech Republic: proceedings/eds. Radmila Řápková [i in.]. Prague; Czech Chemical Society, cop. 2022. s. 93-96. ISSN 2336-6796	A. Mazurek-Hołos, E. Górski, W. Różycka, I. Pawlaczyk-Graja	Polysaccharides from flaxseed - isolation by natural deep eutectic solvents	
PROJEKTY BADAWCZE				
L.p.	Tytuł projektu	Źródła finansowania	Okres realizacji	Charakter udziału
1.	Wieloskalowa analiza wpływu parametrów technologicznych procesu ekstrakcji z zastosowaniem naturalnych mieszanin głęboko eutektycznych na właściwości pektyn z wyłoków owocowych (2020/39/O/ST8/03514)	NCN Preludium Bis 2	01.10.2021 – 30.09.2025	wykonawca
2.	Zagraniczny Staż Doktorski NAWA Preludium BIS 2	NAWA	01.03. – 01.06.2024	kierownik, wykonawca

WSPÓŁPRACE MIĘDZYNARODOWE

L.p.	Ośrodek naukowy	Przedstawiciele	Forma współpracy
1.	Słowacka Akademia Nauk, Instytut Chemii, Bratysława	dr Peter Capek, dr Zuzana Košťálová	- staż zagraniczny - przygotowanie manuskryptów publikacji naukowych

STAŻE NAUKOWE I ZAGRANICZNE

L.p.	Ośrodek naukowy	Opiekun naukowy	Forma współpracy	Okres realizacji
1.	Instytut Chemii, Słowacka Akademia Nauk, Bratysława	dr Peter Capek, dr Zuzana Košťálová	- przeprowadzenie zaawansowanych analiz chromatograficznych oraz spektroskopowych dla wybranych produktów pektynowych - przygotowanie manuskryptów publikacji naukowych	01.03. – 01.06.2024

NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

L.p.	Nagroda	Nazwa instytucji	Data
1.	Nagroda kategorii A w konkursie dla Młodych Naukowców Wystąpienie pt. „Natural Deep Eutectic Solvents in pectins extraction from black currant pomace” Autorzy: E. Górską, A. Mazurek, I. Pawlaczyk-Graja	The 18th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, Praga, Czechy	09-11.11.2022

INNE

L.p.	Aktywność naukowa	Data
1.	Udział w organizacji i prowadzeniu warsztatów pt. "Analityczne tajemnice technologia chemicznego" w ramach Dni Otwartych Wydziału Chemicznego	05.04.2024

KONFERENCJE KRAJOWE I MIĘDZYNARODOWE						
L.p.	Kraj	Data	Konferencja	Tytuł wystąpienia	Autorzy	Typ prezentacji
1.	Lublin, Polska (online)	18.11.2021	III Ogólnopolska Konferencja Naukowa: perspektywy wykorzystania roślin w nauce i przemyśle	Koniugaty polisacharydowe z jeżówki purpurowej - wyodrębnianie przy zastosowaniu mieszanin głęboko eutektycznych i charakterystyka chemiczna	E. Górską, I. Pawlaczyk-Graja	ustna
2.	Wrocław, Polska (online)	12.03.2022	AgroBiotechnology For The Better Future, Fungi and Plants International Conference	Green technologies in separation of pectins from fruit pomace	E. Górską, I. Pawlaczyk-Graja	poster
3.	Łódź, Polska	19- 20.05.2022	IX Łódzkie Symposium Doktorantów Chemii	Pectins from black currant pomace – extraction by NADES and chemical characterization	E. Górską, I. Pawlaczyk-Graja	poster
4.	Praga, Republika Czeska	9-11.11.2022	The 18th International Conference on Polysaccharides- Glycoscience	Natural deep eutectic solvents in pectins extraction from black currant pomace → <i>Nagroda kategorii A w konkursie dla Młodych Naukowców</i>	E. Górską, A. Mazurek, I. Pawlaczyk-Graja	poster
				Polysaccharides from flaxseed - isolation by natural deep eutectic solvents	A. Mazurek, W. Różycka, E. Górską, I. Pawlaczyk-Graja	poster
5.	Paryż, Francja	09- 13.07.2023	The 21st European Carbohydrate Symposium (Eurocarb21)	Optimization and chemical characterization of pectins from blackcurrant fruit pomace obtained by NADES extraction	E. Górską, A. Mazurek, I. Pawlaczyk-Graja	poster
				Optimization of NADES-based polysaccharide extraction from carrot pomace	A. Mazurek, E. Górską, I. Pawlaczyk-Graja	poster
				Physico-chemical characteristics of pectin fractions from Flaxseed	A. Mazurek, E. Górską, I. Pawlaczyk-Graja	poster
6.	Praga, Republika Czeska	8-10.11.2023	The 19th International Conference on Polysaccharides- Glycoscience	Pectins from blackcurrant fruit pomace – extraction by natural deep eutectic solvents (NADES)	E. Górską, A. Mazurek, M. Tsirigotis-Maniecka, I. Pawlaczyk-Graja	poster
				NADES-based extraction of pectins from carrot pomace supported by ultrasound	E. Górską, A. Mazurek, M. Tsirigotis-Maniecka, I. Pawlaczyk-Graja	poster

7.	Praga, Republika Czeska	13- 15.11.2024	The 20th International Conference on Polysaccharides- Glycoscience	Choline chloride-based NADES: an efficient extraction medium for pectin isolation from fruit pomace	E. Górska , A. Mazurek- Hołys, M. Tsirigotis- Maniecka, Z. Kostalova, P. Capek, I. Pawlaczyk-Graja	ustna
				Optimization of extraction of pectins from carrot root bio- waste supported by NADES – I-optimal vs. Box-Behnken design of experiment	A. Mazurek-Hołys, E. Górska , M. Tsirigotis- Maniecka, R. Bleha, I. Pawlaczyk-Graja	ustna
8.	Budapeszt, Węgry	01- 05.06.2025	International Conference on Green & Sustainable Chemistry	Raspberry pomace as a waste with great potential – pectin extraction and its chemical characterization	E. Górska , A. Mazurek- Hołys, M. Tsirigotis- Maniecka, Z. Kostalova, P. Capek, I. Pawlaczyk-Graja	poster
				Application of NADES in UAE of pectins from carrot root pomace – optimization and chemical analysis	A. Mazurek-Hołys, E. Górska , M. Tsirigotis- Maniecka, R. Bleha, I. Pawlaczyk-Graja	ustna
9.	Gdańsk, Polska	06- 10.07.2025	The 22nd European Carbohydrate Symposium (Eurocarb 22)	Pectin from black currant pomace – extraction by NADES and chemical characterization	E. Górska , A. Mazurek- Hołys, M. Tsirigotis- Maniecka, Z. Kostalova, P. Capek, I. Pawlaczyk-Graja	poster
				Comparison of Box-Behnken and I-optimal models in optimization of NADES-based ultrasound-assisted extraction of pectins from carrot root pomace	A. Mazurek-Hołys, E. Górska , M. Tsirigotis- Maniecka, R. Bleha, I. Pawlaczyk-Graja	poster
				Extraction of polysaccharides from fruit pomace using natural deep eutectic solvent (NADES) system supported by microwaves	N. Shahid, E. Górska , S. Jarząbek, I. Pawlaczyk-Graja	poster

